

Z Katedry Chemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Irena KRZECZKOWSKA

Termiczny sposób wywoływania aminokwasów (II)

Термический метод проявления аминокислот (II)

The Thermal Method of Developing Amino-Acids (II)

W pracy opublikowanej w r. 1957 (2) podano chromatograficzną metodę termicznego wywoływania aminokwasów, w przedziale temperatur od 150°C do 220°C.

Celem niniejszych badań było ustalenie temperatur koniecznych do wywoływania poszczególnych aminokwasów metodą termiczną.

METODA BADAŃ I MATERIAŁY

Do badań używano bibuły Whatman N 3 i N 1. Chromatogramy przygotowywano metodą chromatografii krążkowej (3) oraz jednokierunkowej wstępującej (pasmowej) (1). Chromatogramy przed wywoływaniem suszono na powietrzu.

Do sporządzenia roztworów używano następujących aminokwasów:

Nazwa aminokwasu	pochodzenie aminokwasu
cystyna	Z.S.R.R.
lizyny chlorowodorek	Anglia (import)
kw. asparaginowy	„Lawson” Anglia
argininy chlorowodorek	„Chemapol” Czechosłowacja
histydyny chlorowodorek	N.R.D.
glicyna	„Labor” Wrocław
d,l-seryna	Carl Roth Karlsruhe
kw. glutaminowy	„Fluka” Szwajcaria
d,l-treonina	„B.D.H.” Anglia
β-alanina	„B.D.H.” Anglia
d,l-alanina	Merck Darmstadt
d,l-prolina	„Light” Anglia
d,l-tyrozyna	„Fluka” Szwajcaria
d,l-tryptofan	„Dembach” Niemcy
metionina	„Fluka” Szwajcaria
d,l-walina	„Schuchardt” München
d,l-norwalina	„Fluka” Szwajcaria
fenyloalanina	(bez bliższych danych)
d,l-leucyna	„B.D.H.” Anglia
izoleucyna	(bez bliższych danych)

Sporządzano roztwory o stężeniu 0,2% i nakraplano po 0,05, 0,1 i 0,15 ml.

Do rozwijania chromatogramów używano rozpuszczalnika: n-butanol — kwas octowy lod. — woda w stosunku 4:1:1.

Wywoływanie termiczne przeprowadzano w suszarkach z termoregulacją. Do odczytywania temperatury, prócz termometru umieszczonego w zwykły sposób, używano jeszcze drugiego zawieszzonego wewnątrz suszarki na poziomie odpowiadającym położeniu zawieszonych chromatogramów. Chromatogramy umieszczano w chłodnej suszarce i ogrzewano do temperatury koniecznej do wywoływania poszczególnych aminokwasów.

BADANIA WŁASNE

1. Zbadano w jakiej temperaturze pojawiają się zarysy plam widoczne tylko pod światło.

2. Określono temperatury, w których zarysy plam stają się widoczne.

3. Wyznaczono dla poszczególnych aminokwasów zakres temperatur najkorzystniejszy do ich wywoływania przy pomocy metody termicznej. Wyniki badań zebrano w tabeli 1.

Tabela 1.

Lp.	Nazwa aminokwasu	Temperatury w st. C w których		Przedział temperatur w st. C najkorzystniejszy do wywoływania termicznego poszczególnych aminokwasów
		pojawiają się plamy widoczne pod światło	pojawiają się plamy widoczne bez prześwietlania	
1	2	3	4	5
1	Cystyna	156	160	170—172
2	d,l lizyny chlorowodorek	140	160	172—175
3	Kw. asparaginowy	150	160	180—189
4	Argininy chlorowodorek	160	170	175—180
5	d,l histydyna	140	150	180—184
6	Glicyna	150	175	183—185
7	d,l seryna	140	150	178—180
8	Kw. d,l glutaminowy	140	174	185—190
9	d,l treonina	140	156	180—182
10	β-alanina	140	155	186—190
11	d,l-alanina	150	165	176—180
12	d,l prolina	150	160	180—200
13	d,l tyrozyna	140	159	167—170
14	d,l tryptofan	140	155	168—180
15	Metionina	140	180	183—185
16	Walina	140	160	198—200
17	d,l norwalina	140	155	184—185
18	Fenylalanina	150	156	170—175
19	d,l leucyna	160	180	185—195
20	Izoleucyna	140	150	193—195

Z tabeli 1 (kolumna 3) wynika, że 12 aminokwasów: lizyna, HCl histydyny, seryna, kwas glutaminowy, treonina, β -alanina, tyrozyna, tryptofan, metionina, walina, norwalina, izoleucyna, dają bardzo słabe zarysy plam już w temp. 140°C , plamy te są widoczne tylko pod światło. Pięć aminokwasów: kwas asparaginowy, glicyna, d,l-alanina, fenyloalanina i prolina dawało zarysy plam widoczne pod światło w temp. 150°C . Zarysy plam argininy, cystyny i leucyny można było obserwować dopiero w temp. 156°C — 160°C .

Najniższa temp., w której plamy stają się widoczne (bez oświetlenia) wynosi 150°C (kolumna 4).

Najkorzystniejsze warunki do termicznego wywoływania aminokwasów podano w kolumnie 5, leżą one w przedziale temperatur 167°C — 200°C . Powyżej tej temp. można uzyskać wyraźniejsze plamy, ale równocześnie bibuła stopniowo żółknie, co nie jest korzystne. Dopuszczalne jest tylko lekko żółte zabarwienie bibuły, należy zatem unikać długiego ogrzewania.



Ryc. 1. β -alanina wywoływana termicznie
 β -alanine developed thermally.

Ryc. 2. d,l-seryna wywoływana termicznie.
d,l-serine developed thermally.



Ryc. 3. β -alanina wywoływana termicznie (stężenie 3-krotnie większe niż na ryc. 1).
 β -alanine developed thermally (the concentration is three times higher than in Fig. 1).

Ryc. 4. d,l-seryna wywoływana termicznie (stężenie 3-krotnie większe niż na ryc. 2).
d,l-serine developed thermally (the concentration is three times higher than in Fig. 2).

Zauważono, że intensywność brązowego zabarwienia pojawiających się plam jest zależna od stężenia nakropionego aminokwasu. Spostrzeżenie to ilustrują ryc. 1 i 2 oraz 3 i 4.

Ilość nakropionej β -alaniny i d,l-seryny na ryc. 1 i 2 jest trzykrotnie mniejszą niż na ryc. 3 i 4. Widzimy wyraźnie większą intensywność plam na ryc. 3 i 4.

Nie sądzimy jednakże aby chromatogramy wywoływane metodą termiczną nadawały się do ilościowych oznaczeń, ponieważ dla niektórych aminokwasów zupełne wywoływanie następuje w temp. znacznie wyższej niż 200°C , a występujące wówczas żółknienie bibuły wpływa niekorzystnie na oznaczenia (badania w toku).

Wszystkie podane w tabeli 1 aminokwasy wywoływano ninhydriną i termicznie, porównując położenie plam i ich intensywność na uzyskanych chromatogramach. Na ryc. 5 i 6 widzimy norwalinę wywoływaną tymi dwiema metodami, a na ryc. 7 i 8 uzyskano chromatogramy HCl-histydydy.

Ryc. 5.



Ryc. 6.



Ryc. 5. d,l-norwalina wywoływana termicznie.
d,l-norvaline developed thermally.

Ryc. 6. d,l-norwalina wywoływana ninhydriną.
d,l-norvaline developed with ninhydrin.

Ryc. 7.



Ryc. 8.



Ryc. 7. HCl-histydydy wywoływany termicznie.
Histidine hydrochloride developed thermally.

Ryc. 8. HCl-histydydy wywoływany ninhydriną.
Histidine hydrochloride developed with ninhydrin.

Intensywność barwy przy wywoływaniu termicznym, w podanym przedziale temperatur, jest nieco mniejsza niż barw wywoływanych ninhydryną, ponieważ zupełne wywoływanie termiczne następuje w temp. powyżej 200° C. Natomiast trwałość chromatogramów aminokwasów uzyskanych metodą termiczną daje przewagę tej metodzie nad wywoływaniem ninhydryną lub innymi wywoływaczami, dzięki czemu metoda ta może znaleźć zastosowanie przy dokumentacji prac naukowych.

Nawet chromatogramy wywoływane pierwotnie ninhydryną, a których barwa po pewnym czasie, częściowo lub całkowicie znikła, dają się powtórnie wywoływać termicznie. Na ryc. 9 i 10 widzimy chromatogramy wywoływane przed rokiem, ninhydryną, a obecnie metodą termiczną. Zaznaczyć należy, że przedstawione na ryc. 9 krążki 1 i 3 (licząc od dołu) były ledwie widoczne, a 2, 4, 5 i 6 zupełnie były niewidoczne, wszystkie wystąpiły ponownie w czasie termicznego wywoływania. Na ryc. 10 natomiast przed termicznym wywoływaniem żaden krążek nie był widoczny.

Ryc. 9.



Ryc. 10.



Ryc. 9. Chromatogram wywoływany przed rokiem ninhydryną, a obecnie powtórnie termicznie.

Chromatogram developed with ninhydrin a year ago, and now developed thermally for a second time.

Ryc. 10. Chromatogram wywoływany przed rokiem ninhydryną, a obecnie powtórnie termicznie.

Chromatogram developed with ninhydrin a year ago, and now developed thermally for a second time.

Na ryc. 11, 12 i 13 pokazano mapki aminokwasów (po 4) nakropione przed rokiem i nie wywoływane, a obecnie wywołane termicznie.

Termiczne wywoływanie i utrwalanie aminokwasów nadaje się również do prac z materiałem biologicznym. Na ryc. 14 i 15 mamy chromatogramy krążkowe z materiału biologicznego (mocz patologiczny), a na ryc. 16 także chromatogram uzyskany metodą wstępującą pasmową.

Na wszystkich wyżej podanych rycinach, na których są przedstawione chromatogramy wywoływane termicznie, plamy występują w miejscu znajdującego się aminokwasu i są prawdopodobnie wynikiem rozkładu związku organicznego pod wpływem temperatury.



Ryc. 11.

Ryc. 11. Mapa aminokwasów: kw. asparaginowy, β -alanina, lizyna, histydyny chlorowodorek, wywoływanych termicznie.

A map of the following amino-acids developed thermally: asparaginic acid, β -alanine, lysine, histidine hydrochloride.

Ryc. 12.

Ryc. 12. Mapa aminokwasów: metionina, seryna, norleucyna, tryptofan, wywoływanych termicznie.

A map of the following amino-acids developed thermally: methionine, serine, norleucine and tryptophan.

Ryc. 13.

Ryc. 13. Mapa aminokwasów: cystyna, ornityna, asparagina, tyrozyna, wywoływanych termicznie.

A map of the following amino-acids developed thermally: cystine, ornithine, asparagine and tyrosine.

Ryc. 14.



Ryc. 15.



Ryc. 14. Aminokwasy w materiale biologicznym (mocz patologiczny) wywoływane termicznie.

Amino-acids developed thermally in biological material (pathological urine).

Ryc. 15. Aminokwasy w materiale biologicznym (mocz patologiczny) wywoływane termicznie.

Amino-acids developed thermally in biological material (pathological urine).

Zestawienie doświadczalnie określonych temperatur termicznego wywoływania aminokwasów z temperaturami rozkładu i topnienia nie dało dotąd podstaw do wyciągnięcia wniosków porównawczych. Plamy niektórych aminokwasów o wyższych temp. rozkładu pojawiają się

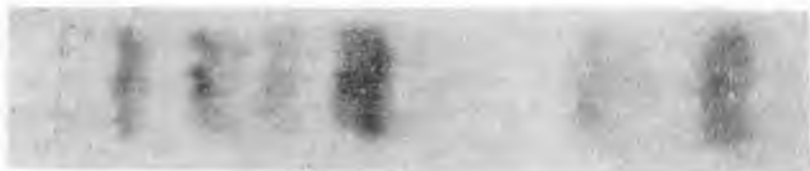


Рис. 16. Chromatogram aminokwasów w materiale biologicznym uzyskany metodą wstępującą, pasmową, wywoływany termicznie. Chromatogram of amino-acids developed thermally in biological material. The chromatogram was obtained by ascending, band chromatography.

w niższej temperaturze niż aminokwasy o niższej temp. rozkładu. Naprzykład histydyna, której temperatura rozkładu wynosi 287° C, daje plamę widoczną już w temp. 150° C, natomiast kw. d,l-glutaminowy, o temp. rozkładu 211—213° C, daje widoczne plamy dopiero w temp. 174° C.

Metodę termiczną utrwalania da się zastosować i do innych związków organicznych. Próbnе badania dały wyniki pozytywne.

P I S M I E N N I C T W O

1. Hiller E., Zinnert F., Fresse G.: *Biochem. Z.* **323**, 245—250, 1952.
2. Krzeczowska I.: *Ann. Univ. M. Curie Skłodowska, Lublin, Sec. D.* **12**, 255—257, 1957.
3. Zimmermann G. i Nehring K.: *Angew. Chem.* **63**, 556, 1951.

Р Е З Ю М Е

Метод термического проявления и фиксирования аминокислот заключается в нагревании хроматограмм, подвешенных в сушильне с термической регуляцией, вследствие чего на месте находящейся аминокислоты появляются коричневые ободки или пятна.

Автором установлены для отдельных аминокислот необходимые для термического проявления температуры, а также установлены наиболее благоприятные условия для получения отчётливых ободков и пятен (Таб. 1, рис. 1—16).

Сопоставление экспериментально установленных температур для термического проявления аминокислот с температурами их распада и плавления не дало покамест каких-либо оснований для сравнительных выводов. Пятна некоторых аминокислот с высшей температурой распада появляются при низших температурах, чем аминокислоты с высшей температурой распада. Напр. гистидин, температура распада которого составляет 287°C , дает хорошо заметное пятно уже при температуре 150°C , а d,l-глутаминовая кислота с температурой распада 211°C — 213°C дает заметное пятно лишь только при температуре 174°C .

Благодаря возможности фиксировать расположение аминокислоты, термический метод может иметь большое значение для документирования научных работ.

Термический метод может применяться и для фиксирования других органических соединений. Предварительные исследования дали удовлетворительные результаты.

ОБЪЯСНЕНИЯ К РИСУНКАМ

Рис. 1. β — аланин проявленный термически.

Рис. 2. d,l — серин проявленный термически.

Рис. 3. β — аланин проявленный термически (концентрация 3 раза больше, чем на рис. 1).

Рис. 4. d,l — серин проявленный термически (концентрация 3 раза больше, чем на рис. 2).

Рис. 5. d,l — норвалин проявленный термически.

Рис. 6. d,l — норвалин проявленный нингидрином.

Рис. 7. HCl — гистидина проявленный термически.

Рис. 8. HCl — гистидина проявленный нингидрином.

Рис. 9. Хроматограмма проявления год тому назад нингидрином, а сейчас второй раз термически.

Рис. 10. Хроматограмма проявления год тому назад нингидрином, а теперь второй раз термически.

Рис. 11. Карта аминокислот: аспарагиновая кислота, β — аланин, лизин, HCl — гистидина, проявленных термически.

Рис. 12. Карта аминокислот: метионин, серин, норлейцин, триптофан, проявленных термически.

Рис. 13. Карта аминокислот: цистин, орнитин, аспарагин, тирозин, проявленных термически.

Рис. 14. Аминокислоты в биологическом материале (патологическая моча), проявленные термически.

Рис. 15. Аминокислоты в биологическом материале (патологическая моча), проявленные термически.

Рис. 16. Хроматограмма аминокислот в биологическом материале полученная восходящим методом, проявленная термически.

SUMMARY

The thermal method of developing and fixing amino-acids consists in heating chromatograms hung in a drying oven with thermal regulation. Under these conditions, brown disks or spots appear in places containing amino-acids.

The temperature required for the thermal developing of amino-acids and the most favourable conditions for obtaining distinct disks or spots, have been determined.

No comparative conclusions can be drawn from a comparison of experimentally determined temperatures for the thermal developing of amino-acids with the temperatures for their decomposition and melting. In some amino-acids which decompose at higher temperatures spots appear at lower temperatures than in amino-acids which decompose at a lower temperature. For instance, histidine which decomposes at 287° C, gives a spot at 150° C, while d,l-glutamic acid which decomposes at 211°—213° C, gives a spot at 174° C.

The method described is important as it enables the location of amino-acids to be fixed.

The thermal method may be applied to the fixation of other organic compounds. Preliminary investigations gave positive results.

