

DOZAREA SPECTROFOTOMETRICĂ A ACIZILOR URONICI ȘI A POLIZAHARIDELOR CU CONȚINUT ÎN ACIZI URONICI

I. Máthé, Lenke Kosch

Acizii uronici intră în compoziția multor polizaharide cu rol biologic și terapeutic cum ar fi heparina, acizii condroitinsulfurici, acidul hialuronic, mucilagiile vegetale și pectina, fapt pentru care dozarea lor prezintă o mare importanță.

Pentru determinarea lor cantitativă s-au propus diferite metode spectrofotometrice, dintre care noi ne-am orientat spre metoda cu carbazol descrisă pentru prima dată de *Dische* (2), reluată și modificată pe parcurs

de alți autori (1, 3, 4, 6). Metoda se bazează pe colorația obținută în urma reacției dintre carbazol și 5-carboxi-2 formil furan, rezultată din acidul uronic prin încălzirea acestuia cu acidul sulfuric.

Partea experimentală

Deoarece datele din literatura de specialitate indică diferite moduri de rezolvare a reacției, am studiat reacția acizilor uronici cu carbazolul în funcție de temperatură, timp de încălzire și am urmărit stabilitatea colorației obținută în funcție de timp. Metoda a servit la dozarea poliuronidelor (mucilagii și pectine) și la dozarea heparinei din soluție injectabilă.

Pentru a urmări efectul temperaturii asupra intensității colorației am efectuat determinările la diferite temperaturi și anume la 60°, 70°, 85° C respectiv 100° C. Am constatat, că odată cu creșterea temperaturii crește și intensitatea colorației în cazul ambilor acizi uronici studiați (fig. nr. 1).

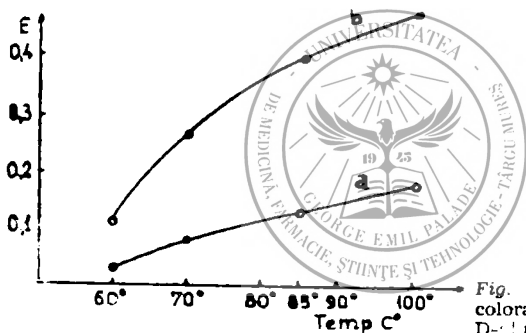


Fig. nr. 1: Dependenta intensității colorației de temperatură; a = Ac. D-glucuronic, b = Ac. D-galacturonic

Colorația cea mai intensă este la 100° C. La această temperatură extincția maximă se obține în 5 minute, însă aceasta scade foarte repede (fig. nr. 2).

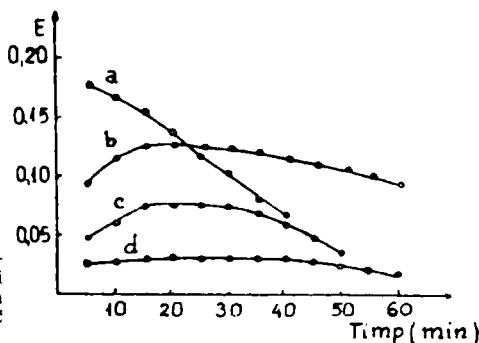


Fig. nr. 2: Stabilitatea în timp a intensității colorației în cazul acidului D-glucuronic; a = la 100° C, b = la 85° C, c = la 70° C, d = la 60° C

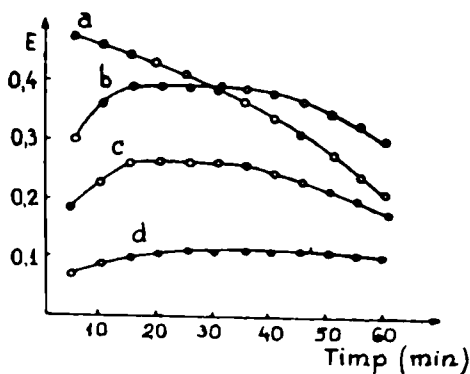


Fig. nr. 3: Stabilitatea în timp a intensității colorației în cazul acidului D-galacturonic; a = 100° C, b = la 85° C, c = la 70° C, d = la 60° C

La temperaturile de 85° C și 70° C extincția maximă se obține în 15 minute, colorația fiind stabilă timp de 20 de minute în cazul acidului D-galacturonic și timp de 15 minute în cazul acidului D-glucuronic, scăzând după aceea în mod treptat. La temperatura de 60° C extincția maximă se obține în 20 de minute, ea fiind stabilă timp de 30 de minute în cazul acidului D-galacturonic și timp de 20 de minute în cazul acidului D-glucuronic.

Pentru a urmări efectul timpului de încălzire, am efectuat reacția încălzind probe de 60 μg/ml timp de 10, 20 și 30 de minute. Rezultatele sînt trecute în tabelul nr. 1.

Tabelul nr. 1

Timpul de încălzire min.	Ac. D-galacturonic și calculul statistic al rezultatelor	Ac. D-glucuronic și calculul statistic al rezultatelor
	$A = \bar{X} \pm t_{\frac{\alpha}{2}} \frac{S}{X}$; K=4; α=95	$A = \bar{X} \pm t_{\frac{\alpha}{2}} \frac{S}{X}$; K=4; α=95
10	0,06 ± 0,016	0,03 ± 0,014
20	0,39 ± 0,023	0,125 ± 0,019
30	0,41 ± 0,056	0,245 ± 0,027

Intensitatea cea mai slabă se obține efectuînd încălzirea timp de 10 minute în cazul ambilor acizi uronici. După o încălzire de 30 de minute colorația este cea mai intensă, însă valorile nu sînt reproductibile. De aceea determinările le-am efectuat prin încălzirea amestecului timp de 20 de minute.

Pentru verificarea valabilității legii lui Lambert-Beer am studiat sensibilitatea reacției. Din datele experimentale reiese o liniaritate între concentrație și extincție în domeniul de concentrație de 5—90 μg/ml acid D-galacturonic, respectiv 5—140 μg/ml acid D-glucuronic, dar în ultimul caz extincția la concentrația de 5 μg/ml este foarte mică. Figurile 4 și 5

reprezintă curbele de calibrație, datele de pe curbă reprezintă media a 5 determinări.

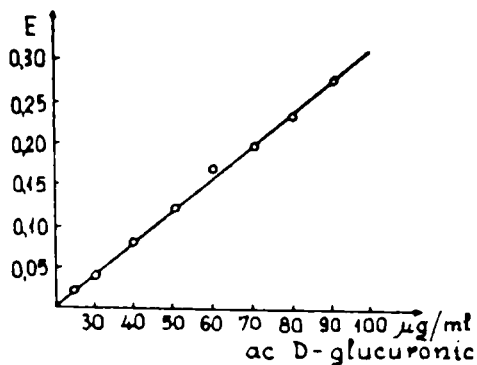


Fig. nr. 4: Curba de calibrație pentru acidul D-glucuronic

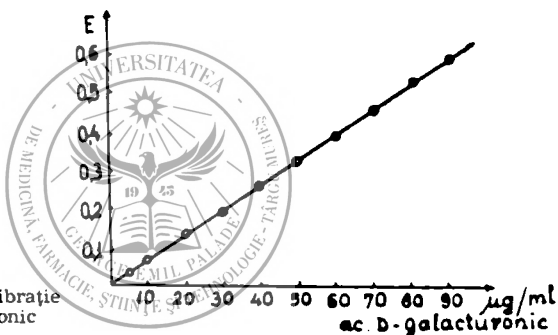


Fig. nr. 5: Curba de calibrație pentru acidul D-galacturonic

Determinarea poliuronidelor

Determinarea s-a făcut după hidroliza poliuronidelor și separarea cromatografică a produșilor de hidroliză. La hidroliza poliuronidelor și separarea cromatografică a produșilor de hidroliză am aplicat o tehnică descrisă de noi (5). Rezultatele sînt trecute în tabelul nr. 2.

Tabelul nr. 2

Nr. crt.	Produsul	Ac. D-galacturonic și calculul statistic al rezultatelor
		$A = \bar{X} \pm t_{\alpha} \frac{s}{\sqrt{X}}$; K=4; $\alpha=95$
1.	Pectina de mere (Fluka)	$69,20 \pm 0,87$
2.	Pectina din gem de prune	$0,92 \pm 0,08$
3.	Pectina din gem de caise	$0,65 \pm 0,08$
4.	Pectina din jeleurii de fructe	$6,46 \pm 0,77$
5.	Mucilagiul de Hibiscus trionum	$19,10 \pm 0,34$
6.	Mucilagiul de Helianthemum sp.	$18,40 \pm 0,34$

Determinarea heparinei

Determinarea acidului D-glucuronic s-a efectuat din soluție injectabilă de heparină (1 ml conține 5000 U.I.). Determinările s-au realizat atât din soluție nehidrolizată, cât și din soluție hidrolizată cu H_2SO_4 5%, în fiole închise, la 100°C.

Rezultatele obținute sînt cuprinse în tabelul nr. 3.

Tabelul nr. 3

Nr. crt.	Produsul	Ac. D-glucuronic și calculul statistic al rezultatelor
		$A = \bar{X} \pm t_{S_{\bar{X}}}$; $K=4$; $\alpha=95$
1.	Heparină hidrolizată	49,44 ± 0,96
2.	Heparină nehidrolizată	49,68 ± 0,82

Rezultatele obținute în cazul soluției hidrolizate cu H_2SO_4 5% corespund cu cele obținute în cazul soluției nehidrolizate, deci nu este nevoie de o hidroliză prealabilă a heparinei pentru determinarea acidului D-glucuronic, ca în cazul determinării acizilor uronici din pectină și mucilagii.

Concluzii

Dozarea acizilor uronici din poliuronide se poate efectua numai după o hidroliză acidă sau enzimatică și separare cromatografică a componentelor.

Rezultatele reproductibile se obțin în domeniul de concentrație 5—90 $\mu\text{g/ml}$ acid-D-galacturonic, respectiv 5—140 $\mu\text{g/ml}$ acid D-glucuronic în cazul în care reacția se efectuează la 85°C timp de 20 de minute.

Bibliografie

1. Bitter T., Muir H. M.: Anal. Biochem. (1962), 4, 330; 2. Dische Z.: J. Biol. Chem. (1947), 167, 189; 3. Dósa E., Szejtli J., Kiss L., Zsádon B.: Acta Pharm. Hung. (1977), 47, 102; 4. Kakač B., Vejdelek Z. J.: Handbuch der Kolorimetrie, Springer, Berlin, 1963, vol. III. 401; 5. Máthé I., Rácz G., Csedő C.: Planta Medica (1976), 3, 295; 6. Mc Comb E. A., McCreedy R. M.: Analyt. Chem. (1952), 24, 1630.

Sosit la redacție: 16 februarie 1981

J. Máthé, L. Kosch

SPECTROPHOTOMETRICAL DETERMINATION OF URONIC ACIDS AND OF POLYSACCHARIDES WITH URONIC ACIDS

The authors have dealt with the assay of uronic acids (D-galacturonic acid and D-glucuronic acid) in vegetal mucilages, pectins and heparin by using carbazol method. The determination can be made only after the acid or enzymatic hydrolysis and the chromatographic separation of the components. They also followed up the factors determining the colour reaction between carbazol and uronic acids. The reproducible results were obtained in the concentration ranging from 5 to 90 $\mu\text{g/ml}$ of D-galacturonic acid and from 5 to 140 $\mu\text{g/ml}$ of D-glucuronic acid, respectively, where the reaction is carried out at 85°C for 20 minutes.