

H. KEERBERG, O. KEERBERG, S. VEIMER, J. VIIL

KROMATO-ELEKTROFOREETILINE MEETOD AMINOHAPETE MÄÄRAMISEKS TAIMSES MATERJALIS

Valkude ja aminohapete metabolismi uurijatel osutub sageli vajalikuks eraldada aminohapped teistest orgaanilise aine rühmadest ja seejärel lahutada saadud aminohapete segu üksikuteks komponentideks. Selleks on välja töötatud ja uurimislaboratooriumide praktikasse rakendatud palju erinevaid analüüsimismeetodeid, mille seas kaasajal levinumaks on mitmesugused kromatograafilised meetodid: paberkromatograafia, kolonnkromatograafia, õhukese kihi kromatograafia jne. Nende kõrvai kasutatakse edukalt ka aminohapete paberelektroforeesi, mille eeliseks, võrreldes paberkromatograafiaga, on aminohapete lahutamise suurem kiirus. Nii õnnestus E. L. Durrumil (1951) ühesuunalise elektroforeesiga lahutada 19-st aminohapest koosnev segu kaheksaks paberil selgesti eraldunud tsooniks 30 minuti jooksul, kahe-suunalise elektroforeesiga aga koguni 13-ks komponendiks, kusjuures analüüs kestis viis tundi.

Erilist huvi pakuvad kromatograafia ja elektroforeesi kombineeritud kasutamisele rajanevad meetodid (Durrum, 1951; Tomotaka, Kazuo, 1961; Peterson, Butler, 1962), kus kromatograafilise meetodi suur lahutusvõime on ühendatud elektroforeetilise meetodi kiirusega. Kasutades esimeses suunas kromatograafiat ja teises elektroforeesi, õnnestus P. Zbigniewil (1962) lahutada aminohapete segu 17-ks komponendiks.

Üheks kromatograafia ja elektroforeesi kombineerimise viisiks on nn. riba ülekande meetod, mis on välja töötatud E. L. Durrumi (1951) poolt. Selle meetodi kohaselt lahutatakse kitsale paberiribale kantud aminohapete segu kromatograafiliselt. Saadud kromatogramm kantakse elektroforeesivannis asuvale elektrolüüdiga märgunud kromatograafilise paberi lehele ja teostatakse aminohapete elektroforees ristuunas kromatograafiaga. See meetod võimaldas Durrumil lahutada 17-st aminohapest koosneva segu 12-ks komponendiks.

Et ribaülekandemeetodi väljatöötamisel kasutati spetsiaalset elektroforeesiaparatuuri ja defitsiitseid kromatograafilise paberi marke, siis meie tingimustes polnud selle meetodi vahetu rakendamine võimalik. Käesolevas töös on Durrumi kirjeldatud meetodit kohandatud kodumaisele elektroforeesiaparaadile ЭФА-1 ja kasutatud taimses materjalis sisalduvate aminohapete kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks analüüsiks. Allpool esitatav analüüsikäik peaks aga sobima ka teistest allikatest pärinevate aminohapete määramiseks.

Kvalitatiivne analüüs

Aminohapete proovide ettevalmistamine. Vabade aminohapete eraldamiseks ekstraheeriti taimset materjali 80%-lise etanooliga. Et etanooli-ekstrakt sisaldab peale aminohapete ka teisi orgaanilisi ühendeid (suhkrud, orgaanilised happed, pigmendid jne.), oli teda aminohapete eraldamiseks vaja veel täiendavalt töödelda. Selleks kasutati fraktsioneerimist ioonvahetajatel. 200 mg kuivale taimmaterjalile vastav etanooliekstrakt aurutati ventilaatori all kuivaks. Moodustunud sade lahustati 50 ml destilleeritud vees. Pärast filtreerimist lasti vesilahusel tilkuda kiirusega 1 ml/min läbi kolonni (mõõtmetega 1×15 cm), mis oli täidetud kationiidiga (mark «Dowex 50») H^+ vormis. Pärast seda, kui kogu lahus oli kolonnist läbi voolanud, pesti kolonni 75 ml destilleeritud veega. Kolonni läbinud lahus ja pesuvesi visati ära. Kationiidi poolt seotud aminohapped eiuueriti 375 ml 2N HCl-ga (kiirusega 1 ml/min). Eluaat aurutati vesivannil kuivaks, jääk lahustati 5–10 ml destilleeritud vees. Saadud vesilahus aurutati uuesti kuivaks. Neid operatsioone korrati kuni soolhappe eemaldumiseni lahusest. Vahetult enne kromatografeerimist lahustati aurutuskaussidesse jäänud sade 1 ml-s 80%-lises etanoolis.

Kromatograafia. Aminohapped lahutati esimeses suunas kromatograafilisest paberist (mark «Whatman 3») lõigatud ribadel (suurusega 1×50 cm). Parema lahutuvuse saavutamiseks on soovitatav ribasid eelnevalt pesta. Selleks hoiti neid 10 min 1%-lises oblikhappelahuses ja seejärel 20 min destilleeritud vees. Pestud ribad asetati puhtale filterpaberile ja kuivatati toatemperatuuril.

Aminohapete segu kanti mikropipetiga ca 0,5 cm läbimõõduga laiguna 2 cm kaugusele riba alumisest otsast. Pealekantav lahuse hulk valiti selliselt, et üksikute aminohapete kogus ribal ei ületaks 0,15 mikromooli (meie tingimustes tavaliselt 20–50 mikrolitrit). Aminohapete segu kromatografeeriti lahusti *n*-butanool-äädikhape-vesi (vahekorras 4:1:5 ruumala järgi) tõusvas voolus 18 tunni kestel $18-19^{\circ}C$ juures. Seejärel ribad kuivatati toatemperatuuril ja kromatografeeriti teistkordselt samades tingimustes. Igast proovist valmistati kaks kromatogrammi, millest üks pärast teistkordset kromatografeerimist ilmutati 0,25%-lise ninhüdriniiahusega 96%-lises etanoolis. Ilmutatud kromatogrammi järgi määrati aminohapete asend teisel (ilmutamata) kromatogrammil, mida kasutati aminohapete edasiseks, elektroforeetiliseks lahutamiseks.

Elektrofoores. Aminohapped lahutati teises suunas elektroforeetilisel kromatograafilise paberi (mark «Whatman 15» või Ленинградская «Б») iehel (suurusega $24 \times 47,5$ cm), mille otsesse kinnitati ca 20 cm pikkused klaaspulgad. Seejärel asetati paber horisontaalselt elektrofooresivannis asuvale raamile, nii et tema otsad koos klaaspulkadega ulatusid 1–1,5 cm sügavuselt elektrolüüdidesse. Klaaspulkade raskus tagas raami otstele vabalt toetuva paberilehe tasapinnalise kuju. Pärast elektrofooresivanni sulgemist lasti paberil märguda elektrolüüdiga. Seejärel lülitati paberi otstele kolmeks tunniks alalispinge 1000 V. Paberi pingestamine oli vajalik selleks, et eemaldada temast elektriliselt laetud lisandid, mis hiljem võiksid aminohapete lahutamist segada.

Kirjeldatud viisil ettevalmistatud paberile 6 cm kaugusele anoodipoolsest otsast asetati ilmutamata kromatogrammist lõigatud 24 cm pikkune lõik, kus paiknesid kromatograafiliselt lahutatud aminohapete grupid. Seejuures jälgiti, et märjale paberilehele asetatud kromatogramm märguks ühtlaselt kogu ulatuses ja liibuks tihedalt vastu paberilehte.

Selleks kanti paberile riba vahetusse lähedusse (anoodipoolsele küljele) täiendavalt mõned tilgad elektrolüüti. Pärast seda suleti elektroforeesivann tihedalt kaanega ja paberi otstele lülitati alalispinge. Elektroforeesi tingimused olid järgmised: elektrolüüdiks 0,25M äädikhape (pH 2,7), pinge 1000 V (keskmine pingegradiend 25 V/cm), voolu tugevus 8—9 mA («Whatman 15») või 4—5 mA (Ленинградская «Б»), elektroforeesi kestus 3—3,5 tundi.

Elektrivälja toimel väljuvad aminohapped kromatogrammist ja liiguvad paberis vastavalt nende elektroforeetilisele liikuvusele antud pH juures. Meie poolt kasutatud elektrolüüdi korral liiguvad kõik aminohapped katoodi suunas. 3—3,5 tunni möödudes saavutavad aminohapped teatud kindla asendi paberil, mis oluliselt ei muutu elektroforeesi kestuse pikemisel. Niisuguse tasakaalulise asendi teket võib seletada järgmiselt. Voolu läbimisel paberist eraldub soojus, mille tulemusena elektrolüüt aurub ja paberi elektrolüüdiga küllastatuse aste väheneb. See omakorda kutsub esile elektrolüüdi voolu vannidest paberisse, mis paberi katoodipoolses osas on vastassuunaline aminohapete liikumisega elektriväljas ja püüab nihutada aminohappeid tagasi anoodi poole. Seejuures on elektrolüüdi juurdevoolu kiirus suurem paberi otstel ja väheneb keskkoha suunas — tekib elektrolüüdi voolu kiiruse gradiend. Lõppkokkuvõttes saavutavad aminohapped sellise asendi paberil, kus nende liikuvus elektriväljas on täielikult tasakaalustunud liikuvusega vastassuunalises elektrolüüdi voolus. Erinevate aminohapete tasakaaluliste asendite järjestus paberi katoodipoolsest otsast lugedes on järgmine:

1. ornitiin*	7. α -aminovõihape	13. metioniin	19. türosiin
2. lüsiin*	8. norvaliin	14. treoniin	20. proliin
3. histidiin*	9. valiin	15. asparagiin	21. oksiproliin
4. arginiin*	10. norleutsiin	16. fenüülalaniin	22. tsüstiin
5. glütsiin	11. leutsiin	17. glutamiin	23. asparagiinhape
6. α -alaniin	12. seriin	18. glutamiinhape	

* Ei oma tasakaalulist asendit paberil, liiguvad katoodipoolsesse elektrolüüdivanni.

Joonisel 1, *b* on kujutatud 16 aminohapest koosneva segu kromato-elektroforeetilisel lahutamisel saadud elektroforeogrammi, mis on ilmutatud ninhüdriniga (vt. kvantitatiivne analüüs). Joonisel 1, *c* on esitatud radioautogramm elektroforeogrammist, mis on saadud türgioa lehtedest eraldatud ^{14}C -ga märgitud aminohapete lahutamisel (türgioa lehti eksponeeriti 10 min kestel $^{14}\text{CO}_2$ keskkonnas valguse käes). Enamik vaadeldavatest aminohapetest annab elektroforeogrammil üksteisest hästi lahutunud kompaktsed laigud. Meie poolt valitud kromatograafilise lahusti ja elektrolüüdi kombinatsioonil ei lahutunud teineteisest glutamiinhape ja treoniin, norvaliin ja valiin ning norleutsiin ja leutsiin. Meetodika puuduseks tuleb pidada ka seda, et eespool kirjeldatud viisil pole võimalik määrata nelja aminohappe (arginiin, histidiin, lüsiin, ornitiin) sisaldust proovis. Nendel aminohapetel puudub tasakaaluline asend paberil ja nad liiguvad ülejäänud aminohapete elektroforeetiliseks lahutamiseks vajaliku aja (3—3,5 h) kestel katoodipoolsesse elektrolüüdivanni. Arginiini, histidiini, lüsiini ja ornitiini lahutamiseks teistest aminohapetest tuleks korraldada täiendav katse elektroforeesi kestusega 0,5—1 tund.

Kirjeldatud meetodika rakendamisel pole võimalik määrata trüptofaani sisaldust, sest trüptofaan laguneb piiritusekstrakti puhastamisel, kromatograferimisel ja elektroforeesil kasutatud happelises keskkonnas.

Trüptofaani lahutamiseks ülejäänud aminohapetest valmistati uuritavast piiritusekstraktist (kolonnidel töötlemata) eraldi kromatogrammid, mida voolutati destilleeritud veega 23–24° temperatuuril laskuvalt. Et trüptofaan lahustub vees halvasti, liikus ta sellisel kromatografeerimisel tunduvalt aeglasemalt kui ülejäänud, vees paremini lahustuvad aminohapped. Viimased liikusid kromatogrammil ühtse laia tsoonina, praktiliselt koos frondiga. Trüptofaani küllaldaseks eraldamiseks jätkati voolutamist seni, kuni lahusti front oli läbinud 40–50 cm. Kromatograafilise paberi Ленинградская «Б» puhul kulus selleks 4–7 tundi, sõltuvalt paberipartii omadustest. Kromatografeerimisel destilleeritud veega lahutus trüptofaan teistest ninhüdroiiniga värvuvatest ühenditest hästi. Järelikult võib sellega piirduda trüptofaani kvantitatiivsel määramisel ninhüdroiiniga. Teistel juhtudel, kui on vajalik trüptofaani suurem puhtusaste (näit. ^{14}C -ga märgitud taimses materjalis sisalduva trüptofaani radioaktiivsuse määramisel), tuleks kromatogrammi trüptofaani sisaldav tsoon elueerida 75%-lise etanooliga (pH viidud HCl abil 3,0-ni), eluaat kontsentreerida ja rekromatografeerida mingis teises lahustis (näit. segus isopropüülalkohol-ammoniaak-vesi vahekorras 9:1:1 ruumala järgi).

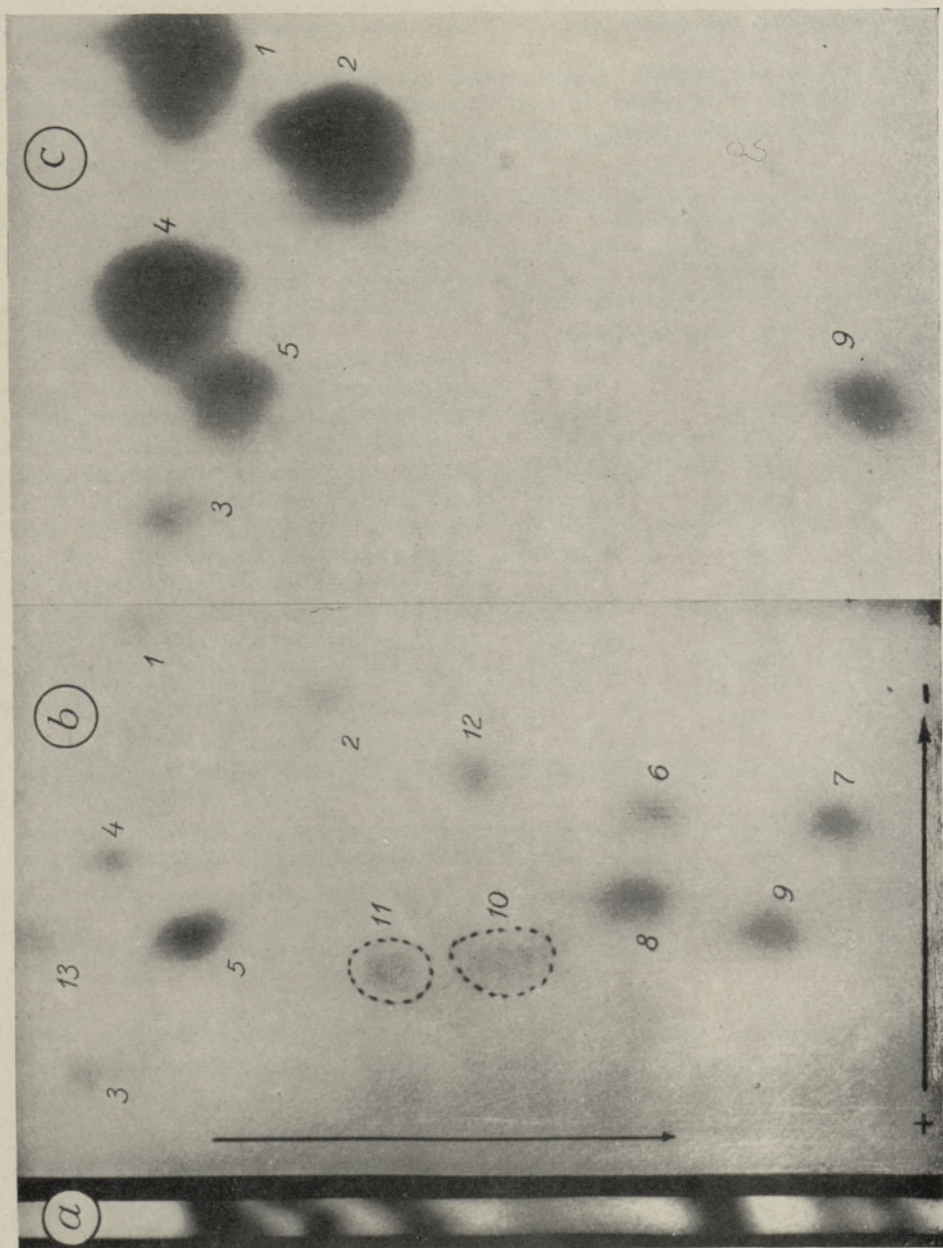
Kvantitatiivne analüüs

Elektroforegrammil lahutatud aminohapete kvantitatiivseks määramiseks kasutati meetodit, mis põhineb aminohapete ninhüdroiniireaktsioonil tekkiva värvaine optilise tiheduse hindamisel (Kawerau, Wieland, 1951).

Reagendid. Ninhüdroinilahuse valmistamiseks võeti 0,5 g ümberkristalliseeritud ninhüdroiini, lahustati see 10 ml 96%-lises etanoolis ja lahuse maht viidi atsetooniga 100 ml-ni. Ninhüdroiini ümberkristalliseerimine teostati S. Moore ja W. H. Steini (1948) poolt kirjeldatud meetodil. 20 g müügilolevat ninhüdroiini (puhtusastmega «ч») lahustati 50 ml kuumas destilleeritud vees. Kuumale lahusele lisati ca 1 mg aktiveeritud sütt (mark «OY», «A»). Lahus filtreeriti kuumalt ja filtraati hoiti järgmise päevani 4° temperatuuril. Väljasadenenud ninhüdroinikristalle pesti 4–5 korda 5 ml külma destilleeritud veega ja kuivatati toatemperatuuril pimedas.

Ninhüdroiniireaktsioonil tekkinud värvaine stabiliseerimiseks vajaliku Cu-reagendi valmistamiseks võeti 1 ml küllastatud CuNO_3 -lahust, lisati sellele 0,2 ml 7%-list lämmastikhapet ja lahuse maht viidi atsetooniga (või etanooliga) 100 ml-ni.

Analüüs. Kuivatatud elektroforegrammi pritsiti pulverisaatori abil ninhüdroinilahusega ja hoiti seejärel 25 min kestel termostaadis 65° juures. Selline temperatuur ja aeg olid küllaldased laikude täielikuks värvumiseks. Tekkinud laigud lõigati elektroforegrammist välja. Lisaks nendele lõigati elektroforegrammi piirkonnast, kus puudusid aminohapete laigud, kaks kontroll-laiku suurusega 4×5 cm. Viimased olid vajalikud selleks, et hinnata elektroforegrammi töötlemisel ninhüdroiiniga tekkinud nõrga värvilise fooni intensiivsust. Kõik väljalõigatud laigud kaaluti analüütilistel kaaludel ja fikseeriti nõelte abil korgist alusele nii, et paber ei puudutaks korki. Seejärel pritsiti laikusid Cu-reagendiga. (Elektroforegrammi pritsimine Cu-reagendiga enne laikude väljalõikamist pole soovitatav, sest tekkiv punane reaktsiooniprodukt lahustub hästi atsetoonis, mistõttu laigud võivad laiali valguda. Kui Cu-reagendi valmistamisel kasutada atsetooni asemel etanooli, on taoline oht veelgi suurem, sest sel juhul kuivavad kromatogrammid aeglasemalt.) Cu-reagen-



Joon 1. Aminohapete kromatograafia autoradiogramid. *a* — 16 aminohapete elektroforeetiline lahutamise tulemus; *b* — 16 aminohapete segu ribakromatogramm; *c* — sama segu kromatograafia autoradiogramm; *d* — radioautogramm elektroforeetilisest lahutamisest saadud turgioa lehtede ^{14}C -ga märgitud aminohapete lahutamisel. (1 — glütsiin, 2 — alanin, 3 — asparagiinhape, 4 — seriin, 5 — glutamiinhape + treoniin, 6 — valiin + norvaliin, 7 — leutsiin + norleutsiin, 8 — türosiin, 9 — fenüüalanin, 10 — proliin, 11 — oksiprolin, 12 — α -aminovõihape, 13 — asparagiin.)

diga pritsitud laigud kuivatati toatemperatuuril, lõigati väikesteks tükideks ja asetati katseklaasi. Punane värvaine elueeriti 5 ml 96%-lise etanooliga, lastes katseklaase seista toatemperatuuril umbes ühe tunni, neid aeg-ajalt loksutades. Seejärel mõõdeti eluaadi optiline tihedus spektrofotomeetril 508 nm juures 10 mm küvetis. Kontrollküvetis oli 96%-line etanool.

Optilise tiheduse ja kaliibrimiskõvera järgi arvatati antud aminohappe sisaldus uuritavas segus.

Kaliibrimiskõverate määramiseks kasutati tuntud kontsentratsioonidega puhaste aminohapete lahuseid, millega tehti läbi kogu eespool kirjeldatud protseduur, alates kromatograafiast. Juuresolevas tabelis esitatakse kaliibrimiskõvera lineaarse osa tõusud mõningatele meie poolt vaadeldud aminohapetele. Kaliibrimiskõvera lineaarse osa tõus väljendab eluaadi optilist tihedust, mis vastab aminohapete sisaldusele laigus 1 μg (tabelis tähistatud $D_a^{\mu\text{g}}$) või 1 mikromool ($D_a^{\mu\text{M}}$). Tabelis esitatud väärtused on kasutatavad nende kontsentratsioonide piirkonnas, kus kehtib Beer'i seadus (eluaadi optiline tihedus ei või ületada 1,0).

Laigus sisalduv aminohappe kogus x (mikrogrammides või mikromoolides) arvutatakse järgmiselt:

$$x = \frac{D - \frac{D_k m_1}{m_2}}{D_a} = \frac{D m_2 - D_k m_1}{D_a m_2},$$

kus D — aminohappe laigu eluaadi optiline tihedus;

D_k — kontroll-laigu eluaadi optiline tihedus (kahe laigu keskmine);

D_a — kaliibrimiskõvera lineaarse osa tõus ($D_a^{\mu\text{g}}$ või $D_a^{\mu\text{M}}$);

m_1 — aminohappe laigu kaal;

m_2 — kontroll-laigu kaal (kahe laigu keskmine).

Üksikmõõtmise viga ei ületanud 10%.

Ninhüdrini reaktsiooni abil pole võimalik määrata proliini- ja oksiprolinisisaldust uuritavas segus, sest tekkev kollane reaktsiooniprodukt ei ole sobiv kvantitatiivseks analüüsiks.

KIRJANDUS

- Durrum E. L., 1951. Two-dimensional electrophoresis and ionophoresis. *J. Colloid Sci.* **6** (3) : 274.
- Kawerau E., Wieland T., 1951. Conservation of amino-acid chromatograms. *Nature* **168** (4263) : 77.
- Moore S., Stein W. H., 1948. Photometric ninhydrin method for use of the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* **176** (1) : 367.

Kaliibrimiskõvera lineaarse osa tõus lainepikkusel 508 nm

(eluaadi ruumala 5 ml, küveti läbimõõt 10 mm)

Aminohape	$D_a^{\mu\text{g}}$	$D_a^{\mu\text{M}}$
α -alaniin	0,066	5,9
α -aminovõihape	0,055	5,7
asparagiinhape	0,022	2,9
fenüülalaniin	0,022	3,5
glutamiin	0,035	5,1
glutamiinhape	0,037	5,5
glütsiin	0,064	4,8
leutsiin	0,041	5,4
seriin	0,052	5,4
treoniin	0,035	4,4
trüptofaan	0,009	1,8
türosiin	0,019	3,4
valiin	0,048	5,6

- Peterson P. J., Butler G. W., 1962. Paper chromatographic and electrophoretic systems for the identification of sulphur and selenium amino acids. *J. Chromatogr.* 8 (1) : 70—74.
- Tomotaka S., Kazuo S., 1961. The spectrophotometric determination as trinitrophenyl derivatives of amino acids and peptides resolved on paper by electrophoresis and chromatography. *J. Biochem.* 50 (4) : 293—298.
- Zbigniew P., 1962. Chromatoelectroforeza aminokwasow. *Roczn. Panstw. zakl. hig.* 13 (1) : 71—75.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaabioloogia Instituut
Tartu Riiklik Ülikool

Saabus toimetuse
7. IX 1966

Х. КЭЭРБЕРГ, О. КЭЭРБЕРГ, С. ВЕЙМЕР, Ю. ВИЙЛЬ

ХРОМАТО-ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Резюме

Аминокислоты отделяли от других растворимых в спирте веществ на колонке Дауекс-50. Очищенный экстракт хроматографировали на полосках хроматографической бумаги в одном направлении с растворителем *n*-бутанол : уксусная кислота : вода. Затем полоску переносили на лист хроматографической бумаги и разделяли аминокислоты в другом направлении при помощи электрофореза (на аппарате типа ЭФА-1).

Для количественного определения разделенных аминокислот электрофореграммы опрыскивали раствором нингидрина и затем нитрата меди. Окрашенный комплекс элюировали из бумаги этанолом, оптическую плотность элюата измеряли при 508 нм.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР
Тартуский государственный университет

Поступила в редакцию
7/IX 1966

H. KEERBERG, O. KEERBERG, S. VEIMER, J. VIIL

A CHROMATO-ELECTROPHORETIC METHOD FOR AN ESTIMATION OF AMINO ACIDS IN PLANTS

Summary

Amino acids were extracted with ethanol and separated from other ethanol-soluble substances by the column of Dowex-50. The purified solution was chromatographed on a strip of chromatographic paper in one direction with *n*-butanol-acetic acid-water. After that the strip was transferred onto a sheet of chromatographic paper, and the amino acids placed on the strip were separated by electrophoresis in the other direction. The Soviet electrophoretic device type ЭФА-1 was used. In order to estimate the quantity of separate amino acids, electrophoregrams were sprayed with a solution of ninhydrin and CuNO_3 . The coloured reaction product was eluted with ethanol, and its optical density was measured at 508 nm.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology
Tartu State University

Received
Sept. 7, 1966