

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr habil. Stanisław Biliński

Jerzy ISKIERKO, Andrzej GÓRSKI,
Małgorzata KACZOROWSKA

**Przydatność jonów niektórych metali dwuwartościowych
jako kompleksorów dwuketo-hydrindylideno-dwuketohydrindaminy
w analizie ilościowej aminokwasów**

Пригодность ионов некоторых металлов, образующих комплексы
с diketо-гидриндилидено-дикетогидринзамидом, для количественного анализа
аминокислот

The Suitability of Ions of some Divalent Metals Forming Complexes with Diketo-hydrindylideno-diketohydrindamine for the Quantitative Analysis of Aminoacids

Ninhydryna z aminokwasami za wyjątkiem proliny i hydroksyproliny tworzy anion o barwie fioletowo-niebieskiej dwuketohydrindylideno-dwuketohydrindaminę, w skrócie zwaną „Dyda” (1, 2, 3). Mayer (4) wykazał ściśle liniową zależność ekstynkcji „Dyda” od stężenia aminokwasów w zakresie 0,5—6 gamma azotu alfa-aminowego. Wg wyżej cytowanego autora tylko 70% azotu aminowego, fenyloalaniny, tyrozyny i tryptofanu przekształcone jest w tak zwaną „Dyda”. Yemm i Cocking wykazali dla reakcji ninhydrynowej szeregu aminokwasów jednakową liniową zależność ekstynkcji od stężenia (5). Reakcja aminokwasów z ninhydryną została wykorzystana do ilościowego kolorymetrycznego oznaczania aminokwasów rozdzielonych chromatograficznie na bibule (6, 7, 8). Barwny produkt reakcji ninhydryny z aminokwasami jest nietrwały i szybko następuje znikanie plam aminokwasów z bibuły (9, 10). Wieland i Kawerau wprowadzili do utrwalenia „Dyda” na bibule jony niektórych metali dwuwartościowych (11). Jony te dają z dwuketo-hydrindylideno-dwuketohydrindaminą różowo-czerwone kompleksy. Wymienieni badacze twierdzą, że jeden gramojon metalu jest związany koordynacyjnie przez azoty dwóch cząsteczek „Dyda”.

W piśmiennictwie dotyczącym omawianego zagadnienia istnieją rozbieżności w ocenie przydatności różnych jonów metali jako kompleksorów „Dyda”. Fischer i Dörfel (12) oraz Giri (13) i inni badacze (14) stosowali do kompleksowania „Dyda” jony miedziowe. Barroulier (15) stosował do tego celu jony kadmu, dowodząc ich wyższości nad jonami miedziowymi. Celem przedstawionej pracy

były badania porównawcze przydatności jonów Cu^{++} , Cd^{++} , Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} i Hg^{++} jako kompleksorów „Dyda” w metodzie ilościowego oznaczania aminokwasów rozdzielonych chromatograficznie na bibule.

Badania przeprowadzono na różnych aminokwasach, to jest alaninie, leucynie, walinie i serynie. Określono zależność ekstynkcji barwnych kompleksów „Dyda” z poszczególnymi jonami metali od stężenia różnych aminokwasów. Porównano wielkość ekstynkcji kompleksów „Dyda” dla takich samych stężeń danego aminokwasu przy użyciu różnych kompleksów. Zbadano także trwałość kompleksów „Dyda” z różnymi jonami metali oraz zależność wielkości powierzchni plam kompleksów „Dyda” na bibule z jonami sześciu metali od logarytmu stężenia aminokwasów.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Odczynniki i aparatura

0,01 M wzorcowe wodne roztwory alaniny, leucyny, waliny, seryny i kwasu glutaminowego. Stosowane aminokwasy były produkcji Nutritional Biochemicals Corporation Cleveland Ohio USA.

Acetonowe 0,003 M roztwory $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ i $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, 0,25% acetonowy roztwór ninhydryny n-butanol, lodowaty kwas octowy i metanol. Odczynniki te były produkcji krajowej.

Bibuła chromatograficzna Whatman nr 3. Kamery do chromatografii wstępującej o wymiarach 50×20 cm. Fotokolorometr „Specol” — Carl Zeiss Jena NRD.

Chromatograficzny rozdział aminokwasów na bibule

Aminokwasy rozdzielano metodą chromatografii bibulowej wstępującej, układ rozpuszczalników n-butanol — kwas octowy — woda w stosunkach objętościowych 4:1:1. Na arkusze bibuły Whatman nr 3 o wymiarach 49×29 nanoszono kalibrowaną mikropipetką pasmowo w odstępach 3 cm 0,05, 0,1, 0,15, 0,20 i 0,25 mikromola każdego z pięciu użytych do badań aminokwasów. Po naniesieniu wzorcowych roztworów aminokwasów bibulę suszono strumieniem ciepłego powietrza. Chromatogramy rozwijano około 44—46 godzin dwukrotnie. Po każdym rozwinięciu chromatogram był suszony w temperaturze pokojowej do momentu całkowitego odparowania rozpuszczalników z bibuły. Wysuszone chromatogramy wywoływano przez zanurzenie w 0,25% acetonowym roztworze ninhydryny i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 24 godziny. Po tym okresie czasu uzyskiwano na bibule maksymalną intensywność barwy plam „Dyda”.

Kompleksowanie „Dyda”

Wywołane ninhydriną chromatogramy każdego aminokwasu w zakresie stężeń 0,05—0,25 mikromola kompleksowano przez zanurzenie do 0,003 M acetonowych roztworów jonów Cd^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} , Hg^{++} , Co^{++} i Ni^{++} . Po skompleksowaniu chromatogramy suszono w temp. pokojowej 24 godziny. W tym czasie fioletowo-niebieskie plamy „Dyda” z jonami poszczególnych metali przechodziły w różowo-czerwone kompleksy.

Pomiar powierzchni plam i ekstynkcji wyeluowanych z bibuły kompleksów „Dyda” z jonami różnych metali

Kompleksy na bibule dokładnie obrysowywano i trzykrotnie mierzono planimetrycznie powierzchnię każdej z plam, przyjmując średnią arytmetyczną z trzech pomiarów. Plamy kompleksów wycinano z bibuły i po pocięciu nożyczkami na małe paski o szerokości około 0,2 cm eluowano w probówkach 70% metanolem. Eluowanie przeprowadzano 15 ml 70% metanolu przez wytrząsanie w ciągu jednej godziny. Eluaty kompleksów „Dyda” z jonami Cu^{++} , Cd^{++} i Hg^{++} posiadały w 70% metanolu barwę różowo-czerwoną, natomiast kompleksy z jonami Co^{++} , Ni^{++} i Zn^{++} zmieniały swą barwę w porównaniu do posiadanej na bibule. Barwa ich w roztworze 70% metanolu zmieniała się na kolor fiołkowy, lub lilaróż. Z tych względów do pomiarów ekstynkcji kompleksów zastosowano różne długości fal. Ekstynkcje kompleksów „Dyda” z jonami Cu^{++} , Cd^{++} i Hg^{++} mierzono przy długości fali 510 milimikronów, a kompleksy z jonami Co^{++} , Ni^{++} i Zn^{++} przy długości fali 580 milimikronów.

Badanie trwałości kompleksów „Dyda” z jonami różnych metali

Trwałość kompleksów „Dyda” z jonami Cd^{++} , Cu^{++} , Hg^{++} , Zn^{++} , Co^{++} i Ni^{++} określano na podstawie zmniejszania się ekstynkcji eluatów w czasie. Dokonano pomiarów ekstynkcji bezpośrednio po elucji, a następnie po 24, 48, 72 i 96 godzinach.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Tab. 1 przedstawia wielkość ekstynkcji eluatów kompleksów „Dyda” ala, ser, wal i leu z jonami Cd^{++} , Cu^{++} , Hg^{++} , Co^{++} , Ni^{++} i Zn^{++} dla jednakowych stężeń poszczególnych aminokwasów.

Tab. 1. Wielkość ekstynkcji eluatów kompleksów „Dyda” z jonami
The extinction value of eluates of "Dyda" complexes with different

Lp.	Aminokwas	Jon metalu	E×1000	Jon metalu	E×1000	Jon metalu
1.	ala	Cd ⁺⁺	400	Cu ⁺⁺	280	Hg ⁺⁺
2.	ser	Cd ⁺⁺	350	Cu ⁺⁺	250	Hg ⁺⁺
3.	wal	Cd ⁺⁺	390	Cu ⁺⁺	270	Hg ⁺⁺
4.	leu	Cd ⁺⁺	310	Cu ⁺⁺	295	Hg ⁺⁺

Ekstynkcję kompleksów „Dyda” z jonami Cd⁺⁺, Cu⁺⁺ i Hg⁺⁺ mierzono przy optymalnej długości
The extinction of "Dyda" complexes with ions Cd⁺⁺, Cu⁺⁺ and Hg⁺⁺ was
Zn⁺⁺ ions at $\lambda=580$ m μ (alanine),

W tab. 2 zobrazowano zależność wielkości powierzchni płam kompleksów „Dyda” ala, ser, wal, i leu z jonami Cd⁺⁺, Cu⁺⁺, Hg⁺⁺, Co⁺⁺, Ni⁺⁺ i Zn⁺⁺ od stężenia wymienionych aminokwasów.

Ryc. 1, 2, 3 i 4 obrazują zależność wielkości ekstynkcji eluatów kompleksów „Dyda” ala, ser, wal i leu z jonami Cd⁺⁺, Hg⁺⁺, Cu⁺⁺, Co⁺⁺, Ni⁺⁺ i Zn⁺⁺ od stężenia wymienionych aminokwasów. Na ryc. 5, 6, 7 i 8 przedstawiono spadek ekstynkcji kompleksów „Dyda” ala, ser, wal i leu z jonami Cd⁺⁺, Cu⁺⁺, Hg⁺⁺, Co⁺⁺, Ni⁺⁺ i Zn⁺⁺ w czasie od 24—96 godzin.

Z przedstawionych danych wynika, że przy analogicznych stężeniach poszczególnych aminokwasów najwyższą ekstynkcję uzyskano dla kompleksów „Dyda” z jonami kadmu, a następnie miedzi. Jony kobaltu i niklu w przybliżeniu wykazują jednakowe wielkości ekstynkcji jednakże mniejsze od kadmu i miedzi. Trzecie miejsce po miedzi zajmują jony rtęciowe, natomiast najmniejszą ekstynkcję zaobserwowano u eluatów kompleksów „Dyda” z jonami cynkowymi. Stosując jako kompleksory „Dyda” alaniny, seryny, waliny i leucyny jony Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Zn⁺⁺, Cd⁺⁺, Cu⁺⁺ i Hg⁺⁺ uzyskano zadawalającą zależność wielkości ekstynkcji od wzrostu stężenia wymienionych aminokwasów. Najkorzystniejszą, najbardziej proporcjonalną zależność uzyskano dla kompleksów z jonami kadmu i miedzi. Dobre wyniki zaobserwowano przy kompleksowaniu „Dyda” jonami kobaltu i niklu, natomiast mniej korzystne rezultaty dawały kompleksy z jonami rtęciowymi i cynkowymi. Omawiane wy-

różnych metali dla jednakowych stężeń 0,2 mikromola ala, ser, wal i leu
 metal ions for the same concentrations 0.2 ala, ser, wal and leu

E×1000	Jon metalu	E×1000	Jon metalu	E×1000	Jon metalu	E×1000
150	Co ⁺⁺	190	Ni ⁺⁺	210	Zn ⁺⁺	160
175	Co ⁺⁺	120	Ni ⁺⁺	175	Zn ⁺⁺	135
160	Co ⁺⁺	110	Ni ⁺⁺	160	Zn ⁺⁺	140
130	Co ⁺⁺	150	Ni ⁺⁺	170	Zn ⁺⁺	130

optymalnej długości fali 510 milimikronów, a z jonami Co⁺⁺, Ni⁺⁺ i Zn⁺⁺ przy fali 580 milimikronów.

determined at the optimum wave length $\lambda=510$ m μ and with Co⁺⁺, Ni⁺⁺ and (serine), (valine), (leucine).

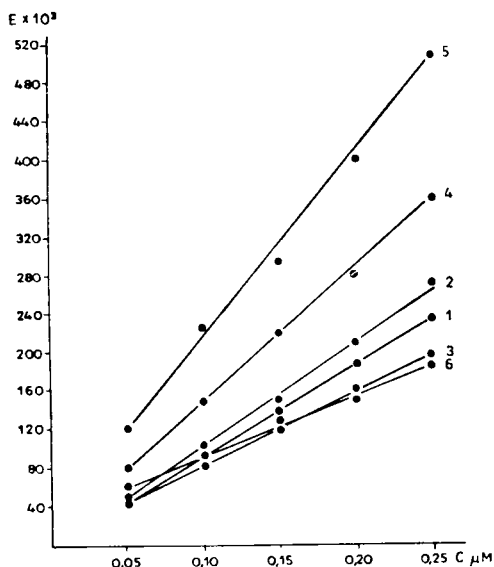
niki dotyczą tylko stężeń w zakresie od 0,05 do 0,25 mikromola każdego z czterech analizowanych aminokwasów.

Badania trwałości eluatów kompleksów „Dyda” z jonami poszczególnych metali w 70% metanolu dowodzą dużej ich trwałości. Po 24 godzinach ekstynkcja kompleksów „Dyda” z jonami sześciu wymienionych metali nie ulega zmianie. Spadek ekstynkcji następuje b. powoli po 48 godzinach. Największą trwałość wykazują kompleksy „Dyda” z jonami kadmu, które po 96 godzinach wykazują niewielki spadek ekstynkcji.

Planimetryczne pomiary na bibule powierzchni plam kompleksów „Dyda” alaniny, seryny, waliny i leucyny z jonami różnych metali w większości przypadków wykazały w przybliżeniu prostolinijną zależność wielkości powierzchni od stężenia aminokwasu. Zależność ta występowała tylko w zakresie stężeń od 0,05—0,2 mikromola naniesionego na bibułę aminokwasu. Uzyskane wyniki dowodzą, że jony kadmu, miedzi, rtęci, kobaltu, niklu i cynku jako kompleksory „Dyda” są przydatne do kolorymetrycznej analizy ilościowej aminokwasów. Jony te tworzą trwałe kompleksy dobrze eluuujące się 70% metanolem. Ze względu na zmianę barwy kompleksów „Dyda” z jonami Co⁺⁺, Ni⁺⁺ i Zn⁺⁺ po ich wyeluowaniu z bibuły 70% metanolem pomiar ich ekstynkcji należy przeprowadzić przy innej długości fali niż kompleksów z pozostałymi metalami. Optymalna długość fali dla tych pomiarów wynosi 580 milimikronów. Spośród przebadanych metali najkorzystniejszym kompleksorem „Dyda” wydają się jony Cd⁺⁺, następnie Cu⁺⁺ oraz Co⁺⁺ i Ni⁺⁺.

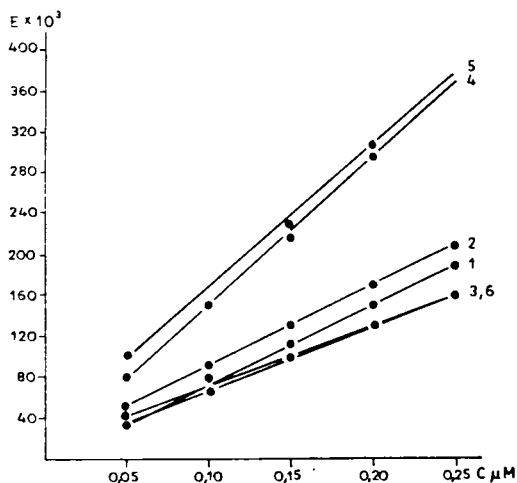
Tab. 2. Zależność wielkości powierzchni plam kompleksów „Dyda” z jonami różnych metali od stężenia poszczególnych aminokwasów
 Relation between the surface of spots of "Dyda" complexes with different metal ions and the concentration of particular aminoacids

Stężenie amino- kwasu	Jon kom- pleksujący	Powierzchnia plam w mm ²			
		leu	wal	ala	ser
μM					
0,05	Cd ⁺⁺	690	810	820	830
0,10	Cd ⁺⁺	995	1020	990	990
0,15	Cd ⁺⁺	1180	1140	1130	1090
0,20	Cd ⁺⁺	1180	1270	1500	1010
0,25	Cd ⁺⁺	1370	1510	1420	1270
0,05	Cu ⁺⁺	950	nie oznaczano	790	680
0,10	Cu ⁺⁺	1030	nie oznaczano	1000	840
0,15	Cu ⁺⁺	1060	nie oznaczano	1020	990
0,20	Cu ⁺⁺	1490	nie oznaczano	1200	1010
0,25	Cu ⁺⁺	1550	nie oznaczano	1200	1110
0,05	Zn ⁺⁺	470	450	560	390
0,10	Zn ⁺⁺	680	740	820	540
0,15	Zn ⁺⁺	820	860	910	650
0,20	Zn ⁺⁺	990	950	1070	720
0,25	Zn ⁺⁺	1080	1040	1150	810
0,05	Co ⁺⁺	1190	750	700	390
0,10	Co ⁺⁺	1200	830	850	560
0,15	Co ⁺⁺	1280	910	1000	770
0,20	Co ⁺⁺	1280	1200	1000	880
0,25	Co ⁺⁺	1310	1480	1230	940
0,05	Ni ⁺⁺	860	560	690	550
0,10	Ni ⁺⁺	1020	730	1100	600
0,15	Ni ⁺⁺	1080	890	1200	810
0,20	Ni ⁺⁺	1080	1100	1240	1050
0,25	Ni ⁺⁺	1230	1230	1200	1055
0,05	Hg ⁺⁺	880	nie oznaczano	800	nie oznaczano
0,10	Hg ⁺⁺	1170	nie oznaczano	1200	nie oznaczano
0,15	Hg ⁺⁺	1230	nie oznaczano	1250	nie oznaczano
0,20	Hg ⁺⁺	1230	nie oznaczano	1250	nie oznaczano
0,25	Hg ⁺⁺	1100	nie oznaczano	1550	nie oznaczano



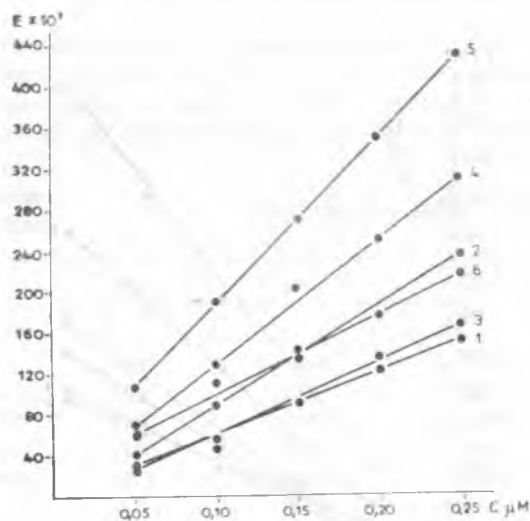
Ryc. 1. Zależność ekstynkcji od stężenia kompleksu „Dyda” alaniny z jonami metali
Relation between the extinction and the concentration of "Dyda" complex of alanine
with metal ions

1-Co, 2-Ni, 3-Zn, 4-Cu, 5-Cd, 6-Hg
dla (for) Co, Ni, Zn, $\lambda = 580 \text{ m}\mu$
dla (for) Cu, Cd, Hg, $\lambda = 510 \text{ m}\mu$



Ryc. 2. Zależność ekstynkcji od stężenia kompleksu „Dyda” leucyny z jonami metali
Relation between the extinction and the concentration of "Dyda" complex of leucine
with metal ions

1-Co, 2-Ni, 3-Zn, 4-Cu, 5-Cd, 6-Hg
dla (for) Co, Ni, Zn, $\lambda = 580 \text{ m}\mu$
dla (for) Cu, Cd, Hg, $\lambda = 510 \text{ m}\mu$

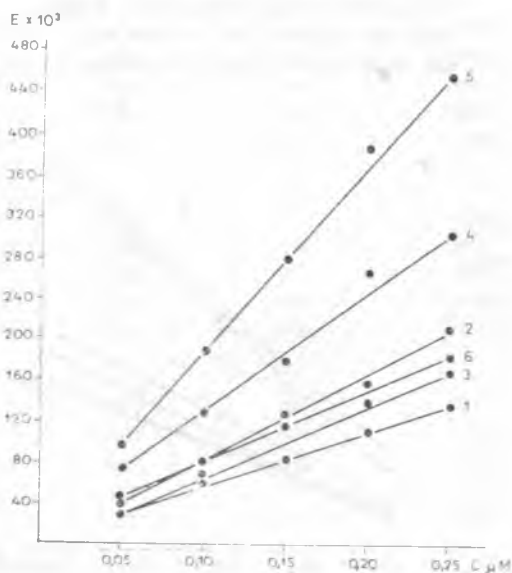


Ryc. 3. Zależność ekstynkcji od stężenia kompleksu „Dyda” seryny z jonami metali
Relation between the extinction and the concentration of "Dyda" complex of serine with metal ions

1-Co, 2-Ni, 3-Zn, 4-Cu, 5-Cd, 6-Hg

dla (for) Co, Ni, Zn, $\lambda = 580 \text{ m}\mu$

dla (for) Cu, Cd, Hg, $\lambda = 510 \text{ m}\mu$

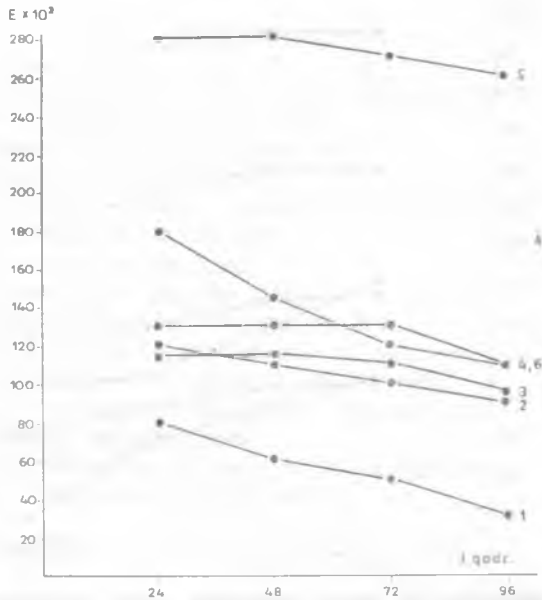


Ryc. 4. Zależność ekstynkcji od stężenia kompleksu „Dyda” waliny z jonami metali
Relation between the extinction and the concentration of "Dyda" complex of valine with metal ions

1-Co, 2-Ni, 3-Zn, 4-Cu, 5-Cd, 6-Hg

dla (for) Co, Ni, Zn, $\lambda = 580 \text{ m}\mu$

dla (for) Cu, Cd, Hg, $\lambda = 510 \text{ m}\mu$

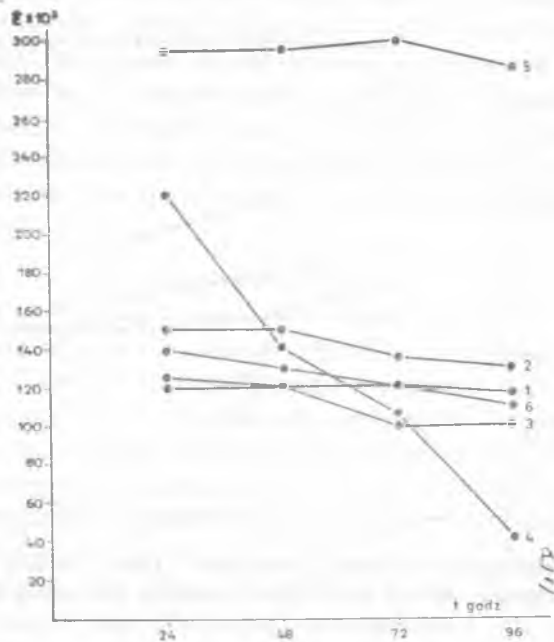


Ryc. 5. Spadek ekstynkcji w czasie kompleksu „Dyda” alaniny z jonami metali
 Fall in the extinction during the "Dyda" complex of alanine with metal ions

1-Co, 2-Ni, 3-Zn, 4-Cu, 5-Cd, 6-Hg

dla (for) Co, Ni, Zn, $\lambda = 580 \text{ m}\mu$

dla (for) Cu, Cd, Hg, $\lambda = 510 \text{ m}\mu$

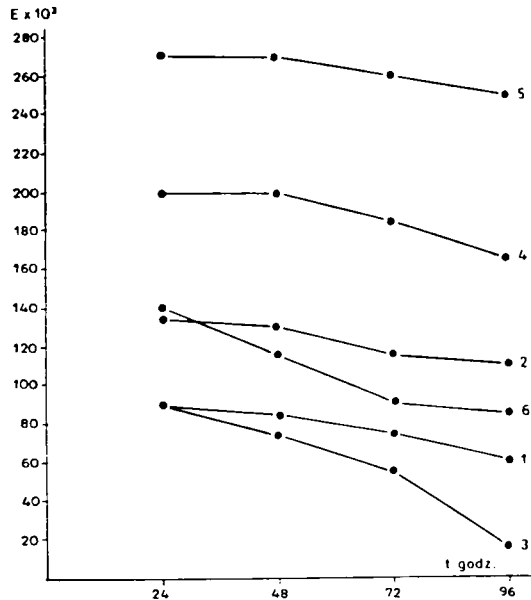


Ryc. 6. Spadek ekstynkcji w czasie kompleksu „Dyda” leucyny z jonami metali
 Fall in the extinction during the "Dyda" complex of leucine with metal ions

1-Co, 2-Ni, 3-Zn, 4-Cu, 5-Cd, 6-Hg

dla (for) Co, Ni, Zn, $\lambda = 580 \text{ m}\mu$

dla (for) Cu, Cd, Hg, $\lambda = 510 \text{ m}\mu$

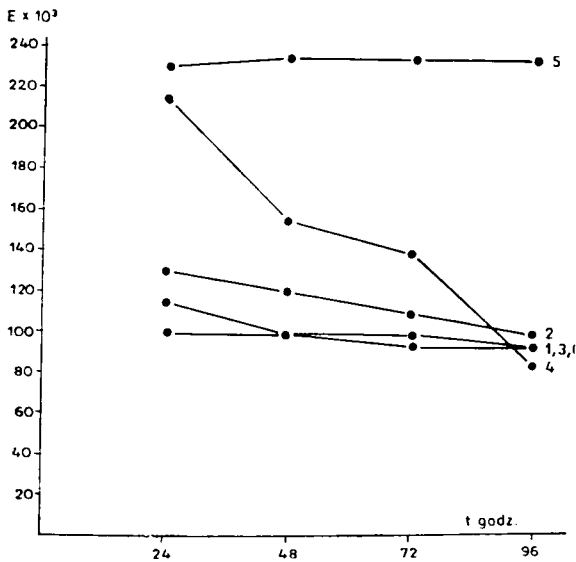


Ryc. 7. Spadek ekstynkcji w czasie kompleksu „Dyda” seryny z jonami metali
Fall in the extinction during the "Dyda" complex of serine with metal ions

1-Co, 2-Ni, 3-Zn, 4-Cu, 5-Cd, 6-Hg

dla (for) Co, Ni, Zn, $\lambda = 580 \text{ m}\mu$

dla (for) Cu, Cd, Hg, $\lambda = 510 \text{ m}\mu$



Ryc. 8. Spadek ekstynkcji w czasie kompleksu „Dyda” waliny z jonami metali
Fall in the extinction during the "Dyda" complex of valine with metal ions

1-Co, 2-Ni, 3-Zn, 4-Cu, 5-Cd, 6-Hg

dla (for) Co, Ni, Zn, $\lambda = 580 \text{ m}\mu$

dla (for) Cu, Cd, Hg, $\lambda = 510 \text{ m}\mu$

PIŚMIENNICTWO

1. Troll W., Cannan R. K.: J. Biol. Chem. **200**, 303, 1953.
2. Ruheman I.: J. Chem. Soc. **99**, 797, 1911.
3. Woker G.: Helv. Chim. Acta. **20**, 1260, 1937.
4. Meyer H.: Biochem. J. **67**, 333, 1957.
5. Yemm E. W., Cocking E. C.: Analyst. **80**, 209, 1955.
6. Fowden L.: Biochem. J. **48**, 327, 1951.
7. Block R. J.: Science **108**, 608, 1948.
8. Block R. J.: Anal. Chem. **22**, 1327, 1950.
9. Wolfe N.: Biochim. Biophys. Acta. **23**, 186, 1957.
10. Moore S., Stein W. H.: J. Biol. Chem. **176**, 367, 1948.
11. Wieland T., Kawerau E.: Nature, **168**, 77, 1951.
12. Fischer F. G. Dörfel H.: Biochem. Z. **324**, 544, 1953.
13. Giri K. V.: Nature. **170**, 1025, 1952.
14. Grossman W., Hannig K., Ploch M.: Hoppe-Seylers Z.: **299**, 258, 1955.
15. Barroulier J.: Naturwiss. **42**, 416, 1955.

Otrzymano 26.I.1972.

РЕЗЮМЕ

В работе исследовали пригодность ионов Cd^{++} , Cu^{++} , Hg^{++} , Co^{++} , Ni^{++} и Zn^{++} , образующих комплексы с „Dyda”, для количественного анализа аминокислот. Исследовали ряд параметров, напр., величину экстинкции комплексов „Dyda” с разными металлами при одинаковой концентрации той же самой аминокислоты. Определяли зависимость экстинкции комплекса от концентрации аминокислот, а также прочность комплексов „Dyda” с исследуемыми металлами. Установили, что ионы исследованных металлов можно использовать для количественного анализа тех аминокислот, которые хроматографически разделены на промокательной бумаге.

SUMMARY

The purpose of this work was to investigate whether Cd^{++} , Cu^{++} , Hg^{++} , Co^{++} , Ni^{++} and Zn^{++} ions forming complexes with „Dyda” were suitable for the quantitative analysis of aminoacids. Several parameters were examined, for instance, the extinction value of „Dyda” complex with different metals at identical concentration of one and the same aminoacid. The relation between the extinction of a complex and concentration of aminoacids as well as the stability of „Dyda” complexes with the investigated ions were determined. It was found that each of the investigated metal ions forming complexes with „Dyda” were suitable for the quantitative analysis of aminoacids chromatographically separated on filter paper.

