

Член-корреспондент АН СССР Н. М. СИСАКЯН, Э. Н. БЕЗИНГЕР, П. Г. ГАРКАВИ
и Г. Я. КИВМАН

ПРОСТОЙ МЕТОД РАЗДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА БУМАГЕ

В последнее десятилетие, со времени применения в распределительной хроматографии бумаги как носителя неподвижной фазы, этот метод получил широкое распространение в биохимических исследованиях. С его помощью были решены вопросы, связанные с белковым обменом, аминокислотным составом растительных и животных организмов, открыты новые аминокислоты и амиды. Метод нашел применение в исследовании не только аминокислот, но и белков, углеводов, аминов, нуклеиновых и органических кислот и множества других классов химических соединений.

При анализе аминокислотного состава белков хроматографический метод, несмотря на свои преимущества, обладает существенными неудобствами. Осуществление этого метода часто требует дефицитных и вредных для здоровья растворителей (коллидин, лутидин, пиколин, фенол и др.), большая часть которых прочно адсорбируется бумагой. Растворители перед их применением нуждаются в обязательной очистке отгонкой. Для работы с этими растворителями необходимо специальное помещение и довольно громоздкая аппаратура. Хорошее разделение аминокислот гидролизатов белков возможно лишь двумерным способом, на листах бумаги большого размера. Получение хроматограмм и удаление растворителей из бумаги требуют продолжительного времени (нескольких суток).

Дальнейшая разработка метода распределительной хроматографии на бумаге направлена преимущественно на его упрощение и замену вредных для здоровья растворителей без ущерба для степени его чувствительности.

В 1953 г. была опубликована работа Редфилда (1), в которой автор упростил существующий метод двумерной хроматографии. Однако и применение метода Редфилда связано с некоторыми затруднениями. В частности, в состав предложенной автором системы растворителей входит третичный бутиловый спирт — растворитель дорогостоящий и мало доступный. Кроме того получение хроматограмм этим методом ограничено применением специальной бумаги (Schleicher and Schuell № 507).

Пытаясь разработать более доступный метод двумерной хроматографии, мы заменили третичный бутиловый спирт *n*-бутиловым и осуществили получение хроматограмм на бумаге отечественного производства. С помощью примененных растворителей удалось на листах бумаги небольшого размера разделить 20 аминокислот, встречающихся в гидролизатах белка, в том числе цистин и метионин. Известно, что серусодержащие аминокислоты при применении фенола в качестве одного из рас-

творителей не обнаруживаются без предварительного их окисления в соответствующие сульфокислоты и требуют постановки дополнительной хроматограммы.

Предлагаемый метод заключается в следующем. Разделение аминокислот проводится двумерным способом. В первом направлении применяется метиловый спирт — вода — пиридин (40 : 10 : 2), во втором — *n*-бутиловый спирт — метилэтилкетон — вода — диэтиламин (20 : 20 : 10 : 2). Растворители не требуют предварительной очистки. Выявление аминокислот достигается обработкой бумаги 0,4% раствором нингидрина в метиловом спирте, в ацетоне или в *n*-бутиловом спирте. Удаление растворителей после распределения аминокислот и после обработки нингидрином производится при комнатной температуре и продолжается всего 15—20 мин. вместо многих часов при обычном методе. Перед обработкой нингидрином хроматограммы помещаются на 5 мин. в струю сухого пара для удаления диэтиламина. Полное развитие окраски при применении раствора нингидрина в метиловом спирте осуществляется в течение получаса при комнатной температуре, а в *n*-бутиловом — несколько дольше и окраска пятен в последнем случае бывает обычно менее интенсивной. Разделение 20 аминокислот проводилось на листах бумаги размером не более 28 × 28 см. Однако хорошее разделение во многих случаях может быть достигнуто и на листах меньшего размера (до 14 × 14 см). Четкое разделение аминокислот достигается после хорошей очистки гидролизатов от посторонних веществ. Для описанных систем растворителей вполне возможно применение восходящего способа хроматографирования, что сильно упрощает аппаратуру.

Применявшаяся нами аппаратура состояла из чашки Петри (или химического стакана), в которую наливались растворители. В последние ставилась свернутая в трубку бумага. Сверху чашка покрывалась опрокинутым стаканом Бунзена. Для создания насыщенной атмосферы можно края стакана Бунзена погрузить в сосуд с водой.

Капля исследуемого раствора наносилась на бумагу на расстоянии двух сантиметров от нижнего и левого края. Диаметр нанесенного пятна не должен превышать 3 мм. Хроматограммы могут быть с успехом получены на предварительно обработанной ленинградской бумаге № 2. Бумага помещалась на полчаса в 0,1 *n*-спиртовой раствор КОН, затем отмывалась водой до исчезновения реакции на фенолфталеин. Последующая обработка состояла в погружении бумаги в 1% раствор HCl на 4—5 часов и тщательной отмывке от кислоты дистиллированной водой*.

Одним из преимуществ метода является также быстрота его проведения. На двумерной хроматограмме в первом направлении фронт растворителя проходит 28 см в течение 8—10 часов, а 14 см за 2,5 часа. Во втором направлении фронт растворителя проходит, соответственно, 10—12 часов и 3 часа.

Применяемое в опыте количество аминокислот составляет от 0,005—0,01 мМ. Таким образом, описанный способ более чувствителен и поэтому требует для исследования меньшее, чем обычно, количество гидролизата белка.

На рис. 1 представлены фотографии хроматограмм смеси чистых препаратов аминокислот. На рис. 1 А изображена хроматограмма, полученная нисходящим способом в растворителях: фенол — вода (I направление) и коллидин — α — пиколин — вода (II направление) на бумаге Ватман № 2. Смесь состояла из 17 аминокислот, из которых проявилось 14. Цистин и метионин, как обычно, окислялись при проявлении в примененных растворителях и их обнаружить не удалось. Лейцин и изолейцин не разделились.

* Способ обработки бумаги заимствован из доклада Г. Д. Елисейевой на 2-м хроматографическом совещании (Москва, 1953 г.).

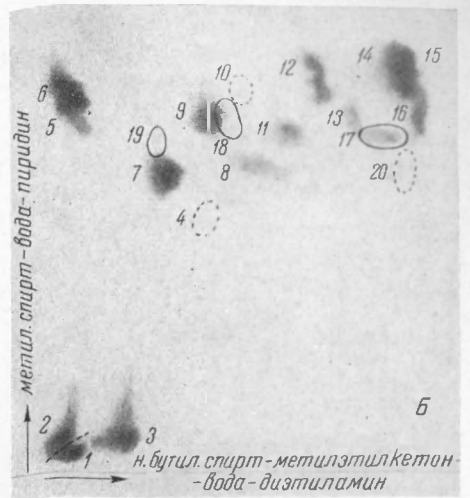
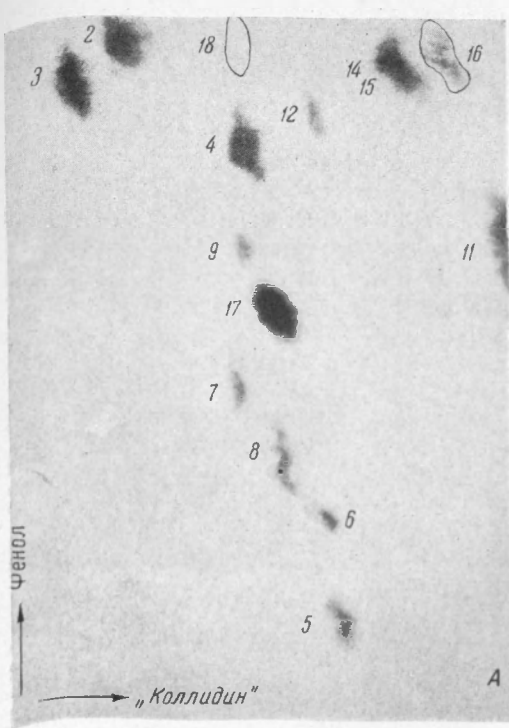


Рис. 1. Хроматограммы смеси чистых аминокислот: А — разделенных в феноле — „коллидине“, Б — разделенных в новых системах растворителей. 1 — цистин, 2 — аргинин, 3 — лизин, 4 — гистидин, 5 — аспарагиновая кислота, 6 — глютаминовая кислота, 7 — гликокол, 8 — серин, 9 — аланин, 10 — α -аминомасляная кислота, 11 — тирозин, 12 — валин, 13 — метионин, 14 — лейцин, 15 — изолейцин, 16 — фенилаланин, 17 — треонин, 18 — пролин, 19 — оксипролин, 20 — триптофан

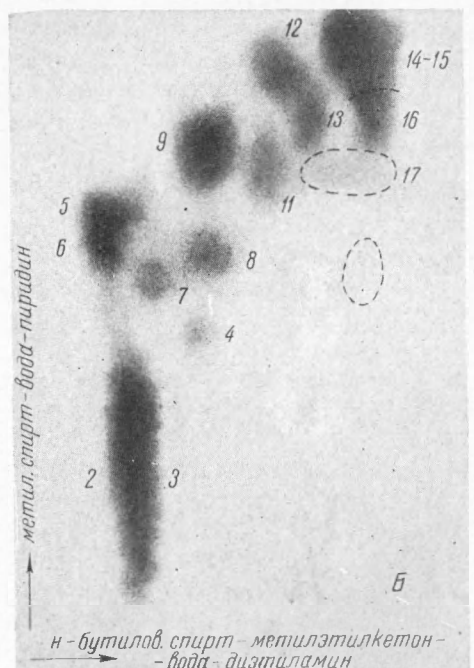
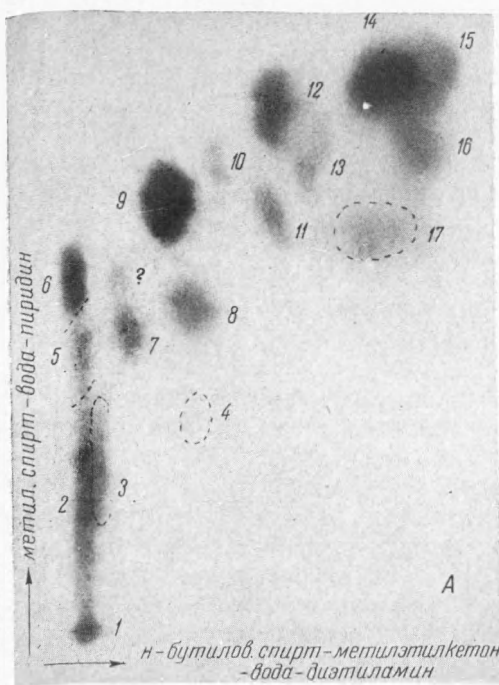


Рис. 2. Хроматограммы гидролизата растительного (А) и животного (Б) белка. 1 — цистин, 2 — аргинин, 3 — лизин, 4 — гистидин, 5 — аспарагиновая кислота, 6 — глютаминовая кислота, 7 — гликокол, 8 — серин, 9 — аланин, 10 — α -аминомасляная кислота, 11 — тирозин, 12 — валин, 13 — метионин, 14 — лейцин, 15 — изолейцин, 16 — фенилаланин, 17 — треонин

На рис. 1 *Б* показана двумерная хроматограмма, полученная восходящим способом на ленинградской бумаге. Смесь состояла из 20 аминокислот. Пунктиром на рисунке отмечено местоположение аминокислот, не входящих в состав данной смеси, но обнаруженных в других опытах. В I направлении применялись метиловый спирт — вода — пиридин, во II — *n*-бутиловый спирт — метилэтилкетон — вода — диэтиламин.

В табл. 1 приведены значения R_f аминокислот, полученные для первого и второго направлений на двумерных хроматограммах на фильтровальной бумаге отечественного производства (не Ленинградской фабрики).

Таблица 1

Значения R_f для аминокислот на двумерной хроматограмме

Аминокислоты	Растворители		Аминокислоты	Растворители	
	1*	2**		1*	2**
1. Цистин	0,00	0,07	11. Тирозин	0,48	0,30
2. Аргинин	0,07	0,07	12. Валин	0,62	0,30
3. Лизин	0,07	0,13	13. Метионин	0,54	0,34
4. Гистидин	0,24	0,24	14. Лейцин	0,67	0,40
5. Аспарагиновая кислота	0,30—0,40	0,10	15. Изолейцин	0,67	0,43
6. Глютаминовая кислота	0,40—0,50	0,10	16. Фенилаланин	0,56	0,45
7. Гликокол	0,30	0,15	17. Треонин	0,46	0,36
8. Серин	0,35	0,21	18. Пролин	0,53	0,20
9. Аланин	0,50	0,19	19. Оксипролин	0,43	0,14
10. α -аминомасляная кислота	0,53	0,22	20. Триптофан	0,36	0,42

* Метиловый спирт — вода — пиридин (40 : 10 : 2).

** *n*-бутиловый спирт — метилэтилкетон — вода — диэтиламин (20 : 20 : 10 : 2).

Таким образом, как видно из рисунков, разделение аминокислот описанным нами способом не уступает общепризнанному методу разделения в феноле — «коллиндине», несмотря на то, что размер хроматограммы, изображенной на рис. 1 *А* — 56 × 60 см, а на рис. 1 *Б* 20 × 20 см. Следует также отметить, что время, необходимое для получения первой хроматограммы, во много раз больше, чем второй: время получения хроматограммы в феноле — «коллиндине» 4—5 дней (включая и удаление растворителей). Получение хроматограммы (рис. 1 *Б*) в описанной нами системе растворителей продолжалось вместе с удалением растворителей всего 15 часов. Кроме того преимуществом нового способа является возможность в одном опыте без дополнительных приемов обнаружить также серусодержащие аминокислоты — цистин, метионин (рис. 1 *Б* №№ 1 и 13).

Как видно на рис. 2 *А*, разделить полностью лейцин и изолейцин не удается, так как пятна тесно примыкают друг к другу. Однако идентифицировать их вполне возможно.

На рис. 2 представлены фотографии хроматограмм белковых гидролизатов, полученных в описанных нами системах растворителей. Как видно на рисунках, пятна лизина и аргинина (№№ 2 и 3), а также аспарагиновой и глютаминовой кислот (№№ 5 и 6) плохо разделились. Это объясняется значительной концентрацией гидролизата, нанесенного на бумагу, что неизбежно для выявления аминокислот, содержащихся в белке в небольших количествах (№№ 4, 10, 17). На рис. 2 *А* дана фотография хроматограммы кислотного гидролизата растительного белка, а на рис. 2 *Б* — ферментативного гидролизата животного белка, являющегося одной из основ питательных сред для выращивания микроорганизмов.

Таким образом, описанный метод пригоден для идентификации аминокислот в белковых гидролизатах — как кислотных, так и ферментативных. Он отличается большой простотой, быстротой выполнения и доступностью применяемых растворителей и аппаратуры. Растворители не требуют предварительной очистки, быстро и полно удаляются из бумаги. Для работы с ними не нужно особого помещения.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
 Академии наук СССР
 и Государственный контрольный институт
 сывороток и вакцин им. Л. А. Тарасевича
 Министерства здравоохранения СССР

Поступило
 13 III 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ R. R. Redfield, *Biochem., Biophys. Acta*, **10**, 344 (1953).

№	Исходный материал	№	Исходный материал
1	Лактоза	11	Лактоза
2	Лактоза	12	Лактоза
3	Лактоза	13	Лактоза
4	Лактоза	14	Лактоза
5	Лактоза	15	Лактоза
6	Лактоза	16	Лактоза
7	Лактоза	17	Лактоза
8	Лактоза	18	Лактоза
9	Лактоза	19	Лактоза
10	Лактоза	20	Лактоза

Таблица 1. Результаты анализа гидролизатов лактозы. В таблице приведены данные по содержанию аминокислот в гидролизатах лактозы, полученных различными методами. В таблице 1 приведены данные по содержанию аминокислот в гидролизатах лактозы, полученных различными методами. В таблице 1 приведены данные по содержанию аминокислот в гидролизатах лактозы, полученных различными методами.