

А. ЛИНДПЕРЕ

ФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАЛЫХ КОЛИЧЕСТВ α -АМИННОГО АЗОТА АМИНОКИСЛОТ

Большинство применяемых в настоящее время методов определения малых количеств α -аминокислот основано на фотометрическом измерении поглощения света окрашенными продуктами, образовавшимися вследствие реакции аминокислот с нингидрином.

В литературе описаны различные модификации определения аминокислот с нингидрином, которые по существу можно разделить на две группы. В одном случае для проведения реакции используется восстановленный нингидрин — гидринтантин (Moore, Stein, 1948; Fowden, 1951), или же реактивы, которые наряду с нингидрином содержат продукты, восстанавливающие его, например, хлорное олово (Moore, Stein, 1941), цианистый калий (Froll, Cannon, 1953), аскорбиновая кислота (Алексеев, 1964; Meyer, 1957). В другом случае восстановители не добавляются, а стабильность окраски раствора достигается внесением в смесь ионов двухвалентной меди (Зайцева, Тюленева, 1958; Пасхина, 1964; Филиппович, 1958) или кадмия (Маркосян, 1958; Семенов и др., 1961).

В настоящей работе исследовались условия определения α -аминного азота аминокислот с нингидрином в среде этилового спирта в присутствии соли кадмия. Метод был использован для определения α -аминного азота аминокислот в гидролизатах торфа, но может найти применение и при других биологических объектах.

Выбор растворителя и кислотности. Чувствительность реакции α -аминокислот с нингидрином в большой степени зависит от растворителя, в котором происходит реакция (Meyer, 1957). В качестве растворителя для нингидринового реактива предлагается использовать этиловый (Зайцева, Тюленева, 1958; Meyer, 1957; Patton, Chism, 1951; Thomson, Morris, 1959; Froll, Cannon, 1953) и *n*-бутиловый спирт (Ермакова, 1957; Patton, Chism, 1951). Преимущество этилового спирта по сравнению с бутиловым — возможность проведения реакции в однородной среде, что повышает воспроизводимость результатов. Кроме того, по данным литературы (Patton, Chism, 1951), образующиеся комплексные соединения кадмия с продуктом реакции нингидрина с α -аминокислотами в этиловом спирте отличается стабильностью. В данной работе реакцию α -аминокислот с нингидрином провели в 70%-ном этиловом спирте, т. е. соотношение исследуемого раствора и этилового спирта составляло 2 : 5. Чувствительность реакции уменьшается с повышением содержания воды в среде (Meyer, 1957), что подтвердилось и в проведенной работе при использовании 70 и 80%-ных реакционных смесей (рис. 1) по этиловому

спирту, хотя данные холостого опыта в последнем случае несколько повышенные.

Другое важное условие определения — сохранение определенной кислотности среды, что достигается введением в нингидриновый реактив уксусной кислоты (Зайцева, Тюленева, 1958). В данной работе конечная концентрация уксусной кислоты составляла 0,7% (рН среды 5,3). Повышение концентрации уксусной кислоты в

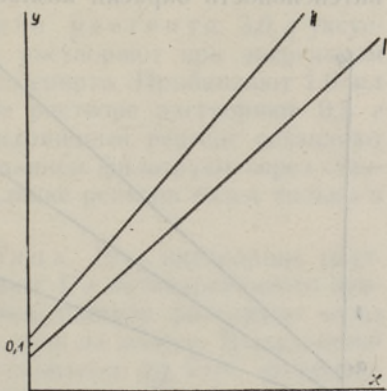


Рис. 1. Зависимость интенсивности комплексного соединения α -аминокислот с нингидрином от концентрации этанола в среде: кривая I — 70%-ный этанол; II — 80%-ный этанол; y — оптическая плотность; x — содержание аминного азота.

реакционной смеси вызывало уменьшение интенсивности окраски комплексного соединения α -аминокислот с нингидрином.

Количество стабилизатора. Для стабилизации окраски комплексного соединения α -аминокислот с нингидрином к реакционной смеси прибавляли соли кадмия. Чтобы выяснить оптимальную концентрацию, опыты проводились с различными количествами уксуснокислого кадмия в составе нингидринового реактива. Выяснилось (рис. 2), что с по-

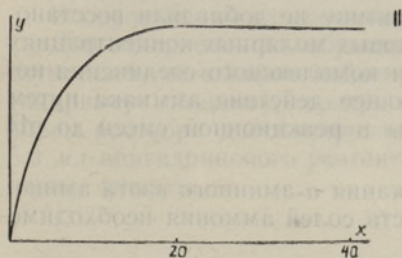


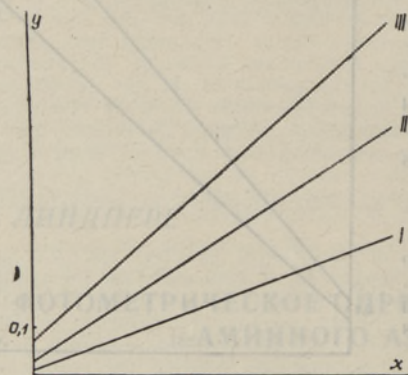
Рис. 2. Зависимость интенсивности комплексного соединения α -аминокислот с нингидрином от количества соли кадмия: y — оптическая плотность; x — количество уксуснокислого кадмия в мг/мл нингидринового реактива.

вышением концентрации уксуснокислого кадмия в составе нингидринового реактива до 20 мг/мл, резко повысилась и интенсивность окраски комплексного соединения α -аминокислот с нингидрином. При дальнейшем повышении концентрации ацетата кадмия от 20 до 40 мг/мл интенсивность окраски комплексного соединения изменилась немного. При использовании более высоких количеств соли кадмия иногда отмечалось повышенное окрашивание в холостом опыте.

Замена соли кадмия солью меди в данных условиях не дала положительного результата.

Длительность нагревания. Из опытов выяснилось, что интенсивность окраски комплексного соединения α -аминокислот с нингидрином зависит от температуры, при которой проводится реакция, и от продолжительности нагревания (рис. 3). Для получения более точных и

совпадающих данных, реакцию следует вести на равномерно кипящей водяной бане, нагревая точно 30 мин. При более длительном нагревании интенсивность окраски комплексного соединения повышается, но проис-



ходит довольно интенсивное окрашивание и в холостом опыте. Интенсивность окраски в холостом опыте зависит и от чистоты применяемого нингидрина. По этой причине для приготовления реактива следует использовать перекристаллизованный нингидрин.

Рис. 3. Зависимость интенсивности комплексного соединения α -аминокислот с нингидрином от времени нагревания. Время нагревания: I — 10 мин; II — 20 мин; III — 30 мин; y — оптическая плотность; x — содержание аминного азота.

Интенсивность окраски растворов довольно устойчива, так как у охлажденных до комнатной температуры проб через три часа заметных изменений в оптической плотности не наблюдалось. Только на следующий день произошло уменьшение интенсивности на 3%.

Влияние иона аммония. Известно, что аммиак и α -аминокислоты в одинаковых молярных концентрациях образуют с восстановленным нингидрином комплексное соединение с одинаковой интенсивностью (Moore, Stein, 1948). Это один из недостатков при определении α -аминокислот с помощью восстановленного нингидрина.

В данной работе к нингидриновому реактиву не добавляли восстановитель, но в присутствии аммиака в одинаковых молярных концентрациях с α -аминокислотами интенсивность окраски комплексного соединения повысилась почти на 25%. Устранить мешающее действие аммиака путем увеличения концентрации уксусной кислоты в реакционной смеси до pH среды 4,8 не удалось.

Таким образом, для определения содержания α -аминного азота аминокислот в присутствии значительных количеств солей аммония необходимо их предварительно удалить.

Спектры поглощения. В данной работе исследовались спектры поглощения продуктов реакции тринадцати аминокислот с нингидрином в присутствии соли кадмия. Максимумы поглощения всех комплексных соединений α -аминокислот с нингидрином находятся при длине волн 505 м.к. По значениям молярной экстинкции аминокислоты могут быть разделены на две группы. Самые низкие величины молярной экстинкции имели α -аминокислоты первой группы, куда входили гистидин, аспарагиновая кислота, цистин и фенилаланин. У α -аминокислот второй группы (аланин, аргинин, валин, глутаминовая кислота, лейцин, лизин, метионин, серин) разница в величинах молярной экстинкции не превышала $\pm 7\%$. Известно, что в биологических объектах преобладают α -аминокислоты второй группы. Так как метод определения α -аминного азота аминокислот приближителен, калибровочный график можно построить на основе любой из α -аминокислот второй группы.

При преобладании α -аминокислот первой группы для построения калибровочного графика следует использовать представителей первой группы.

Метод определения

Приготовление нингидринового реагента. 3,0 г уксуснокислого кадмия $[\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ растворяют при энергичном перемешивании в 100 мл 96%-ного этилового спирта. Прибавляют 1,0 мл ледяной уксусной кислоты и в полученном растворе растворяют 0,5 г перекристаллизованного нингидрина. Нингидриновый реагент оставляют на ночь в темной склянке и перед использованием фильтруют через стеклянный фильтр. При хранении в темной склянке реактив годен только в течение пяти дней.

Перекристаллизация нингидрина. 10 г нингидрина растворяют в 50 мл 2 н. раствора HCl , добавляют 1 г активированного древесного угля и нагревают до кипения; горячий раствор фильтруют через стеклянный фильтр. Фильтрат оставляют на ночь на холоде. Выпадавший кристаллический осадок промывают на стеклянном фильтре несколько раз холодной водой и сушат в вакуум-эксикаторе над KOH .

Выполнение анализа. В 50-миллиметровую коническую колбу со шлифом пипетируют 0,2—2,0 мл исследуемого раствора, доведя общий объем всегда до 2,0 мл дистиллированной водой. К раствору прибавляют 5,0 мл нингидринового реагента и смесь перемешивают. Колбы плотно закрывают пришлифованными воздушными холодильниками, нагревают их точно 30 мин на равномерно кипящей водяной бане, затем быстро охлаждают до комнатной температуры. Полученные таким образом растворы розовой окраски фотометрируют против контрольной (вода) при длине волны 505 мкм в 10-миллиметровых кюветах. Для внесения поправок аналогично вышеописанному провели холостой опыт с нингидриновым реагентом.

Воспроизводимость составляет $\pm 2\%$.

Для построения калибровочного графика в 50-миллилитровую коническую колбу со шлифом пипетируют $2,5 \cdot 10^{-4}$ М раствора α -аминокислоты (например глицина), содержащего 0,5—5 μ α -аминного азота. Общий объем раствора дистиллированной водой доводят до 2,0 мл, прибавляют 5,0 мл нингидринового реагента и проводят определение согласно выполнению анализа.

Заключение

Выработана простая методика для фотометрического определения малых количеств α -аминного азота (0,5—5 μ) аминокислот с нингидрином. Реакцию проводили в среде 70%-ного этилового спирта в присутствии уксусной кислоты и соли кадмия в качестве стабилизатора.

Выяснены подходящие условия проведения реакции (концентрация стабилизатора, время нагревания и действия иона аммония).

ЛИТЕРАТУРА

- Алексеевко Л. П., 1964. Аминокислотный анализ белков, тканевых экстрактов и биологических жидкостей. В сб.: Современные методы в биохимии: 124—161. М., Медицина.
- Зайцева Г. Н., Тюленева Н. П., 1958. Количественное определение аминокислот на хроматограммах посредством образования медных производных с нингидрином. Лаб. дело 4 (3) : 24—30.
- Ермакова Е. А., 1957. Метод количественного определения аминокислот на полностью проявленных нингидрином хроматограммах. Биохимия 22 (5) : 917.

- Маркосян Л. С., 1958. Количественное определение аминокислот методом хроматографии на бумаге. Изв. АН Арм. ССР. Сер. биол. и сельхоз. н. 11 (12) : 117—127.
- Пасхина Т. С., 1964. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге. Современные методы в биохимии: 162—180. М., Медицина.
- Семенов А. Д., Ивлева И. Н., Дацко В. Г., 1961. Определение микрограммовых количеств аминокислот в природных водах. Изв. АН СССР. Отд. хим. (1) : 184—185.
- Филиппович Ю. Б., 1958. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге. Уч. зап. Моск. гос. пед. ин-та 140 : 147—212.
- Fowden L., 1951. The quantitative recovery and colorimetric estimation of amino acids separated on paper chromatography. Biochem. J. 48 (3) : 327—333.
- Meyer H., 1957. The ninhydrin reaction and its analytical applications. Biochem. J. 67 (2) : 333—340.
- Moore S., Stein W. H., 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem. 176 (1) : 367—388.
- Patton A. R., Chism P., 1951. Quantitative paper chromatography of amino acids. Analyt. Chem. 23 (11) : 1683—1685.
- Thomson J. F., Morris A. J., 1959. Determination of amino acids from plants by paper chromatography. Analyt. Chem. 31 (6) : 1031—1037.
- Troll W., Cannon K. R., 1953. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. J. Biol. Chem. 200 (2) : 803—811.

Институт зоологии и ботаники
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
27/IV 1966

A. LINDPERE

AMINOHAPETE α -AMINOLÄMMASTIKU VÄIKESTE HULKADE FOTOMETRILINE MÄÄRAMINE

Resüme

Artiklis esitatakse aminohapete α -aminolämmastiku (0,5—5 γ α -NH₂-N) ninhüdriniiga määramise meetodika.

Aminohapete ja ninhüdrini vaheline reaktsioon teostati 70%₀-lises etanoolis äädikhappe juuresolekul keeval vesivannil. Stabilisaatorina kasutati kadmiumisoola.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Saabus toimetusse
27. IV 1966

A. LINDPERE

PHOTOMETRIC DETERMINATION OF MICRO-AMOUNTS OF α -AMINO NITROGEN OF AMINO ACIDS

Summary

The reaction between α -amino acids and ninhydrin was carried out in 70-percent-ethanol in the presence of acetic acid and cadmium acetate, on a boiling water bath.

The measurement range is 0.5—5 γ of α -amino nitrogen of amino acids.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Zoology and Botany

Received
April 27, 1966