

O. KIRRET, E. KÜLLIK, MARET LÕUS

## ALIFAATSETE MONOAMINOKARBOKSÜÜLHAPETE PÜROLÜÜSI PRODUKTIDE UURIMINE GAASIKROMATOGRAAFILISEL MEETODIL

Aminohapete analüüsiks ja termilise lagunemise uurimiseks on kasutatud mitmesuguseid meetodeid. Aminohappeid analüüsides oksüdeerisid Zlatkis jt. [1] nad mikroreaktoris aldehüüdideks, mis järgnevalt eraldati kromatograafiliselt. Perrone [2] identifitseeris proteiinide lõpugruppe aminohapete 2,4-dinitrofenüülderivaatide kaudu, kasutades õhukese-kihilist ja paberkromatograafiat. Viimasel ajal on aminohapete analüüsiks kasutatud ka pürolüüsi. Kanomata jt. [3] pürolüüsisid gaasikromatograafiliselt aminohappeid ja proteiine. Stack [4] pürolüüsis proteiine ning sai produktidena alifaatseid amiine ja aminohappeid. Winter ja Albro [5] pürolüüsisid aminohappeid madalal temperatuuril ning võrdlesid ja identifitseerisid mitmete albumiinide, hemoglobiini ja teiste proteiinide ning peptiidide pürolüsaate. Samuti selgitasid nad pürolüüsitavate segude kvantitatiivse määramise võimalust. Merritt ja Robertson [6] analüüsisid 17 aminohapet 10 peptiidi kombineeritud pürolüüsi-gaasikromatograafilise ja mass-spektromeetrilise süsteemi abil. Nad identifitseerisid tundmatud pürolüüsi produktid ja esitasid uue peptiidide ja proteiinide kvalitatiivse analüüsi meetodi. Janak [7] lagundas mõningaid aminohapete kaaliumisoola- sid ja vere albumiini.

Kirjanduse andmetel on pürolüüsitud ka teisi bioloogilisi aineid. Reiner [8] pürolüüsis baktereid ja bakterite kestasid, kusjuures pürolüüsi produkte analüüsiti klassikaliste keemiametodite, mass-spektromeetri ja infrapunase absorptsioonispektroskoobi abil. Oyama [9] kasutas gaasikromatograafiat bioloogiliste materjalide pürolüüsi produktide identifitseerimiseks. Stack [10] refereerib Kirki tööd juuste pürolüüsis nende individuaalsuse määramiseks gaasikromatograafiliselt ja Brodasky uurimust linkomütsiini ja tema derivaatide pürolüüsis, kus saadi pürrooli ja selle derivaate. Masuda jt. [11] pürolüüsisid L-glutamihapet ja L-leutsiini. Pürolüüsi produktidest vaadeldi lähemalt 1- ja 2-naftüülamiinide tekkimist. Heyns ja Pavel [12] töötlesid termiliselt glütsiini ja määrasid madala molekulmassiga produktidestalaniini, glütsiilglütsiini jt. Lenduvatest produktidest määrati  $H_2O$ ,  $NH_3$ ,  $SO_2$  ja  $HCN$ . Teiste aminohapete käitumist neis tingimustes võrreldi glütsiini omadustega.

Käesoleval korral pürolüüsitati alifaatseid monoaminokarboksüülhappeid (glütsiini,alaniini, valiini, leutsiini ja isoleutsiini), et määrata nende lagunemisel tekkivaid kerge- maid produkte.

### Ekspérimentaalne osa

Alifaatsete monoaminokarboksüülhapete pürolüüsiks kasutati gaasikromatograafi YX-1 koos roostevabast terasest pürolüüsibloki ja temperatuuri programmeeriva lisaseadmega [13]. Pürolüüsiblokk võimaldas alifaatseid monoaminokarboksüülhappeid pürolüüsida kromatograafi kandegaasi voolus. Pürolüüsi temperatuuri valikul arvestati, et kromatogrammidel esi-



neks maksimaalselt aminohapete eristamiseks sobivaid iseloomulikke piike. Neile nõuetele vastas temperatuur 500° C. Pürolüüs kandegaasi voolus kestis 10—12 sekundit. Gaasikromatograafi kolonni temperatuuri valikul olid määravateks teguriteks kolonni täidis ja pürolüüsil tekkivate komponentide spetsiifika.

Produktide gaasikromatograafilise lahutuvusteravuse seisukohalt osutus kasutatud kolonnide puhul optimaalseks temperatuuriks aktiivsõel 46° C, silikageelil 55° C ja DMS-il 25° C.

Pürolüüsitava aine kaalutis valiti selline, et iseloomulikud piigid põhiliselt jääksid diagrammilindile ja et mikrokomponendid oleksid maksimi-

Tabel 1

## Alifaatsete monoaminokarboksüülhapete pürolüüsil kasutatud kolonnid ja režiimid

| Kolonne täidis                           | Tahke kandja tera suurus, mesh | Tahke kandja ja stationaar-se faasi suhe | Kolonne mater-jal | Kolonne mõõtmed |                         | Kolonne temp., °C | Kandegaasi kiirus, l/h | Kandegaasi rõhk, atm. |
|--|--------------------------------|--|-------------------|-----------------|-------------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|
|  |                                |  |                   | Pikkus, m       | Sisemi-ne läbi-mõõt, mm |                   |                        |                       |
| Chromosorb P/2,4-dimetüülsulfolaan (DMS) | 60/80                          | 80/20                                    | rooste-vaba teras | 6,0             | 3,5                     | 25                | 3,8                    | 1,0                   |
| Silikageel KCM (SG)                      | —                              | —  | vask              | 2,3             | 3,9                     | 55                | 4,5                    | 2,2                   |
| Aktiivsüsi                               | —                              | —  | rooste-vaba teras | 3,0             | 3,5                     | 46                | 4,5                    | 0,78                  |

Märkused: 1) Aktiivsõe mark teadmata, kolonn saadud koos gaasikromatograafia YX-1, 2) Kandegaas He, 3) Detektori vool 190 mA.

Tabel 2

## Alifaatsete monoaminokarboksüülhapete pürolüüsi produktid

| Piigi nr. | Aine nimetus  | Eta-loom-aine | Glütsiin       |                | Alaniin         |                | Valiin          |                | Leutsiin        |                | Isoleutsiin     |                |
|-----------|---|---------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
|           |   |               | Kovatsi indeks | Kovatsi indeks | Piigi pind, (%) | Kovatsi indeks | Piigi pind, (%) | Kovatsi indeks | Piigi pind, (%) | Kovatsi indeks | Piigi pind, (%) | Kovatsi indeks |
| 1.        | CO, CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> | —             | —              | 17,8           | —               | 14,8           | —               | 43,9           | —               | 41,0           | —               | 41,1           |
| 2.        | Eteen   | —             | —              | —              | —               | 2,6            | —               | 3,0            | —               | 8,6            | —               | 12,1           |
| 3.        | Propaan   | 300           | 300            | 82,2           | 300             | 82,5           | 300             | 26,6           | 300             | 31,5           | 300             | 26,3           |
| 4.        | Propeen   | 349           | —              | —              | —               | —              | 354             | 14,3           | 351             | 13,2           | 350             | 12,0           |
| 5.        | n-butaan  | 400           | 400            | —              | 400             | —              | 400             | —              | 400             | —              | 400             | —              |
| 6.        | 2,2-dimetüül-propaan  | 403           | —              | —              | —               | —              | —               | —              | —               | jäl-jed        | 402             | 0,1            |
| 7.        | Etüün   | 424           | —              | —              | —               | —              | 430             | 0,1            | 429             | 0,1            | 429             | 0,1            |
| 8.        | Buteen-1  | 445           | —              | —              | —               | —              | 447             | 0,4            | 449             | 0,5            | 448             | 2,0            |
| 9.        | Isobuteen   | 454           | —              | —              | —               | —              | 455             | 3,6            | 456             | 3,1            | 455             | 0,8            |
| 10.       | 2-buteen-trans  | 473           | —              | —              | —               | —              | 477             | 0,1            | 475             | 0,2            | 474             | 1,3            |
| 11.       | 2-buteen-cis  | 489           | —              | —              | —               | —              | 492             | 0,1            | 492             | 0,1            | 488             | 0,8            |
| 12.       | n-pentaan   | 500           | 500            | —              | 500             | —              | 500             | —              | 500             | —              | 500             | —              |
| 13.       | 3-metüül-1-buteen   | 505           | —              | —              | —               | —              | —               | —              | 506             | 1,1            | 506             | 0,1            |
| 14.       | 1,3-butadien  | 530           | —              | —              | —               | —              | 530             | 0,4            | 533             | 0,2            | 530             | 0,5            |
| 15.       | 2-metüül-1-buteen   | 563           | —              | —              | —               | —              | 560             | 0,1            | 563             | 0,1            | 558             | 2,8            |
| 16.       | n-hektaan   | 600           | 600            | —              | 600             | —              | 600             | —              | 600             | —              | 600             | —              |



maalselt eraldatud. Proovi kaalutisel alla 1,5 mg ei olnud mikrokomponendid gaasikromatograafi nulljoone foonist igakord küllaldaselt eraldatavad. Kui kaalutised olid üle 3,5 mg, segasid makrokomponendid mikrokomponentide eraldamist. Sellest lähtudes kujunes pürolüüsitava proovi kaalutiseks enamasti 1,5—2,5 mg. Kasutati roostevabast terasest kolonni, et vältida vase võimalikku katalüütilist mõju.

Pürolüüsi kergemate produktide identifitseerimiseks kasutati aktiivsõe ja silikageeliga täidetud adsorptsioonikolonne, mis võimaldavad eraldada ainult kergemaid gaasilisi komponente.

Pürolüüsi kergemate produktide eraldamiseks kasutatavatest suurema lahutuvuspiirkonnaga kolonnidest valiti 2,4-dimetüülsulfolaan/Chromosorb P kolonn [14]. Alifaatsete monoaminokarboksüülhapete pürolüüsil kasutatud kolonnid ja režiimid on esitatud tabelis 1, pürolüüsi kergemate produktide retentsiooniajad, Kovatsi indeks ja piigi pindala protsentides aga tabelis 2.

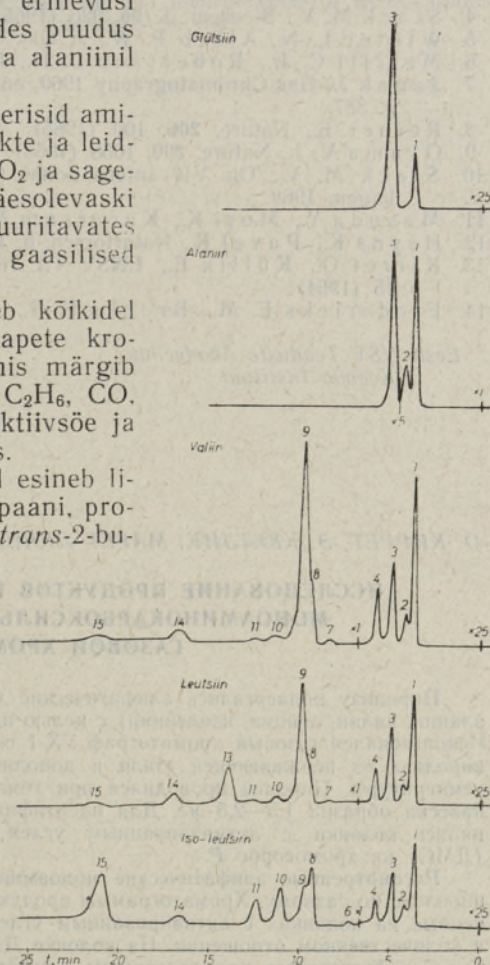
Aktiivsõe ja silikageeliga täidetud kolonne kasutades esines saadavatel alifaatsete monoaminokarboksüülhapete pürolüüsi produktide kromatogrammidel olulisi erinevusi piikide kvantitatiivsetes vahetordades. Suuremaid erinevusi esines glütsiinil jaalaniinil, milledes puudus etaan. Glütsiinil puudus ka eteeni jaalaniin metaani piik.

Merrit ja Robertson [6] identifitseerisid aminohapete koostises kergemaid produkte ja leidsid, et kõigis aminohapetes esineb  $\text{CO}_2$  ja sagedasti ka  $\text{CH}_4$ . See leidis kinnitust käesolevaski töös. Lisaks eelmainituile määrati uuritavates aminohapetes mitmed kergemad gaasilised produktid.

Nagu tabelist 2 nähtub, esineb kõikidel alifaatsetel monoaminokarboksüülhapete kromatogrammidel ühine piik (1.), mis märgib kergemaid gaasilisi produkte  $\text{CH}_4$ ,  $\text{C}_2\text{H}_6$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ . Need ained määrati kahes (aktiivsõe ja silikageeliga) adsorptsioonikolonnis.

Valiinil, leutsiinil ja isoleutsiinil esineb lisaks eespool märgituile eteeni, propaani, propeni, etüüni, buteen-1, isobuteeni, *trans*-2-buteeni, *cis*-2-buteeni, 1,3-butadieeni ja 2-metüül-1-buteeni piik. Erinevalt valiinist esineb leutsiinil ja isoleutsiinil 2,2-dimetüülpropaani ja 3-metüül-1-buteeni piik.

Tabelis 2 esitatud andmetest selgub, et vaadeldud alifaatsed monoaminokarboksüülhapped lagunevad pürolüüsil erinevalt. DMS kolonniga eraldatud komponentidest moodustavad glütsiinil jaalaniinil suuremad piigid propaan ning valiinil, leutsiinil ja isoleutsiinil eteen, propaan, propen, buteen-1 ja isobuteen. Teiste tabelis 2 esitatud komponentide osatähtsus on suhteliselt väiksem. Erandiks on isoleutsiin,



Alifaatsete monoaminokarboksüülhapete pürolüüsiproductide kromatogrammide. Kolonn DMS.



mille termilisel lagunemisel tekib rohkem buteen-1, *cis*- ja *trans*-2-buteeni ning 2-metüül-1-buteeni. Valiiniil ja leutsiiniil aga tekib isobuteeni ning leutsiiniil 3-metüül-1-buteeni. Lämmastikku sisaldavaid ühendeid ei uuritud.

Alifaatsete monoaminokarboksüülhapete pürolüüsi produktide kromatogrammid DMS kolonniga on esitatud joonisel.

Erinevalt varasemate autorite töödest [4, 6, 10] lagundati käesoleval korral alifaatseid monoaminokarboksüülhappeid pürolüütiliselt ja võrreldi pürolüüsi produktide kergemaid komponente C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>. Seda meetodit võib kasutada ka teiste aminohapete pürolüüsil tekkinud ühendite võrdluseks, mis sisaldavad C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub> aatomeid.

#### KIRJANDUS

1. Zlatkis A., Oro John F., Kimball A. P., Anal. Chem., **32**, 162 (1960).
2. Perrone J. C., Nature, **167**, 513 (1951).
3. Kanomata K., Mashiko Y., Nippon Kagaku Zasshi, **87**, 57 (1966); C. A., **65**, 1252 f (1966).
4. Stack M. V., Biochem. J., **96**, 926 (1965).
5. Winter L. N., Albro P. W., J. Gas Chromatogr., **2**, 1 (1964).
6. Merritt C. Jr., Robertson D. H., J. Gas Chromatogr., **5**, 96 (1967).
7. Janak J., Gas Chromatography 1960, ed. R. P. W. Scott Butterworth, London, 1961, p. 387.
8. Reiner E., Nature, **206**, 100 (1965).
9. Oyama V. I., Nature, **200**, 1058 (1963).
10. Stack M. V., On VII International Gaschromatographic Symposium in Copenhagen, 1968.
11. Masuda Y., Mori K., Kuratsum M., Intern. J. Cancer, **2**, 489 (1967).
12. Heyns K., Pavel K., Naturforsch. b, **12**, 97 (1957).
13. Kirret O., Küllik E., ENSV TA Toimet. Füüs.-Mat. ja Tehn.-tead. Seeria, **13**, 15 (1964).
14. Fredericks E. M., Brooks F. R., Anal. Chem., **28**, 297 (1956).

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Keemia Instituut

Saabus toimetusse  
28. XII 1968

O. КИРРЕТ, Э. КЮЛЛИК, МАРЕТ ЛЮИС

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ПИРОЛИЗА АЛИФАТИЧЕСКИХ МОНОАМИНОКАРБОКСИЛЬНЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Пиролизу подвергались алифатические моноаминокarbоксильные кислоты (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин) с целью идентификации летучих продуктов пиролиза. Использовался газовый хроматограф УХ-1 совместно с вмонтированным в него блоком пиролиза из нержавеющей стали и дополнительным устройством для регулирования температуры. Пиролиз проводился при температуре 500°С в течение 10—12 сек. Вес навески образца 1,5—2,5 мг. Для идентификации летучих продуктов пиролиза применялись колонки с активированным углем, силикагелем и 2,4-диметилсульфофаном (ДМС) на хромосорбе Р.

Рассмотренные алифатические моноаминокarbоксильные кислоты разлагаются при пиролизе по-разному. Хроматограммы продуктов пиролиза — CO<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, полученные на колонках с активированным углем и силикагелем, различались в основном в количественном отношении. На колонке ДМС были идентифицированы углеводороды C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>. Полученные хроматограммы алифатических моноаминокarbоксильных кислот приведены на рисунке и идентифицированные углеводороды C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub> — в табл. 2. Продукты пиролиза, содержащие азот, не изучались.

Пиролизную газовую хроматографию можно применять в данных условиях и для идентификации углеводородов C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>, образующихся при пиролизе других аминокислот.



O. KIRRET, E. KULLIK, MARET LOUS

### STUDY OF PRODUCTS OF PYROLYSIS OF ALIPHATIC MONOAMINOCARBOXYL ACIDS BY GAS CHROMATOGRAPHIC METHODS

The task of the present work is to determine light products of pyrolysis in the decomposition of aliphatic monoaminocarboxyl acids (glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine). The apparatus used consists of a gas chromatography equipment YX-1, stainless steel pyrolysis block and a pyrolysis-programming system. The temperature required for the pyrolysis (500°C) was attained in 10–12 sec. The quantity of the material tested was 1.5–2.5 mg.

For identifying light products of pyrolysis, columns filled with activate coal, silicagel, 2,4-Dimethylsulpholan/Chromosorb P (DMS) were used. The examined aliphatic monoaminocarboxyl acids decompose at pyrolysis differently. The chromatogrammes of products of pyrolysis (CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>) of aliphatic monoaminocarboxyl acids obtained with the column of activated coal and silicagel had fundamental differences in quantitative relations. Light hydrocarbons C<sub>1</sub>–C<sub>6</sub> were determined with the column DMS. The chromatogrammes of aliphatic monoaminocarboxyl acids with the column DMC are presented in Fig., and identified hydrocarbons C<sub>1</sub>–C<sub>6</sub> in Table 2.

Compounds containing nitrogen were not examined in this work.

Pyrolysis gas chromatography can be used for the identification of hydrocarbons C<sub>1</sub>–C<sub>6</sub> of other amino acids, under the same conditions as well.