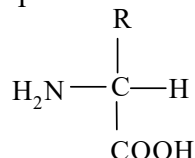


Laborator 4 Medicina

Aminoacizi. Aplicații ale reacțiilor de identificare a aminoacizilor. Teste de solubilitate și metode de separare. Peptide -glutacionul

Aminoacizii sunt unitățile structurale ale proteinelor având formula structurală generală:



de la care fac excepție prolina și hidroxiprolina, care au o funcțiune amino secundară inclusă într-un ciclu pirolitic, fiind de fapt doi iminoacizi. În peptidele și proteinele naturale, aminoacizii sunt uniți prin legături peptidice formate, în general, între grupările amino și carboxil din poziția α . Fiecare proteină are o structură unică, secvența ei de aminoacizi fiind caracteristică speciei și, în unele cazuri, chiar organului sau țesutului. Proteinele globulare sunt compacte, pliate, catenele lor stabilizându-se prin numeroase interacții fizice. Proteinele fibrilare au structură mult mai ordonată decât cele globulare (α -helix pentru α -keratină, planuri pliate β pentru β -keratină și fibroină, triplu helix pentru collagen). La cele globulare nu apare un singur tip de structură, conformația nativă incluzând zone de α -helix, elemente de structură β și regiuni cu structură neregulată.

Reacții de identificare a aminoacizilor

Aminoacizii pot fi identificați prin *reacții generale și particulare* (Tabel 1).

Tabel 1. Reacții de identificare a aminoacizilor

Reacții	Tipul de reacție	Numele reacției	Pozitivă pentru
GENERALE	formarea de săruri complexe	-	Toți aminoacizii
	reacția cu acidul azotos	Van Slyke	Toți aminoacizii
	reacția cu formaldehida	Sørensen	Toți aminoacizii
	reacția cu ninhidrina	Ruheman	Toți aminoacizii
PARTICULARE	reacția cu acidul azotic	Xantoproteică	Fenilalanina Tirozina Triptofan
	reacția cu HgNO_3	Millon	Tirozina
	reacția cu acidul diazobenzensulfonic	Pauly	Histidina Tirozina
	reacția cu α -naftol	Sakaguchi-Weber	Arginina
	reacția cu aldehide	Adamkiewicz-Hopkins-Cole	Triptofan
	reacția cu hidroximetilfurfural	Pettenkofer	Triptofan
	reacția cu isatina	-	Prolina Hidroxiprolina
	reacția cu acetat de plumb	-	Cisteina Metionina
	reacția cu nitroprusiat de sodiu	-	Cisteina Metionina

Reacțiile generale care servesc la identificarea aminoacizilor se datorează prezenței în moleculă a grupărilor $-\text{COOH}$ și $-\text{NH}_2$, iar cele specifice sunt determinate de existența diverselor grupe funcționale cuprinse în radicalii acestora ($-\text{OH}$, $-\text{SH}$, imidazol, guanido, fenil, etc.).

Reacții generale

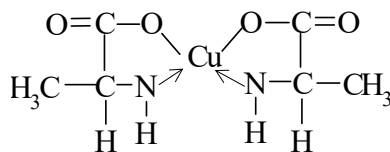
Formarea de săruri complexe

Principiu: α -aminoacizii formează cu sărurile de cupru, cadmiu, nichel, plumb, săruri complexe interne sau chelați care sunt colorate, stabile și greu solubile. Metalul care intră în structura

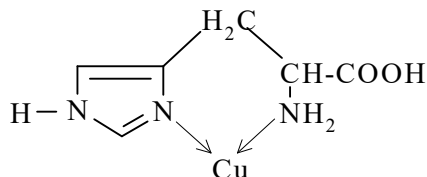
complexului colorat se leagă de aminoacid prin intermediul oxigenului și prin perechea de electroni neparticipanți ai grupei amino.

Exemple:

- Cuprul formează cu α -alanina un complex cu structura:



- Cuprul formează cu histidina un complex intramolecular:



Reactivi:

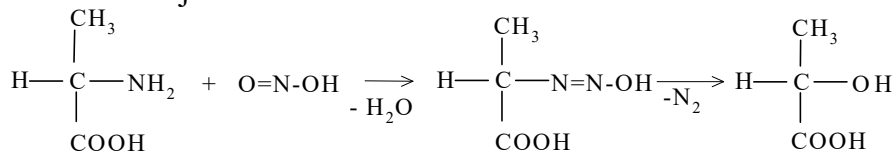
- Soluție de aminoacid 1%;
- NaOH 10 %;
- Sulfat de cupru 1 %.

Mod de lucru:

- se introduc într-o eprubetă 1-2 ml soluție de aminoacid 1% (glicocol, alanină etc.);
- se adaugă circa 1 ml NaOH 10%;
- soluția de CuSO_4 1 % se adaugă picătură cu picătură până la apariția unei colorații albastre intense.

Reacția cu acidul azotos (Van Slyke)

Principiu: Acidul azotos produce o dezaminare a aminoacizilor cu degajare de azot. Reacția decurge conform schemei de mai jos:



Această metodă a fost utilizată la *dozarea azotului aminic din aminoacizi și proteine*.

Reactivi:

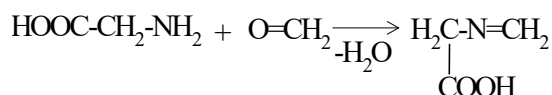
- Soluție de aminoacid 5 % (glicocol, alanină);
- NaNO_2 5%;
- CH_3COOH 2 N.

Mod de lucru:

- într-o eprubetă se introduc cca. 2 ml soluție de aminoacid 5 %;
- se adaugă circa 2 ml soluție de NaNO_2 5%;
- se adaugă 2 ml soluție de CH_3COOH 2N;
- se încălzește eprubeta la flacără sau în baie de apă;
- se observă o degajare de gaz (azot) al cărui volum se poate măsura.

Reacția Sörensen (cu aldehidele)

Principiu: Prin tratarea α -aminoacizilor cu formaldehidă se blochează grupa amino cu formare de bază Schiff sau derivați azometinici, iar grupa carboxil liberă va acidifia mediul, fapt pus în evidență cu ajutorul indicatorului roșu de metil.



Reactivi:

1. Soluție de glicocol 2%;
2. Formol;
3. Roșu de metil.

Mod de lucru:

- într-o eprubetă se introduc cca. 2 ml soluție de glicocol 2 %;
- se adaugă 1-2 picături roșu de metil;
- se observă apariția unei colorații galbene ceea ce indică un pH peste 6,2 (indicatorul roșu de metil virează între 4,4 - 6,2);
- prin adăugarea a 2 ml formol, colorația virează spre roz ca urmare a scăderii pH-ului.

Reacția cu ninhidrina

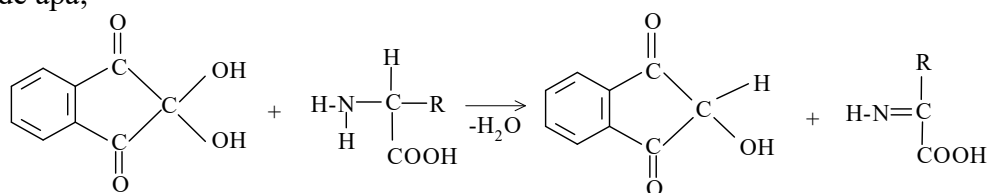
Principiu: Toți aminoacizii formează cu ninhidrina (hidratul tricetohidrindenului) un compus colorat albastru violet, denumit “purpura lui Ruheman”. Fac excepție prolina și hidroxiprolina care formează un compus colorat în galben, respectiv portocaliu, datorită structurii iminice.

În afară de aminoacizi, reacția cu ninhidrina este pozitivă pentru peptide și proteine, dar culoarea se formează cu întârziere și cu o intensitate redusă. Reacția este dată de prezența simultană a grupărilor amino și carboxil, având loc la cald, în soluție neutră sau slab bazică.

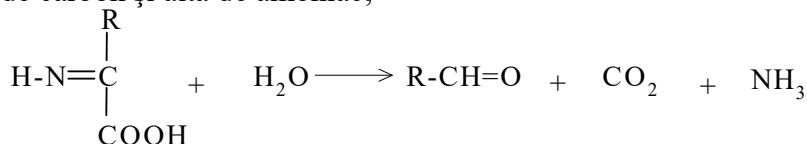
Reacția cu ninhidrina este foarte importantă deoarece este cea mai utilizată reacție pentru *developarea cromatogramelor* ce separă aminoacizii liberi din lichide biologice, aminoacizii rezultați în hidrolizatele proteice și pentru dozarea colorimetrică a aminoacizilor.

Fazele reacției sunt următoarele:

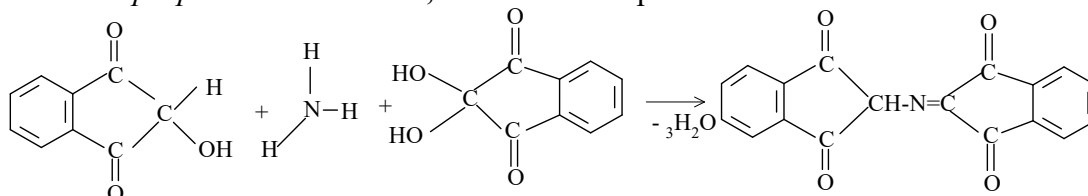
- 1- oxidarea aminoacidului la iminoacid, reducerea ninhidrinei și eliberarea unei molecule de apă;



- 2- în prezența apei și la cald, iminoacidul rezultat eliberează o moleculă de aldehydă, una de dioxid de carbon și alta de amoniac;



- 3- în ultima fază a reacției, o moleculă de tricetohidrinden reacționează cu amoniacul și o moleculă de ninhidrină redusă, dând naștere unui complex colorat în albastru-violet, denumit “*purpura lui Ruheman*”, care absoarbe specific la 540 nm.

**Reactivi:**

1. Soluție de aminoacid 0,1 %;
2. Ninhidrină 0,1 % în acetonă, alcool etilic sau butanol.

Mod de lucru:

- într-o eprubetă se pun 1-2 ml soluție de aminoacid 0,1 %;
- se adaugă 1 ml soluție de ninhidrină 0,1 %;
- se încălzește pe o baie de apă 1-2 minute;
- apare o colorație albastră violetă.

Reacții particulare

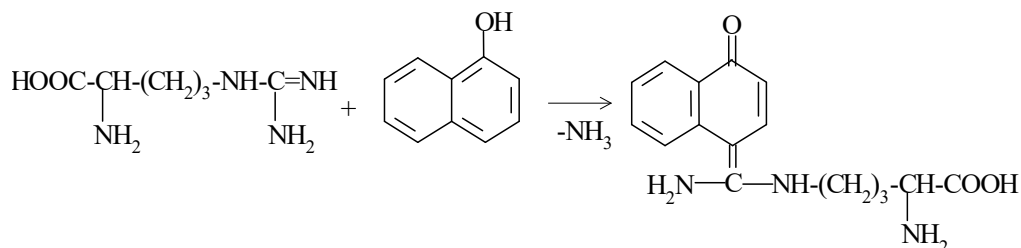
Reacția Sakaguchi-Weber

Principiu: Arginina, datorită grupării guanidice pe care o conține în structura sa, formează în mediu alcalin, în prezența α -naftolului sau a 8-oxi-chinoleinei și a hipobromitului de sodiu ca oxidant, un produs de condensare colorat în roșu. Această reacție este utilizată și pentru identificarea argininei în cromatografia pe hârtie.

Reactivi:

1. Arginină 1 %, caseină 1 %, ovalbumină 1 %;
2. Soluție alcoolică de α -naftol 2 %;
3. Soluție de NaOBr (obținută prin tratarea a 100 ml NaOH 5% cu 2 g Br₂).

Reacția decurge după schemele de mai jos, rezultând în fiecare caz câte un complex colorat vișiniu:



Mod de lucru:

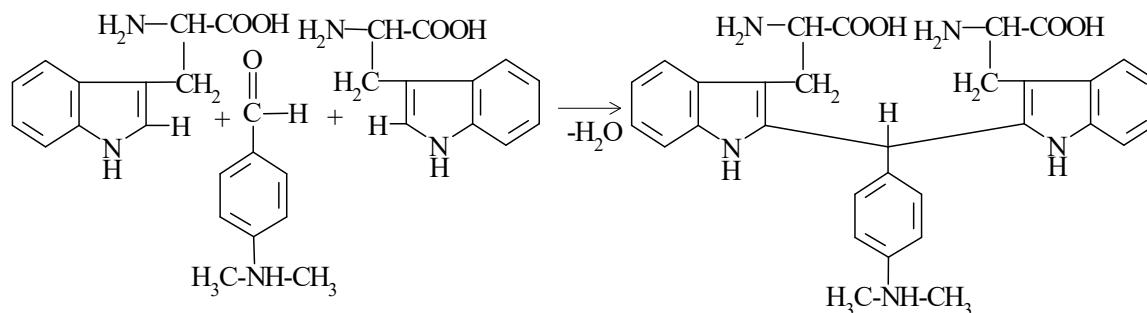
- într-o eprubetă se introduc circa 2 ml soluție de arginină, caseină sau ovalbumină;
- se adaugă 1 ml soluție α -naftol;
- se adaugă 10-15 picături soluție de NaOBr sau NaOCl;
- se obține o colorație roșie a cărei formare poate fi accelerată și intensificată la cald.

Reacția Adamkiewicz-Hopkins-Cole

Principiu: Tryptofanul, în mediu puternic acid, se condensează cu unele aldehyde având ca rezultat un produs colorat. Se utilizează frecvent următoarele aldehyde:

- acidul glioxilic HOOC-CHO;
- aldehida cinamică C₆H₅-CH=CH-CHO;
- p-dimetilaminobenzaldehida (CH₃)₂-N-C₆H₄-CHO (p-DABA);
- formaldehida (CH₂O).

Reacția triptofanului cu p-DABA decurge astfel:



p-DABA este utilizată și în metode de dozare a triptofanului (variante Lombardi).

Reactivi:

1. Soluție de triptofan, caseină, ovalbumină 1 %;
2. Acid acetic glacial (care conține acid glioxilic ca impuritate);
3. Acid sulfuric concentrat;
4. p-DABA 1 % în HCl concentrat.

Mod de lucru:

- într-o eprubetă se pun 1-2 ml soluție de triptofan sau una din proteine;
- se adaugă un volum egal de acid acetic glacial sau p-DABA;
- după agitare se adaugă pe pereții eprubetei 1-2 ml acid sulfuric concentrat;
- la limita de separare a celor două straturi apare un inel albastru-violet.

Reacția Pettenkofer

Principiu: Triptofanul liber sau rezultat prin hidroliza proteinelor se poate identifica prin tratare cu zaharoză sau fructoză și acid sulfuric concentrat.

Posibilitatea identificării triptofanului dintr-un lanț polipeptidic se datorează următoarelor reacții:

- hidroliza zaharozei și transformarea glucozei și fructozei rezultate în hidroximetilfurfural;
- hidroliza parțială a proteinei cu eliberare de triptofan;
- reacția de culoare a triptofanului cu hidroximetilfurfuralul.

Reacția este utilizată și pentru *identificarea ozelor*.

Reactivi:

1. Soluție de triptofan 1 % sau ovalbumină 1%;
2. Zaharoză 2 %;
3. Acid sulfuric concentrat.

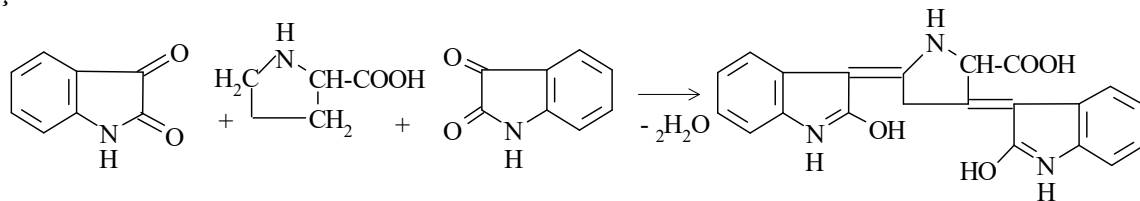
Mod de lucru:

- într-o eprubetă se introduc 2 ml soluție de triptofan sau de proteină;
- se adaugă 2-3 picături soluție de zaharoză și se agită;
- se lasă să se scurgă pe pereții eprubetei cu atenție 2 ml de acid sulfuric concentrat;
- la limita de separare între cele două soluții se formează un inel de culoare roșie care indică prezența triptofanului.

Reacția cu isatina

Principiu: Prolina și hidroxiprolina se condensează cu isatina dezvoltând o colorație albastră.

Reacția are loc astfel:



Reacția este folosită atât la *identificarea prolinei și hidroxiprolinei pe cromatograme*, precum și pentru *dozarea colorimetrică a prolinei urinare în boli de collagen*.

Reactivi:

1. Isatină 0,4 % în acetonă sau butanol;
2. Soluție de prolină 0,1%, hidroxiprolină 0,1% sau proteină 1 %.

Mod de lucru:

- într-o eprubetă se adaugă cca. 1 ml soluție de prolină, hidroxiprolină sau proteină;
- se adaugă 0,5 ml soluție de isatină;
- după o ușoară încălzire se dezvoltă o colorație albastră.

Teste de solubilitate

Reactivi:

1. Soluții de aminoacizi: glicocol, α -alanină, acid glutamic, lizină, tirozină;
2. HCl 0,2 M;
3. NaOH 0,2 M;
4. Alcool etilic;
5. Cloroform;

Mod de lucru: 0,2 g din fiecare aminoacid se introduc în câte o eprubetă. Se adaugă apă. Se observă solubilizarea. Se repetă pentru fiecare dintre reactivii 2-5.

Separarea aminoacizilor prin cromatografie în strat subțire pe plăci cu silicagel

Silicagelul G, depus ca strat subțire, este un produs de policondensare a acidului ortosilicic, grupările active fiind resturile -OH. Are în compoziția sa ca liant CaSO₄ 1/2 H₂O, în cantități diferite (5-10%).

Cromatografierea. Se aplică probele și martorii (soluții de aminoacizi) pe linia de start trasată la 1,5 cm de marginea plăcii în spoturi mici. Placa este introdusă în tancul cromatografic după ce spoturile au fost uscate la aer. Tancul conține amestecul de solvenți de dezvoltare.

Se pot folosi: etanol 96%:apă; (70:30); n-propanol:apă;(70:30); n-butanol:acid acetic:apă (80:20:20)

Dezvoltarea se realizează monodimensional până ce frontul solventului atinge partea superioară a plăcii. Se scoate placa și se usucă la 90° C, 5-10 minute.

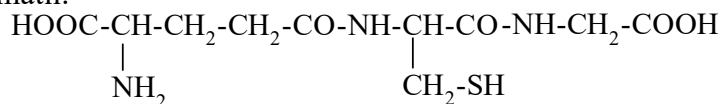
Evidențierea zonelor separate se poate face prin detectare policromatică. Se pulverizează placa cromatografică cu o soluție de ninhidrină. Se încălzesc cromatogramele 4 minute la 110 °C și se notează culorile imediat, deoarece după 10 minute încep să scadă în intensitate. Culorile specifice sunt prezentate în tabelul 2.

Tabel 2. Detectarea policromatică a aminoacizilor în CSS

Aminoacid	Culoare
Lizina	brun-roșu, apare un inel roz după staționare
Histidina	brun-strălucitor cu un inel galben interior
Arginina	purpuriu închis
Serina	brun-verzui
Glicina	brun-orange
Prolina	verde strălucitor cu inel galben
Cisteina	verde
Triptofan	brun cu inel albastru luminos
Fenilalanina	galben-verzui
Leucina	purpuriu luminos

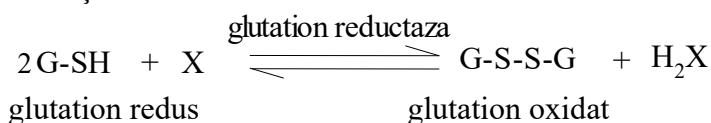
Peptide – glutationul. Dozarea glutationului. Semnificația diagnostică

Glutationul (γ-glutamyl-cisteinil-glicina) a fost izolat pentru prima dată din drojdii, ulterior fiind descoperit și în hematii.



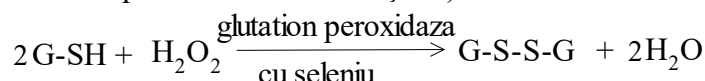
glutathion

Proprietățile glutathionului derivă din faptul că are grupa –SH (tiol) care se poate oxida sub acțiunea unor compuși variați ca structură.



In vivo, reacția este catalizată de glutathion reductază, o enzimă NAD⁺ sau NADP⁺ dependentă. Sistemul glutathion - glutathion reductază protejează hematiile, împiedicând liza acestora.

Glutathionul intervine în atenuarea acțiunii toxice a H₂O₂ (poate să intervină ca antioxidant în prevenirea stresului oxidativ implicat în diferite afecțiuni).



Dozarea glutathionului redus prin metoda Beutler

Principiu: Glutathionul formează cu acidul 2, 2' Dinitro-5,5'-dithiodibenzoic (DTNB), un complex de culoare galbenă, intensitatea culorii fiind proporțională cu concentrația.

Reactivi:

1. Reactiv de precipitare: 1,67g acid metafosforic, 0,2 g EDTA , 30 g NaCl și apă la 100 ml ;
2. Tampon disodic 0,3 M;
3. Soluție DTNB 40 mg % în citrat de sodiu 1 % (preparată extemporaneu);
4. Soluție stoc glutathion redus 100 mg %.

Mod de lucru:

Sânge total 0,4 ml (sau hemolizat vol. 0,8 ml)
 H₂O dist. 1,6 ml (în cazul hemolizatului 1,2 ml)
 Soluție de precipitare 3ml
 Se agită, se lasă 10 min. și se centrifughează.
 Supernatant 1ml
 Tampon disodic 4 ml
 Soluție DTNB 0,5 ml

Se citește imediat extincția la 412 nm. Blancul de reacție se lucrează la fel, înlocuind volumul probei cu volumul corespunzător de apă.

Aceeași tehnică se folosește și pentru dozarea glutathionului hepatic doar că se utilizează un omogenat obținut din ficat în tampon fosfat, iar rezultatul se raportează la cantitatea de proteine tisulare dozate prin metoda Lowry.

Calcul:

$$\text{glutathion redus (mg \% ml sânge)} = (E_p - E_{bl}) / 13600 \times 5/2 \times 11/2 \times 307 \times 100$$

unde: 13600 este coeficientul de absorbție molară a glutathionului redus, iar 307 este greutatea moleculară a glutathionului redus