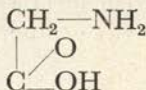


Mededeling uit het *Physiologisch-Chemisch Laboratorium der Rijks-Universiteit te Groningen*. (Dir.: Prof. Dr. R. Brinkman).

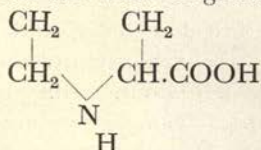
## Het aantonen van vrije aminozuren in speeksel met behulp van verdelingschromatografie op filtreerpapier

door S. Rosebeek

§ 1. Onder normale omstandigheden zijn de in de natuur voorkomende aminozuren zonder uitzondering  $\alpha$ -aminozuren; hierbij komt de  $-\text{NH}_2$ -groep voor aan het C-atoom naast de  $-\text{COOH}$ -groep. bv. amino-azijnzuur of glycine



Een enkele keer kan door ringsluiting de situatie anders lijken, zoals bij proline



maar het verband met  $\alpha$ -aminozuren is toch onmiskenbaar (iminocarbonzuur).

Het aantal aminozuren, dat met zekerheid bekend is bedraagt ongeveer 20 (1). Hieronder komen een aantal onmisbare voor nl. valine, leucine, isoleucine, lysine, arginine, methionine, threonine, phenylalanine, histidine, tryptophaan.

Door het organisme kunnen de andere aminozuren hieruit opgebouwd worden.

Men vindt deze aminozuren bv. bij de hydrolyse van eiwitten. Het

aantal aminozuren dat op deze manier ontstaat varieert met het bewuste eiwit; ook de hoeveelheden van ieder dezer aminozuren is van geval tot geval verschillend.

Een kwalitatieve — om niet te spreken van een kwantitatieve — analyse van een gecompliceerd aminozuurmengsel is uiterst lastig en tijdrovend. Gewoonlijk is men aangewezen op bepaalde fractioneringsmethoden en kleurreacties (2).

§ 2. Intussen heeft men ook de aanwezigheid van *vrije* aminozuren in verschillende vloeistoffen, zoals bv. urine (3) en speeksel (4) met zekerheid kunnen aantonen. Gedeeltelijk is dit mogelijk gemaakt door microbiologische methodes. Aan de andere kant moet men de verkregen resultaten echter grotendeels toeschrijven aan de omstandigheid dat men tegenwoordig de beschikking heeft over een analytische hulpmethode van buitengewone gevoeligheid — een gevoeligheid, die de alom bekende spectroscopische gevoeligheid zeer nabij komt.

Deze methodiek, die speciaal van Engelse zijde is ingevoerd (M a r t i n en S y n g e (5)), staat bekend onder de naam van partitie- of verdelingschromatografie.

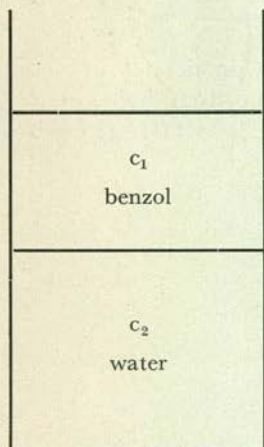


Fig. 1

§ 3. Om een indruk te geven van de grondslag van deze methode is het noodzakelijk om terug te grijpen op de evenwichtstoestand, die zich instelt, wanneer een vaste stof zich moet verdelen over twee niet-mengbare vloeistoffen.

In fig. 1 is aangegeven een tweefasensysteem, dat gevormd wordt door water en benzol. Wanneer een vaste stof toegevoegd wordt, dan lost deze gedeeltelijk in het water en voor de rest in het benzol op. Er ontstaat een evenwichtstoestand, die bekend staat onder de naam van verdelingsevenwicht.

Wanneer de concentratie van de opgeloste stof in benzol  $c_1$  en die in het water  $c_2$  is,

dan bestaat er een bepaalde verhouding van de vorm  $\frac{c_1}{c_2} = f$ , de zg. verdelingsconstante is. Deze wetmatigheid geldt voor verdunde oplossingen en onder deze restrictie, dat de molecuulgrootte van de opgeloste stof in beide fasen gelijk is (Wet van N e r n s t). Indien dit niet het geval is, moet het evenwicht iets anders geformuleerd worden. Dat er evenwel een bepaald verband tussen de concentraties blijft bestaan is voor de volgende beschouwingen het meest essentieel (6).



§ 4. Van het instellen van een verdelingsevenwicht maakt men bv. gebruik, wanneer men een in water aanwezige stof uitschudt met aether. Als deze stof ook in aether oplosbaar is, dan onttrekt men deze gedeeltelijk aan het water. Een voordeel van deze bewerking is dat men van de verkregen aetherische oplossing veel gemakkelijker het oplosmiddel kan verdampen. Bovendien kan men gemakkelijk apparaatjes construeren, waarmede deze extractie continu uitgevoerd kan worden.

Nu kan men a.h.w. deze extractie ook op filtreerpapier uitvoeren. Daartoe brengt men op een strook filtreerpapier een geringe hoeveelheid van een oplossing, die bv. aminozuren bevat.

Op de in fig. 2 aangegeven manier laat men vervolgens een bepaalde vloeistof door het papier heen diffunderen, door gebruik te maken van de capillaire krachten, die deze vloeistof uit een reservoir opzuigen.

Men moet er nu verder voor zorgen, dat de gehele opstelling zich bevindt in een afgesloten ruimte, die met waterdamp verzadigd is.

§ 5. Men moet zich voorstellen, dat de cellulose van het filtreerpapier een bepaalde hoeveelheid water bevat. Wanneer er een andere vloeistof doorheen diffundeert, moet men dus de instelling van een verdelingsevenwicht verwachten. Hierbij verdeelt zich de op het papier aangebrachte vaste stof tussen het water waarvan het filtreerpapier a.h.w. de drager is en de vloeistof, die men er doorheen laat diffunderen.

Een nadere wiskundige behandeling van het probleem toont aan dat het gevolg van het instellen van dit verdelingsevenwicht moet zijn, dat de opgeloste stoffen zich in betrekkelijk scherpe zónes afzetten (7). Op deze manier wordt dus een scheiding verkregen van de opgeloste stoffen — men zegt in zo'n geval dat er een chromatogram gevormd is. Het is waarschijnlijk zo, dat dit chromatogram al ontstaat, wanneer men een druppel oplossing op het papier brengt.

Door de diffunderende vloeistof — het elutiemiddel — worden de zónes uit elkaar gedreven: het chromatogram wordt dan zg. ontwikkeld. De bewerking met het elutiemiddel heet elueren.

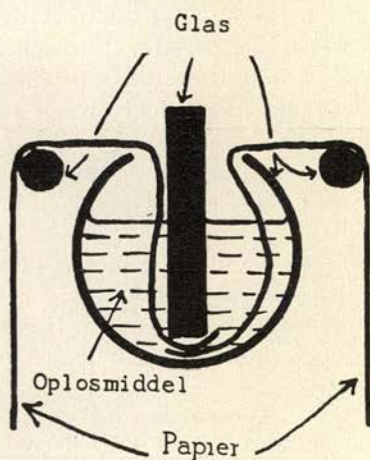


Fig. 2

Ontleend aan Consden, Gordon en Martin, *Biochem. J.* 38, 227, (1944).

§ 6. Bij gebruik van een strook filtreerpapier ontstaat een zg. één-dimensionaal chromatogram (fig. 3). Bij A is een druppel van een oplossing van aminozuren op het papier gebracht. De vlekken worden veroorzaakt door de aanwezigheid van: asparaginezuur, serine,  $\alpha$ -alanine en valine (van onderen naar boven).

Men kan echter de te onderzoeken stoffen een dubbele verschuiving laten ondergaan door een vel filtreerpapier en twee elutiemiddelen te gebruiken. Het ene elutiemiddel doorloopt het papier in een bepaalde richting en na drogen wordt het tweede elutiemiddel er in een richting, die loodrecht op de eerste is, doorgestuurd.

Iedere aanwezige stof verplaatst zich dan dus in twee onderling loodrechte richtingen en verkrijgt zo een plaats in het platte vlak. Dit wordt een tweedimensionaal chromatogram genoemd.

Fig. 4 stelt voor een reproductie van een tweedimensionaal chromatogram van een hydrolysaat van wol. Bij A is een druppel van de te onderzoeken oplossing op het papier gebracht.

In de richting AB is collidine, in de richting AC phenol gediffundeerd. (Consd en, Gordon en Martin (8)).

§ 7. De identiteit van een bepaalde opgeloste stof kan vastgesteld worden door de verhouding van de verplaatsing van deze stof tot die van het elutiemiddel in het chromatogram.

Deze verhouding staat in de literatuur bekend als  $R_F$ -waarde van de beschouwde stof (9).

De  $R_F$ -waarde is van verschillende factoren afhankelijk, waarvan het gebruikte elutiemiddel en het filtreerpapier de voornaamste zijn.

In fig. 5, welke ontleend is aan Consd en, Gordon en Martin (8) vindt men de  $R_F$ -waarden van een serie aminozuren voor een tweedimensionaal chromatogram voor een Engelse papiersoort (Whatman) aangegeven. De betekenis der afkorting

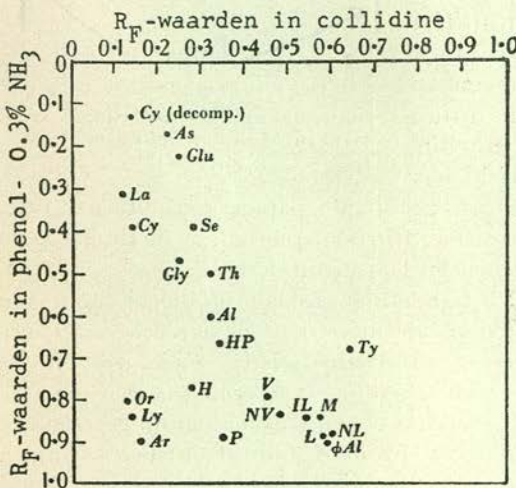


Fig. 5

Chromatogram van aminozuren verkregen met phenol en collidine.





Fig. 3

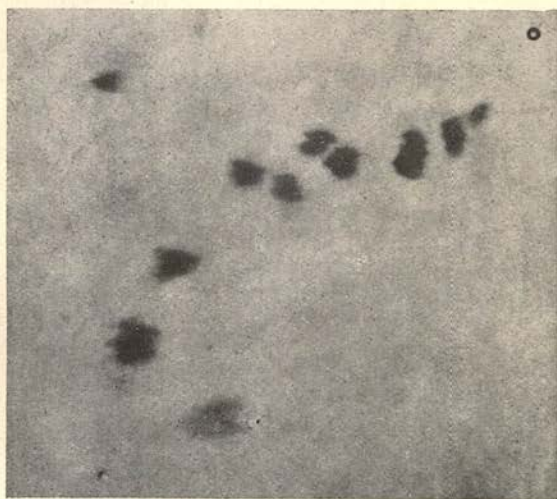


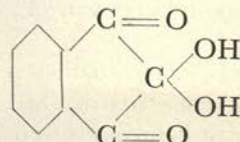
Fig. 4



gen: Al = alanine, Ar = arginine, As = asparaginezuur, Cy = cystine, Glu = glutaminezuur, Gly = glycine, H = histidine, HP = hydroxyproline, IL = isoleucine, La = lanthionine, L = leucine, Ly = lysine, M = methionine, NL = norleucine, NV = norvaline, Or = ornithine, Al = phenylalanine, P = proline, Se = serine, Th = threonine, Tr = tryptofaan, Ty = tyrosine, V = valine.

Het opsporen van een bepaalde stof is natuurlijk het gemakkelijkst wanneer deze gekleurd is. Wanneer dit niet het geval is kan men het chromatogram op fluorescentie in het ultraviolette licht onderzoeken. Van meer belang is nog, dat men ook bepaalde kleurreacties kan toepassen om de plaats van een bepaalde stof in het chromatogram vast te stellen.

§ 8. Bij aminozuren is men vrijwel uitsluitend op kleurreacties aangewezen. Als reagens voor deze groep stoffen vindt men in de literatuur vrijwel uitsluitend aangegeven het ninhydrine = triketohydrindeenhydraat.



Na droging wordt het chromatogram bespoten met een 0.1 percentoplossing van deze stof in normaal butanol. Hierna wordt het chromatogram op ca. 110° C verwarmd. Op de plaats van de aminozuren ontstaan dan gekleurde vlekken, als gevolg van de omstandigheid dat aminozuren met ninhydrine vrij gecompliceerde kleurstoffen leveren (10).

Men kan volgens onze ervaring als algemeen reagens op aminozuren evengoed alloxaan gebruiken (2) — ook deze stof geeft op alle aminozuren, met uitzondering van proline, een uitstekende kleurreactie. Ze heeft het voordeel dat ze veel gemakkelijker te verkrijgen is.

Terwijl dus het uitvoeren van een algemene kleurreactie op aminozuren geen moeilijkheden oplevert is dit wel het geval met voor bepaalde aminozuren specifieke reacties. Deze laatste zijn bovendien zonder meer voor filterpapier niet geschikt te maken, omdat er vaak reagentia gebruikt worden die het papier aantasten.

Een enkele keer is gebruik gemaakt van een oplossing van isatine in ijsazijn, die met proline een blauwe kleur geeft. Ook de kleurreactie met het natriumzout van  $\beta$ -naphthochinonsulfonzuur in alkalische omgeving kan een enkele keer gebruikt worden.

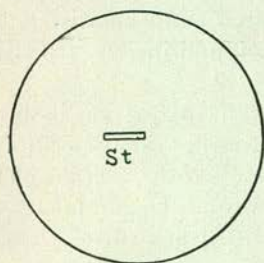
§ 9. Waarschijnlijk omdat we niet de beschikking hadden over de goede soorten filterpapier zijn onze ervaringen zowel met één- als met tweedimensionale chromatografie niet zo erg gunstig geweest. Speciaal wanneer phenol als elutiemiddel werd gebruikt bleek onregelmatige verspreiding van de vloeistof op te treden: het phenol



veroorzaakte verschillende vertakkingen en het geheel leek dan ten slotte meer op een denneboom dan op een chromatogram. Het is ook mogelijk dat er door het gebruikte papier een scheiding optrad tussen het phenol en het erin aanwezige water. In ieder geval vormt het nog een punt van onderzoek, welke eisen men aan het filtreerpapier moet stellen opdat het geschikt is voor verdelingschromatografie.

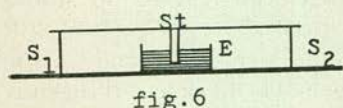
Betere resultaten werden aanvankelijk verkregen door het gebruik van rondfilters (kwaliteit Schleicher en Schüll, No. 595).

Ook was het hier zo, dat een soort die later geleverd was, van hetzelfde nummer, weer ongeschikt was voor ons doel. Maar in ieder geval hebben de oorspronkelijke resultaten aanleiding gegeven tot een uitvoeringsvorm, die we zouden willen betitelen met de naam van circulaire chromatografie en waarvan in de volgende paragrafen een overzicht zal worden gegeven.



§ 10. Oorspronkelijk werd de methode als volgt uitgevoerd, naar aanleiding van een opmerking van L. Rutter (11).

In een rondfilter van 25 cm. diameter wordt vanuit het midden een strip (St) geknipt; deze strip wordt omgevouwen op de manier zoals aangegeven is in fig. 6. Het filter wordt gesteund door 2 glasstaafjes  $S_1$  en  $S_2$ .



Een druppel van de te onderzoeken oplossing wordt op het rondfilter juist boven het eind van de strip gebracht. Door het andere eind van de strip te hangen in een bakje met elutiemiddel (E) wordt bereikt, dat deze capillair wordt opgezogen door de strip. Het elutiemiddel verspreidt zich vervolgens min of meer cirkelvormig over het rondfilter. Filter en elutiemiddel worden geplaatst in een exsiccator, die verzadigd is met waterdamp.

Als elutiemiddel werd in het begin voornamelijk phenolum liquefactum gebruikt. Bij het onderzoek van aminozuren bleken vrijwel concentrische ringen te ontstaan, zoals na drogen en behandelen met ninhydrine kon worden aangetoond.

§ 11. Inmiddels bleken aan de gevolgde methode twee bezwaren voor te komen. In de eerste plaats werden de ringen meestal te dik, waardoor een goede scheiding verhinderd werd. In de tweede plaats had phenol als elutiemiddel nog het bezwaar dat het hier en daar



wat onregelmatig uitliep. Bovendien is het zeer onaangenaam bij het drogingsproces, wanneer phenoldampen uit de elektrische stoof ontsnapten.

Het eerste bezwaar kon ondervangen worden door over te gaan op een andere papiersoort: Schleicher en Schüll, No. 601 (momenteel Zwitsers fabrikaat). Dit papier is enigszins harder dan No. 595; vermoedelijk wordt daardoor de grotere scherpte van de ringen veroorzaakt. Een elutiemiddel dat aan redelijke eisen voldeed wat scheidend vermogen betreft werd ten slotte gevonden in een mengsel van de volgende samenstelling: butanol 128, phenol 16, water 16 en azijnzuur 40 (volumeverhouding).

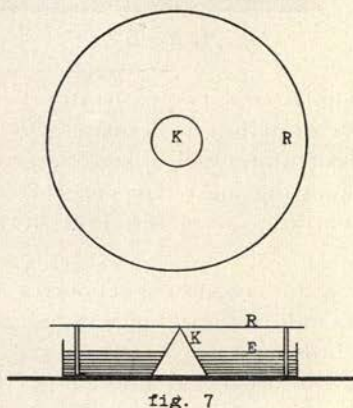
§ 12. Een bezwaar van geheel andere aard was hierin gelegen dat door de aanwezigheid van de strip het symmetrische karakter van de ringen verloren ging. Daarom werd er gezocht naar een andere methode volgens welke het elutiemiddel aan het rondfilter zou kunnen worden toegevoerd. Verschillende opstellingen werden geprobeerd; gebruik werd gemaakt van capillairen, van kranen, van poreuze buisjes enz. om het elutiemiddel toe te voeren.

De vraag die gesteld werd was deze: hoe kan men een hoeveelheid van ongeveer 3 ml. elutiemiddel in een tijd van ca. 10 uur continu over het rondfilter verdelen. Een tijd van 10 uur is noodzakelijk, omdat gebleken was, dat dan de optimale scherpte van de ringen werd verkregen. Ten slotte werd voor het geval de volgende zeer simpele oplossing verkregen. Een rondfiltertje van ca. 5 cm. diameter werd op de gewone manier gevouwen tot een kegeltje (K). Met een draadje wordt het kegeltje gehecht, zodat het niet weer uit elkaar gaat. Het wordt vervolgens in een bakje met elutiemiddel (E) geplaatst (zie fig. 7).

Een druppel van het te onderzoeken mengsel wordt precies in het midden van een rondfilter (R) van 25 cm. diameter gebracht. Met een föhn wordt de ontstane vlek even gedroogd. Daarna wordt het rondfilter zo geplaatst dat zijn middelpunt in contact komt met de top van de kegel.

Als bij de eerste proeven wordt ook het geheel weer in een excicator geplaatst.

Het rondfilter (R) ontvangt hier de nodige steun van een ronde



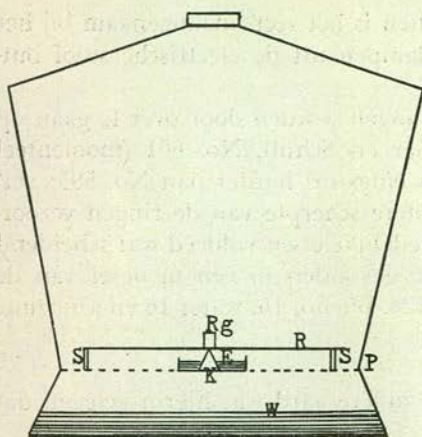


fig. 8

glazen ring (S) eveneens van ongeveer 25 cm. diameter. (fig. 8).

Het bakje met elutiemiddel (E) staat op een porseleinen plaat (P) in de exsiccator, die gedeeltelijk gevuld is met water (W).

De opzuigsnelheid bleek nu zo te zijn, dat bij gebruik van het in 11. genoemde elutiemiddel, het rondfilter in een tijd van ca. 8 uur vol liep. Door kegeltjes te nemen van hardere papiersoorten heeft men de uitlooptijd enigszins in de hand; in ieder geval kan men op deze

wijze steeds per exsiccator per etmaal 2 chromatogrammen maken. De opstelling is dermate eenvoudig en men kan rustig een twintigtal exsiccatoren gebruiken, hetgeen van belang is als men van eenzelfde oplossing meer dan een chromatogram moet maken, bv. als de concentratie van de opgeloste stoffen niet bekend is.

§ 13. In de eerste plaats moesten van alle te onzer beschikking staande aminozuren met het genoemde elutiede  $R_F$ -waarden bepaald worden.

Om dit snel te kunnen doen werd gebruik gemaakt van een cirkelvormige schijf van celluloid (zie fig. 9), waarop een twintigtal stralen werden aangebracht van verschillende lengte, die ieder in 20 gelijke delen werden verdeeld. Door deze schijf op het chromatogram te leggen, zodanig dat de middelpunten van rondfilter en schijf samenvallen, kan men onmiddellijk de  $R_F$ -waarde van een bepaalde ring aflezen door te zorgen, dat er een bepaalde straal juist samenvalt met de afstand waarover het elutiemiddel zich heeft verplaatst.

De gevonden  $R_F$ -waarden zijn samengevat in de volgende tabel; hierbij moet nog de opmerking gemaakt worden, dat we de verplaatsing van het oplosmiddel op 100 gesteld hebben. De  $R_F$ -waarden, zoals men die in de literatuur aantreft, verkrijgt men door de opgegeven getallen door 100 te delen. De in tabel I aangegeven kleurings heeft betrekking op de reactie met ninhydrine.

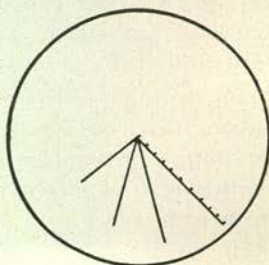


fig. 9



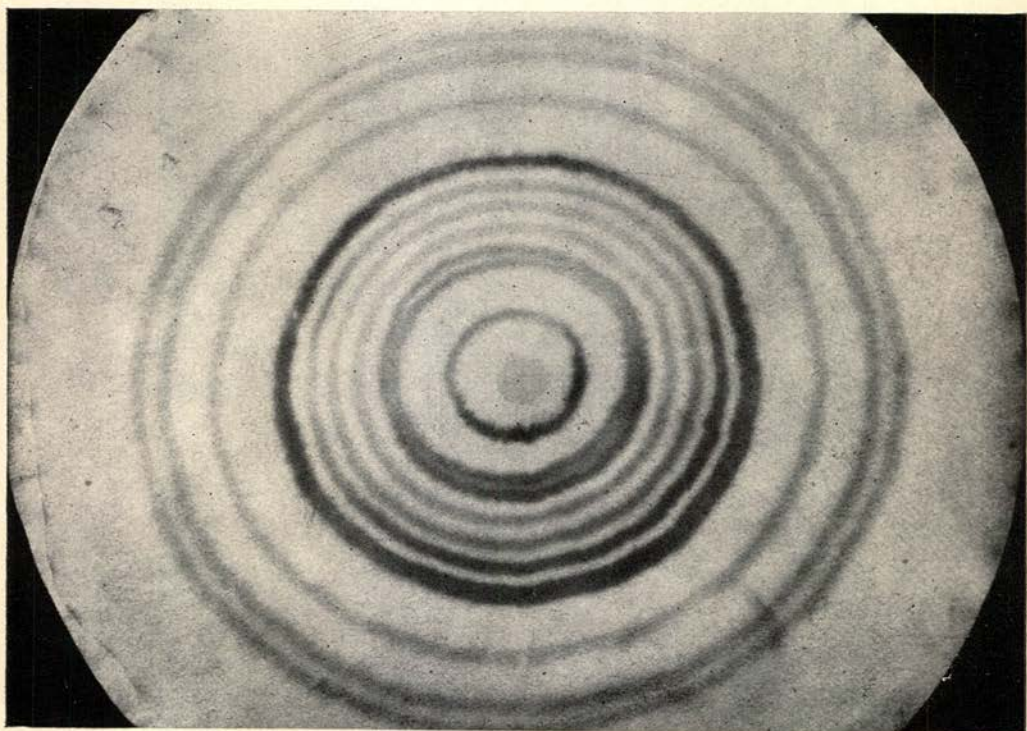


Fig. 10

Circulair chromatogram van een mengsel van 10 aminozuren. Van binnen af zijn de ringen toe te schrijven aan: cysteine, asparagine, asparaginezuur, glycine, threonine,  $\alpha$ -alanine,  $\beta$ -alanine, methionine, isoleucine, norleucine. De grotere concentratie van  $\beta$ -alanine blijkt duidelijk uit de intensiteit van de bijbehorende ring.





TABEL I

R<sub>F</sub>-waarden van aminozuren bij gebruik van S en S papier No. 602 en het elutie-middel: butanol 128, phenol 16, water 16, azijnzuur 40.

Cystine	10-14	oranjerood, diffuus
Cysteine	10-15	oranje, soms vrij scherp
Lysine	19-23	oranje, vrij scherp
Asparagine	19-22	bruin tot grijs, scherp
Histidine	20-24	oranje tot paars, vrij scherp
Asparaginezuur	25-28	oranjerood, scherp
Arginine	24-28	paars, vrij scherp
Serine	27-30	oranjerood, vrij scherp
Glycine	27-30	oranje, scherp
Glutaminezuur	31-34	paars of oranje, scherp
α-Alanine	32-35	paars tot rood, scherp
Threonine	36-40	paars, scherp
Proline	39-43	geel, soms zwak en diffuus
Tyrosine	42-49	zwak paars, diffuus, slechte kleur
β-Alanine	43-46	paars, scherp
Valine	53-56	paars, scherp
Tryptofaan I	53-57	zwak paars, vrij breed
Methionine	54-57	paars, scherp
Leucine	62-66	zwak paars, vrij scherp
Tryptofaan dl	62-67	zwak paars, vrij breed
Isoleucine	63-66	paars scherp
Phenylalanine	64-68	zwak paars, vrij scherp
Norleucine	69-72	paars, scherp

Zoals men uit deze tabel kan aflezen zijn er vaak aminozuren met dezelfde R<sub>F</sub>-waarde. Om deze van elkaar te scheiden zou men nog weer een extra fractionering moeten toepassen. Welke fractionering hiervoor het meest geschikt is wordt momenteel nog onderzocht. Voor het onderzoek van speeksel is deze bewerking overbodig gebleken, omdat door het toevoegen van een bepaald aminozuur altijd definitief aangetoond kan worden of het al dan niet aanwezig is.

§ 14. We vatten de hele bewerking hier kort samen (fig. 8). In een exsiccator wordt een voldoende hoeveelheid water gebracht om er voor te zorgen, dat de ruimte erin verzadigd is met waterdamp. Op de porseleinen plaat in de exsiccator wordt een bakje geplaatst waarin ca. 5 ml. van het elutiemiddel wordt gedaan. In dit elutiemiddel wordt een kegeltje van filtreerpapier geplaatst, waar desnoods even in geknipt wordt om de lucht te laten ontwijken.

Voor het onderzoek van een bepaalde oplossing ontwerpt men 4 tot 6 chromatogrammen, vooral wanneer de concentratie van de opgeloste stoffen niet precies bekend is. Op het eerste filter wordt 1 drup-

pel (ca. 0.04 ml.) van de te onderzoeken oplossing gebracht; op de andere filters grotere hoeveelheden.

Nadat de door de opgebrachte druppels veroorzaakte vlek gedroogd is wordt het rondfilter in de exsiccator gebracht, zodanig dat zijn middelpunt op de top van de kegel komt. Een glazen ringetje ( $R_2$ ), dat midden op het filter gebracht wordt, zorgt ervoor dat het contact tussen kegel en rondfilter gehandhaafd blijft. Hierna wordt de exsiccator afgesloten. Na een tijd van 8 tot -4 uur wordt het rondfilter uit de exsiccator gehaald en in een elektrische stoof bij ca.  $100^\circ$  C gedroogd. Vervolgens wordt het filter bespoten met een 0.1 percents-oplossing van ninhydrine in normaal butanol. Daarna wordt gedurende 15 minuten wederom in de elektrische stoof verwarmd op  $120^\circ$  C.

§ 15. Teneinde een indruk te geven van hetgeen er met deze methode is te doen werd een synthetisch mengsel samengesteld, waarin voorkomen de volgende aminozuren: cysteine, asparagine, asparaginezuur, glycine, threonine,  $\alpha$ -alanine,  $\beta$ -alanine, methionine, isoleucine en norleucine. De sterkte van de gebruikte oplossing voor ieder van de aminozuren was 0.25 %.  $\beta$ -alanine werd eigenlijk alleen toegevoegd als vergelijkingsstof met een concentratie van 1.5 %. Voor de ontwikkeling van een chromatogram was 0.02 ml. voldoende. In fig. 10 vindt men een reproductie van het verkregen chromatogram. Het is in vergelijking met de gewone één- en tweedimensionale chromatogrammen veel scherper. Dit komt nog duidelijker tot uiting in plaat I, waar een kleurenreproductie van hetzelfde chromatogram is gegeven.

§ 16. Met behulp van tweedimensionale chromatografie hebben Goldberg, Gilda en Tishkoff (4) de aanwezigheid van 13 vrije aminozuren in speeksel aangetoond (glutaminezuur, asparaginezuur, glycine, alanine, methionine, arginine, leucine, lysine, phenylalanine, taurine, tyrosine, valine en proline). Voor het ontwerpen van een chromatogram werd hierbij het speeksel eerst onderworpen aan ultrafiltratie, terwijl van te voren de omstandigheden (lage temperatuur) zo werden gekozen, dat er geen ontleding van de aanwezige eiwitstoffen kon optreden.

Langs microbiologische weg is speeksel onderzocht door Kirch, Kessel, O'Donnell en Wach (4). Deze onderzoekers vinden in totaal de aanwezigheid van 16 aminozuren, nl. tryptofaan, arginine, valine, glutaminezuur, phenylalanine, threonine, lysine, glycine, tyrosine, proline, leucine, serine, isoleucine, cystine, histidine en methionine.

Deze onderzoeken hebben als resultaat opgeleverd dat variatie



in concentratie van deze zuren onafhankelijk bleek te zijn van caries-activiteit.

Interessant is in dit verband de vraag of er verband bestaat tussen caries-activiteit en tryptofaan-gebrek, een vraag, die het onderwerp is geweest van een onderzoek van *Turner en Crowell* (12). Uit dit laatste onderzoek mag geconcludeerd worden, dat het speeksel van caries-vrije individuen een behoorlijk gehalte aan tryptofaan heeft.

§ 17. In verband met de in 16 genoemde kwesties werd besloten speeksel op de aanwezigheid van vrije aminozuren te onderzoeken met de in de vorige paragrafen beschreven methode der circulaire chromatografie.

Daartoe werd speeksel van verschillende proefpersonen verzameld in een bekersglas, dat geplaatst was in ijs teneinde proteolyse tot een minimum te beperken. In totaal werd er van een bepaald persoon steeds 30–40 ml. speeksel verzameld.

Wanneer het speeksel direct op een rondfilter gebracht werd, zonder voorbehandeling, bleken de chromatogrammen geen van alle scherp te worden. Zeer waarschijnlijk werken de aanwezige slijmstoffen storend op de vorming van het chromatogram, zodat deze eerst verwijderd dienden te worden. Ook na centrifugeren van het speeksel waren de chromatogrammen van de verkregen heldere vloeistof niet scherp. Eveneens bleek behandeling met bariumhydroxyd geen gunstige resultaten op te leveren.

Goede chromatogrammen werden echter verkregen door het speeksel te onderwerpen aan dialyse door een cellofaanhuls.

Het verkregen dialysaat werd in een vacuumexsiccator boven geconcentreerd zwavelzuur ingedampt en in aldus geconcentreerde toestand gebruikt.

Ook ultrafiltratie door cellofaan bleek het gewenste effect te hebben; dit is natuurlijk principieel hetzelfde als dialyse, alleen gaat het wat vlugger. Enige ml. ultrafiltraat worden na een kwartier verkregen; ook dit kan op de zojuist vermelde methode worden geconcentreerd.

§ 18. Het onderzoek wordt nu op de volgende wijze uitgevoerd:

a. 10 tot 20 ml. speeksel wordt in een cellofaanhuls gebracht. Dit wordt in een cilinderglas gehangen, zodanig dat de huls juist door water omgeven is, waarvoor 10 tot 20 ml. water nodig is. Er wordt gedurende 24 tot 48 uur gedialyseerd bij een temperatuur van 0° C. 5 ml. van het dialysaat wordt in een porseleinen schaalje boven geconcentreerd zwavelzuur in een exsiccator geplaatst. Na ongeveer 24 uur is de oplossing voldoende geconcentreerd. Van de verkregen ge-

concentreerde oplossing wordt 0.05 ml. op een rondfilter gebracht.

b. 5 ml. speeksel wordt onderworpen aan ultrafiltratie door cellofaan met behulp van een sneldraaiende centrifuge (2500 omwentelingen per minuut). Op deze manier wordt ongeveer 2 ml. vloeistof verkregen. Dit wordt vervolgens op de onder a. aangegeven methode geconcentreerd. Ook hier wordt van de geconcentreerde vloeistof 0.05 ml. op een rondfilter gebracht.

Als elutiemiddel voor het verkrijgen van chromatogrammen wordt het in 11 genoemde mengsel van butanol, phenol, water en azijnzuur gebruikt. Voor ieder rondfilter wordt het bijbehorende schaalje met 5 ml. hiervan gevuld. Na ongeveer 10 uur is het filter vol gelopen; het wordt dan gedroogd en bespoten met een 0.1 % oplossing van ninhydrine in butanol. De gewenste kleurreactie wordt verkregen door verhitting op 120° C.

In fig. 11 is een reproductie van een der verkregen chromatogrammen aangegeven.

§ 19. Volgens de methode a. werd het speeksel van 8 personen onderzocht.

De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in *tabel IIa*.

TABEL IIa  
*Aminozuren aanwezig in speeksel*

- 
1. lysine, asparaginezuur, glutaminezuur, tryptofaan;
  2. lysine, asparaginezuur, glutaminezuur, proline, tryptofaan;
  3. lysine, asparagine, asparaginezuur, glutaminezuur, proline, tryptofaan;
  4. lysine, asparaginezuur, glycine,  $\alpha$ -alanine;
  5. asparagine, histidine, asparaginezuur, glutaminezuur, proline, leucine;
  6. lysine, asparagine, histidine, serine, glutaminezuur, tyrosine, tryptofaan;
  7. lysine, asparagine, histidine, glycine,  $\alpha$ -alanine, tryptofaan;
  8. lysine, asparagine, histidine, glycine,  $\alpha$ -alanine, tryptofaan.
- 

Volgens de methode b. werd het speeksel van 15 personen onderzocht.

De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in *tabel II b*.

TABEL IIb  
*Aminozuren aanwezig in speeksel*

- 
1. asparagine, asparaginezuur, glutaminezuur,  $\alpha$ -alanine, phenylalanine;
  2. lysine, asparagine, asparaginezuur, glycine,  $\alpha$ -alanine, valine, leucine;
  3. lysine, asparagine, glycine,  $\alpha$ -alanine, valine, leucine;
  4. lysine, asparagine, asparaginezuur, glutaminezuur,  $\alpha$ -alanine, valine, leucine.
-



5. cystine, lysine, asparagine, asparaginezuur, glutaminezuur, tyrosine, valine, tryptofaan;
6. lysine, asparagine, histidine, asparaginezuur, glycine, glutaminezuur, threonine,  $\alpha$ -alanine, tyrosine, tryptofaan, leucine, phenyl-alanine;
7. asparagine, asparaginezuur, glycine, glutaminezuur,  $\alpha$ -alanine, tryptofaan;
8. lysine, asparagine, histidine, glycine, glutaminezuur,  $\alpha$ -alanine, tryptofaan;
9. asparagine, histidine, asparaginezuur, glycine,  $\alpha$ -alanine, tryptofaan;
10. lysine, asparagine, histidine, asparaginezuur, serine, glycine, threonine,  $\alpha$ -alanine, leucine, tryptofaan, norleucine;
11. lysine, asparagine, histidine, asparaginezuur,  $\alpha$ -alanine, tryptofaan;
12. lysine, asparagine, histidine, serine, glycine, glutaminezuur, threonine,  $\alpha$ -alanine, tryptofaan, leucine, isoleucine, norleucine?
13. lysine, histidine, asparaginezuur,  $\alpha$ -alanine, tryptofaan, norleucine?
14. lysine, asparagine, asparaginezuur,  $\alpha$ -alanine, tryptofaan;
15. lysine, asparagine, histidine, arginine, serine, glycine,  $\alpha$ -alanine, tryptofaan.

§ 20. De resultaten kunnen in het kort als volgt samengevat worden:

Er werden in totaal 14 verschillende aminozuren gevonden, nl.: glycine,  $\alpha$ -alanine, valine, leucine, phenylalanine, cystine, lysine, tyrosine, histidine, asparagine, asparaginezuur, proline, tryptofaan en glutaminezuur.

Behalve uit de  $R_F$ -waarden konden de verschillende conclusies getrokken worden uit de kleurreacties der verschillende aminozuren met ninhydrine en door toevoeging van bekende aminozuren.

De aminozuren die bij vrijwel alle onderzochte gevallen voorkomen zijn: lysine, asparaginezuur, glutaminezuur, tryptofaan,  $\alpha$ -alanine, histidine, asparagine.

Het eerste deel van het onderzoek is hiermede afgesloten. Naar enige correlaties met caries is niet gezocht, maar binnenkort zal dit alsnog gebeuren.

Op deze plaats zij een woord van hartelijke dank gebracht aan Prof. Dr. R. Brinkman en Prof. Ir. J. N. Tekenbroek voor hun voortdurende belangstelling en aan de heer P. C. v. d. Schaaf, Pharm. Cand., voor de uitvoering van een groot deel van het experimentele werk.

Verder spreken wij gaarne onze erkentelijkheid uit aan de Medino-Prodent-Research, die haar medewerking heeft verleend om deze wijze van speekselonderzoek uit te voeren.

Groningen, Januari 1949.

LITERATUUR:

- |  |  |
|--|--|
| 1. Karrer, P.,<br>Holleman, A. F.  | Organic Chemistry 275 (1947).<br>Leerboek der organische chemie, bewerkt door Wibaut, J. P., 388 (1946).                   |
| 2. Schoorl, N.   | Organische Analyse III, 200, (1941).   |
| 3. Dent, C. E.   | Conf. on Metabolic Aspects of Convalescence, Trans. of the 14th Meeting, Nov. 1946, New York; Biochem. J., 41, 240 (1947). |
| 4. Goldberg, H. J. V., Gilda, J. E., en Tishkoff, G. H.<br>Kirch, E. R., Kesel, R. G., O'Donnell, J. F. en Wach, E. C.<br>Idem | J. Dent. Res., 27, 493 (1948)...   |
| 5. Martin, A. J. P. en Synge, R. L.  | J. Dent. Res., 26, 297 (1947).<br>J. Am. Dent. Ass., 33, 695 (1946).   |
| 6. Rutgers, A. J.  | Biochem. J., 35, 91 (1941).<br>Physische Scheikunde, 298 (1939).   |
| 7. Martin, A. J. P., en Synge, R. L.<br>Wilson, J. N.<br>Du Vault, D.  | Biochem. J., 35, 1358 (1941).<br>J. Amer. Chem. Soc., 62, 1583 (1946).<br>J. Amer. Chem. Soc., 65, 532 (1943).             |
| 8. Conden, R., Gordon, A. H. en Martin, A. J. P.   | Biochem. J., 38, 226 (1944).   |
| 9. Martin, A. J. P. en Synge, R. L.  | Biochem. J., 35, 1361 (1941).  |
| 10. v. Arnim, K. en Grassmann, W.  | Ann. Chem., 509, 288 (1934).   |
| 11. Rutter, L.   | Nature 161, 435 (1948).  |
| 12. Turner, N. C. en Crowell, G. E.  | J. Dent. Res., 26, 99 (1947).  |

Voor een oriënterend overzicht over chromatografie in het algemeen zie men:

- |                              |                                  |
|------------------------------|----------------------------------|
| Symposium on Chromatography: | The Analyst, 71, 251-267 (1946). |
| Martin, A. J. P.             | Endeavour, 6, 21 (1947).         |