

BOGUMIŁA MUSZKATOWA

WYNIKI WSTĘPNYCH PRÓB METODYCZNYCH  
Z ZAKRESU CHROMATOGRAFII BIBUŁOWEJ  
DO BADAŃ NAD SKŁADEM AMINOKWASOWYM BIAŁEK

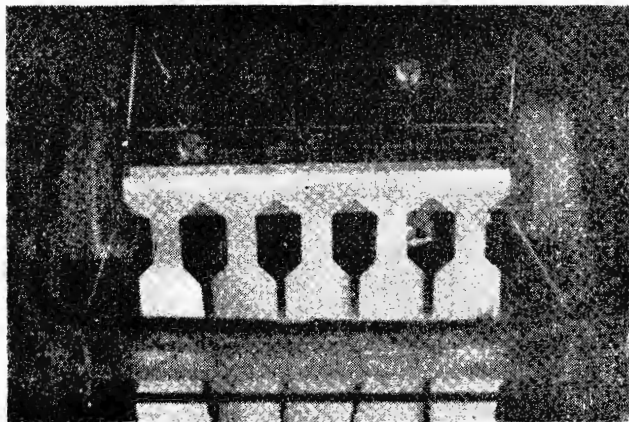
(Doniesienie tymczasowe)

Z Zakładu Higieny Żywnienia PZH

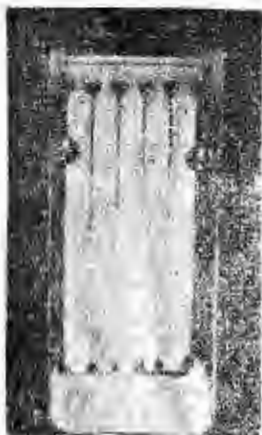
Celem pracy jest zbadanie możliwości zastosowania metody chromatografii bibułowej do szybkiego oznaczania ilościowego aminokwasów niezbędnych w produktach spożywczych i ich zestawach. Stosuję chromatografię jednokierunkową splotową, bibułę Whatmana Nr 1 i 3 przeważnie buforowaną, rozpuszczalniki wg McFarrena (1) i technikę rozdzielania i ilościowego oznaczania opisaną przez McFarrena i Fishera i Dörfla (2).

Ponieważ w wstępnych badaniach otrzymałam wyniki rozbieżne i o dużym rozrzucie, rozpatrzyłam dokładniej warunki, w jakich się znajdują aminokwasy wzorcowe w trakcie postępowania chromatograficznego. Zmiany dotyczą przede wszystkim sposobu przygotowania arkuszy bibuły i ich umieszczania w komorze chromatograficznej.

Jako komory służą mi naczynia akumulatorowe o wymiarach około  $20 \times 22 \times 50$  cm. Daje się w nich umieścić w dwóch ryńienkach cztery arkusze bibuły szerokości maks. 16 cm. Sposób zawieszenia ryńienki i zanurzenia w niej arkusza przedstawiony jest na ryc. 1a, 1b. Obok pełnych arkuszy wprowadziłam widoczne na tych fotografiach arkusze wycięte w specjalny sposób, zbliżony do sposobu Matthiasa (3); zwężenie pod punktami startu naniesionego na bibułę roztworu w niektórych przypadkach poprawia rozdział składników. Przy zastosowanych przeze



Ryc. 1a.



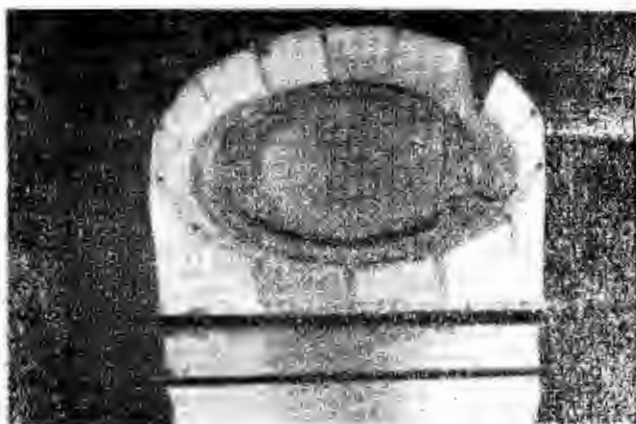
Ryc. 1b.



Ryc. 2a.

mnie wycięciach arkusz stanowi całość, podczas gdy u *Matthiasa* jest on rozcięty do końca, przez co trudniej jest nim operować.

Do oznaczeń ilościowych korzystniejsze jest stosowanie dużych arkuszy o kilkunastu punktach startowych w celu naniesienia roztworów aminokwasów wzorcowych o kilku stężeniach obok roztworów badanych (2). Nie pozwalał mi na to jednak zbyt mały rozmiar komór. Zagadnienie rozwiązałam w sposób przedstawiony na ryc. 2a i 2b. Arkusz



Ryc. 2b.

zwinęty w rulon obejmuje płytkę Petri (średnicy 15 cm), która jest umieszczona w komorze na cylindrze szklanym o wysokości większej od długości arkusza o kilka cm. Wycięte w górze arkusza zęby zanurzone są w rozpuszczalniku znajdującym się w płytce i doprowadzają go do punktów startowych. Wewnątrz dużej płytki widoczna jest mniejsza, przytrzymująca zęby bibuła. Posługując się tymi urządzeniami zbadałam zachowanie się 6 niezbędnych aminokwasów wzorcowych: treoniny, lizyny, waliny, metioniny, leucyny i izoleucyny w reakcji barwnej polegającej na połączeniu na bibule aminokwasu z ninhydryną i skompleksowaniu powstałego barwnika z miedzią dwuwartościową. Kompleks

eluowałał metanolem i oznaczałał ekstynkcję eluatu w kolorymetrze Bauscha-Lomba przy  $\lambda = 510$  m $\mu$ . Zbadałał zależności między stęże-  
niem a ekstynkcją dla kaźdego z aminokwasów:

1) naniesionego na czystą nietraktowaną bibułę i poddanego reakcjom barwnym i elucji bezpośrednio w punkcie naniesienia;

2) naniesionego na bibułę traktowaną, tj. buforowaną (lub nie, w przypadku lutydyny), po której przeszedł w komorze chromatograficznej i został usunięty rozpuszczalnik. W punkcie naniesienia przeprowadziłał reakcje barwne i elucję;

3) wydzielonego z ekwimoralnej mieszaniny 18 aminokwasów.

Mieszaninę te nanosiłał w kilku stężeniach na bibułę buforowaną (lub nie, w przyp. lutydyny). Rozwijałał chromatogram, wywoływałał ninhydrynę, wycinałał plamy badanego aminokwasu, a na skrawkach tworzyłał kompleks z miedzią, który eluowałał.

W granicach stężeń od  $1,5 \cdot 10^{-8}$  M do  $9 \cdot 10^{-8}$  M otrzymałał trzy zależności prostoliniowe dla kaźdego aminokwasu:

$E = A_1 + B_1 C$ ,  $E = A_2 + B_2 C$  i  $E = A_3 + B_3 C$ , gdzie  $E = E_{510} : 10^3$ ,  $C$  — ilość aminokwasu w punkcie startu. Parametry prostych obliczyłał metodą najmniejszych kwadratów. Wartości  $A$  nie zawsze są równe zeru, pomimo uwzględnienia ślepej próby.

Tabela I

## Straty aminokwasów

Nr	Aminokwas	Treo-	Lizyna	Walina	Metio-	Leucyna	Izoleu-	
		nina			nina			
	Rozpuszczalnik	Fenol pH 12	Lutyd.-woda (2:1)		m-krezol pH 8,4	alk. n. but.-benz. (1:1) pH 8,4		
I	Straty I = $\frac{B_1 - B_2}{B_1} \cdot 100\%$	12	0	14	48	40	14	34
II	Straty II = $\frac{B_2 - B_3}{B_1} \cdot 100\%$	29	22	13	20	23	8	6
III	Straty IIa = $\frac{B_2 - B_3}{B_2} \cdot 100\%$	33	22	15	38	39	9	10
		18*)					- 2*)	34*)

\* Wyniki Fishera i Dörfla (2).

W tabeli I podaję spadki jednostkowej ekstynkcji  $B$ , wyrażające straty aminokwasów: w rubryce I — spowodowane ewentualnym buforowaniem bibuły i obecnością na niej rozpuszczalnika (straty I), w rubryce II — spowodowane rozwijaniem chromatogramu w danym roz-

puszczalniku i usuwaniem tego ostatniego w przepływie powietrza w 50 do 60<sup>o</sup> (straty II) w procentach wartości wyjściowych (B<sub>1</sub>). Straty I + II stanowią całość strat chromatografii. W rubryce III podają straty II<sup>a</sup> odniesione do ekstynkcji otrzymanych na bibule traktowanej bez rozwijania (B<sub>2</sub>), tak jak to robili *Fischer* i *Dörfel*.

Ogólnie biorąc otrzymałam duże straty aminokwasów. Obecnie prowadzam dalsze badania nad ich obniżeniem.

Wydaje się, że wartości ekstynkcji punktu 1) postępowania należałoby uważać za wyjściowe. Wówczas można przeprowadzić głębszą analizę strat aminokwasów w czasie chromatografii; np. już zetknięcie substratów z bibułą traktowaną m-krezolem buforowanym obniża wydajność reakcji barwnych o przeszło 40% (walina, metionina).

Należy zastrzec, że przedstawione zależności odnoszą się do konkretnych stosowanych przeze mnie warunków.

Б. Мушкатова

РЕЗУЛЬТАТЫ ПЕРВЫХ МЕТОДИЧЕСКИХ ПРОБ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ АМИНОКИСЛОТ

B. Muszkatowa

RESULT OF THE PRELIMINARY METHOD TESTS IN THE FIELD OF PAPER  
CHROMATOGRAPHY FOR INVESTIGATIONS ON THE AMINOACID  
COMPOSITION OF PROTEINS

PIŚMIENNICTWO

1. *McFarren E.*: Anal. Chem., t. 23, str. 168, 1951. — 2. *Fisher F. G. i Dörfel H.*: Bioch. Ztschr., t. 324, str. 544, 1953. — 3. *Matthias W.*: Naturwiss., t. 41, str. 17, 1954.