

---

Milena Vujović

## Hromatografska i spektrofotometrijska analiza aminokiselina – poređenje i primenljivost

---

*Ispitavana je primena novog metoda obrade podataka u spektrofotometrijskoj i hromatografskoj analizi smeša aminokiselina (leucina, alanina i treonina). Vršeno je i ispitivanje smeša metodom tankoslojne hromatografije, ali zbog niskih koncentracija aminokiselina nisu dobijeni zadovoljavajući rezultati. Analize su vršene na ninhidrinskim i fenilizotiocijan-nim derivatima aminokiselina. Pokazano je da ninhidrin nije pogodan derivatizujući reagens za primenu ovog metoda. Spektrofotometrijska analiza fenilizotiocijan-nih derivata aminokiselina nije dala očekivane rezultate. Međutim, poređenjem hromatograma ovako derivatizovanih aminokiselina utvrđena je veza između visine i redosleda hromatografskih pikova pojedinačnih aminokiselina i sastava njihovih smeša. Na osnovu tih rezultata može se zaključiti da je ovaj način prikazivanja rezultata primenljiv za analizu dvo- i trokomponentnih smeša aminokiselina.*

---

### Uvod

Spektrofotometrijski metodi omogućavaju jednostavno određivanje koncentracije ispitivanih supstanci. Zasnivaju se na merenju intenziteta emitovane svetlosti  $I_0$  i svetlosti koja prolazi kroz uzorak, tj. apsorbovane svetlosti  $I_t$ . Po Ber-Lambertovom zakonu apsorbanca ( $\log \frac{I_0}{I_t}$ ) je srazmerna koncentraciji supstance:

$$\log \frac{I_0}{I_t} = a \times c \times l$$

gde je  $c$  – koncentracija supstance,  $a$  – molarni apsorpcioni koeficijent, a  $l$  – debljina sloja kroz koji

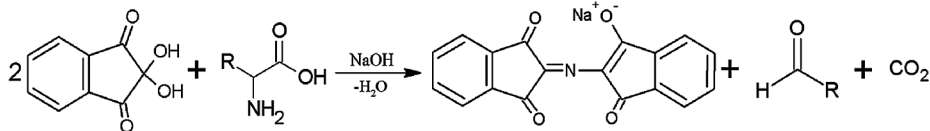
prolazi zrak svetlosti izražen u centimetrima (debljina kivete) (Vogel 1989). Spektrofotometrija se može koristiti pri određivanju koncentracije pojedinačnih supstanci i višekomponentnih smeša. Jedna od mana ovog metoda se može uočiti upravo pri analizi višekomponentnih smeša. Ukoliko jedinjenja od kojih se sastoje imaju apsorpcione maksimume na bliskim talasnim dužinama, dolazi do tzv. preklapanja pikova što onemogućava precizno određivanje koncentracije. Precizniji metod kvantitativne i kvalitativne analize je tačna hromatografija visokih performansi (HPLC), koja omogućava razdvajanje komponenti smeše pre njihovog snimanja UV/Vis detektorom.

Međutim, ispitivanje smeša hromatografskim metodom često zahteva skupocenu aparaturu, za razliku od spektrofotometrije koja je pristupačnija. Aminokiseline su jedinjenja koja imaju apsorpcione maksimume na bliskim talasnim dužinama, tako da je njihovo određivanje spektrofotometrijski dosta otežano. Postoji 20 proteinogenih aminokiselina ( $\alpha$ -aminokiselina), tj. onih koje ulaze u sastav proteina. Proteini su kopolimeri  $\alpha$ -aminokiselina koje su kovalentno povezane amidnom vezom – peptidnom vezom i razlikuju se međusobno po broju i sekvenci aminokiselina (Hughes 2011). Identifikacija primarne strukture proteina, tj. sekvencioniranje polipeptida, ima primenu u određivanju mehanizma biološkog dejstva proteina. Bitan korak pri sekvencioniranju polipeptida je određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava smeše aminokiselina koje se dobijaju. Aminokiseline su uglavnom dobro rastvorne u vodi i njihovi rastvori su bezbojni (Vogel 1989). Najpogodniji metod za određivanje aminokiselina je HPLC, pri čemu aminokiseline moraju prethodno biti derivatizovane (Molnár-Perl 2005). One su karboksilne kiseline koje u svom molekulu sadrže amino-grupu (Vollhardt i Schore 1997), na osnovu koje je moguće izvršiti njihovu derivatizaciju. Najčešće se primenjuje pretkolonska derivatizacija jer zahteva manje aparature.

---

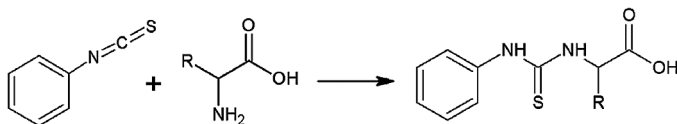
Milena Vujović (1993), Beograd, Stevana Dukića 51, učenica 4. razreda XII beogradske gimnazije

MENTOR: mr Zoran Milićević, dipl. hemičar  
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd



Slika 1. Ninhidrijska reakcija

Figure 1. Ninhydrin reaction



Slika 2. Reakcija derivatizacije aminokiselina fenilizotiocijanatom (PITC)

Figure 2. Derivatization of amino acids with phenylisothiocyanate

Detekcija aminokiselina u vidljivom delu spektra je moguća uz derivatizaciju ninhidrinom, pri čemu se dobijaju jedinjenja ljubičaste boje, tzv. Ruhemanovo ljubičasto (slika 1). Derivatizacijom aminokiselina fenilizotiocijanatom, pri čemu se dobijaju PTC derivati (slika 2) omogućena je detekcija u UV delu spektra.

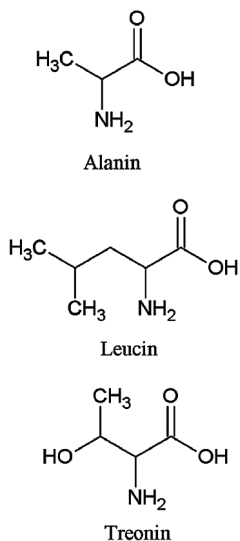
U radu su ispitivane smeše tri aminokiseline: alanina, leucina i treonina (slika 3).

Cilj rada je pokušaj primene novog načina obrade podataka na spektrofotometrijsku analizu aminokiselina i poređenje ovako dobijenih rezultata sa rezultatima HPLC analize, izračunavanje koncentracija aminokiselina u smeši na osnovu poređenja hromatograma i, na kraju, poređenje ova dva metoda i sa tankoslojnom hromatografijom.

## Materijali i metod

### Aminokiseline derivatizovane ninhidrinom

Prvo su napravljeni rastvori standarda aminokiselina alanina, treonina i leucina u fiziološkom rastvoru (0.9% NaCl) tri koncentracije:  $10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>,  $10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup> i  $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>, potom dvokomponentni i trokomponentni rastvori aminokiselina u tri koncentracije:  $10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>,  $10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup> i  $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>. Ođmereno je po 2 mL svakog od rastvora i u svaki je dodato po 5 mg ninhidrina. Zatim su rastvori zagrevani na špiritusnoj lampi do promene boje u ljubičasto. Kako je pri zagrevanju dolazilo do isparavanja rastvarača, uzorci su kvantitativno preneti u normalne sudove od 5 mL i razblaženi tako da su dobijeni rastvori koncentracija:  $4 \times 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>,  $4 \times 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> i  $4 \times 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>. Apsorpcioni spektri ovako dobijenih rastvora su snimani na spektrofotometru (CINTRA 10 UV/Visible Spectrometer) u opsegu talasnih dužina od 450 do 600 nm, a očitavanja su vršena sa otvorom reza od 2 nm. Takođe, dvokomponentni i trokomponentni



Slika 3. Strukturne formule alanina, leucina i treonina

Figure 3. Structural formulae of alanine, leucine and threonine

Tabela 1. Rastvori aminokiselina u molском odnosu i zapreminskom odnosu

Redni broj	Odnos aminokiselina	Zapremina rastvora [mL]		
		Alanin (Ala)	Treonin (Thr)	Leucin (Leu)
1.		0.5	–	–
2.		–	0.5	–
3.		–	–	0.5
4.	Ala : Thr = 1 : 1	0.25	0.25	–
5.	Ala : Thr = 2 : 1	0.33	0.17	–
6.	Ala : Thr = 1 : 2	0.17	0.33	–
7.	Ala : Leu = 1 : 1	0.25	–	0.25
8.	Ala : Leu = 1 : 2	0.17	–	0.33
9.	Ala : Leu = 2 : 1	0.33	–	0.17
10.	Thr : Leu = 1 : 1	–	0.25	0.25
11.	Thr : Leu = 2 : 1	–	0.33	0.17
12.	Thr : Leu = 1 : 2	–	0.17	0.33
13.	Ala : Thr : Leu = 1 : 1 : 1	0.17	0.17	0.17

uzorci aminokiselina su snimani i razrezom 0.24 nm, da bi se poredila preciznost i tačnost metoda za dobijanje koncentracije pojedinačnih aminokiselina u dvokomponentnim i trokomponentnim rastvorima.

Nakon toga su pripremljeni rastvori standarda aminokiselina alanina, leucina i treonina u fiziološkom rastvoru koncentracije  $10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> i u svaki je dodato po 3.56 mg ninhidrina. Rastvori su upareni do suva i razblaženi tako da su dobijeni rastvori derivatizovanih aminokiselina iste koncentracije ( $10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>). Od njih su dobijeni pojedinačni rastvori sve tri aminokiseline, dvokomponentni i trokomponentni rastvori u tri koncentracije:  $10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>,  $10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup> i  $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>. Svi uzorci su hromatografisani na tečnom hromatografu visokih performansi (HP-1050 UV/Vis), na C-18 koloni (4.6 mm × 250 mm × 5 μm), eluentom sastava MeCN : H<sub>2</sub>O = 40 : 60 u izokratskom režimu na sobnoj temperaturi. Snimanje je vršeno na talasnoj dužini od 567 nm.

Rastvori aminokiselina su podvrgnuti i tankoslojnoj hromatografiji (Silica gel, G60, MERCK), međutim promena boje nije uočena, jer su koncentracije bile premale da bi se izazvao hromatogram.

### Aminokiseline derivatizovane fenilzotiocijanatom

Rastvorene su aminokiseline treonin, leucin i alanin (3 mg, 3.5 mg i 2.25 mg) u po 100 mL destilovane vode, tako da su dobijeni rastvori koncentracija  $C = 2.52 \times 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>. Potom su napravljene

dvokomponentne i trokomponentne smeše, tako da je ukupna zapremina rastvora 0.5 mL, i to na način prikazan u tabeli 1.

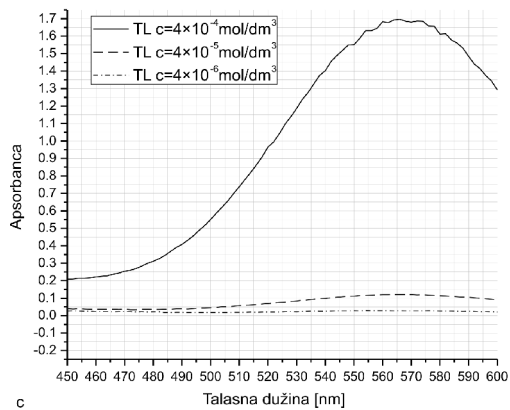
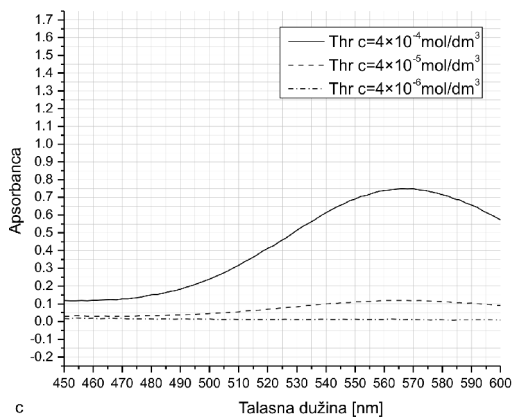
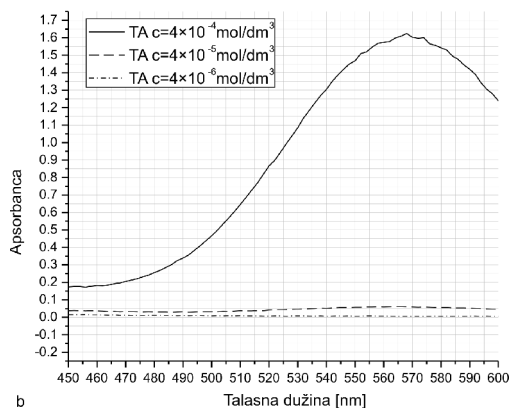
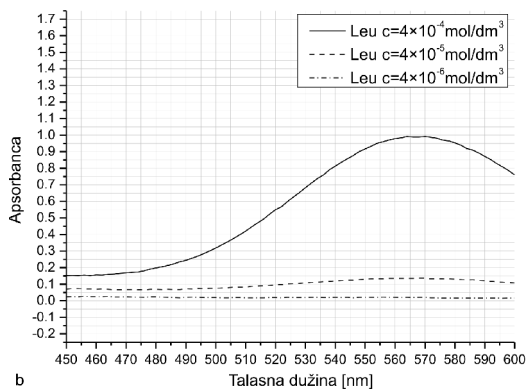
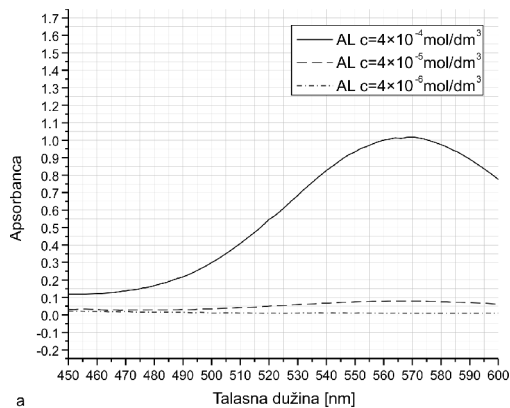
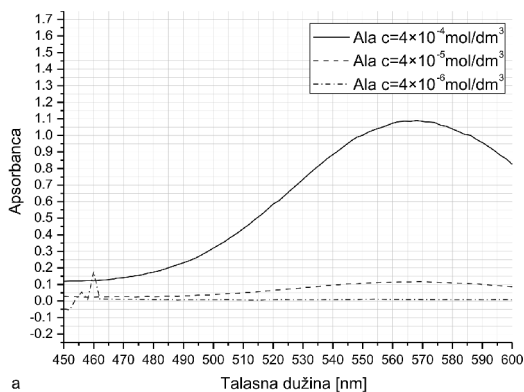
Pripremljeni rastvori su potom kuplovani dodatkom 0.52 mL rastvora za kuplovanje (MeCN (acetonitril) : C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N (piridin) : N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (triethylamin) : voda = 10 : 5 : 2 : 3). Zatim je dodato 0.05 mL fenilzotiocijanata (PITC) i rastvori su ostavljeni da stoje 24 časa. Nakon toga snimani su apsorpcioni spektri na spektrofotometru (Shimadzu UV/Vis 2100) u opsegu talasnih dužina od 250 do 350 nm sa otvorom razreza 0.5 nm. Potom su uzorci hromatografisani na tečnom hromatografu visokih performansi (HP-1050 UV/Vis), na C-18 koloni (4.6 mm × 250 mm × 5 μm), eluentom sastava MeCN : H<sub>2</sub>O = 40 : 60 u izokratskom režimu na sobnoj temperaturi. Očitavanje signala je vršeno na talasnoj dužini 254 nm.

Tankoslojna hromatografija PTC-derivata aminokiselina nije rađena; kako su ovi derivati bezbojni, mrlje se ne bi videle.

## Rezultati i diskusija

### I Aminokiseline derivatizovane ninhidrinom

Rezultati dobijeni snimanjem aminokiselina na spektrofotometru (CINTRA 10 UV/Visible Spectrometer) u opsegu 450–600 nm sa otvorom razreza 2 nm prikazani su na slikama 4, 5 i 6.

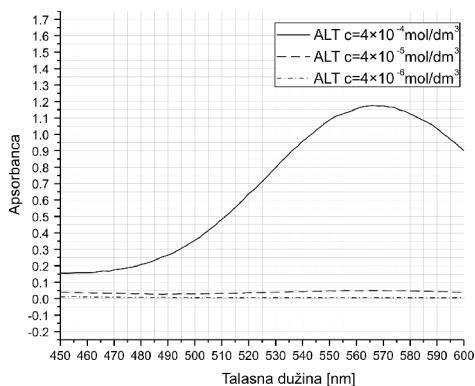


Slika 4. Apsorpcioni spektar rastovora alanina (a), leucina (b) i treonina (c)

Figure 4. Absorption spectra of alanine (a), leucine (b) and threonine solution (c)

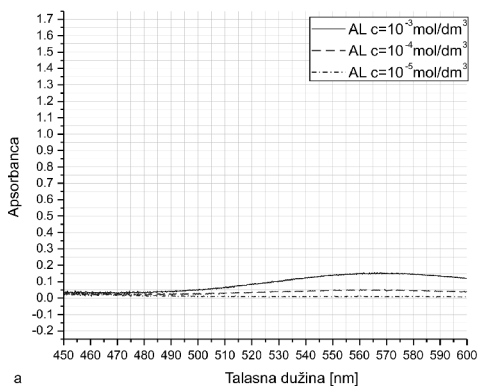
Slika 5. Apsorpcioni spektar rastovora alanina i leucina (a), treonina i alanina (b) i treonina i leucina (c) snimljeni sa otvorom razreza 2 nm

Figure 5. Absorption spectra of alanine and leucine solution (a), threonine and alanine (b), and threonine and leucine (c), obtained with a 2 nm slit

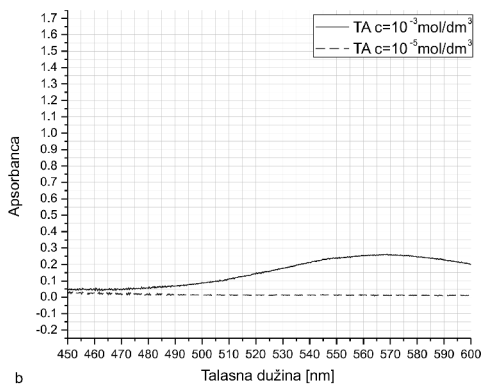


Slika 6. Apsorpcioni spektar rastvorâ alanina, leucina i treonina

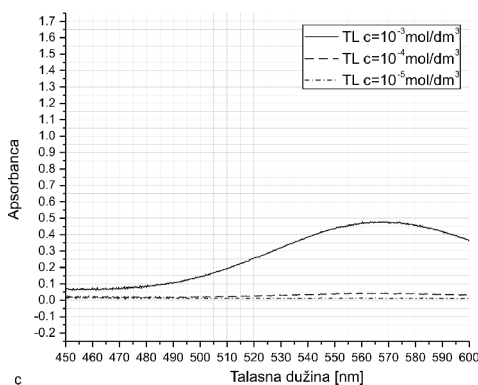
Figure 6. Absorption spectra of alanine, leucine and threonine solutions



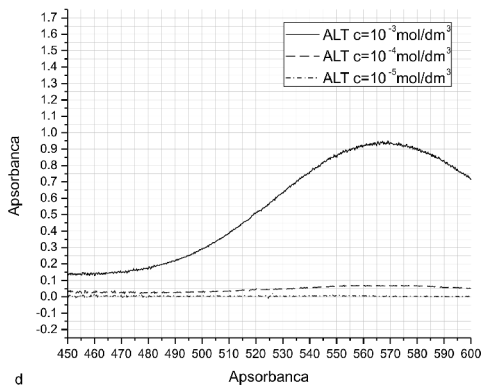
a



b



c



d

Slika 7. Apsorpcioni spektar rastvorâ alanina i leucina (a), treonina i alanina (b) i treonina i leucina (c) i rastvora alanina, leucina i treonina (d) snimljeni sa otvorom razreza 0.24 nm

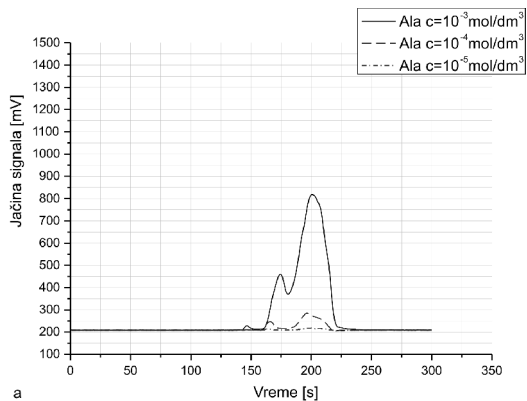
Figure 7. Absorption spectra of alanine and leucine solution (a), threonine and alanine solution (b), threonine and leucine solution (c), and alanine, leucine and threonine solution (d), obtained with a 0.24 nm slit

Rezultati dobijeni snimanjem apsorpcionih spektara aminokiselina na spektrofotometru (CINTRA) u opsegu talasnih dužina od 450 do 600 nm sa otvorom razreza od 0.24 nm prikazani su na slici 7.

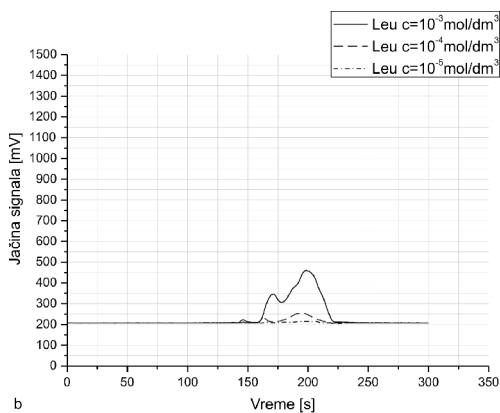
Pokazano je da spektrofotometrija nije pogodan metod za kvantifikaciju rastvora aminokiselina derivatizovanih ninhidrinom čije su koncentracije niže od  $C = 0.001 \text{ mol/dm}^3$ .

Rezultati dobijeni hromatografisanjem rastvora aminokiselina na tečnom hromatografu visokih performansi na talasnoj dužini 567 nm prikazani su na slikama 8, 9 i 10.

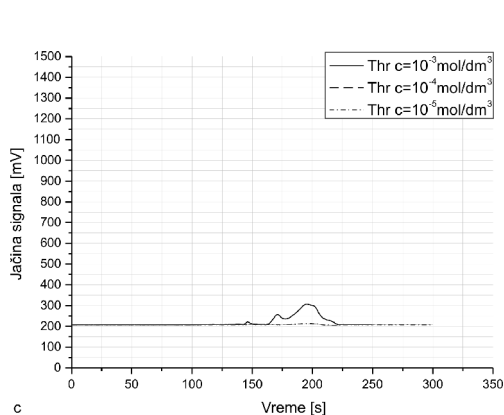
Tokom istraživanja je primećeno da rastvor treonina prelazi iz ljubičaste u narandžastu boju, što ukazuje na to da se treonin derivatizovan ninhidrinom razgrađuje, što potvrđuje slika 8c.



a



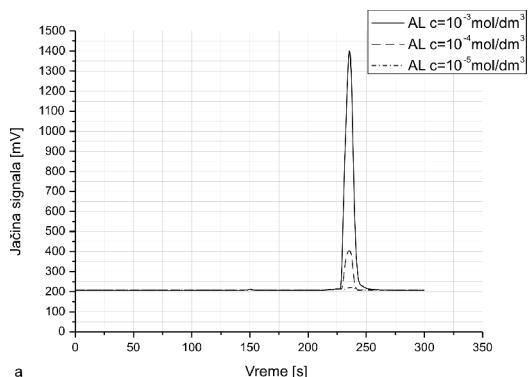
b



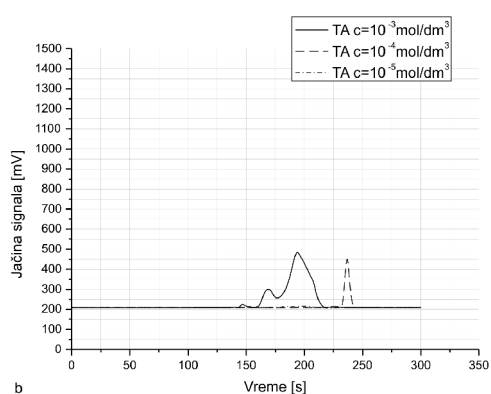
c

Slika 8. Hromatogram rastvora alanina (a), leucina (b) i treonina (c)

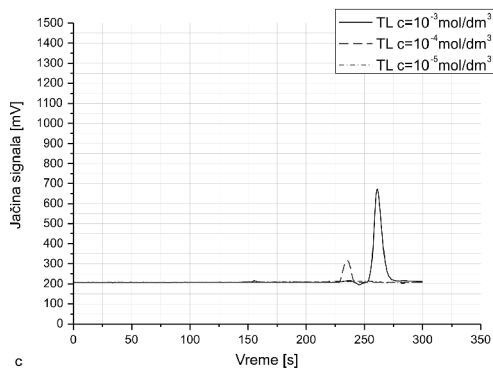
Figure 8. Chromatogram of alanine solution (a), leucine solution (b), and threonine solution (c)



a



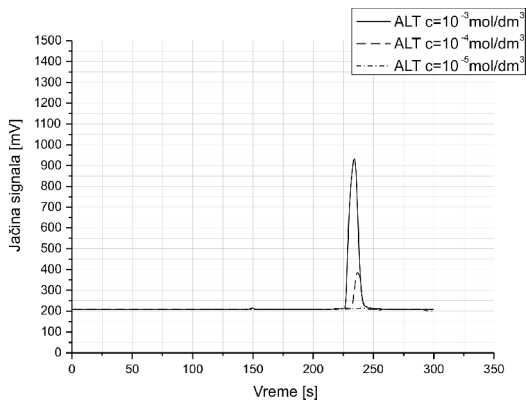
b



c

Slika 9. Hromatogram rastvora alanina i leucina (a), treonina i alanina (b) i treonina i leucina (c)

Figure 9. Chromatogram of alanine and threonine solution (a), threonine and alanine solution (b), and threonine and leucine solution (c)



Slika 10. Hromatogram rastvorâ alanina, treonina i leucina

Figure 10. Chromatogram of alanine, threonine and leucine solution

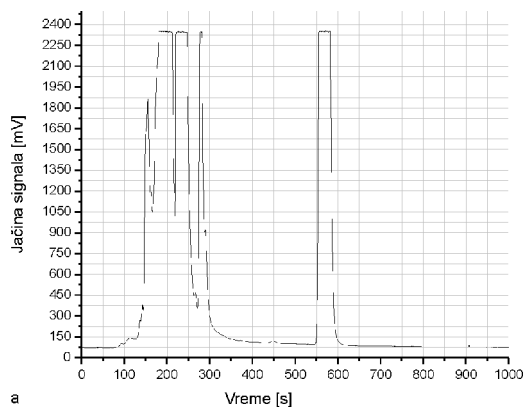
Nije primećena veza između grafika dobijenih spektrofotometrijski i hromatografski, kao ni koncentracija aminokiselina, i stoga se zaključuje da ninhidrin nije dobar derivatizujući reagens za ove metode.

## II Aminokiseline derivatizovane fenilzotocijanatom

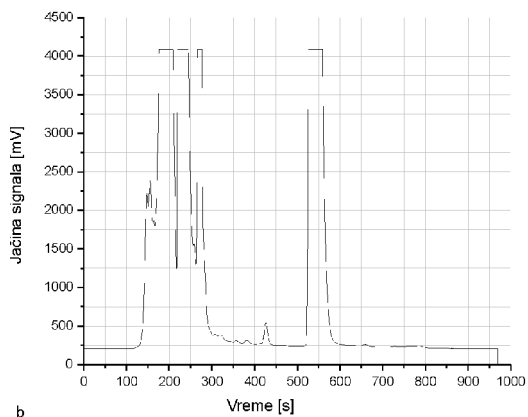
Rastvori su analizirani na spektrofotometru (Shimadzu UV/Visible recording spectrophotometer UV/Vis 2100) u opsegu talasnih dužina od 250 do 350 nm sa otvorom razreza 0.5 nm. Međutim, ovako dobijeni spektri se nisu mogli obraditi, jer pikovi nisu bili dovoljno razdvojeni.

Rezultati dobijeni hromatografisanjem rastvora aminokiselina na tečnom hromatografu visokih performansi na talasnoj dužini 254 nm prikazani su na slikama 11, 12, 13, 14 i 15.

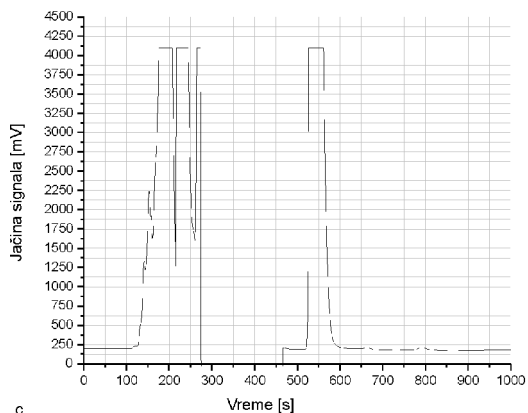
Utvrđena je veza između visine i redosleda hromatografskih pikova pojedinačnih aminokiselina i sastava njihovih smeša. Za utvrđivanje korelacije korišćena je visina pika, zato što je došlo do visokog stepena preklapanja hromatografskih pikova u smešama, pa zbirna površina tako dobijenih pikova nije mogla da se koristi u ovu svrhu. Na osnovu visina pikova u jednokomponentnim rastvorima izračunat je „odgovor detektora po jediničnoj koncentraciji svake aminokiseline”. Na osnovu tako dobijenih vrednosti za svaku aminokiselinu izračunate su teorijske vrednosti visina pikova u dvo- i trokomponentnim smešama sabiranjem pojedinačnih vrednosti za svaku aminokiselinu.



a



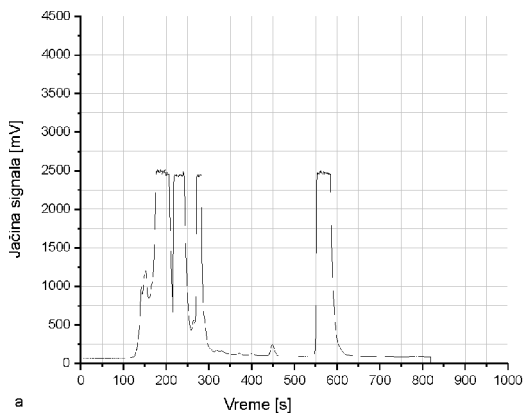
b



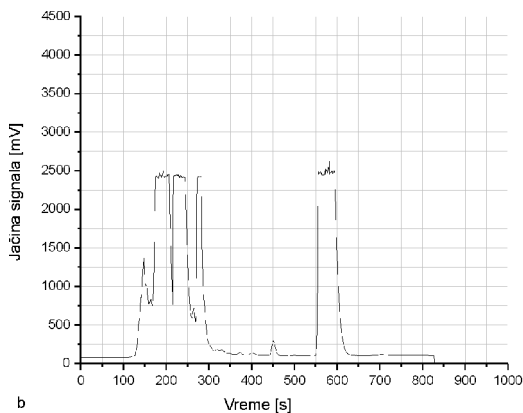
c

Slika 11. Hromatogram rastvora alanina (a) leucina (b) i treonina (c)

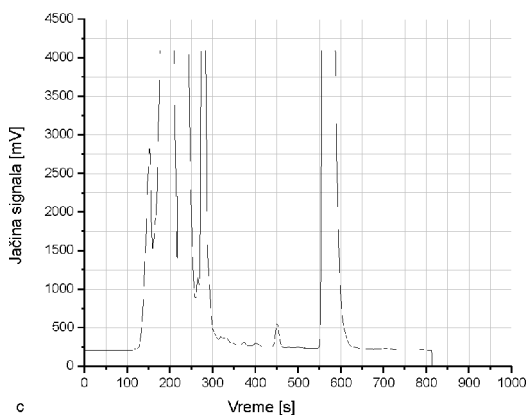
Figure 11. Chromatogram of alanine solution (a), leucine solution (b) and threonine solution (c)



a



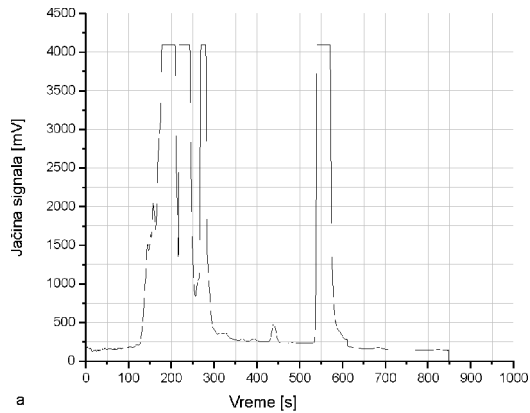
b



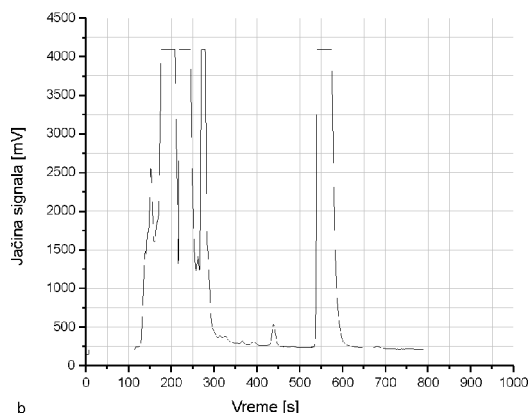
c

Slika 12. Hromatogram rastvora alanina i leucina u odnosu 1 : 1 (a), 2 : 1 (b) i 1 : 2 (c)

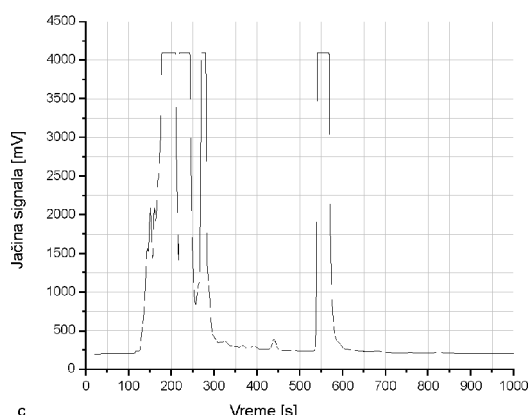
Figure 12. Chromatogram of alanine and leucine solution in ratio 1 : 1 (a), 2 : 1 (b) and 1 : 2 (c)



a



b

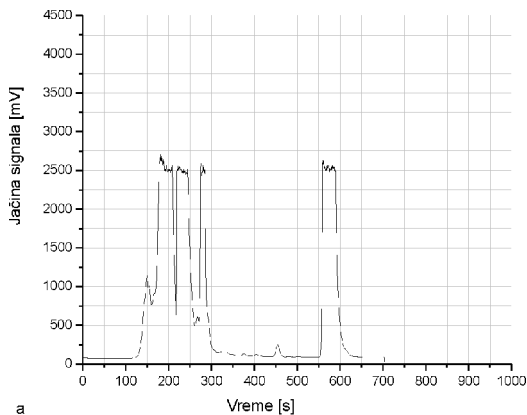


c

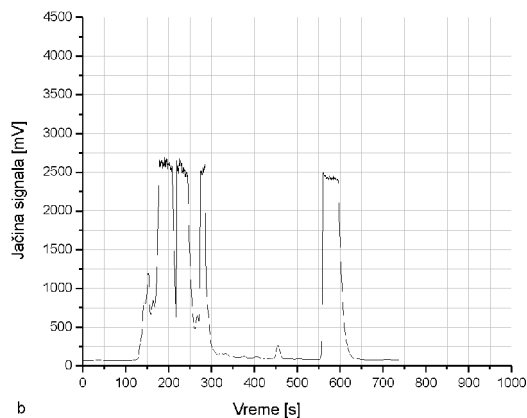
Slika 13. Hromatogram rastvora alanina i treonina u odnosu 1 : 1 (a), 2 : 1 (b) i 1 : 2 (c)

Figure 13. Chromatogram of alanine and threonine solution in ratio 1 : 1 (a), 2 : 1 (b) and 1 : 2 (c)

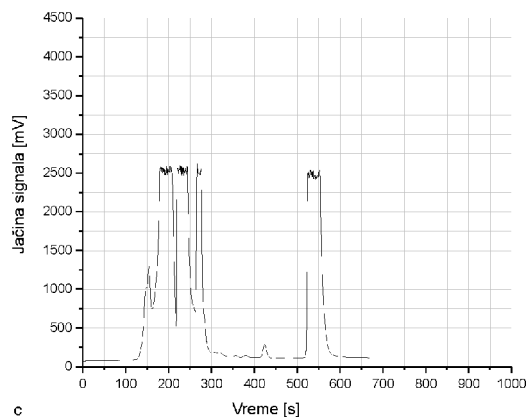




a



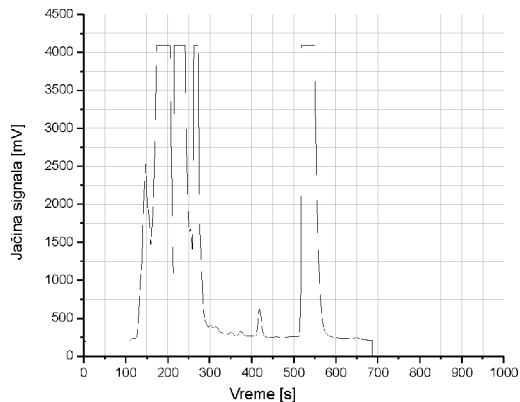
b



c

Slika 14. Hromatogram rastvora treonina i leucina u odnosu 1 : 1 (a), 2 : 1 (b) i 1 : 2 (c)

Figure 14. Chromatogram of threonine and leucine solution in ratio 1 : 1 (a), 2 : 1 (b) and 1 : 2 (c)



Slika 15. Hromatogram rastvora alanina, treonina i leucina (1 : 1 : 1)

Figure 15. Chromatogram of alanine, threonine and leucine solution (1 : 1 : 1)

Nakon toga je vršeno poređenje tih teorijskih visina pikova za smeše sa eksperimentalno dobijenim vrednostima i utvrđeno je slaganje u velikoj meri. Jedino odstupanje od tog slaganja je uočeno za smeše koje su injektirane u sekvenci dosta kasnije u odnosu na prve, pa se stoga pretpostavlja da je zbog stajanja došlo do određenog razlaganja PTC derivata. Iz svega toga stoga sledi da se injektiranje svih pripremljenih smeša mora završiti veoma brzo, zbog očigledne nestabilnosti na sobnoj temperaturi. Koeficijent srazmere između teorijske i eksperimentalne vrednosti ulazi unutar greški merenja.

## Zaključak

Utvrđeno je da ninhidrin nije pogodan derivatizujući reagens pri hromatografskoj i spektrofotometrijskoj analizi aminokiselina. Takođe, tankoslojna hromatografija ninhidrinskih derivata aminokiselina, kao i fenilzotocijanatnih, nije dala očekivane rezultate, tako da se nije mogla porediti sa druga dva metoda. Apsorpcione trake pojedinačnih aminokiselina dobijene snimanjem apsorpcionih spektara PTC-derivata aminokiselina nisu mogle da budu uočene, zbog šuma koji ih je prekrrio. Eksperimentalno je utvrđena veza između visine i redosleda hromatografskih pikova pojedinačnih aminokiselina i sastava njihovih smeša. Tako je pokazano da je ovaj način obrade podataka primenljiv na hromatografsku analizu aminokiselina. Problem pri analizi je predstavljala relativna

nestabilnost PTC-derivata aminokiselina, tako da se za dalja istraživanja predlaže optimizacija vremena između dva injektiranja ili korišćenje drugog derivatizujućeg reagensa. Pretpostavlja se da bi uvođenje drugog derivatizujućeg reagensa, moglo dovesti u vezu hromatografsku i spektrofotometrijsku analizu.

---

## Literatura

- Bernštejn I. Ya., Kaminskij Yu. L. 1975. *Spektrofotometričeskij analiz v organičeskoj himii*. Himiya, Leningradskoe otdelenie
- Hughes A (ur.) 2011. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*. New York: Wiley
- Lim C. K. (ur.) 1986. *HPLC of small molecules, a practical approach*. Oxford: IRL PRESS
- Molnár-Perl I. (ur.) 2005. *Quantitation of amino acids and amines by chromatography: methods and protocols*. Amsterdam: Elsevier
- Vogel A. I. 1989. *Vogel's Textbook of quantitative chemical analysis*. London: Longman Scientific & Technical
- Vollhardt K. P. C., Schore N. E. 1997. *Organska hemija*. Beograd: Hajdigrtaf

---

Milena Vujović

## Chromatographic and Spectrophotometric Analysis of Amino Acids: Comparison and Application

The application of a new method for interpreting data collected by spectrophotometric and chromatographic analysis of amino acids (leucine, alanine and threonine) was tested on solutions of single amino acids as well on two- and three-component mixtures. These solutions were also subjected to analysis by thin layer chromatography (TLC), however it did not give suitable results. Spectrophotometric and chromatographic analysis was performed on ninhydrin and phenylisothiocyanate derivatives of amino acids. It has been shown that ninhydrin is not a suitable derivatization reagent for the application of this method. Spectrophotometric analysis of phenylisothiocyanate amino acid derivatives did not yield the expected results. However, by comparing chromatograms of these derivatives of amino acids, a relation has been established between the height and sequence of chromatographic peaks of single amino acid solutions and the composition of their two- and three-component mixtures. On this basis, it can be concluded that this method for interpreting data is applicable on the analysis of two- and three-component mixtures of amino acids.

