

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Stanisław SZCZEPANIAK

**Badania nad zastosowaniem krajowych kationitów fenolosulfonowych  
w analizie ilościowej aminokwasów.  
I. Metodyka rozdzielania aminokwasów**

**Исследования возможности применения сульфифеноловых катионитов  
отечественного производства в количественном анализе аминокислот.  
I. Методика разделения аминокислот**

**Investigations on the Usefulness of Polish Phenolsulphonic Cation  
Exchange Resins for the Quantitative Analysis of Amino Acids.  
I. Separation of Amino Acids**

Syntetyczne żywice jonowymienne zostały po raz pierwszy otrzymane przez Adamsa i Holmesa w 1935 r. (1). Od tego czasu zastosowanie ich coraz bardziej rozpowszechnia się zarówno w przemyśle, jak i w pracowniach naukowych. Wśród nich niemałe znaczenie posiada rozdzielanie oraz ilościowe oznaczanie aminokwasów w materiale biologicznym. Do tych celów stosuje się powszechnie kationity polistyrenowe, natomiast żywice fenolosulfonowe są prawie zupełnie nie wykorzystane.

Kationity polistyrenowe są bardzo trudno dostępne na rynku krajowym, dlatego wydało się celowe podjęcie systematycznych badań nad możliwością stosowania krajowych kationitów fenolosulfonowych do rozdzielania i ilościowego oznaczania aminokwasów.

W r. 1951 Moore i Stein (7) jako pierwsi wykazali dużą przydatność kationitu Dowex 50 × 8 do chromatografii jonowymiennej aminokwasów. Stosowali kolumnę o wymiarach 100 × 0,9 cm, ogrzewaną wodą o temp. od 37,5°C do 75°C. Aminokwasy eluowali buforami cytrynianowymi o stopniowo wzrastającym pH (od 3,4 do 11,0). Trzy lata później (8) badacze ci ulepszyli swą metodę. Modyfikacja polegała na użyciu dłuższej kolumny (150 cm), żywicy o mniejszym stopniu usieciowania (Dowex 50 × 4), oraz zastosowaniu techniki elucyjnej o ciągle wzrastającym pH (od 3,1 do 5,1) i sile jonowej (od 0,2 do 2,0 n Na<sup>+</sup>). Jest to technika zwana elucją gradiencyjną (Gradient elution).

Systematyczne badania nad rozdzielaniem aminokwasów na żywicach polistyrenowych prowadzili nieco później Müller i Krampitz (6, 9), oraz Stegemann i współpracownicy (14, 15). Wszyscy podkreślają, że elucja gradiencyjna daje lepsze rezultaty niż technika stopniowej zmiany pH i siły jonowej. Stegemann (14) zaleca stosowanie tylko jednego buforu (pH 3,5), do którego splywa roztwór octanu sodu o stężeniu 2,5 M/l lub 4,5 M/l. Jako główną zaletę tego postępowania wymienia autor łatwość uzyskiwania wyników powtarzalnych.

Większość badaczy ustosunkowuje się krytycznie do możliwości stosowania kationitów dwufunkcyjnych w chromatografii jonowymiennej aminokwasów (2, 19). Niemniej jednak niektórzy autorzy korzystają z tych żywic w analizie aminokwasów. Tak np. Cleaver, Hardy i Cassidy (5) badali adsorpcję niektórych aminokwasów na Amberlicie IR-100 w zależności od takich parametrów jak: wysokość kolumny, wielkość ziarna, szybkość wypływu eluatu i inne. Stwierdzili oni, że kationit ten w formie wodorowej zatrzymuje wszystkie aminokwasy, a w formie sodowej i amonowej nie adsorbuje kwasu glutaminowego i aminokwasów obojętnych.

Liczne są prace Partridge'a i jego szkoły (10, 11, 12), w których używali żywicy fenolosulfonową Zeokarb 215 do rozdzielania aminokwasów w skali preparatywnej na grupy, stosując przy tym technikę wypierania (displacement chromatography). Carsten i Cannan (4) studiowali powinowactwo aminokwasów do trzech Amberlitów: IR-100, IR-120 i IRA-400 (anionit). Stwierdzili oni, że Amberlit IR-100 w porównaniu z kationitem polistyrenowym Amberlit IR-120 silniej wiąże aminokwasy o większych drobinach. Carsten (3) stosował Amberlit IR-100 do oddzielania aminokwasów od związków obojętnych w moczu. Sołowiew i współpracownicy (13) rozdzielali aminokwasy w hydrolizacie białka, stosując kolumny wypełnione różnymi żywicami typu fenolosulfonowego (MSF, Wofatyt KS, Amberlit IR-100 i inne). Elucję prowadzili amoniakiem lub rozcieńczonymi kwasami mineralnymi i stwierdzili, że tylko niektóre aminokwasy opuszczają żywicę w postaci czystych frakcji.

Powyższy przegląd najważniejszych prac, dotyczących rozdzielania aminokwasów na jonitach, pozwala zauważyć, że do tego celu w powszechnym użyciu są żywice polistyrenowe typu Dowex i Amberlit. Celem niniejszej pracy było sprawdzenie przydatności najlepszych kationitów krajowych typu fenolosulfonowego do rozdzielania aminokwasów.

## MATERIAŁY, APARATURA i METODY

1 Żywice. Z porównawczych badań nad własnościami kationitów fenolosulfonowych, przeprowadzonych poprzednio (17, 18) wynikało, że w studiach nad rozdzielaniem aminokwasów na wymienniczkach krajowych, mogą być brane pod uwagę jedynie żywice K 26 W-L i MK-2.

2 Odczynniki: 1) kwas octowy lodowaty cz. d. a. Zakłady Chemiczne Oświęcim, 2) kwas cytrynowy  $\cdot H_2O$  cz. d. a. Gliwice, 3) octan sodu  $\cdot H_2O$  cz. d. a. Gliwice, 4) tymol — pochodzenie nieznanne, 5) dwumetyloamina „Fluka” Szwajcaria, 6) n-butanol cz. d. a. „Estron” Warszawa, 7) ninhydryna cz. Politechnika Śląska Gliwice i 8) olej parafinowy.

3. Przybory i aparatura: 1) promienniki podczerwieni, 2) eksykator próżniowy, 3) urządzenie do automatycznego nanoszenia cieczy na kolumnę (16), 4) kolumna szklana z płaszczem wodnym o wymiarach  $150 \times 0,8$  cm, 5) urządzenie do elucji gradiencyjnej wg Stegemanna (14), zmodyfikowane przez autora,

6) mieszadło elektromagnetyczne firmy Friedrich Geyer, Laboratoriums Apparate Ilmenau/Thüringen, 7) kolektor frakcji firmy Elektrotechn. Rzem. Spółdz. Z. Z. i U. Poznań, 8) ultratermostat wg Höpplera i 9) manometr od fotometru płomieniowego.

4 **Metody.** Sposób postępowania przy rozdzielaniu aminokwasów był podobny do metody Stegemanna (14). W pewnych szczegółach została ona przez autora zmodyfikowana (dokładny opis zob. niżej).

## BADANIA WŁASNE

Doświadczenia wstępne wykazywały, że lepsze wyniki, jeśli chodzi o rozdział aminokwasów, uzyskuje się na kationicie K 26 W-L, jednak wymienniacz MK-2 może być również stosowany do rozdziału aminokwasów. Wszystkie czynności opisane niżej dotyczą kationitu K 26 W-L.

1. **Stosowane roztwory.** Do przeprowadzenia analizy potrzebny był 2,5 m roztwór octanu sodu oraz dwa bufor cytrynianowe o pH 2,2 i 3,5. Siła jonowa obydwu buforów równa była 0,2 n Na<sup>+</sup>. Bufor o pH 2,2 sporządzano wg Krampitza i Müllera (6), a pozostałe roztwory wg Stegemanna (14). Wszystkie roztwory konserwowano tymolem, pokrywano cienką warstwą oleju parafinowego i przechowywano w ciemnych butlach.

2. **Przygotowanie żywicy.** Surowy wymienniacz w ilości 300 g rozdrabniano w młynie kulowym i za pomocą mechanicznej wytrząsarki wyodrębniano frakcję o grubości ziaren 0,06—0,075 mm. Usunięcie drobnego pyłu i zanieczyszczeń wykonywano sposobem, podanym w poprzedniej pracy (17). Oczyszczoną żywicę zadawano w zlewce buforem cytrynianowym o pH 3,5 i zawiesinę tę pozostawiano na noc. Następnego dnia roztwór buforowy dekantowano, dodawano świeżą porcję buforu i uzyskaną zawiesinę wprowadzano do kolumny.

3. **Napełnianie kolumny.** Do kolumny wlewano około 15 ml buforu o pH 3,5, a następnie wprowadzano pierwszą porcję zawiesiny w buforze. Ziarna jonitu, które zatrzymały się na ściankach kolumny splukiwano buforem, a następnie czekali na opadnięcie żywicy. Gdy wysokość słupka żywicy już nie zmniejszała się, wówczas przystąpiono do przepychania buforu przez złożę za pomocą sprężonego powietrza. Stosowano ciśnienie 0,2 Kg/cm<sup>2</sup>, a jego wielkość kontrolowano za pomocą manometru od fotometru płomieniowego. Z chwilą, gdy złożę jonitu przestało zmniejszać swą wysokość, dodawano świeżą porcję żywicy. Dalsze czynności były takie same jak opisano wyżej. Całkowite wypełnienie kolumny jonitem było wykonywane w 10 rzutach. Gdy złożę jonitu zajmowało wysokość 150 cm, proces nanoszenia żywicy zakańczano.

4. **Nanoszenie analizowanej próbki.** Po napełnieniu kolumny jonitem, umieszczano na powierzchni złoża mały kryształek tymolu, który miał na celu zapobieganie przerastania szczytu żywicy pleśnią lub bak-

teriami. Następnie płaszcz kolumny łączono z ultratermostatem nastawionym na temperaturę 40°C. W czasie ogrzewania kolumny przepuszczano przez złożę bufor o pH 3,5. Po ustaleniu się temperatury na szczyt złoża nanoszono analizowaną mieszaninę aminokwasów. Przygotowanie próbek do naniesienia odbywało się w sposób następujący. Sporządzano po 50 ml roztworu wodnego każdego aminokwasu. W przypadku aminokwasów trudniej rozpuszczalnych w wodzie dodawano 1—3 kropel 0,2 n HCl. W objętości 50 ml roztworu znajdowały się niższe ilości poszczególnych aminokwasów. Roztwory te będą dalej nazywane podstawowymi. Celem sporządzenia syntetycznej mieszaniny aminokwasów, do kolbki miarowej na 50 ml przenoszono po 0,5 ml roztworów podstawowych, za wyjątkiem seryny, glicyny, proliny i tyrozyny, których wzięto po 1 ml. Następnie objętość kolbki uzupełniano do kreski wodą. Wszystkie roztwory wzorcowe konserwowano tymolem. Z mieszaniny syntetycznej pobierano 2 ml roztworu aminokwasów i rozcieńczano je do 6 ml buforem o pH 2,2. Na szczyt wilgotnego złoża w kolumnie nanoszono 3 ml tej mieszaniny (3 razy po 1 ml). Ilości poszczególnych aminokwasów naniesionych na kolumnę podane są w tab. 2. Szybkość wyciekania eluatu w czasie nanoszenia próbki wynosiła 1,5 ml na godz. Po naniesieniu roztworu aminokwasów szczyt kolumny przemywano buforem o pH 2,2 (3 razy po 1 ml).

Tab. 1. Ilości aminokwasów, znajdujące się w 50 ml mieszaniny syntetycznej  
Quantities of amino acids present in 50 ml of a synthetic mixture

Lp.	Aminokwas	mg	Lp.	Aminokwas	mg
1	Kwas asparaginowy	707,5	10	Metionina	195,0
2	Treonina	460,0	11	Leucyna	720,0
3	Seryna	292,5	12	Izoleucyna	360,0
4	Prolina	345,0	13	Tyrozyna	293,5
5	Cystyna	340,0	14	Fenylalanina	430,0
6	Glicyna	125,0	15	Histydyny · HCl	272,0
7	Alanina	386,0	16	Lizyny · HCl	952,0
8	Kwas glutaminowy	964,0	17	Argininy · HCl	423,0
9	Walina	391,0			

5. **Elucja gradiencyjna.** Elucję aminokwasów z kolumny prowadzono w sposób podobny do metody *Stegemanna* (14). Stosowano jednak inne temperatury i zmodyfikowano aparaturę do elucji gradiencyjnej (ryc. 1). Aparatura ta składała się z następujących części: 1) urządzenie do automatycznego dozowania cieczy, 2) rozdzielacz z nałożonym na wylotową

rukę węzłem kauczukowym ze ściskaczem śrubowym (w przewodzie gumowym tkwiła rurka szklana wyciągnięta w kapilarę), 3) butla litrowa z bocznym tubusem i 4) mieszadło elektromagnetyczne.

Do butli z tubusem wlewano 500 ml buforu o pH 3,5 i umocowywano ją przy kolumnie na takiej wysokości, by poziom buforu znajdował się około 3 cm niżej niż wierzchołek kolumny. Pod butlą z buforem umocowywano mieszadło elektromagnetyczne, a do wnętrza butli wprowadzano wylot rurki szklanej, kapilarnie wyciągniętej, połączonej z rozdzielaczem za pomocą kauczukowego przewodu. Nad rozdzielaczem przy mocowywano urządzenie do samoczynnego dozowania cieczy. Dwie rurki szklane, wychodzące z kolby odwróconej do góry dnem tkwiły w rozdzielaczu. W kolbie tej znajdowało się 900 ml 2,5 m roztworu octanu sodu.

Tab. 2. Ilości  $\mu\text{M}$  poszczególnych aminokwasów naniesionych na kolumnę  
Quantities of particular amino acids (in  $\mu\text{M}$ ), added to the surface of the column

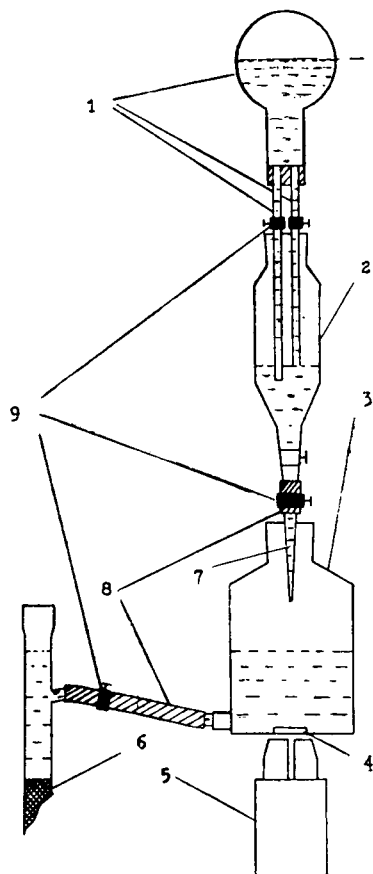
Lp.	Aminokwas	$\mu\text{M}$	Lp.	Aminokwas	$\mu\text{M}$
1	Kwas asparaginowy	2,126	10	Metionina	0,261
2	Treonina	0,772	11	Leucyna	1,096
3	Seryna	1,113	12	Izoleucyna	0,548
4	Prolina	1,190	13	Tyrozyna	0,648
5	Cystyna	0,283	14	Fenylalanina	0,520
6	Glicyna	0,665	15	Histydyna	0,236
7	Alanina	0,866	16	Lizyna	1,040
8	Kwas glutaminowy	1,310	17	Arginina	0,400
9	Walina	0,667			

Po naniesieniu analizowanej próbki i przemyciu szczytu żywicy buforem o pH 2,2, umieszczano kolumnę nad kolektorem frakcji i na wierzchołek złożyła nanoszono 20 ml buforu o pH 3,5. Następnie butelkę z tubusem łączono z bocznym wylotem kolumny za pomocą węża kauczukowego i odkręcano znajdujący się na nim ściskacz. Szybkość wyciekania eluatu zwiększano teraz do 3 ml/godz. Odkręcano również ściskacze na urządzeniu samoczynnie dozującym do rozdzielacza 2,5 m roztwór octanu sodu. Szybkość wkraplania tej cieczy do buforu regulowano ściskaczem w taki sposób, by była ona równa prędkości wyciekania eluatu, tzn. 3 ml/godz. Po tych czynnościach puszczano w ruch mieszadło elektromagnetyczne i od tego momentu elucja odbywała się samoczynnie. Frakcje jednomililitrowe zbierano w probówkach stożkowych z kołnierzem i ze skalą do 10 ml. Do chwili pojawienia się w wycieku cystyny elucję prowadzono w temperaturze  $40^{\circ}\text{C}$ , a później temperaturę zwiększono.

szone do 50°C. Szybkość wyciekania eluatu w temperaturze 50°C zwiększyła się do 4 ml/godz., a w temp. 70°C do 6 ml/godz. Elucję zakończono po 10 dobach. Przy szybszym przepływie buforu rozdział aminokwasów był niezadowolający, szczególnie jeśli chodzi o aminokwasy desorbujące się łatwiej. Całkowita objętość wycieku wynosiła 800 ml. Po skończonej elucji kolumnę regenerowano 4 n HCl i przemywano wodą do wycieku obojętnego. Następnie na noc nanoszono około 300 ml buforu o pH 3,5 i na drugi dzień kolumna była gotowa do ponownego użycia.

Ryc. 1. Aparatura do elucji gradientyjnej; 1 — urządzenie samoczynnie dozujące 2,5 m roztwór octanu sodu, 2 — rozdzielacz z 2,5 m octanem sodu, 3 — flaszka z tubusem zawierająca bufor cytrynianowy o pH 3,5, 4 — sztabka magnetyczna, 5 — mieszadło elektromagnetyczne, 6 — złoże żywicy w kolumnie, 7 — rurka szklana kapilarnie wyciągnięta, 8 — przewody kauczukowe, 9 — ściskacze śrubowe

Apparatus for gradient elution; 1 — apparatus for the automatic dosage of 2.5 m. sodium acetate solution, 2 — separatory funnel containing 2.5 m sodium acetate solution, 3 — bottle with tabulature containing citrate buffer solution of pH 3.5, 4 — small magnetic bar, 5 — magnetic bar stirrer, 6 — bed of the resin in the column, 7 — glass capillary tube, 8 — rubber tubes, 9 — clumps



**6. Identyfikacja aminokwasów.** Kolejność wychodzenia aminokwasów z kolumny sprawdzano za pomocą rozdzielczej chromatografii na bibule, stosując technikę wstępującą. Najpierw za pomocą reakcji ninhydrynowej, przeprowadzanej na bibule stwierdzano w których frakcjach wycieku znajdują się wyelutowane aminokwasy. Następnie frakcje wycieku należące do danego wierzchołka łączono razem i odsalano na ko-

lumnie z kationitem MK-2. Aminokwasy zatrzymane na żywicy eluowano 2 n NH<sub>3</sub> z dodatkiem 5% dwumetyloaminy. Amoniak i aminę odparowywano pod promiennikami, a wilgotną pozostałość suszono w eksykatorze próżniowym. Aminokwasy odsolone oraz pozbawione amoniaku i aminy наносzono na bibułę Whatman nr 3. Do rozwijania chromatogramu stosowano mieszaninę n-butanol — kwas octowy—woda w stosunku objętościowym 4:1:1. W tym układzie rozpuszczalników, po dwukrotnym przepuszczeniu ich przez bibułę, rozdzielały się wystarczająco wszystkie aminokwasy z wyjątkiem seryny i glicyny, kwasu glutaminowego i treoniny oraz leucyny i izoleucyny. Celem zidentyfikowania tych aminokwasów rechromatografowano plamy odpowiadające tym parom metodą krążkową, stosując układy: n-butanol — aceton — woda w stosunku 2:2:1 dla pierwszej pary, n-butanol — etanol — woda (4:1:1) dla drugiej i n-butanol — kwas octowy — woda (4:1:5) dla trzeciej. Otrzymane wyniki zestawiono w tab. 3. Z tabeli widać, że niektóre aminokwasy, a w szczególności izomeryczne, aromatyczne i zasadowe ulegały niecałkowitemu rozdzieleniu.

Tab. 3. Kolejność wychodzenia aminokwasów z kolumny  
Succession of emergence of amino acids on the column

Lp.	Aminokwas	Lp.	Aminokwas
1	Kwas asparaginowy	8	Walina
2	Treonina	9	Metionina
3	Seryna	10	Leucyna — Izoleucyna
4	Prolina	11	Tyrozyna — Fenyloalanina
5	Cystyna	12	Histydyna — Lizyna
6	Glicyna — alanina	13	Arginina
7	Kwas glutaminowy		

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Przeprowadzone próby wykazały, że na zdolność rozdzielczą kolumny wypełnionej kationitem fenolosulfonowym istotny wpływ posiada wiele czynników. Jednym z nich jest stopień rozdrobnienia żywicy. Początkowo próbowano rozdzielać aminokwasy, stosując ziarno o przeciętnej średnicy 0,075—0,088 mm. Osiągane rezultaty były niezadowalające. Rozdrobnienie jonitu winno być możliwie największe, jednak bardzo drobny pył jest również nieodpowiedni ze względu na to, że zatyka kolumnę i ciecz nie przechodzi przez złożo.

Stopień pęcznienia żywicy ma również duży wpływ na jakość rozdziału. Kationit o małym współczynniku pęcznienia (MK-3) wykazał zupełną nieprzydatność do jonowymiennej chromatografii aminokwasów. Stosowanie żywic zbyt silnie pęczniejących jest również niewskazane ze względu na skłonność złoża do „osiadania” w czasie zwiększania się siły jonowej przepływającego buforu. Żywica K 26 W-L nie ulegała kurczeniu w czasie elucji aminokwasów, jedynie w czasie regeneracji 4 n HCl nieznacznie zmniejszała swą objętość.

Kolumna musi być dostatecznie wysoka. Początkowo próbowano rozdzielać aminokwasy na kolumnie o długości 100 cm i średnicy 0,9 cm, podobnej do tej jaką stosowali Moore i Stein (7). Pozytywnych wyników nie otrzymywano. Jest rzeczą zrozumiałą, że im dłuższa kolumna, tym zdolność rozdzielcza powinna być większa. Jednak stosowanie zbyt wysokich złóż przy tak drobnym ziarnie jest niewskazane ze względu na możliwość zatykania się kolumny w czasie pracy. Upakowanie kolumny jonitem powinno być szczególnie staranne. Chodzi o to, żeby nie nanosić zbyt szybko kolejnych porcji żywicy, jak również, żeby były one możliwie niewielkie. W przypadku nieprzestrzegania tych wskazań, tworzą się w kolumnie „strefy rozrzedzenia”, zakłócające reakcję wymiany jonów.

Sposób elucji i technika jej prowadzenia odgrywa, jak się wydaje, najważniejszą rolę w procesie rozdzielania aminokwasów na żywicach fenolosulfonowych. Dużo doświadczeń wykonywano stosując technikę elucji stopniowej wg Moore i Steina (7). Okazało się, że dla żywic fenolosulfonowych jest ona nieprzydatna. Większość aminokwasów łatwiej resorbujących się wyciekała z kolumny razem. Również powtarzalność wyników jest w tej metodzie trudna do osiągnięcia. Stegemann (14) podkreśla dużą trudność w dokładnym uchwyceniu czasu zmiany buforu w technice elucji stopniowej. Metoda elucji gradiencyjnej jest bardzo zalecana przez wielu autorów (6, 14, 20) do rozdzielania aminokwasów na żywicach polistyrenowych. Również w przypadku kationitów fenolosulfonowych technika ta dała lepsze rezultaty. Jako szczególnie proste wybrano postępowanie wg Stegemanna (14). Autor ten podaje dwa warianty swej metody. W pierwszym przypadku stosuje kombinację: bufor o pH 3,5 oraz 4,5 m roztwór octanu sodu, a w drugim postępowaniu do tego samego buforu wkrapla octan sodu o stężeniu 2,5 M/l. W przypadku kationitów fenolosulfonowych sposób drugi okazał się przydatniejszy. Wydaje się, że w sposobie pierwszym, zmiana pH i siły jonowej buforu następowała zbyt szybko, co prawdopodobnie było przyczyną łącznego opuszczania żywicy przez aminokwasy desorbujące się łatwiej. Bardzo ważną rzeczą w metodzie elucji gradiencyjnej jest utrzymywanie jednakowego tempa wkraplania roztworu soli do buforu. W li-



teraturze można spotkać różne sposoby rozwiązania tego problemu (6, 14). W naszej pracy wykorzystano do tego celu urządzenie własnego pomysłu, samoczynnie dozujące ciecz, opisane poprzednio (16).

Prowadzenie elucji w temperaturze podwyższonej jest rzeczą konieczną. Wydaje się, że rozwijanie chromatogramu w temp. wyższej od 70°C mogłoby poprawić wyniki. Jednak stosowanie tak wysokiej temperatury najprawdopodobniej spowodowałoby zniszczenie wewnętrznej struktury jonitu.

Poza sposobem elucji przedstawionym wyżej przeprowadzono uprzednio szereg doświadczeń z innymi układami elucyjnymi, zmieniając wszędzie gradient stężenia w sposób ciągły. Były to następujące układy: 1 n HCl — 4 n HCl; 5 % CH<sub>3</sub>COOH — 80% CH<sub>3</sub>COOH; woda — 20% etanol i bufony cytrynianowe o pH 3,1 i 5,1. Osiągane rezultaty były niezadowolające.

Ariginę próbowano eluować 0,2 n NH<sub>3</sub>, oraz 0,2 n NaOH. Odzysk był lepszy, lecz sposób ten był praktycznie nie do przyjęcia ze względu na silną adsorpcję tych związków na wymienniczkach fenolosulfonowych. Kolumnę trzeba było kilka dni przemywać wodą, zanim wyciek stał się obojętny.

Pani Doc. Dr Irenie Krzeczkovskiej, Kierownikowi Katedry Chemii Ogólnej, Wydz. Lek. Akademii Medycznej w Lublinie, wyrażam gorącą wdzięczność za wnikliwą dyskusję niniejszego tematu oraz troskliwą opiekę w czasie wykonywania pracy.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Adams B. A., Holmes E. L.: J. Soc. Ind., 54, 1, 1935.
2. Calmon C., Kressman T. R. E.: Ion Exchangers in Organic and Biochemistry. Interscience Publisher, New York 1957, s. 257.
3. Carsten M. E.: J. Am. Chem. Soc., 74, 5954—5959, 1952.
4. Carsten M. E., Cannan R. K.: J. Am. Chem. Soc., 74, 5950—5954, 1952.
5. Cleaver Ch. S., Hardy R. A., Cassidy H. G.: J. Am. Chem. Soc., 67, 1343—1353, 1945.
6. Krampitz G., Müller R.: Z. f. Tierphysiol. Tierernähr. und Futtermittelkunde, 13, 114—128, 1958.
7. Moore S., Stein W. H.: J. Biol. Chem., 192, 663—681, 1951.
8. Moore S., Stein W. H.: J. Biol. Chem., 211, 893—909, 1954.
9. Müller R., Krampitz G.: Z. f. Tierernähr. und Futtermittelkunde, 11, 44—54, 1956.
10. Partridge S. M., Westall R. G.: Biochem. J., 44, 418—428, 1949.
11. Partridge S. M., Brimley R. C., Pepper K. W.: Biochem. J., 46, 334—340, 1950.
12. Partridge S. M., Brimley R. C.: Biochem. J., 51, 618—639, 1952.
13. Соłovev i inni: Teoriya i praktika primienienija jonoobmiennych matieriałow. M. Akad. Nauk SSSR, 1955, 135—140.

14. Stegemann H.: Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem., **319**, 87—101, 1960.
15. Stegemann H., Bernhard G.: Mikrochim. Acta, **4**, 555—564, 1961.
16. Szczepaniak St.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, **16**, 263—273, 1961.
17. Szczepaniak St.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, **17**, 13—24, 1962.
18. Szczepaniak St.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, **17**, 43—53, 1962.
19. Turba F.: Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie. Springer-Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg 1954, 125.
20. Williams R. J. P.: Analyst, **77**, 905—913, 1952.

Pracę otrzymano 13 II 1965.

## РЕЗЮМЕ

Проведены исследования по установлению пригодности лучших отечественных катионитов (К 26W-L и МК-2) для разделения аминокислот. Наилучшие разделительные способности отмечены у катионита К 26 W-L.

Применялись различные системы и способы элюирования. Лучшие результаты были получены при помощи градиентного элюирования с применением системы: 0,2 n Na<sup>+</sup> лимоннокислой буферной смеси рН 3,5 и 2,5 m раствора уксуснокислого натрия.

В процессе элюирования изменялась температура в пределах 40—70°C.

Получено разделение всех обычных аминокислот, за исключением пар: глицин — аланин, лейцин — изолейцин, тирозин — фенилаланин и гистидин — лизин, которые не совсем разделялись.

Автором описана модификация аппаратуры для градиентного элюирования с применением прибора собственной конструкции, обеспечивающего автоматическое введение жидкости на колонку.

Табл. 1. Количества аминокислот, которые находились в 50 ml синтетической смеси.

Табл. 2. Количества  $\mu\text{M}$  отдельных аминокислот, которые были нанесены на колонку.

Табл. 3. Последовательность выхождения аминокислот из колонки.

Рис. 1. Аппаратура для градиентного элюирования. 1 — прибор обеспечивающий автоматическое нанесение 2,5 m раствора уксуснокислого натрия, 2 — делительная воронка с 2,5 m раствором уксуснокислого натрия, 3 — бутылка с тубусом, содержащая лимоннокислую буферную смесь рН 3,5, 4 — небольшой магнитный слиток, 5 — магнитная мешалка, 6 — слой смолы в колонке, 7 — стеклянная трубка в виде капилляра, 8 — каучуковые трубки, 9 — винтовые зажимы.

## SUMMARY

The paper describes investigations on the usefulness of the best Polish cation exchange resins (K 26 W-L and MK-2). Cation exchange resin K 26 W-L showed a higher resolving power in comparison with MK-2. Different systems and methods of elution were applied. The best results were obtained with gradient elution by using the system: 0.2 n Na citrate buffer, pH 3.5, and 2.5 m sodium acetate solution. During the separation temperature gradually increased from 40 to 70°C. The resolution proved satisfactory for all common acids except for the following pairs: glycine-alanine, leucine-isoleucine, tyrosine-phenylalanine, and histidine-lysine. With the above-mentioned compounds the resolution was found incomplete. The paper gives the description of the apparatus for gradient solution, developed by the author, with the arrangement for automatic dosage of liquids.

