

STUDIUL DETERMINĂRII CANTITATIVE A AMINOACIZILOR
PRIN CROMATOGRAFIE PE HIRTIE

I.ászló Nemes, Árpád Szurkos

În urma aplicării pe scară largă a metodelor de separare a aminoacizilor prin cromatografia pe hirtie (1—8), s-au aplicat aceleaşi procedee şi la determinarea cantitativă a aminoacizilor. (9—19). Dintre metodele cunoscute, cea mai răspândită şi cea mai exactă este metoda eluării (18,19) care se execută astfel: spoliul aminoacidului dezvoltat cu ninhidrină se taie din hirtia cromatografică, se eluează cu ajutorul unui solvent, se determină extincţia soluţiei colorate obţinute din care se deduce apoi cantitatea aminoacidului respectiv. În condiţii optime, limita erorii este de $\pm 5\%$. Extincţia maximă a soluţiei se poate obţine numai în cazul dacă în amestecul de reacţie se asigură şi prezenţa formei reduse a ninhidrinei, adică a hidrindantinei fiindcă în formarea substanţei colorate ia parte şi aceasta. Reducerea ninhidrinei în cazuri simple se datoreşte prezenţei aminoacidului respectiv, dar o parte a hidrindantinei se reoxidează sub influenţa oxigenului din aer şi din această cauză cantitatea substanţei colorate obţinute va fi mai mică decît cea teoretică. Extincţia maximă şi uniformă a soluţiei colorate se obţine numai atunci, dacă excesul de hidrindantină este asigurat. Aceasta se poate realiza, fie prin folosirea hidrindantinei ca reactiv iniţial, fie prin adăugarea unei substanţe reducătoare - în cele mai multe cazuri KCN sau $\text{Cl}_2\text{Sn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (19,20).

Fordeu a arătat (21) că determinarea exactă a cantităţii aminoacizilor pe cromatograme este tulburată datorită amoniaciului din hirtia cromatografică, prin valorile oarbe ce se schimbă de la caz la caz. În general dezavantajul celor mai cunoscute metode este că prescriu reactivi greu de procurat şi depozitarea reactivului într-o atmosferă de gaz inert.

Partea experimentală

După separarea aminoacizilor pe hirtie de filtru Watman Nr. 1, cromatogramele au fost dezvoltate prin pulverizarea unei soluţii de ninhidrină 0,04% în acetonă, uscîndu-se ulterior la 65°C timp de 10 minute. Spoturile le-am conturat cu un creion grafic şi le-am pulverizat cu o soluţie de KON 1% în alcool metilic. Spoturile au fost uscate la 70°C timp de 5 minute. Am decupat spoturile tăind marginea contururilor trasate cu creion, apoi le-am introdus separat într-o eprubetă calibrată pînă la 10 ml punînd în fiecare eprubetă 4 ml de reactiv de ninhidrină.

Reactivul de ninhidrină l-am preparat de fiecare dată proaspăt în felul următor: încălzind uşor am dizolvat 0,38 gr ninhidrină de două ori recristalizată, în 25 ml de soluţie tampon (acidul acetic-acetat de sodiu) pH 4, 8. Soluţia astfel obţinută am amestecat-o cu 25 ml soluţie de citrat de sodiu 1%, care şi ea conţine 30 mg de $\text{Cl}_2\text{Sn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Trebuie să amintim, că citratul de sodiu a fost folosit şi de Seifer şi Newhouse (26). La prepararea reactivului de ninhidrină necesar la determinarea proteinelor pentru tamponarea soluţiei, ei au utilizat citratul de sodiu. Reactivul l-au completat cu metoxi-etanol, care lipseşte în reactivul nostru.

Eprubetele le-am încălzit în apă de baie ecloctită timp de 20 de minute, după care l-am introdus în apă răcită la gheaţă, timp de 3 minute; apoi am completat eprubetele cu un amestec de acetonă: apă (7:3) pînă la 10 ml. În scopul eluării complete eprubetele astupate le-am scuturat din 5 în 5 minute şi după 30 de minute am filtrat conţinutul eprubetelor printr-o hirtie de filtru fără amoniac, iar după 35—45 minute de la introducerea soluţiei de acetonă am determinat extincţia soluţiilor obţinute faţă de proba oarbă, cu ajutorul unui fotocolorimetru tip Lange, avînd un filtru de lumină OG 2 (570 m μ). Pentru determinarea probei şi oxiprolinei am folosit o lumină de

filtru cu absorbție minimă de 440 m μ . Pentru pregătirea probei narbe, din părțile goale ale cromatogramei am decupat bucăți de hirtie cu o mărime aproape identică a spoturilor, pe care le-am tratat în același fel ca la pregătirea probelor.

Conform metodei expuse mai sus am construit linii de calibrare pentru 21 aminoacizi. Linile de calibrare se referă la o cantitate de aminoacizi de 5—40 microgr. iar între aceste limite de concentrație am constatat valabilitatea legii lui Lambert-Beer. În multe cazuri am observat că aceleași cantități de diferiți aminoacizi au diferite valori de extincție din care reiese că pentru determinarea cantitativă a aminoacizilor trebuie să fie folosită pentru fiecare în parte o linie de calibrare proprie.

Tabelul Nr. I.

Aminoacizi	Experim- ental	Factorul leucinic			
		După Kisfaludy	După Moore Stein	După și Boissonas	După Troll
		(9)	(3)	(21)	(20)
1. Alanină	1,07	1,08	1,01	1,01	1,02
2. Arginină	0,92	0,86	1,00	1,08	0,98
3. Asparagină	0,96	0,93	0,94	—	—
4. Acidul asparginic	0,96	1,02	0,88	0,93	0,99
5. Cistină	1,06	0,59	0,54	1,04	—
6. Fenilalanină	1,00	1,05	0,88	0,94	1,01
7. Ac. glutaminic	1,01	1,05	1,05	0,93	0,99
8. Glicină	1,00	1,01	1,01	1,00	0,98
9. Histidină	0,92	0,81	1,04	0,95	1,02
10. Leucină	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
11. Lizină	1,87	0,99	1,12	1,09	1,10
12. Methionină	1,00	0,99	1,00	1,00	1,02
13. Prolină	0,64	0,34	0,05	0,26	—
14. Oxiprolină	0,61	0,27	0,03	—	—
15. Ornithină	0,87	—	—	—	—
16. Serină	0,95	1,05	0,94	0,95	0,99
17. Threonină	0,92	0,93	0,92	0,94	1,03
18. Triptolan	0,91	0,89	0,72	0,73	0,75
19. Tirozină	1,02	1,04	0,88	0,90	0,98
20. Valină	1,08	1,04	1,04	1,00	1,00
21. Citrulină	1,00	—	—	—	—

aminoacizi, care corespunde valorilor comunicate în literatură. Prin factor leucinic înțelegem valoarea extincției moleculare a aminoacizilor, raportată la valoarea extincției moleculare a leucinei, valoare care este considerată ca unitate. (Tabelul Nr. I.)

Tabelul Nr. II.

Aminoacizi	Cântărit %	Obținut %	Eroare în %	Δ ;
Lizină	19,84	20,00	+ 0,8	- 0,16
	4,96	5,00	+ 0,8	- 0,04
Histidină	11,46	11,50	+ 0,3	- 0,04
	22,92	23,50	+ 2,5	- 0,58
Serină	16,14	15,40	- 4,6	+ 0,74
	21,52	21,50	- 0,1	+ 0,02
Triptolan	16,05	16,20	+ 0,9	- 0,15
	26,75	27,00	+ 0,9	- 0,25
Leucină	6,00	6,30	+ 5,00	- 0,30
	18,00	18,50	+ 2,7	- 0,50

În reactivul de ninhidrină citratul de sodiu l-a folosit pentru menținerea clorurii stenoase în stare dizolvată. Citratul de sodiu e cu atât mai indicat cu cât dizolvă nu numai clorura stenoasă ci menține în stare de dizolvare și ninhidrina, amestecându-se

foarte bine cu soluția de tampon folosită și neevaporându-se la punctul de fierbere a apei, ca de exemplu propanolul care este utilizat de alți autori în acest scop. Avantajul lui constă în faptul că nu micșorează sensibilitatea reacției și este foarte ușor de procurat. Pe baza experiențelor am stabilit că concentrația cea mai favorabilă a soluției citratului de sodiu este cea de 1%.

Penru urmărirea aplicabilității metodei și reactivului am efectuat determinări de control cu diferite cantități de aminoacizi. Rezultatele experiențelor de control le expunem în tabelul nr. 2.

Rezultă deci că probele paralele efectuate cu anumiți aminoacizi se pot determina cu exactitate suficientă.

Am cercetat dacă se constată pierderi evidențiabile în cantitatea aminoacizilor ca urmare a migrării lor unidimensionale pe cromatogramă. Rezultatele obținute sînt trecute în tabelul nr. 3.

Tabelul Nr. III.

Aminoacizi	Cîntărit	Obținut	%	Eroare în %	Δ%
	γ	γ			
1. Arginină	5,70	5,70	100	0,0	0,00
2. Leucină	23,28	23,00	98,7	-1,3	+0,28
3. Tirozină	16,03	15,70	97,3	-2,7	+0,33
4. Valină	17,91	17,30	96,5	-3,5	+0,61
5. Cistină	17,11	17,00	99,3	-0,7	+0,11
6. Lizină	10,61	10,40	98,2	-1,8	+0,21
7. Methionină	16,85	16,50	97,9	-2,1	+0,80
8. Ornithină	13,66	13,10	95,2	-4,8	+0,56
9. Fenilalanină	6,32	6,00	98,1	-1,9	+0,32
10. Threonină	13,80	13,20	95,7	-4,3	+0,68

Din rezultatele obținute reiese că în condițiile date, cantitatea aminoacizilor nu se micșorează ca urmare a migrării lor și că erorile se pot reduce la 1—5%, față de erorile 5—10% obținute cu celelalte metode. Din aceste rezultate se poate conchide că reactivul cu o compoziție nouă propus de noi, eluează foarte bine produsul colorat al aminoacizilor din cromatograme, fiind astfel mai bine utilizabil, decît reactivul propus de Trohl care conține fenol și piridină, deși sensibilitatea acestuia în soluțiile apoase ale aminoacizilor e mai mare.

Concluzii

Noul reactiv (introducerea citratului de sodiu), folosit pentru determinarea cantității aminoacizilor, corespunde tuturor cerințelor determinării cantitative. Linii de calibrare construite cu ajutorul metodei preconizate se pot folosi în scopul determinării cantitative. Factorul leucinic al aminoacizilor, calculat de noi, corespunde celui existent în literatură. În timpul cromatografierii nu s-au constatat pierderi apreciable în cantitatea aminoacizilor. Erorile acestei metode sînt mai reduse decît cele ale metodelor similare utilizate. Cu metoda expusă se poate determina conținutul în aminoacizi al hidrolizaților proteici.

Sosit la redacție: 12 mai 1959.

Bibliografie

1. CORDON A. H.: Biochem. J. 35. 91. (1941); 2. CONSDEN R.: Biochem. J. 38. 224. (1944); 3. MOORE S., STEIN W.: Ann. Rev. Biochem. 21. 521. (1952); 4. RACSINSKIJ V. V.: Uszpehi Himii 13, 445, (1950); 5. BRAUN P., KALDOR A., KISFALUDI S.: Orvosi Hetilap 92. 1187. (1951); 6. PONGOR G.: Magyar Kémikusok Lapja 6. 374. (1951); 7. CRAMER F.: Papierchromatographie. Verlag Chemie (1953); 8. R. BLOCK, R. LESTRANGE, G. ZWEIG: Kromatografia na bumaga, (1954), 9. KISFALUDI S., BRAUN P.: A Magyar Tud. Akad. Biol. és Orv. Oszt. Közl. V. kötet. 1. 770. (1949);

10. BERRY H., CAIN K.: Arch. Biochem. 21. 179. (1949); 11. FISCHER R., PARSONS D., HOLMS R.: Nature 164. 183. (1949); 12. FISCHER R., PARSONS D., MORRISON G.: Nature 161. 764. (1948); 13. BLOCK R.: Science 109. 608. (1948); 14. BULL H.: J. Am. Chem. Soc. 71. 550. (1949); 15. KLATZKIN G.: Nature. 169. 422. (1932); 16. MARTIN A. J.: Biochem. J. 353. (1948); 17. WIELAND TH.: Naturwissenschaft 35. 290. (1948); 36. 28. (1949); 18. L. NAFTALIN: Nature 161. 763. (1948); 19. MOORE S., STEIN W. J.: Biol. Chem. 176. 367. (1949); 20. TROLL W., CANNEN K.: Biol. Chem. 200. 83. (1953); 21. BOISSONAS R. A.: Helv. Chim. Acta 33. 972. (1950); 22. A. E. ERMAKOVA: Biochimija 22. 5. (1957); 23. И. N. MEDVEDJEVA: Biochimija 23. 3. (1958); 24. T. C. PASKINA: Biochimija 702. 5. (1954); 25. M. SISJAKIAN, DENZIGER J.: Doklady Akademii Nauk 91. 907. (1953); 26. A. SEIFER, A. NEWHOUSE: J. Biol. Chem. 208. 159. (1954).

ДАННЫЕ О КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ АМИНОКИСЛОТ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

Немеш Ласло, Суркош Арпад

Авторы для количественного определения аминокислот бумажной хроматографией составили один новый нингидриновый реактив. Новый реактив, содержащий 1% раствор лимоннокислого натрия, который находится в SnCl_2 и жидкости гидриндантина, полностью заменяет до сих пор употребляемые реактивы. Так как на точке кипения воды не испаряется, оказался лучше и *n*-пропанола. При его применении чувствительность реакции не снижается, легко доставляем и дешевле реактивов, употребляемых до сих пор.

CONTRIBUTIONS À LA DÉTERMINATION QUANTITATIVE DES AMINO-ACIDES À L'AIDE DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

L. Nemes A. Szurkos

Pour la détermination quantitative des amino-acides effectuée à l'aide de la chromatographie sur papier les auteurs ont utilisé un réactif de ninhydrine d'une nouvelle composition. Ce réactif contient une solution de citrat de Na 1% qui peut remplacer les réactifs utilisés jusqu'à présent en ce qui concerne la capacité de maintenir en solution la Sn Cl_2 et la hydrinantine.

Vu qu'il ne s'évapore pas au point d'ébullition de l'eau, ce réactif s'est avéré meilleur que le *n*-propanol. En l'utilisant, la sensibilité de la réaction ne diminue pas. Le nouveau réactif est facilement procurable et moins cher que les autres.