

Su^F
M,
EINIGE NEUE LAUFMITTEL MIT sek.—BUTANOL—
STATT n-BUTANOLSYSTEM ZUM NACHWEIS VON
AMINOSAEUREN IN DER PAPIERCHROMATOGRAPHIE

(Kâğıt Kromatografisi yardımıyla Aminoasid'lerin tayini için n-Butanol sistemi yerine sek-Butanol sistemi kullanılarak elde edilmiş birkaç yeni Solvent)

M. Münip YEĞİN

(Çekmeze Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi)

Zum Nachweis geringster Aminosaeuremengen wurden verschiedene Laufmittel verwendet (1,2,3,4,5), von denen das beste das n-Butanol-System nach WOIWOD war (6,7,8). Doch auch damit konnte man keine guten Ergebnisse erzielen. Daher wurden von uns über 100 neue Laufmittel ausprobiert, und statt des n-Butanol-Systems wurde das sek-Butanol-System verwendet, damit wir in isotonischer NaCl-Lösung in kurzer Zeit austretende bis 1 mmeg freie Aminosaeuremengen von Hefezellen in der Papierchromatographie auch quantitativ feststellen und den Alter von Hefezellen richtig schätzen können.

Die hergestellten neuen Laufmittel sind mit Y (YeğİN) bezeichnet und numeriert. Die Chromatographie-Gefaesse sind mit dem gleichen Laufmittel gesättigt. Nachweis durch Ninhydrin-Kupferreagenzien (1,6,9.) Vergleichende Rf-Werte von einigen Aminosaeuren sind auf Tabelle I angegeben.

Maya Hücreleri (*Saccharomyces Cerevisia*) üzerinde yapılması kararlaştırılan bazı biyolojik araştırmalar münasebetiyle, ele geçen hücrelerin daima aynı tazelikte olup olmadıklarının bilinmesi elzem bulunuyor idi. Biz, Fabrikadan her sabah yeni Ürün kaydıyla aldığımız Mayalarda tazelik kontrolünü, onlardan kısa süre içinde dışarıya itrah olunan serbest Aminoasid miktarlarını tesbit etmek suretiyle yaptık.*)

(*) I. Bize muntazaman taze Maya hediye eden (ERNST SANDVOOS/München 54) Firmasına alenen teşekkür ederiz.

II. Bu Mesai, Almanya (Institut f. Biologie der Gesell. f. Strahlenforschung) Neuherberg'de yapılmıştır.

Lâboratuvar Analizlerinde hassasiyet bakımından ön sırayı muhafaza etmese bile, büyük bir değer taşıyan kromatografi metodları tetkik edildi; Kâğıt Kromatografisi tercih olundu. Literatürde kayıtlı olup Aminoasidler için kullanılan Solventler teker teker denendi (1,2,3,4,5), bunlardan maksada en uygun gibi görüneni WOIWOD'un Solventleri idi. (6,7,8). Fakat biz, daha iyi bir Solventin bulunabileceğine kani olduğumuzdan, 100 den fazla yeni sistemler teşkil ederek, daha iyi sonuç almağa çalıştık. Neticede, maya hücrelerinden itrah olunan 9 serbest Aminoasid'in herbireri vazih bir şekilde ve 1 mmcgr miktarları dahi kolorimetrik ölçmelerde tesbit edilebilir durumda olan, yeni Solvent sistemleri elde ettik. Bunları Y harfi ile işaretleyip sayıları 4 olduğundan, 1 den 4 e kadar numaraladık. Aminoasid'lerin Kromatogram üzerindeki yerlerini ve birbirlerine nazaran mesafelerini gösteren Rf kıymetlerini tesbit ederek, bu yönden WOIWOD'un Solventi ile bir karşılaştırma yaptık. 1 No. lu Cedvelde, adı geçen izahat mevcuttur.

Kromatografi Tankı cam'dan mamul bulunmaktaydı. Kapağı şilifli olup hafif vaselin ile yağlanmıştı. Kâğıt olarak Schleicher-Schüll No. 2043 b Mgl kullanıldı. Kâğıtlar önce impregne edilmedi ve hiçbir ön muameleye tabi tutulmadı. Kromatografi Tanklarının içine, Kâğıtlar konulmadan evel bir miktar aynı Solvent dökülerek havası doymuş duruma getirildi.

Kromatogramlara tatbik edilen, içinde Aminoasid aranan Eriyikler aynı en ve boyda çizgiler şeklinde tatbik olundu ve bir Saç kurutma cihazıyla, tatbikatın sür'atlenmesi için kurutma işlemi yürütüldü.

Solvent ve Kâğıt, Tank içine konup kapağı kapatıldıktan sonra, Kromatogramların Solvent tarafından kat edilmiş süresi, hemen hemen 20 Saat'lik bir zaman almaktadır. Sonra dışarı alınan Kromatogramlar, en az 24 Saat oda ısısında kurutulmalıdır. Kâğıtlar iyi kurutulmamışsa, neticelerin hassasiyeti bozulur.

Cedvel No. 1

Maya hücrelerinden izah oldukları tesbit edilen 9 Aminoasid'in WOIWOD'un n-Butanol Sistemi ile YEĞİN'in sekonder-Butanol Sistemleri altında Kâğıt Kromatografisindeki Rf-kıymetlerini göstermektedir.

Amino Asid çeşitleri	Solventler ve Rf-Kıymetleri					
	1. nci Cihaz			2. nci Cihaz		
	W ₁	Y ₁	Y ₂	W ₂	Y ₃	Y ₄
Cystin	0,06	0,01	0,02	0,01	0,12	0,06
Lysin	0,12	0,05	0,05	0,03	0,19	0,10
Glykokoll	0,20	0,13	0,13	0,07	0,23	0,22
Threonin	0,24	0,18	0,19	0,09	0,29	0,30
Alanin	0,29	0,27	0,23	0,22	0,35	0,37
Tryptophan	0,42	0,29	0,31	0,30	0,43	0,40
Methionin	0,44	0,41	0,40	0,20	0,50	0,47
Valin	0,48	0,47	0,45	0,19	0,56	0,52
Leucin	0,60	0,60	0,57	0,40	0,67	0,58

A  ı k l a m a : W (WoIWod) , Y (Yeğın)

W₁ = n-Butanol/Eisessig/Wasser = 25:6:25, (V/V).

W₂ = n-Butanol/Aethylmethylketon/Wasser = 2:2:1, (V/V).

Y₁ = Sek.-Butanol/Eisessig/Wasser = 5:1:1 (V/V); pH = 2,7.

Y₂ = Sek.-Butanol/Eisessig/Wasser = 50:15:10 (V/V); pH = 2,3.

Y₃ = Sek.-Butanol/Eisessig/Aethylmethylketon/Wasser = 3:2:1:1 (V/V).

Y₄ = Sek.-Butanol/Eisessig/Aethylmethylketon/Wasser = 2:4:3:1 (V/V).

Kromatogramlar iki Cihetli (dimensiyonlu) olarak hazırlanmış olup, W_1 ve W_2 de Tanklar $4n-NH_4OH$ ile meşbu hale getirilmiştir. (Y Solventlerinde, Tanklar aynı Solventle doyurulmuştur).

Kromatogramın yapılış tarzı : Yukarıdan aşağı (absteigende).

Kurutulmuş olan Kromatogramlarda Aminoasidlerin tesbit ve tayinleri için aşağıdaki Ninhydrin-Bakır Kompleksi Reaktifleri kullanılmıştır (1,6,9):

A. Ninhydrin Reaktifi :

- 1) 0,2 gr Ninhydrin (E. Merck)
100 ml n-Butanol içinde eritildi.
- 2) 12 ml Glasiyal Acetik Acid (E. Merck)
88 ml Distille Su ile karıştırıldı.

1 No. lı Reaktiften 95 ml ve 2 No. lı Reaktiften de 5 ml alınıp bir Pulvarizatör içinde iyice karışması temin edildikten sonra, Kromatogram üzerine muntazam olarak püskürtüldü ve nemli Kromatogram hemen $105^{\circ}C$ lik Soba içine konulmak suretiyle 10 dakika kadar kurutuldu. Bu müddet zarfında Aminoasidler, turuncu renkte Lekeler ile belirmektedirler, fakat bu renk bir kaç gün zarfında hafiflemeğe başladığından, Kromatogramların ikinci bir muameleye tâbi tutulmaları icabetmektedir.

B. Bakır Reaktifi :

1 ml doymuş Cupfernitrat (Riedel de Heän) Eriyiği ile 0,02 ml Nitrik Asid (Salpetersäure p.A. E. Merck), Aceton içinde 100 ml ye tamamlanır.

Ninhydrin Reaktifi ile hazırlanan Kromatogramlar, bir düz ve dar Küvet içinde, bu Bakır Reaktifi ile tam ıslanır ve sonra oda ısısında 30 dakika kadar karanlıkta bırakılır. Bu takdirde Aminoasidlerin görünüşü, muhtelif nuanslarda koyu Kavun-içi sabit renge döner.

Kâğıt üzerindeki bu renkli alanlar aynı büyüklükte kesilmek ve n-Methanol içinde eritmek suretiyle, Standart kıymetler karşısında kolorimetrik olarak ölçülüp kantitatif tayinleri yapılır.

Standard olarak SCHUCHARD ve SERVA Firmalarından temin olunan saf Aminoasidler, Serum Fizyolojikte eritilerek ve eşit konsantrasyonda karıştırılarak, benzeri karışımlar şeklinde kullanıldı.

SONUÇLAR : İzotonik NaCl (0,009) içersinde üç defa yıkandıktan sonra, dördüncü yıkantısının kromatografisinde, Maya Hücrelerinin izotonik Vasatta 9 serbest Aminoasid bıraktıkları ve bunların miktarlarında, Hücrelerin bekletilişleri nisbetinde bir artış olduğu tesbit edildi Hücrelerin Vasatta bekletiliş süresi 10 dakika olarak sabit tutulduğundan.

da, aynı maya topağından alınıp oda ısısında bekletilen ve 1., 2., 4. ve 6. ncı günlerde aynı muamele ile analizleri yapılan Maya Hücrelerinden ıtrah olunmuş Aminoasid çeşit ve miktarları 2 No. lı Cedvelde gösterilmiştir.

Cedvel No. 2

Saccharomyces Cerevisia Hücrelerinin oda ısısında bekletildikleri günler zarfında, eskimişlik derecelerine göre, ıtrah ettikleri serbest Aminoasid miktarlarını göstermektedir.

Sıra No.	Amino-Asidler	Analiz Sayısı	Eskiliklerine göre vasatı Aminoasid miktarları (Micro Mol/Gram Maya Hücresi)			
			1.nci Gün	2.nci Gün	4.ncü Gün	6.nci Gün
1	Cystin	30	3,0	4,1	4,6	5,0
2	Lysin	32	4,6	4,9	5,4	5,8
3	Glykokoll	32	4,9	5,5	5,6	6,0
4	Threonin	34	5,0	5,8	6,0	6,5
5	Alanin	34	4,2	5,9	6,1	6,6
6	Tryptophan	32	3,4	4,0	4,3	4,8
7	Methionin	30	6,0	6,5	6,6	6,9
8	Valin	33	3,4	3,8	4,0	4,5
9	Leucin	32	3,1	4,0	4,3	4,9

2 No. lı Cedvelde görüleceği gibi, Hücrelerden Aminoasidlerin ıtrah miktarları bakımından fazlalık sırasına göre: Başta 6,9 mc.Mol/Gram Maya ile Methionin gelmekte ve müteakiben Alanin, Threonin, Glikokoll, Lysin, Cystin, Leucin, Tryptohan ve nihayet 4,5 mc.Mol/Gram Maya ile Valin bulunmaktadır. Cedveldeki Numarotaj, Rf-Kıymetlerine göredir.

Yukarıda, 6. ncı güne kadar analize tabi tutulan maya Hücrelerindeki miktarlar dile getirilmiştir. Daha taze olan Hücrelerdeki Aminoasid ıtrah miktarları da hemen hemen bunlara paralel bir seyir takip etmektedirler. 1. gün ile 6. gün arasındaki miktalar, ortalama olarak birbirlerinden %60 farklıdır.

Literatür kayıtlarında da Maya Hücrelerinin Protein yapılarında bu 9 Aminoasidin mevcut olduğu yazılıdır ve miktarları, arama metod-