

UTILIZAREA SCHIMBULUI DE IONI ÎN CROMATOGRAFIA PE HIRTIE *)

I. PREGATIREA AMESTECURILOR DE AMINOACIZI

Blazsek Vladimir

Obiectul cercetărilor farmaceutice prin cromatografia pe hirtie îl formează de obicei lichidele biologice, ca sânge, urină, lichid cefalorahidian, extracte de organe, extracte de plante, produși principali și secundari ai industriei farmaceutice etc. În vederea examinării conținutului de aminoacizi, primul și cel mai important pas îl constituie pregătirea materialului de cercetat. Obiectul acestei pregătiri vizează separarea aminoacizilor de impuritățile însoțitoare. Astfel de impurități pot fi: proteine, hidrocarburi, diferiți alți compuși anorganici și organici. În vederea pregătirii amestecului de aminoacizi literatura propune cele mai variate procedee.

Proteinele sînt îndepărtate prin precipitare sau ultrafiltrare. Pentru a aminti numai pe cele mai importante, în vederea precipitării se propune acidul trichloracetic, acidul wolframic, hidroxidul de bariu, acidul cloric, acetona, etanolul etc. (1, 2, 3, 4, 5, 6). Precipitățile cu acid trichloracetic sau alte săruri au dezavantajul comun de a majora salinitatea soluției. Acest lucru implică desalifierea cu ajutorul unor aparate speciale. Acesta este motivul pentru care se utilizează mai des desalifierea etanolică. Este de notat însă că această precipitare necesită o cantitate destul de ridicată de etanol pentru a atinge concentrația în

*) Conferință ținută în cadrul „Zilelor farmaceutice” din Tg.-Mureș, la data de 12 decembrie 1956.

alcool de 80%. În soluția alcoolică de o asemenea concentrație, acidul glutamic însă devine puțin solubil. *Boulanger* și *Biserte* (7) propun pentru îndepărtarea impurităților o soluție clorhidrică de acetona anhidă. În asemenea condiții se insolubilizează și sărurile anorganice și astfel desalifierea și deproteinizarea se execută în mod simultan.

Din păcate procedeul nu a corespuns așteptărilor, nereușind să îndepărteze impuritățile în mod cantitativ. I se mai poate imputa de asemenea, că în aceste condiții de lucru, hidrolizează atât glutamina cât și asparagina.

Szára și *Iudaev* (8, 9) precipită aminoacizii sub forma sărurilor de mercur, deblocându-i ulterior cu H_2S . Caracterul greoi al acestei tehnici este incontestabil. Ultrafiltrarea ca metodă eficace de deproteinizare necesită un utilaj special.

În vederea îndepărtării hidrocarburilor nu dispunem de procedee directe. Zahărurile creează dificultăți în cazul utilizării orcinei în timp ce aminele de hidrocarburi interferează la dezvoltarea cu ninhidrină.

Lipidele se îndepărtează prin extractele cu eter sau cloroform. Această extracție provoacă însă pierderi în materialul de determinat, deoarece și aminoacizii se dizolvă destul de bine în eter (10).

Acțiunea perturbantă a sărurilor anorganice este amintită de majoritatea autorilor (10, 11). A fost dovedit, că paralel cu creșterea concentrației $NaCl$ se alungesc și spoturile aminoacizilor. Astfel de exemplu în urma acțiunii $NaCl$ conținută într-un ser care a fost concentrat în proporție de 1:10, spotul metioninei devine de trei ori mai lung decât cel original. În general prezența unei cantități mai mari de sare implică alungirea și contopirea spoturilor. Acesta este motivul pentru care desalifierea înaintea cromatografierii prezintă o importanță deosebită. Este foarte cunoscut aparatul de desalifiere electrolitică propus de *Conden* (12).

Metodele care au fost prezentate mai sus în mod succint complică și lungesc în mod excesiv examinarea prin cromatografia pe hirtie, realizabila de altfel extrem de simplu și cu o instalație minimă.

Introducerea schimbătorilor de ioni a făcut posibilă simplificarea procedurii de purificare (pregătire). *Block* a utilizat (13) rășinile *Duolit C-3* și *Amberlit IR-120* în vederea determinării conținutului de aminoacizi liberi în extracte de țesuturi. Față de procedeele anterioare această metodă prezintă avantaje extrem de mari. Cu ajutorul rășinii schimbătoare de ioni se îndepărtează într-un singur pas atât compușii organici cât și sărurile anorganice. Luând în considerare avantajele amintite, am început cercetările în vederea pregătirii amestecurilor de aminoacizi cu ajutorul schimbătorului de cationi, puternic acid, preparat de noi.

Partea experimentală

Pentru experiențe a fost utilizat cationitul *RC-1* sintetizat în laboratorul nostru. În cursul cercetărilor a fost necesar să găsim în primul rând concentrația optimă de NH_4OH necesară eluării tuturor aminoacizilor. Pentru eluarea lor am ales soluția de NH_4OH deoarece aceasta

poate fi îndepărtată cantitativ în cursul evaporării ulterioare. Încercările executate cu amestecuri sintetice au dovedit că o concentrație de 0,15 N a soluției de NH_4OH este suficientă pentru eluarea celor 20 de aminoacizi întâlniți mai frecvent.

A fost necesar să clarificăm dacă cationii anorganici prezenți în amestecul de analizat și care se fixează pe coloană împreună cu aminoacizii, sint și ei eluați în aceleași condiții. În vederea elucidării acestui fapt, prin coloană a fost trecută o soluție de NaCl având concentrația de 150 mg% ioni de sodiu. Din extractul uscat al soluției de eluare am dozat ionul sodiu. S-a constatat că concentrația în ioni de sodiu a soluției a scăzut sub 1 mg%. Aceasta înseamnă că acțiunea dificilă a concentrației saline poate fi neglijată.

În urma rezultatelor experimentale am utilizat următorul procedeu:

Într-o coloană obișnuită (6x150 mm) am introdus 2 g rășină pe care am spălat-o cu o soluție 10% acid clorhidric până când concentrația soluției introduse a fost identică cu cea scursă. După acest procedeu coloana a fost spălată cu apă distilată până când pH-ul apei de spălare scurse a corespuns celei introduse. Soluția de cercetat a fost scursă prin coloană cu o viteză de 15 picături pe minut. Pe urmă, coloana a fost spălată din nou cu 50 ml apă distilată. Eluarea s-a executat cu o soluție de 0,15 N NH_4OH în așa fel, încât primii 5 ml i-am aruncat, iar următorii 15 ml au fost colectați și evaporați. Bineînțeles, în cazul fiecărei coloane trebuie determinat volumul fracțiunii care conține aminoacizii după fiecare încărcare. După evaporare, extractul uscat este reluat cu un solvent corespunzător, pe urmă cromatografiat.

Discuția rezultatelor

Prin procedeul de pregătire (purificare) descris mai sus a fost cercetată compoziția de aminoacizi liberi a unor lichide biologice de proveniență umană, animală sau vegetală (asupra rezultatelor acestor experiențe vom reveni într-un articol ce va apărea în viitor). S-a dovedit că procesul de pregătire suferă o simplificare remarcabilă în sensul că separarea aminoacizilor de impuritățile însoțitoare reușește printr-o singură operație. Cu ocazia trecerii prin coloană, aminoacizii, cationii anorganici precum și acele combinații organice care se comportă drept cationi, se vor deplasa, în timp ce cationii mai puternic fixați vor rămâne și mai departe pe rășină. Astfel se execută în același timp și desalifierea fără a utiliza pentru acest scop o instalație specială. În anumite cazuri va putea fi neglijată chiar și deproteinizarea anticipată, și anume în cercetarea unor lichide biologice a căror concentrație proteică este scăzută. Atunci când concentrația în proteine a soluției este ridicată, se poate utiliza precipitarea acid tricloracetică. Este de menționat, că acidul tricloracetic nu mărește salinitatea soluției, deoarece rășina fixează acest acid. În anumite cazuri poate fi necesară precipitarea compușilor mucinici, deoarece prin ridicarea viscozității soluției, prezența acestora poate diminua în mare măsură viteza de scurgere a soluției peste rășină. Mucinele eventual precipitate mai pot astupa coloana.



In fig. 1 și 2 sînt redate cromatogramele aceleiași urini, irigată în condiții identice.

Fig. 1 reprezintă cromatograma urinii netratate anterior.

Din figuri se poate vedea că impuritățile prezente în urină împiedică în mare măsură separarea aminoacizilor.



Cromatograma din fig. 2 a fost executată utilizînd amestecul pur de aminoacizi separați anterior din urină prin schimb de ioni.

Avantajele metodei se rezumă la următoarele :

1. Prin utilizarea rășinii schimbătoare de ioni, majoritatea impurităților însoțitoare pot fi îndepărtate într-un singur pas executând prin aceeași operație în mod simultan și desalifierea amestecului. Prin aceasta devine inutilă utilizarea instalațiilor speciale de desalifiere.

2. Amestecul de aminoacizi pentru cromatografiere poate fi preparat într-un timp mult mai scurt.

3. Prezența urmelor de aminoacizi se poate determina în acest fel mai simplu decât prin orice alte metode descrise pînă în prezent.

4. Printr-o regenerare simplă același cationit poate fi utilizat timp îndelungat .

Primită la redacție : la 18 februarie 1957.

Bibliografie :

1. Agren G., Nilsson T.: Acta Chem. Scand. 3, 525, 1949; 2. McFurreen E. F.: Anal. Chem. 23, 168, 1951; 3. McFarren E. F., Prand K., Ruthowski H R.: Anal. Chem. 23, 1146, 1951; 4. Roberts E., Frankel S.: J. Biol. Chem. 187, 55, 1950, 5. Kisfaludy S., Braun P.: M. T. A. V. Oszt. Közl. 77, 1954; 6. Krijman A., Conicova F., Davidova V.: DAN 69, 397, 1949; 7. Boulanger P., Biserte G.: Bul. Anal. du Chem. Nat. Rech. Sci. 696, 1949; 8. Szára I. conf. ținut la M. K. E. 1952; 9. Jadaev N.: DŃA 68, 119, 1949; 10. Hais I. M., Macek K.: Papirova chromatografie, Praha, 1951; 11. Eraun P., Kuldor A., Kisfaludy S.: Orvosi Hetilap 1187, 1951; 12. Consden R., Gordon A., Martin A.: Biochem. J. 41, 590, 1947; 13. Block R. J., Lestrangle R., Zweig G.: Chromatografia na bumage, Moscova 1954.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОБМЕНА ИОНОВ В БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

1. Приготовление амнинокислотной смеси

В. Блажек

Для хроматографического исследования содержания аминокислот в биологических жидкостях необходимо, чтобы содержащий аминокислоты раствор был подвергнут предварительной подготовке. В изготовлении смеси аминокислот, автор пользуется катионообменной смолой. С ее помощью удаётся удалить примеси из раствора и в то же время освободить его от солей. Та же смола, после простого регенераторного процесса, может быть использована много раз подряд. Вышеописанный способ является весьма несложным и не требует большой затраты времени.

UTILISATION DES ECHANGES D'IONS DANS LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Blazsek V.

La chromatographie des acides aminés dans les solutions de nature biologique ou végétale peut être exécutée seulement après un traitement préliminaire. Les méthodes décrites dans la littérature rendent la chromatographie — procédé simple et facile à appliquer — bien difficile. Dans le présent travail l'auteur décrit la préparation de la solution à chromatographier par l'utilisation des échangeurs d'ions. On a éliminé, à l'aide de la résine échangeuse d'ions, préparée dans nos laboratoires, la majorité des impuretés et on a réussi à débarrasser la solution du sel qu'elle contenait. La résine peut être utilisée plusieurs fois à condition d'être régénérée. La méthode de préparation des solutions pour chromatographie est simple et expéditive.