

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XVI, 26

SECTIO D

1961

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

Irena KRZECZKOWSKA i Diwa MISIUNA

**Nowy sposób identyfikowania niektórych aminokwasów rozdzielonych
przy pomocy chromatografii na bibule**

**Новый способ идентификации некоторых аминокислот, выделенных
при помощи хроматографии на бумаге**

**A New Method of Identifying some Amino Acids Partitioned by Paper
Chromatography**

Szereg autorów zajmuje się metodyką chromatograficznego rozdzielania i oznaczania aminokwasów, ale dotąd uzyskiwane wyniki bywają rozbieżne, a podawane metody i ryciny budzą duże wątpliwości. Zwłaszcza identyfikacja aminokwasów o zbliżonych R_f natrafia na trudności, ponieważ te aminokwasy, przy używanych ogólnie układach rozpuszczalników, dają wspólne plamy. Identyfikacja oparta na bardzo subtelnych różnicach w odcieniach barw jest mało dokładna i w dużej mierze oparta na pewnej dowolności. Taki stan rzeczy usprawiedliwia stałe powracanie do tematu rozdzielania aminokwasów i poszukiwanie jak najdokładniejszych sposobów ich identyfikacji. Celem więc niniejszej pracy było znalezienie wywoływacza, który służyłby jako odczynnik specyficzny dla niektórych aminokwasów.

W toku pracy zwrócono uwagę na związek, który Seiichi Ohkuma (3) zastosował do identyfikacji polinitrozwiazków, redukując je uprzednio do odpowiednich poliamin. Związkiem tym był pięciocyjanoaminożelazian sodu. W czasie badań poznano (w różnych warunkach doświadczalnych) zachowanie się tego odczynnika z 19 aminokwasami.

METODA BADAŃ I MATERIAŁY.

Do rozdzielania mieszaniny aminokwasów używano metody chromatografii wstępującej wg Williams i Kirby (4), stosując rozpuszczalnik n-butanol — kwas octowy — woda w stosunku 4:1:1 (1). Chromatografię przeprowadzano w szklanych, dobrze uszczelnionych kamerach. Najlepsze wyniki uzyskiwano na bibule Whatman N 3, na którą nakraplano mikropipetką o pojemności 0,0447 ml — 0,1% roztwory aminokwasów do badań bez rozwijania chromatogramu, a mikropipetką o objętości 0,085 ml 0,1% roztwory aminokwasów do wywołania po rozwi-

nięciu chromatogramów. Spis aminokwasów podany jest w pracy Krzeczowskiej I. i Wach T. (2). Aminokwasy wywoływano w temperaturze pokojowej 0,5% acetonowo-wodnym roztworem pięciocyjanoaminożelazianu sodu, oznaczanym w pracy jako (P); aceton mieszano z wodą w stosunku 4:3. Chromatogramy opryskiwano, używając rozpryskiwacza pozwalającego na bardzo równomierne zraszanie powierzchni bibuły. Do wszystkich badań używano wody podwójnie destylowanej.

BADANIA WŁASNE

Badano barwy poszczególnych aminokwasów uzyskiwane z (P): 1) bez rozwijania chromatogramów, 2) po rozwinięciu chromatogramów, nakraplając aminokwasy pojedynczo lub mieszaniny. Badania przeprowadzano w środowisku kwaśnym, obojętnym i zasadowym. Do alkalizowania bibuły używano 1% metanolowego roztworu NaOH (p. a.), a do zakwaszania 0,1 n kwasu solnego. Zaznaczyć należy, że przed opryskaniem chromatogramów wywoływaczem (P), suszono je w temperaturze pokojowej i alkalizowano lub zakwaszano, po czym ponownie suszono.

Tab. 1. Barwy aminokwasów uzyskane z pięciocyjanoaminożelazianem sodu w środowisku obojętnym, bez rozwijania chromatogramu

Amino acid stains obtained with sodium pentacyanoamminoferrate (III) in neutral medium, without developing the chromatogram

Lp.	Nazwa aminokwasu	Barwa
1	cysteina	oliwkowa
2	cystyna	seledynowa
3	arginina	seledynowa
4	histydyna	pomarańczowa
5	kwas asparaginowy	seledynowa
6	glicyna	seledynowa
7	seryna	seledynowa
8	kwas glutaminowy	seledynowa
9	oksyprolina	seledynowa
10	alanina	seledynowa
11	prolina	seledynowa
12	kwas alfa aminomasłowy	seledynowa
13	tyrozyna	seledynowa
14	tryptofan	ciemnozielona
15	metionina	seledynowa
16	walina	seledynowa
17	norwalina	seledynowa
18	izoleucyna	seledynowa
19	leucyna	seledynowa

1. Barwy aminokwasów z wywoływaczem (P) bez rozwijania chromatogramów:

a) W środowisku kwaśnym.

Bibulę zakwaszono 0,1 n HCl; zauważono, że wywoływacz (P) w środowisku kwaśnym nie daje z aminokwasami reakcji barwnych.

b) W środowisku obojętnym uzyskano barwy wyszczególnione w tabeli 1.

Szybkość pojawiania się barw w środowisku obojętnym zależna jest od stężenia nakroplonego aminokwasu. Po nakropieniu 0,02 ml aminokwasu o stężeniu 0,1% najszybciej dają barwną reakcję z (P): tryptofan, histydyna, arginina, seryna, cysteina, metionina — po około 40 minutach. Inne

Tab. 2. Zachowanie się aminokwasów z pięciocyjanoaminożelazianem sodu w środowisku zasadowym (bibulę alkalizowano 1% roztworem metanolem NaOH) Behaviour of amino acids with sodium pentacyanoamminoferrate (III) in alkaline medium (filter paper alkalized with 1% methanol solution of NaOH)

Lp.	Nazwa aminokwasu	Barwa	Uwagi
1	cysteina	seledynowa	na ciemniejszym tle zalkalizowanej bibuły, po 1 godz. zielona obwódka
2	cystyna	jasnozielona	
3	arginina	różowa, później lila-róż	barwa ukazuje się natychmiast
4	histydyna	buraczkowa	barwa ukazuje się po 15 min.; po 24 godz. zmienia się na buraczkowobrunatną.
5	kw. asparaginowy	seledynowa	po kilku dniach — różowa otoczka
6	glicyna	jasnoseledynowa	na ciemniejszym tle bibuły dobrze widoczna
7	seryna	seledynowa	po 2—3 dniach środek przybiera barwę różową
8	kw. glutaminowy	seledynowa	po 2—3 dniach środek przybiera barwę różową
9	oksyprolina	seledynowa	po 2—3 dniach środek przybiera barwę różową
10	alanina	seledynowa	po 2—3 dniach lekko różowa — zanikająca
11	prolina	seledynowa	po 2 tygodniach pomarańczowa
12	kw. alfa aminomasłowy	seledynowa	
13	tyrozyna	seledynowa	słabo widoczna, szybko niknie
14	tryptofan	ciemnozielona	stopniowo intensywnieje
15	metionina	jasnoseledynowa	
16	walina	seledynowa	bardzo słabo widoczna
17	norwalina	jasnoseledynowa	„ „ „
18	izoleucyna	seledynowa	„ „ „
19	leucyna	seledynowa	„ „ „

aminokwasy ukazują się po 2—3 godzinach, prolina po 6 godzinach. Tyrozyna nakroplona w tej ilości nie daje reakcji barwnej. Po nakropleniu 0,0447 ml 0,1% roztworów wszystkie aminokwasy dają barwne reakcje najdalej po 2 godzinach. Wyjątek stanowi tyrozyna, której plama widoczna jest po 48 godzinach.

c) W środowisku zasadowym.

Zachowanie się aminokwasów z (P) w środowisku zasadowym (bibułę alkalizowano metanolem roztworem 1% NaOH) uwidocznione jest w tabeli 2.

W środowisku zasadowym czułość reakcji barwnej (P) z aminokwasami jest większa. Po nakropleniu 0,01 ml 0,1% roztworów aminokwasów barwne plamy z (P) dają większość aminokwasów oprócz proliny, oksyproliny, norwaliny, waliny, leucyny, tyrozyny. Nakroplenie 0,02 ml 0,1% roztworów pozwala na wykrycie dalszych aminokwasów. Tylko tyrozyna wymaga większego stężenia, efekt barwny występuje u niej po kilku godzinach i to po nakropleniu 0,0447 ml 0,1% roztworu.

2. Barwy plam aminokwasów wywołanych (P) po rozwinięciu chromatogramu.

Po rozwinięciu chromatogramu aminokwasy wywoływano (P) w środowisku zasadowym (bibułę alkalizowano 1% metanolem roztworem NaOH). Wywoływania w środowisku obojętnym nie przeprowadzono, ze względu na 1) jednolitość barw aminokwasów w tym środowisku, 2) większe rozmywanie się plam po wywołaniu, 3) mniejszą czułość reakcji oraz 4) dłuższy czas potrzebny do ujawnienia się barw aminokwasów.

Badania przeprowadzano tylko nad tymi aminokwasami, których plamy barwne były dobrze widoczne, intensywne: arginina, histydyna, glicyna, alanina, tryptofan, metionina. Nakraplano mieszaniny po 2—6 aminokwasów o zbliżonych wartościach R_f .

a) Metionina i tryptofan.

Chromatogram tych aminokwasów jest widoczny na ryc. 1. Metionina spryskana (P) dała barwę seledynową na żółtym tle bibuły, tryptofan — ciemnozieloną, zawsze widoczną pod plamą metioniny. Różnica w barwie i wzajemnym położeniu plam pozwala na wykrycie obu aminokwasów.

b) Arginina, histydyna, glicyna.

Chromatogram tych aminokwasów widoczny jest na ryc. 2. Barwna plama argininy ukazuje się natychmiast jako różowe pasmo, które po kilkunastu minutach blednie i na jej miejscu ukazuje się ciemnoburaczkowa plama histydyny; barwa glicyny pojawia się po upływie 40 minut jako jasnoseledynowe pasmo na ciemniejszym tle bibuły.

c) Arginina, histydyna, glicyna, alanina, tryptofan, metionina. W mieszaninie tej wszystkie plamy wywołane (P) były dobrze widoczne.



Ryc. 1. Chromatogram metioniny i tryptofanu wywołany pięciocyjanoaminożelazianem sodu w środowisku alkalicznym

Chromatogram of methionine and tryptophan detected with sodium pentacyanoamminoferrate (III) in alkaline medium



Ryc. 2. Chromatogram argininy, histydyny i glicyny wywołany pięciocyjanoaminożelazianem sodu w środowisku alkalicznym

Chromatogram of arginine, histidine and glycine detected with sodium pentacyanoamminoferrate (III) in alkaline medium



Ryc. 3. Chromatogram mieszaniny sześciu aminokwasów: argininy, histydyny, alaniny, proliny, tryptofanu i metioniny, wywołany pięciocyjanoaminożelazianem sodu w środowisku alkalicznym

Chromatogram of a mixture of six amino acids: arginine, histidine, alanine, proline, tryptophan and methionine detected with sodium pentacyanoamminoferrate (III) in alkaline medium

Ryc. 3 obrazuje na chromatogramie położenie wyżej podanych aminokwasów.

Metionina leży nad tryptofanem, a barwa jej jest seledynowa, pasmo odpowiadające tryptofanowi położone jest nieco niżej i ma intensywnie zieloną barwę. Trochę niżej leży pasmo alaniny seledynowe, zanikające. Następne 3 aminokwasy umiejscowiły się jeszcze niżej i w pewnym oddaleniu od poprzedniej grupy. Kolejność ich jest następująca: glicyna — lekko seledynowa, arginina — lilioworóżowa, nieco wystająca nad buraczkowo-brunatnym pasmem histydyny.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSEK

Przeprowadzono badania nad zachowaniem się pięciocyjanoaminożelazianu sodu z 19 aminokwasami. Badano barwy aminokwasów z pięciocyjanoaminożelazianem sodu: a) bez rozwijania chromatogramu i b) po rozwinięciu chromatogramu. W środowisku kwaśnym aminokwasy nie dawały barwnych plam z odczynnikiem (P). Najlepsze wyniki osiągnięto, przeprowadzając badania na bibule zalkalizowanej 1% metanolowym roztworem NaOH. Bardzo charakterystyczną ciemnozieloną trwałą plamę daje tryptofan. Histydyna zabarwia się na kolor buraczkowobrunatny, a arginina jest różowa, po 24 godz. czasie lilaróż. Ponieważ inne aminokwasy dają z (P) plamy o barwie seledynowej (jaśniejsze lub ciemniejsze) łatwo jest zidentyfikować: tryptofan, histydyne i arginę.

Dalsze badanie zmian w zachowaniu pięciocyjanoaminożelazianu sodu w różnych warunkach doświadczalnych jest w toku.

Wniosek: Użycie pięciocyjanoaminożelazianu sodu pozwala na wykrycie w środowisku zasadowym argininy, histydyny i tryptofanu.

PIŚMIENNICTWO

1. Kirby-Berry H., Cain L., Sutton H. E. Berry J. S.: Development of Paper Chromatography for Use in the Study of Metabolic Patterns. Univ. Texas Publ. 5109, 22—55, 1951.
2. Krzeczowska I., Wach T.: Wolne aminokwasy w szczepionce wg Delbeta Annal. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sec. D. 16, 279—284, 1961.
3. Seichi Onkuma: A Microdetection of Aromatic Nitro Compounds with Sodium Pentacyanoammineferrate. J. Pharm. Soc. Japan, 75, 1342—1345, 1955.
4. Williams R. J., Kirby H.: Paper Chromatography Using Capillary Ascent. Science, 107, 481—483, 1948.

РЕЗЮМЕ

Авторами изучено в разных средах и в различных экспериментальных условиях поведение пентацианоаминожелезистого (III) натрия с 19 аминокислотами.

Установлено, что после подщелачивания бумаги 1%-ым метаноловым раствором NaOH удастся идентифицировать пентациано-аминожелезистым (III) натрием следующие аминокислоты: аргинин, гистидин и триптофан.

Дальнейшие исследования продолжаются.

S U M M A R Y

The authors studied the behaviour of sodium pentacyanoamminoferrate (III) with 19 amino acids in various media and under various experimental conditions.

It was found that, after alkalizing the paper with 1% methanol solution of NaOH, the following amino acids can be identified with sodium pentacyanoamminoferrate (III): arginine, histidine and tryptophan.

The research is continued.

