

Iniciació a la bromatologia (pràctiques)	Protocols d'anàlisi	Ref: 22.2
<b>AMINOÀCIDS PER CG</b>		

## OBJECTE I FONAMENTS

Els trifluorobutilèsters dels aminoàcids poden ésser separats i quantificats per cromatografia de gasos. Aquest trifluorobutilèsters aminoacídics experimenten una retenció selectiva depenent de la temperatura, amb etilenglicoladipat (EGA) o amb metil-fenil-silcona ("rubber"), (OV-17)

La obtenció dels trifluorobutilèsters requereix:

1r.- Hidròlisi de les proteïnes.

2n.- Trifluorobutilació mitjançant fases intermèdies: a) Conversió en metilèsters. b) Conversió dels metilèsters a butilèsters. c) Obtenció de trifluorobutilèsters.

S'utilitza ornitina com estàndard intern, per ser un aminoàcid inexistent a les mostres objecte de l'anàlisi.

Cal preparar simultàniament amb els problemes, una mescla estàndard d'ornitina i els aminoàcids que interressi determinar, a fi de calcular els factors de resposta i els temps de retenció relatius de cada aminoàcid respecte l'ornitina.

## MATERIAL

Balança analítica.

Balança granatària.

Baló de 250 ml, esmerilat.

Columna de les característiques indicades a la metodologia.

Cromatògraf de gasos proveït amb registrador-integrador, equipament complementari i detector d'ionització de flama.

Cronòmetre.

Rellotge avisador.

Fluxòmetre de bombolla.

Matrassos aforats de 100 ml.

Microxeringa per C.G., graduada, de 10 µl.

Pipetes aforades de 25 ml.

Placa calefactora.

Refrigerant de reflux.

Tubs d'assaig de 10 ml, amb tap roscat.

Evaporador rotatori ("Buchi") amb dispositiu de buit.

Bomba de buit.

Bany termostàtic d'aigua.

Instal·lació protectora de la bomba de buit.

Bany de parafina amb agitador i termòstat regulable.

Bateries d'agitadors magnètics.

Per mostres amb contingut de sucres alt, cal, a més:

Matràs esmerilat forma baló de 1000 ml.

3 embuts de decantació esmerilats (tant a la boca com a la clau), o bé 1 que caldrà rentar cada cop que calgui, de 500 ml.

Columna amb placa filtrant i clau, esmerilat femella, de 2 cm de  $\varnothing$ .

## REACTIUS

Àcid clorhídric 1'25N en alcohol metílic, obtingut segons el procediment emprat a la pràctica 22.1.

Àcid clorhídric 1'25N en butanol, obtingut mitjançant procediment similar a l'utilitzat per l'obtenció del HCl 1'25N/metanol.

Aigua destil·lada.

Aire sintètic qualitat cromatogràfica.

Hexà pa.

Hidrogen qualitat cromatogràfica

Nitrogen qualitat cromatogràfica.

Clorur de metilè anhidre, grau espectromètric.

Anhídrid trifluoracètic, qualitat C.G.

Parafina líquida transparent incolora.

Gel de sílice (per dessecació).

Clorur càlcic (per dessecació).

Àcid clorhídric ~6N ( $\frac{1}{2}$  HCl conc. i  $\frac{1}{2}$  H<sub>2</sub>O dest.).

HCl 0'1N pa.

Clorhidrat d'ornitina patró.

Dissolucions d'aminoàcids patró per test: En un matràs aforat de 50 ml, dissoldre 130 mg de patró d'aminoàcid en 20-25 ml de HCl 0,1N (si es presenten dificultat per dissoldre algun aminoàcid, afegir unes gotes de HCl concentrat), arrasar fins a 50 ml amb HCl 0'1N (una dissolució per cada aminoàcid). Procedir igualment amb l'ornitina.

Per mostres amb contingut de sucres alt, cal, a més:

Reina Dovex 50 WX-8 (40 cc).

Paper indicador.

Amoníac 2N

NaOH diluït.

Nitrat de plata.

## METODOLOGIA 1 (per mostres amb contingut de sucres baix o moderat)

1.- Pesar una quantitat de mostra, homogeneitzada i molturada, que contingui uns 200-250 mg de proteïna.

2.- Hidrolitzar amb HCl 6N a reflux (~110 °C) durant 22 hores.

3.- Deixar refredar. Filtrar, rentant el residu i arreplegant el filtrat.

4.- Evaporar al buit a uns 60 °C fins sequedat quasi total. Redisoldre amb aigua destil·lada i repetir l'evaporació 2 cops més.

5.- Dissoldre en petites quantitats de HCl 0'1 N i passar a un matràs aforat de 100 ml. Arrasar i homogeneïtzar.

6.- Passar 25 ml a un matràs esmerilat de forma pera de 100 ml. Afegir 2 ml de l'estàndard intern d'ornitina. Simultàniament, preparar una mostra estàndard amb 2 ml de l'estàndard intern i 2 ml de dissolució patró de cadascun dels aminoàcids que volem determinar. A partir d'aquí, procedirem paral·lelament amb aquesta mostra estàndard.

7.- Evaporar al buit a 60 °C fins sequedat.

- 8.- Deixar un mínim de 15 hores en un dessecador al buit.
- 9.- Afegir 10 ml de metanol/HCl 1'25N i agitar durant 30 minuts en placa magnètica, a temperatura ambient i el flascó tapat.
- 10.- Evaporar a 60 °C fins sequedat.
- 11.- Afegir 10 ml de n-butanol/HCl 1'25N, tancar amb un tap de CaCl<sub>2</sub> i escalfar en un bany de parafina a 100 °C ± 1 °C durant 2'5 hores i agitació magnètica.
- 12.- Evaporar al buit a 60 °C fins sequedat.
- 13.- Afegir 4 ml de diclorometà i 1 ml d'anhídrid trifluoracètic.
- 14.- Col·locar durant 15 minuts a temperatura ambient i tapat.
- 15.- Passar 2 ml a un tub de pressió amb tanca hermètica a rosca i deixar 5 minuts a 150 °C (ó 5 hores a l'ambient).
- 16.- Refredar el tub amb aigua freda i guardar en frigorífic. Treure del frigorífic només el temps necessari per injectar en el CG, a fi de que les condicions de estàndard i problema siguin idèntiques..
- 17.- Injectar 2 µl en el CG.

## **METODOLOGIA 2 (per mostres amb contingut de sucres elevat)**

- 1.- Procedir com en els punts 1 al 3 de l'apartat anterior.
- 2.- Evaporar a quasi sequedat al buit a 60 °C.
- 3.- Diluir en aigua destil·lada i portar a pH aprox. de 3, mitjançant solució de HCl o de NaOH. El volum final no ha de ultrapassar dels 300 ml.
- 4.- Passar per una columna de 2 cm de  $\text{AE}$  farcida amb 40 cc de reïna Dowex WX-8, a un flux màxim de 0'5 ml/mn (es pot deixar a un flux molt més baix i deixar per la nit), segons el procés següent:
  - a) Activar la columna amb 300 ml de HCl 6N.
  - b) Rentar amb aigua fins test de clorurs negatiu (prova de turbidesa amb nitrat de plata).
  - c) Passar la mostra per la columna (retenció dels aminoàcids).
  - d) Passar aigua destil·lada fins pH neutre (aproximadament).
  - e) Passar 250 ml d'amoníac 2N (elució dels aminoàcids)
  - f) Passar 250 ml d'aigua (arreglar aquestes dues últimes fraccions)
- 5.- Evaporar al buit a 60 °C fins sequedat.
- 6.- Procedir seguint des de el punt 5 de la Metodologia 1.

### Paràmetres cromatogràfics :

Gas portador = nitrogen

Flux gas portador = 80 ml/mn.

Flux d'hidrogen = 50 ml/mn

Flux d'aire = 450 ml/mn.

Temperatura inicial = 75 °C

Temperatura final = 215 °C.

Gradient de temperatura ("rate") = 4°C/mn

Detector = Ionització de flama.

Sensibilitat = 103 X 2.

Temperatura del detector = 350 °C

Temperatura injector = 200 °C.

Columna = Vidre, de 1'5 metres i 4 mm de diàmetre intern, amb fase estacionària d'etilenglicoladipat al 0'6 % sobre suport "Chromosorb 60-100".

## CÀLCULS

$$\%A_x = 400 \cdot \frac{A_x}{A_{si}} \cdot \frac{m_{si}}{m} \cdot F_c$$

a on:

**%AX** = % de l'aminoàcid considerat, sobre el total de la mostra.

**AX** = àrea del pic de l'aminoàcid considerat.

**Asi** = àrea del pic de l'estàndard intern (ornitina).

**msi** = massa d'estàndard intern (ornitina)

**m** = massa de mostra.

**Fc** = factor de correcció del aminoàcid.

El factor de correcció (**Fc**) es calcula considerant:

$$F_c = \frac{1}{F_r} = \frac{F_g}{F}$$

a on:

**Fr** = factor de resposta relatiu =  $F/F_e$

essent **F** el factor de resposta absolut de l'aminoàcid (*Àrea/massa*) i **Fe** el factor de resposta absolut de l'estàndard (*Àrea de l'estàndard / massa de l'estàndard*).

## OBSERVACIONS

El temps de hidròlisi de les mostres pot reduir-se considerablement, utilitzant la pressió (en autoclau). Kaiser, Gehrke i altres investigadors han utilitzat l'autoclau (4 hores a 145 °C), obtenint resultats tan acceptables i reproduïbles com els obtinguts per hidròlisi a 110 °C.

Basant-me en el mètode dels esmentats investigadors, he comprovat empíricament una relació entre el temps d'hidròlisi i la temperatura adient d'hidròlisi, que respon a la següent expressió:

$$e^{[a+b \cdot (418-T)]} = \theta$$

en que **T** és la temperatura en Kelvin i  $\theta$  el temps en hores, essent **a** i **b** constants característiques per cada aminoàcid; per la lisina aquests valors son aproximadament de  $a=1'300$  i  $b=0'0488$  (determinats empíricament). Teòricament, cal esperar lleugeres desviacions dels valors i la reproductibilitat de **a** i **b** per la serina, tirosina, isoleucina, valina i leucina, desviacions bastant més apreciables per la metionina i ja del tot inadmissibles pel triptòfan.

El mètode no és vàlid per determinar cistina i arginina (el pics no apareixen utilitzant columna EGA) ni pel triptòfan que queda destruït quasi totalment a la hidròlisi àcida. La metionina queda parcialment destruïda a l'hidròlisi.

Si volem determinar cistina i/o arginina, cal utilitzar una columna de OV-17, però cal observar que pel que fa a la resta d'aminoàcids, els resultats obtinguts amb aquesta columna son bastant menys fiables que els obtinguts amb la columna EGA.

Per determinar triptòfan, alguns autors ha investigat amb hidròlisi alcalines o amb dissolucions d'àcid tioglicòlic.

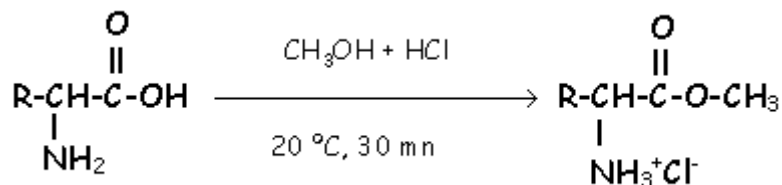
L'error per defecte per la metionina, pot compensar-se multiplicant el resultat obtingut

pel factor empíric 1'25. Els resultats són, de totes maneres, poc reproduïbles si els comparem amb els altres aminoàcids, però bastant més bons que el mètode semiquantitatiu per cromatografia en capa fina.

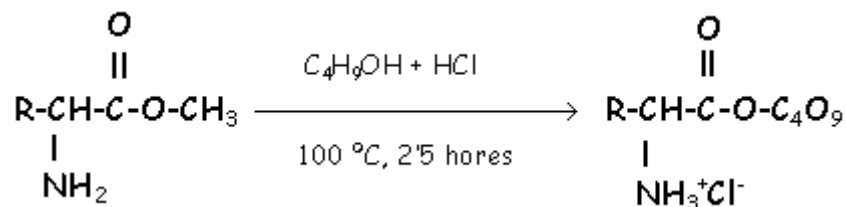
Pot suprimir-se el pas de la metilació fent la butilació amb n-butanol/HCl 3N; i fent un tractament amb ultrasons durant 15 minuts a 100 °C

### Esquema de les reaccions químiques del procés:

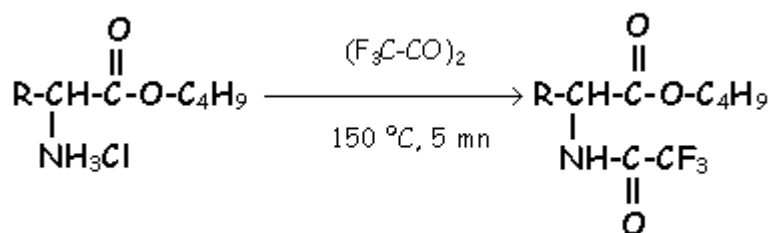
#### Metilació:



#### Butilació:



#### Trifluoroacetilació:



### Aspecte dels cromatogrames

Els temps de retenció relatius dels aminoàcids, referits a l'ornitina, amb columnes EGA com la utilitzada en aquesta pràctica, són els que s'indiquen a la taula de la pàgina següent:

<b>aminoàcid</b>	<b>t<sub>R</sub></b>
alanina	0'26
valina	0'29
isoleucina	0'36
glicina	0'37
leucina	0'41
prolina	0'44
treonina	0'47
serina	0'53
hidroxiprolina	0'63
metionina	0'66
fenilalanina	0'70
asparagina	0'72
glutamina (+ ac. glutàmic)	0'83
tirosina	0'89
ornitina	1'00
lisina	1'07

L'àcid glutàmic i la glutamina apareixen com un únic pic, per produir-se una transformació de l'àcid glutàmic en glutamina durant el procés. El resultat s'expressa com "àcid glutàmic + glutamina expressats com glutamina".

El primer pic que apareix immediatament després de la injecció correspon al dissolvent (diclorometà). A continuació emergeix un pic irregular i asimètric que correspon a l'excés de reactiu. De vegades també poden aparèixer tot seguit un cert nombre de petits pics que corresponen a productes de descomposició i impureses.

### **Qüestionari 22.2.- Aminoàcids per CG**

- 1.- Deducir raonadament les fórmules utilitzades en els càlculs
- 2.- Fer l'esquema gràfic del procediment analític
- 3.- Confeccionar el corresponent "butlletí d'anàlisi".
- 4.- Idear un procediment per determinació d'aminoàcids per CG, basat en aquest, en el cas de que no disposessim de patró intern d'ornitina.
- 5.- Dissenyar un protocol d'anàlisi per poder treballar simultàniament amb varies mostres a la vegada.