

flaco
dist:
mă
color
turi
agiti
tre.

(zinc, cupru, mangan, fier) în nutriția plantelor. Spre deosebire de influența acestor elemente, insuficiența azotului și molibdenului conduce la scăderea cantității aminoacizilor și amidelor în organele vegetative ale plantelor.

Unele specii de plante adesea acumulează aminoacizi caracteristici numai pentru specia dată, ceea ce determină particularitatea metabolismului lor.

exact

În țesuturile organismelor animale cantitatea aminoacizilor liberi, de asemenea, suferă fluctuații în funcție de natura hranei și starea fiziopatologică.

unde:

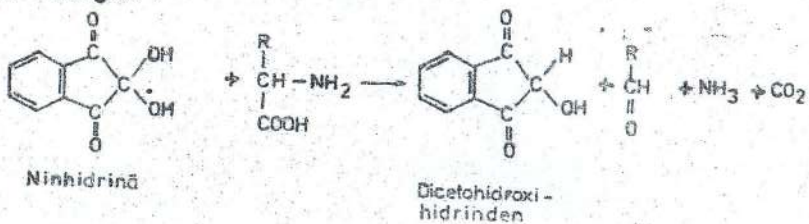
Determinarea aminoacizilor din compoziția proteinelor sau aminoacizilor liberi din organele plantelor și animalelor se practică pentru studierea mai detaliată a valorii nutritive a produselor alimentare și furajelor, de asemenea, în cazul investigării diferitelor procese ale metabolismului azotat în organismele vii. Între metodele larg utilizate în acest scop se numără cromatografia pe hirtie.

10.1.1. DETERMINAREA AMINOACIZILOR LIBERI PRIN METODA CROMATOGRAFIEI PE HIRTIE

de a

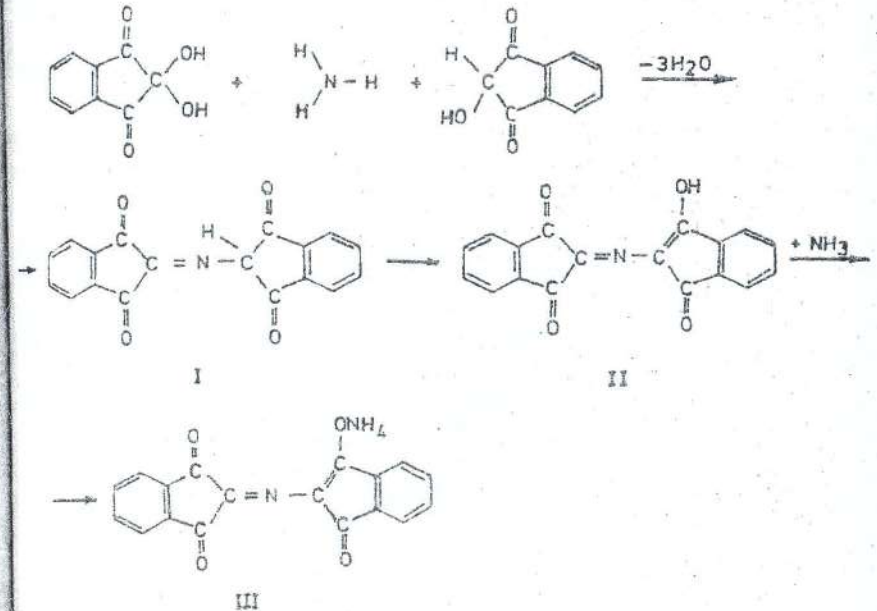
Principiul metodei. Aminoacizii liberi se extrag din țesuturile animalelor sau plantelor cu alcool etilic sau cu apă. Extractele obținute se purifică și se supun cromatografiei pe hirtie. Datorită diferențelor existente între constantele de distribuție (repartiție) ale diversilor aminoacizi, aceștia pot fi separați, cu ajutorul unui sistem de solvenți organici saturați cu apă, pe hirtie de filtru introdusă într-o cameră cromatografică. Aminoacizii separați pe hirtia cromatografică, sînt puși în evidență prin reacția de culoare cu reactivi specifici, cel mai adesea cu ninhidrină. Între aminoacizi și ninhidrină are loc următoarea reacție :

sența
reacți



1
talic
cool,
2
3

Amoniacul degajat se condensează cu o nouă moleculă de ninhidrină și cu cetoalcoolul format prin reducerea ei, rezultînd combinația (I), care la pH=4,5 se transformă în enolul (II) a cărui sare de amoniu (III) este colorată în roșu-violet sau purpuriu-albastru :



După imersare sau pulverizare cu o soluție de ninhidrină, cromatograma se usucă. Pe hirtie apar zone (spoturi) colorate în diferite locuri care corespund diversilor aminoacizi.

Cunoscînd condițiile experienței se pot determina după aceste spoturi colorate tipurile de aminoacizi existente în extractul tisular analizat. Identificarea aminoacizilor pe cromatogramă se face prin câteva procedee.

Cel mai simplu, așa-numitul procedeu al marțorilor constă în aceea că pe aceeași fișă de hirtie se cromatografiază amestecul de cercetat și o probă cu aminoacizi cunoscuți. Soluția marțorilor și cea de analizat se aplică pe hirtie, în același timp, pe linia de start. Pe cromatogramă se compară vizual poziția spoturilor colorate a aminoacizilor din soluția de analizat cu poziția aminoacizilor din proba marțorilor.

le ninhidri-
tind combina-
cărui sare
puriu-albaș-

O altă metodă de identificare se reduce la determinarea așa-numitului coeficient de mobilitate R_f al aminoacizilor, care practic se poate calcula folosind ecuația (5.3) :

$$R_f = \frac{d}{D}$$

unde : d - distanța de la linia de start pînă în centrul spotului dat de aminoacidul respectiv și

D - distanța de la linia de start pînă la linia frontului de solvent(vezi fig.5.1).

Comparînd valorile coeficientului de mobilitate aflate pe această cale cu datele din literatură se pot identifica aminoacizii separați.

Aminoacizii identificați pe cromatogramă pot fi determinați cantitativ prin eluția spotului colorat și fotometrarea eluatului obținut la un fotoelectrocolorimetru.

Modul de lucru. Practic cromatografia aminoacizilor liberi în obiectele biologice, suprinde cîteva etape succesive : extracția aminoacizilor din țesuturile animale sau vegetale, aplicarea soluției de aminoacizi pe hîrtie, separarea cromatografică propriu-zisă a aminoacizilor, identificarea și determinarea lor cantitativă.

Extracția aminoacizilor liberi din țesuturile animale.

Se cîntăresc 2 g țesut prelevat imediat după moartea animalului și se triturează într-un mojar în prezență de nisip de cuarț sau sticlă pisată pînă la obținerea unei paste perfect omogene. Peste pasta astfel obținută se adaugă 10 ml acetonă acidulată (100 ml acetonă + 1 ml HCl concentrat). După 30 minute se centrifughează timp de 10 minute la 3000 rot./min. Supernatantul separat se transvazează într-un pahar Berzelius de 25 ml care se introduce într-un termostat la 37-38°C pentru evaporarea acetonei. Operația de extracție a rezidului din eprubeta de centrifugă cu 10 ml de acetonă se repetă încă de două ori, de fiecare dată supernatantul turnîndu-se în paharul Berzelius, după care se evaporă la sec în termostat sau pe baia de apă. Rezidul din pahar se reia cu 1 ml soluție de HCl 1N și se filtrează pe o hîrtie de filtru cantitativă. Se spală paharul și filtrul cu 1 ml soluție de HCl 1N.

+ NH₃

ninhidrină,
colorate în
si.

mina după aceste
te în extractul
omatogramă se

ilor constă în
iază amestecul
luție marilor
timp, pe linia
a spoturilor co-
poziția amino-

Filtratul se evaporă la sec. Se reia rezidul cu 5 ml soluție NH₄OH 0,5 N și apoi se filtrează. La filtrat se adaugă 10 ml etilic. Se agită, se separă stratul eteric, iar stratul apos se poră din nou pe baie de apă la sec. Rezidul se reia cu 1 ml soluție de NH₄OH 0,5 N.

Extracția aminoacizilor liberi din serul sanguin. Un volum de 2 ml ser sanguin (fără urme de hemoliză) se usucă într-un sicator de vid cu clorură de calciu anhidră, la temperatura camerei. Serul deshidratat se pisează sub formă de pulbere într-un mojar mic (se recomandă ca uscarea să se facă direct în mojar) și se trece cantitativ cu 8 ml de acetonă acidulată într-o eprubetă de centrifugă. Conținutul eprubetei se agită cu o baghetă de sticlă din 10 în 10 minute pe o perioadă de timp de 60 minute. Se centrifughează 10 minute la 3000 rot./min. Supernatantul conținut aminoacizii extrași se transvazează într-o fiolă de sticlă cu fundul plat care se introduce într-un termostat la 37-38°C pentru evaporarea acetonei. Rezidul rămas în eprubeta de centrifugă se tratează în mod similar cu 8 ml de acetonă încă de două ori, iar tractele obținute adăugîndu-se la primul supernatant pentru evaporare. După evaporarea acetonei pe fundul fiolei rămîne o peliculă foarte fină de lichid uleios. Pentru uscarea completă a rezidului, aceasta se introduce într-un exsicator de vid. Rezidul uscat din fiolă se dizolvă într-un ml de apă distilată și se eliberează de lipide prin adăugarea a 2 ml eter etilic. Majoritatea a aminoacizilor se poate absorbi cu o pipetă, iar stratul fin rămas se separă pîrtează cu ajutorul unei fișii înguste de hîrtie de filtru. Soluția apoasă de aminoacizi din nou se evaporă într-un exsicator de vid timp de 18-24 ore, după care rezidul uscat se reia cu 0,5 ml apă distilată. Din soluția obținută se aplică pe hîrtia cromatografică probe de cîte 0,02 ml (ceea ce corespunde la 0,4 ml ser sanguin) pentru separarea aminoacizilor prin cromatografia unidimensională și probe de cîte 0,06 ml (corespunzător la 1,2 ml ser sanguin) pentru cromatografia bidimensională.

Extracția aminoacizilor liberi din plantele de cultură. Se recoltează aproximativ 5-10 g semințe mature sau imature, frunze proaspete sau alte organe vegetative și se spală cu apă de robinet, apoi cu apă distilată pentru înapărtarea impurităților.

flaco
disti
ză cu
color
turi
agiti
tre.

exact

unde:

de a 1

sența
reați

1
talie
cool, a
2
3

aderente. Se pune pe o hirtie de filtru sau pe un vas de sticlă și se usucă în etuvă la 90°C , timp de 48 ore fără întrerupere. Probele uscate se macină pînă la obținerea unei pulberi fine. Din pulberea obținută se cîntăresc între 2 și 5 g, în funcție de natura produsului de analizat și se extrag cu 10 ml alcool etilic 96% (încălzit la $50-60^{\circ}\text{C}$ pe baie de apă) timp de 2 ore, prin agitare permanentă. Extractul se separă prin centrifugare și se transvazează într-o pîlnie de separare. Reziduul se extrage încă de două ori cu cîte 10 ml de alcool 80%. Ultimele două supernatante se unesc cu primul în pîlnia de separare și la lichidul obținut se adaugă 15 ml cloroform și 15 ml apă distilată. Amestecul se agită cu atenție și se lasă în repaus 10 minute. Stratul superior conținînd aminoacizii extragi se separă și se evaporă la sec pe baie de apă. Reziduul se dizolvă într-un ml soluție de alcool izopropilic 10% în soluție de HCl 0,1 N.

Aplicarea soluției de aminoacizi pe hîrtia cromatografică. La aplicarea soluției de aminoacizi pe hîrtia cromatografică se cer respectate o serie de reguli. După metoda clasică diametrul punctului de start unde se aplică proba nu trebuie să depășească 5-6 mm. Pentru a realiza acest lucru, aplicarea probelor se face în mod repetat cu ajutorul unei micropipete gradate în porțiuni de cîte 0,003-0,005 ml în cromatografia unidimensională (monodimensională) și cu o cantitate de cîte 0,010-0,015 ml în cromatografia bidimensională. Fiecare nouă porțiune de soluție se aplică după uscarea completă a celei precedente.

Pentru o orientare mai bună pe linia de start a cromatografei se desenează anticipat cu creionul un cerc cu diametrul cercului (5-6 mm), unde se aplică soluția de analizat. Punctul de start se alege la 5,5 cm de la capătul hîrtiei cromatografice, iar în tehnica bidimensională într-un colț, la distanța de 6-7 cm față de lungimea și lățimea hîrtiei, în funcție de adîncimea vasului cu faza mobilă în care se introduce capătul hîrtiei.

La aplicarea soluțiilor de aminoacizi trebuie să se țină cont de capacitatea hîrtiei, mai ales în cazul cromatografiei monodimensionale pe fișii înguste. "Încărcarea" hîrtiei conduce la spălarea aminoacizilor dizolvați, cauzată de lipsa

echilibrului între aceștia și solvent și adsorbția lor în timpul de separare cromatografică.

În cazul identificării aminoacizilor cu ajutorul marșurilor standard se folosesc două soluții standard de aminoacizi cu distribuția indicată în tabelul 10.1, care se aplică odată cu proba de cercetat pe aceeași hirtie cromatografică.

Tabelul 10.
Compoziția soluțiilor standard de aminoacizi

Soluția A	Concentrația, mg/10 ml	Soluția B	Concentrația mg/10 ml
Cisteină	70	Lizină	59
Histidină	62	Arginină	69
Acid aspartic	53	Serină	42
Glicocol	30	Acid glutamic	59
Treonină	47	Alanină	35
Prolină	46	Metionină	59
Tirozină	72	Leucină	54
Valină	46		
Fenilalanină	55		

Ambele amestecuri se aduc la 10 ml cu același solvent și se așteaptă la dizolvarea reziduului obținut după ultima evaporare a soluției de aminoacizi extragi din materialul cercetat.

Distribuția relativă a diferiților aminoacizi prin cromatografierea soluțiilor standard menționate este arătată în cromatograma din fig. 10.1. În spotul notat cu N se găsește roșu de metil. Acest indicator are un coeficient de mobilitate R_f de două ori mai mic decât cel al leucinei și de aceea cu ajutorul său se poate urmări când aminoacidul care migrează cel mai lent ajunge la marginea de jos a cromatografei în procedeele standard.

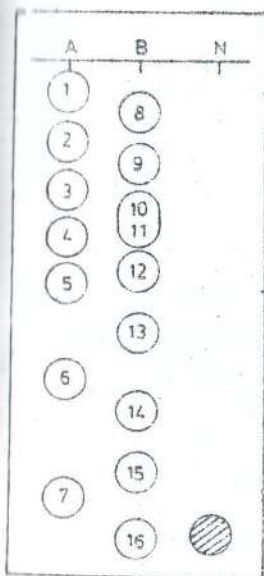


Fig.10.1. Dispunerea aminoacizilor pe hirtie în cromatografia descendentă în sistemul butanolic.

A și B-amestecuri de aminoacizi, N-rogu neutral.

- 1-Cisteina; 2-Histidina; 3-Acid aspartic;
4-Glicocol; 5-Treonina; 6-Prolina;
7-Fenilalanina; 8-Lizina; 9-Arginină;
10-Metionina; 11-Serina; 12-Acid glutamic;
13-Alanina; 14-Tirozina; 15-Valina;
16-Leucina.

Separarea cromatografică a aminoacizilor. Pentru cromatografia aminoacizilor se folosește de obicei hirtia Schleicher-Schüll 2043 și Whatman 1. Dimensiunile hirtiei pot varia în funcție de parametrii camerei cromatografice: Distanța între punctele de start trebuie să fie de 2-3 cm în cazul când pe aceeași foaie de hirtie se aplică mai multe probe. Locul startului pe hirtie depinde de metoda cromatografică folosită (vezi pag.186).

Pentru o separare mai bună a aminoacizilor prin cromatografia monodimensională, se pot folosi forme modificate ale fișii de hirtie, așa cum se arată în figura 10.2.

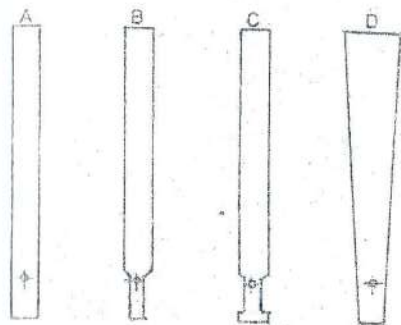


Fig.10.2. Fișii de hirtie pentru cromatografia monodimensională.

A-Formă obișnuită; B, C-Forme cu ista; D-Formă cu aspect conic. Cercul-locul de aplicare a soluțiilor de aminoacizi.

Pe cromatogramele B, C și D spre deosebire de cromatograma obișnuită spoturile de aminoacizi se separă și se evidențiază mult mai izolat, ceea ce este important pentru analiza cantitativă.

După aplicarea soluțiilor de aminoacizi hirtia se introduce în vasul cu faza mobilă și se lasă să migreze dizolventul prin hirtie. Se închide apoi ermetic camera cromatografică. Pentru a reduce la minim evaporarea dizolventului de pe suprafața hirtiei asigurându-se astfel stabilitatea compoziției sistemului, se saturează atmosfera cu vapori de dizolvent care se toarnă direct în vase așezate pe fundul camerei cromatografice.

În literatură sînt descrise multe sisteme de dizolvanți utilizați pentru analiza cromatografică a aminoacizilor. Unul din aceste sisteme care se poate întrebuița în multe cazuri este alcătuit din n-butanol-apă-acid acetic (120: 50: 30). Sistemul de dizolvanți proaspăt preparat se poate utiliza imediat; nu se recomandă să fie păstrat mai mult de 10-15 zile, întrucît după acest interval de timp se produce esterificarea.

O separare foarte bună a aminoacizilor se realizează prin irigarea hirtiei de 4-5 ori cu dizolvent. Faza mobilă se lasă să curgă de 3 ori pînă la 2/3 din lungimea hirtiei, apoi de 2 ori pînă la așapătul fișiei. După fiecare migrare a dizolventului cromatograma se usucă într-un curent de aer.

În cazul necesității de separare rapidă a aminoacizilor se poate lucra după tehnica circulară sau radială.

Cromatografia circulară. Cromatografia circulară se bazează pe migrarea substanțelor amestecului de cercetat, din mijlocul hirtiei în toate direcțiile. În cromatografia circulară hirtia sub forma unei runde se așază orizontal, iar probele de studiat se aplică circular la o mică distanță de punctul central. Faza mobilă se aduce din vas cu ajutorul unui fitil de hirtie de filtru. Aparatura folosită în această tehnică constă din două vase rotunde care pot avea dimensiuni variabile, funcție de scopul urmărit. Pentru încercări preliminare se folosesc două cutii Petri cu același diametru (8-12 cm). Pentru separarea amestecurilor complexe de aminoacizi se recomandă folosirea exsicatorului. Rondela de hirtie se așază între capac și partea inferioară a exsicatorului,

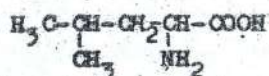
iar dizolvantul se aduce cu ajutorul unui fitil.

Reactivi. 1. Soluție de acid aspartic M/100 în alcool izopropilic 10%.

2. Soluție de tirozină M/100 în alcool izopropilic 10%.

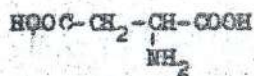
3. Soluție de leucină M/100 în alcool izopropilic 10%.

4. Amestec de soluție M/100 de acid aspartic, tirozină și leucină în alcool izopropilic 10%.



Leucina

(Acid α -aminoisopropic)



Acid aspartic

(Acid α -aminosuccinic)



Tirozina

[Acid α -amino- β -(para-hidroxi-fenil)-propionic]

5. Sistemul de dizolvanți. Se amestecă 60 ml alcool butilic normal (n-butanol) cu 25 ml apă distilată și 15 ml acid acetic glacial într-o pîlnie de separare. După amestecare sistemul de dizolvanți se scurge în cutia Petri.

6. Soluție de ninhidrină 0,5%. Se dizolvă 0,5 g ninhidrină recristalizată în 95 ml acetonă și se adaugă 4 ml apă distilată și 1 ml acid acetic concentrat.

Tehnica cromatografierii. Pe un disc de hirtie cromatografică, se agază cu ajutorul pensetei un gablon transparent cu cinci orificii (unul central și patru radiale). După ce se notează cu creionul aceste semne pe hirtia cromatografică, gablonul se îndepărtează. Discul de hirtie marcată se pune într-o hirtie de filtru obișnuită, împăturită în două așa ca semnul central să nu fie acoperit. Stringînd hirtia aproape de acest semn între degetul mare și cel arătător se sparge semnul central cu un instrument ascuțit, de exemplu cu o baghetă de sticlă avînd diametrul de 0,5 cm și unul din capete ascuțit. Din hirtia cromatografică lată de 1,2 cm și lungă de 1,5-2,0 cm se face un fitil, înfășurînd foaia de hirtie pe o baghetă de sticlă cu diametrul ceva mai mic decît cel

al orificiului central. Fitulul se montează pînă la 3/4 din lungimea lui în orificiu, continuînd să ținem rondela de hirtie cromatografică în foaia de hirtie împăturită în două.

După aceea pe unul din cele patru semne radiale se aplică cu o micropipetă o picătură (0,003 ml) din soluția amestecului de aminoacizi, iar pe celelalte trei semne picături separate din fiecare soluție de aminoacid. Se notează pe marginea rondelii de hirtie aminoacidul, a cărui soluție s-a pipetat pe locul indicat prin semnul respectiv. Hirtia cromatografică se usucă în aer (aer cald). Apoi, rondela de hirtie se agază cu capătul lung al fitilului în jos pe cutia Petri, conținînd dizolvantul pentru eluare și se acoperă cu cealaltă cutie Petri. Solventul se ridică prin fitil și se răspîndește radial în hirtia cromatografică. Viteza de cromatografiere depinde de grosimea fitilului și de distanța între suprafața solventului și suprafața hirtiei, precum și de calitatea hirtiei cromatografice.

Peste 60 minute, cînd solventul pe rondela de hirtie va avea diametrul de 6-7 cm, hirtia cromatografică se ia cu ajutorul unei pensete, se marchează cu un creion frontul solventului și se usucă în aer timp de 1-2 ore pînă la îndepărtarea completă a solventului. Cromatograma uscată se dezvoltă (prin imersare sau mai bine prin pulverizare) cu soluție de ninhidrină 0,5%. Apoi cromatograma se usucă în aer timp de 30-60 minute, după care se introduce în termostat la 80° pentru 5-10 minute, temperatura favorizînd dezvoltarea culorii produsului de reacție dintre aminoacizi și ninhidrina.

După dezvoltare și uscare pe cromatogramă vor apărea, în cazul amestecului de aminoacizi, trei arcuri de cerc colorate în roșu-violet, care indică separarea acidului aspartic, tirozinei și leucinei. În cazul soluțiilor separate de aminoacizi vor apărea câte un arc de cerc colorat, corespunzător aminoacidului respectiv. Zona corespunzătoare acidului aspartic se află aproape de centru, zona tirozinei ocupă o poziție intermediară, iar zona leucinei se găsește aproape de marginea cromatogramei (fig. 10.3).

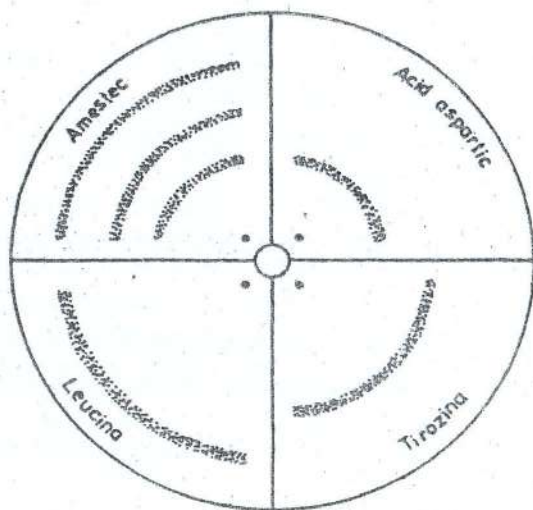


Fig.10.3. Cromatografia circulară a amestecului de acid aspartic, tirozină și leucină și a fiecăruia din acești aminoacizi.

Identificarea și determinarea cantitativă a aminoacizilor.

Identificarea aminoacizilor din amestec pe cromatogramă se efectuează cu ajutorul spoturilor aminoacizilor cromatografiați separat și care s-au folosit drept martori.

Spoturile aminoacizilor din amestec se stabilesc prin coeficientul de mobilitate R_f . Pentru calcularea lui R_f se determină distanța (în mm) de la punctul de start pînă în centrul spotului aminoacidului și se împarte la distanța parcursă de la start de frontul solventului (vezi p.184).

Determinarea cantitativă a aminoacizilor separați pe cromatogramă se poate realiza prin diferite procedee. Unul din aceste procedee se bazează pe formarea complexilor aminoacizilor cu cupru și ninhidrină.

Cromatograma dezvoltată cu ninhidrină este trecută printr-o soluție de azotat de cupru (1 ml soluție saturată $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ se amestecă cu 0,02 ml acid azotic concentrat și se completează la

100 ml cu acetonă sau alcool etilic 96%). După uscare timp de 30 minute la aer spoturile de pe cromatogramă își schimbă culoarea din violet în roșu-orenj. Spoturile colorate se decupează, se taie mărunt și se introduc în eprubete curate și uscate. În fiecare eprubetă se adaugă cite 5 ml metanol și se agită. Complexul colorat, se eluează complet în timp de 15-30 minute, se colorimetrează față de o probă de control (care reprezintă aluatul unui fragment decolorat de cromatogramă, egal ca mărime cu un spot de aminoacid de dimensiuni medii) la 530 nm (filtru verde).

Calculul rezultatelor. Pentru calcularea rezultatelor este necesar să se traseze cite o curbă de etalonare pentru fiecare aminoacid. Curbele de etalonare, se construiesc folosind soluții standard din fiecare aminoacid conținind cantități crescătoare de la 0,07 la 2,8 micrograme de azot α -aminic. Soluțiile standard se cromatografiază în mod identic și pe baza extincțiilor obținute pentru fiecare aminoacid se trasează curba de etalonare corespunzătoare, trecind pe ordonată extincția și pe abscisă micrograme azot aminic în probă. Pe aceste curbe etalon se află concentrația diferiților aminoacizi în soluția cercetată.

Conținutul aminoacizilor se exprimă în mg la 100 g de țesut proaspăt sau 100 ml lichid biologic.

10.1.2. DETERMINAREA AZOTULUI AMINIC

Azotul aminic liber constituie azotul aminoacizilor liberi conținuți în materialul de cercetat. Determinarea azotului aminic este necesară în cazul analizei formelor de combinații azotate, înosebi în investigarea metabolismului aminoacizilor și proteinelor.

10.1.2.1. DOZAREA AZOTULUI AMINIC LIBER ÎN SERUL SANGUIN (METODA G.A. UZBEKOV, MODIFICATA DE Z.S. CIULKOVA)

Principiul metodei. Conținutul de azot aminic se determină colorimetric după reacția de colorare a aminoacizilor cu ninhidri-