ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA
VOL. XXIX, 15 SECTIO D 1974

Zakład Chemii Ogólnej. Instytut Chemii Podstawowych. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr habil. Stanisław Biliński

Jerzy ISKIERKO, Stanisław BILIŃSKI,
Jerzy GOSPODAREK, Andrzej GÓRSKI

Badania oscylopolarograficzne wzorcowych PTH-aminokwasów

Осциполярографические исследования стандартных PTH-аминокислот

Oscillopolarographic Examinations of Standard PTH Amino Acids

Opracowano szereg metod rozdziału i identyfikacji fenylotiotiohydantoinowych pochodnych (PTH) aminokwasów. Do tego celu użyto metody chromatografii bibułowej (10, 2) oraz cienkowarstwowej na płytkach szklanych lub z folii aluminiowej pokrytych żelem krzemionkowym (9, 4). Do rozdziału PTH-aminokwasów zastosowano także z dobrymi rezultatami cienkowarstwowe płytki poliamidowe na folii aluminiowej (11). Edman i Sjöquist stosując cztery różne układy rozpuszczalników chromatograficznie rozdzielili 19 różnych PTH-aminokwasów (2). Rozdział PTH-aminokwasów przeprowadzono również metodą elektroforezy na bibule lub cienkich warstwach żelu krzemionkowego (8). Położenie plam PTH-aminokwasów na chromatogramach ustala się wywołując je odczynnikiem Jodazidowym (5) względnie Grothego (3). Do tego celu stosuje się również pary jodu i amoniaku. PTH-aminokwasy świecą w świetle UV dzięki czemu plamy ich mogą być obrysowywane, a następnie eluowane do badań ilościowych. W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano prac dotyczących oscylopolarograficznego oznaczania PTH-aminokwasów. W związku z powyższym podjęto próbę identyfikacji PTH-aminokwasów na podstawie różnic ich obrazów oscylopolarograficznych w trzech różnych podstawowych elektrolitach 1 m KCl, 1 m H_2SO_4 i 1 m KOH.

MATERIAŁY I METODY

Do badań użyto niżej podane wzorcowe PTH-aminokwasy firmy Nutritional Biochemicals Corporation Cleveland Ohio USA: 1) PTH — Ala, 2) PTH — Gli, 3) PTH — Pro, 4) PTH — Met, 5) PTH — His, 6) PTH — Try, 7) PTH — Liz, 8) PTH — Ser, 9) PTH — Ileu, 10) PTH — Wal, 11) PTH — AspN, 12) PTH — NorWal, 13) PTH — Nor Leu, 14) PTH — Glu, 15) PTH — Kwas Cys 1/2, 16) PTH — Kwas α amino Mas., 17) PTH — sulfon Met., 18) PTH — Cys 1/2, 19) PTH — Citr, 20) PTH — Leu, 21) PTH — Tyr.

Czynność oscylopolarograficzną PTH-aminokwasów zbadano w trzech podstawowych elektrolitach w 1 m roztworach KCl, H_2SO_4 i KOH w mieszaninie z metanolem w stosunku objętościowym 1:1. Posługiwano się oscylopolarografem LP 600 — Polaroscope produkcji czechosłowackiej. Ze względu na wyłącznie jakościowy charakter badań poszczególne PTH-aminokwasy rozpuszczano bezpośrednio w naczynku polarograficznym. Polaryzacji kroplowej elektrody rtęciowej (KER) dokonywano prądem 0,3 mA, a tylko w niektórych przypadkach stosowano prąd 0,5 mA. Czas trwania kropli wynosił 2 sek. Obraz oscylopolarograficzny rejestrowano fotograficznie posługując się filmem małoobrazkowym NP-27 (ORWO). Czas naświetlania 1/8 sek. przy przesłonie 1:1,8. Zarejestrowane krzywe rzutowano na papier, wyznaczając położenie i wartości Q wcięć katodowych i anodowych charakterystycznych dla poszczególnych PTH-aminokwasów. W przedstawionych obrazach oscylopolarograficznych pominięto wcięcia stosowanych podstawowych elektrolitów.

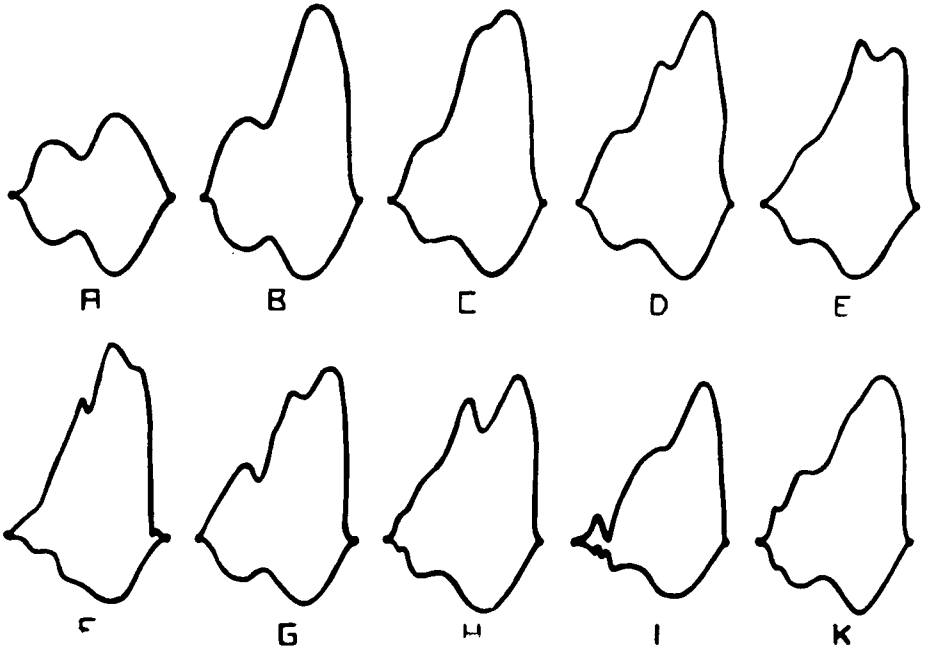
OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Na podstawie dokonanej analizy można stwierdzić, że PTH-aminokwasy wykazują czynność oscylopolarograficzną przynajmniej w jednym z trzech elektrolitów podstawowych. W kwasie siarkowym nieczynne polarograficznie okazały się PTH-Pro, Leu, Ala, Tyr, His, Citr, NorWal, NorLeu, Ileu. W roztworze KCl nieczynne były PTH-Pro i Leu. Natomiast w ługu potasowym wszystkie analizowane PTH-aminokwasy okazały się polarograficznie czynne, co obrazuje tab. 1. Wartości Q poszczególnych wcięć katodowych i anodowych poza PTH-Ala i PTH-Ileu są na tyle charakterystyczne, że umożliwiają rozróżnianie i identyfikowanie oscylopolarograficzne pozostałych PTH-aminokwasów. Rozróżnienie PTH-Ala od Ileu można przeprowadzić za pomocą chromatografii bibułowej lub cienkowarstwowej. Wymienione PTH-aminokwasy dobrze się rozdzielają w różnych układach rozpuszczalników. PTH-Wal i Sulfon Met w roztworze KCl i KOH posiadają podobne wcięcia katodowe. Na podkreślenie zasługuje wyraźna różnica w obrazie oscylopolarograficznym PTH-Leu i Ileu. W odróżnieniu od PTH-Ileu, PTH-Leu nie wykazuje czynności w roztworze KCl. Omawiane PTH-pochodne aminokwasów są bardzo trudne do chromatograficznego rozdzielenia. PTH-Gli i AspN w roztworze KOH barwią się na kolor różowo-fioletowy, a PTH-Cys 1/2 powoduje czernienie powierzchni dennej elektrody rtęciowej.

Przeprowadzone wstępne oscylopolarograficzne badania PTH-aminokwasów odszczepionych w wyniku Edmanowskiej degradacji (1) z łańcucha B-Insuliny (7) wskazują na możliwość wykorzystania tej metody do określania sekwencji aminokwasowej białek i peptydów. Z wyżej podanych względów szczególne znaczenie posiada oscylopolarograficzna identyfikacja PTH-aminokwasów, które występują w białkach. Praca nad wspomnianym zagadnieniem jest w toku, a wyniki będą omówione w następnej publikacji.

Tab. 1. Charakterystyka obrazów oscylopolarograficznych PTH-aminokwsów
The characteristics of oscillopolargraphic pictures of PTH aminoacids

PTH-aminokwas	1 m H_2SO_4 : metanol 1 : 1		1 m KCL : metanol 1 : 1		1 m KOH : metanol 1 : 1	
	Położenie wcięcia katodowego Q x 100	Położenie wcięcia anodowego Q x 100	Położenie wcięcia katodowego Q x 100	Położenie wcięcia anodowego Q x 100	Położenie wcięcia katodowego Q x 100	Położenie wcięcia anodowego Q x 100
Pro	—	—	—	—	28 45	27
Leu	—	—	—	—	30	—
Try	17	17	—	—	36	12
Ala	—	—	29	—	24 45	—
Tyr	—	—	20	20	32 47	—
His	—	—	12 31	12	23 46	23
Citr	—	—	22 36	—	47	—
Nor-Wal	—	—	31	—	18 45	—
Nor-Leu	—	—	36	—	23 48	—
Ileu	—	—	31	—	23 48	—
Glu	66	—	25 34 41	—	22 48	—
Met	72	—	26 32	—	26 46	—
Wal	63	—	27	—	18 47	—
Sulfon Met	64	—	36	—	27 46	—
AspN	61	—	21 45	—	36 42	38
Cys 1/2	66	—	22 31 44	35	22 30 42	23 37
Kwas α-amino-Mas.	62	5 12	26	—	18	5 27
Liz	51 81 90	25	23 34 42	33	28 45 67	12 32
Ser	63	—	26 43	36	34 50	—
Kwas Cys 1/2	23	17 21	30 41	—	26 46	—
Gli	56	—	25 35 43	43	23 46	

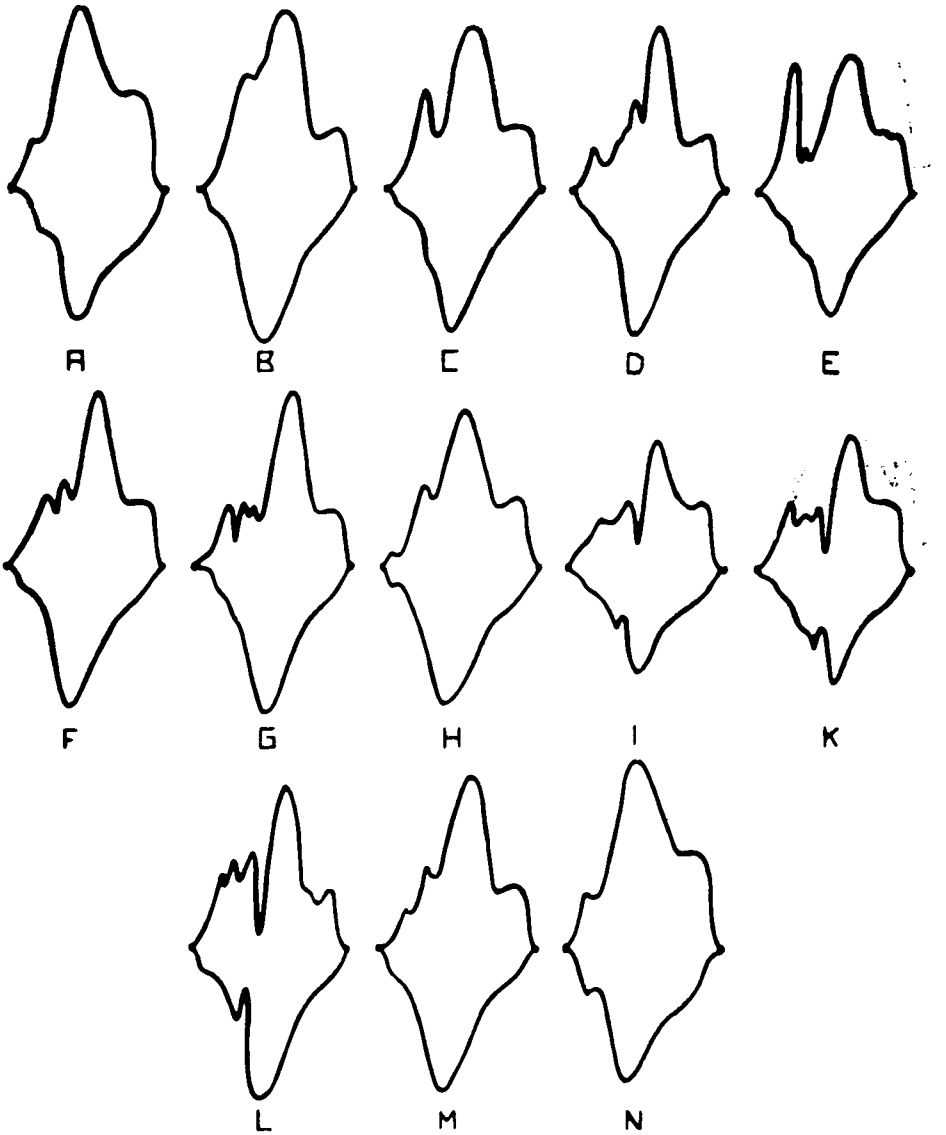


Ryc. 1. Krzywe oscylopolarograficzne PTH-aminokwasów w 1 m H_2SO_4: CH_3OH 1 : 1
Oscillopolarographic Curves of PTH-amino acids in 1 M H_2SO_4 : CH_3OH 1 : 1
A — 1 m H_2SO_4: CH_3OH 1 : 1, B — His, Pro, Nor-Leu, Tyr, Leu, C — Gli, Ileu, Ala, Nor-Wal, Citr, D — AspN, Ser, Glu, Sulfon Met., E — Wal, Met., F — Liz, LG — Cys 1/2, H — kwas α-amino-Mas., I — Kwas Cys 1/2, K — Try

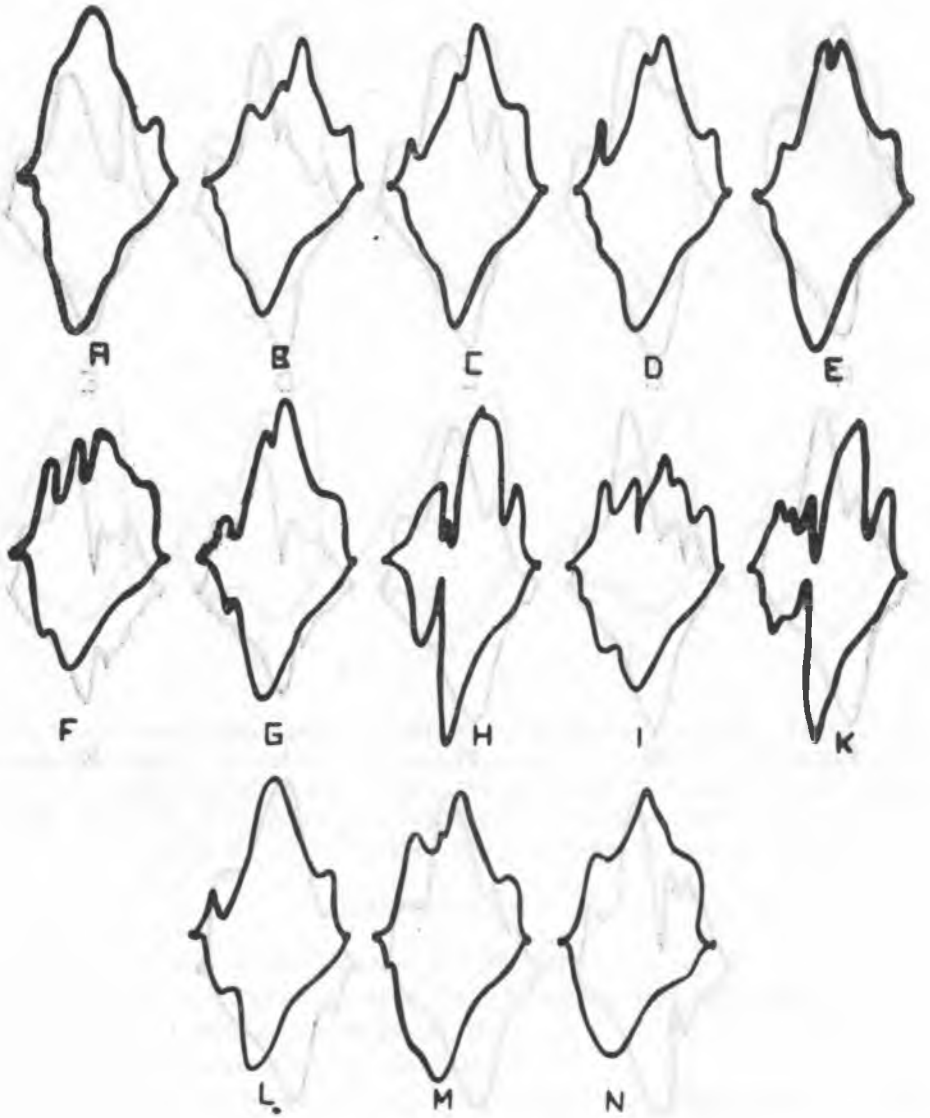
PIŚMIENNICTWO

1. Edman P.: Acta Chem. Scand. **4**, 277—283, 1950.
2. Edman P., Sjöquist J.: Acta Chem. Scand. **10**, 1507—1508, 1956.
3. Grothe J.: J. Biol. Chem. **93**, 25—27, 1931.
4. Grüner K.: Chem. Listy **64**, 1160—1162, 1970.
5. Cherbulier E., Bachler Br., Rabinowitz J.: Helv. Chem. Acta **43**, 1871—1872, 1960.
6. Kalvoda R.: Techniques of Oscillographic Polarography SNT, 104--110 Publishers of Technical Literature, Prague 1965.
7. Sanger F.: Biochem. J. **44**, 126—129, 1949.
8. Sjöquist J.: Acta Chem. Scand **7**, 447—420, 1953.
9. Sjöquist J.: Arkiv Kemi. **11**, 129, 1957.
10. Sjöquist J.: Biochim., et Biophys. Acta **41**, 20, 1960.
11. Wang K., Wu P.: J. Chromatog. **37**, 353—356, 1968.

Otrzymano 10 X 1973.



Ryc. 2. Krzywe oscylopolarograficzne PTH-aminokwasów w 1 m KCl : CH_3OH 1 : 1
Oscillopolarographic Curves of PTH amino acids in 1 M KCl : CH_3OH 1 : 1
A — 1 m KCl: CH_3OH 1 : 1 Pro, Try, Leu, B — Nor-Leu, Sulfon Met., C — Kwas α-amino-Mas., Wal, Nor-Wal, Ala, Ileu, D — AspN, E — Met, F — Kwas Cys 1/2, G — Glu, H — His, I — Ser, K — Gli, L — Cys 1/2, Liz, M — Citr, N — Tyr.



Ryc. 3. Krzywe oscylopolarograficzne PTH-aminokwasów w 1 m KOH : CH_3OH 1 : 1
Oscillopolarographic Curves of PTH-amino acids in 1 M KOH : CH_3OH 1 : 1
A — 1 m KOH : CH_3OH 1 : 1, B — Ser, C — Met, Nor-Wal, Nor-Leu, D — Wal, Ileu, E — Gli, Ala, Glu, Tyr, Sulfon Met, Citr. Kwas Cys 1/2, F — Pro, G — His, H — AspN, I — Liz, K — Cys 1/2, L — Kwas α-amino-Mas., M — Try, N — Leu.

РЕЗЮМЕ

Авторы исследовали осциполярографические функции 21 PTH-аминокислоты в трех основных электролитах. Подвергнутые исследованию PTH-аминокислоты проявляли активность хотя бы в одном основном электролите. Значение Q катодных и анодных зарубок дают возможность отличить и отождествлять отдельные PTH-аминокислоты. В этой работе сигнализируется о возможности использования осциполярографических обозначений в исследовании аминокислотных проявлений белков и пептидов методом Эдмана.

SUMMARY

The authors examined the oscillopolarographic activity of 21 PTH amino acids in three different basic electrolytes. The examined PTH amino acids showed oscillopolarographic activity in at least one basic electrolyte. The Q values of cathodic and anodic identations permit a differentiation and identification of separate PTH amino acids. The paper shows the possibility of making use of oscillopolarographic identification in the examination of the amino acid sequence of proteins and peptides by Edman's method.