

К ВОПРОСУ ОБ АЗОТЕ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ДИКТИОНЕМОВОВОГО СЛАНЦА *

Л. НАППА

А. ФОМИНА,

доктор химических наук

В ранее опубликованной статье [2] было показано, что при гидролизе керогена диктионемового сланца от 15 до 30% азота переходит в растворимые формы. При качественном анализе гидролизата, методом бумажной хроматографии, в нем были идентифицированы 9 аминокислот, в том числе шесть моноаминокарбоновых: глицин, α -аланин, изолейцин, лейцин, валин и γ -аминоасляная кислота; одна оксимоноаминокислота — серин, одна моноаминодикарбоновая кислота — глутаминовая и одна ароматическая аминокислота — фенилаланин.

Установление в керогене диктионемового сланца значительного количества гидролизуемых форм азота, а главное идентификация аминокислот, свойственных широкому кругу растительных и животных белков указывало на несомненную целесообразность дальнейшего углубления исследований.

Из наименований идентифицированных аминокислот следует, что все они относятся к моноаминокислотам. Однако известно, что гидролиз белков минеральными кислотами [1] сопровождается дезамидированием амидов, например глутамина, аспаргина и др. с выделением аммиака, разрушением (в результате окисления) триптофана, серина и т. д.

Выявление амидного азота возможно при определении форм гидролизованного азота. С целью проведения этого анализа была поставлена новая серия опытов гидролиза керогена диктионемового сланца и проведены анализы гидролизатов. Результаты вышеуказанных исследований излагаются ниже.

Экспериментальная часть

Для определения форм растворимого азота гидролиз керогена осуществлялся 33%-ной серной кислотой при 95° на водяной бане и при 105° на воздушной бане. Гидролиз проводился 24 и 48 часов. Концентрат сланца (обогащение производилось центрифугированием в тяжелых жидкостях, водных растворах хлористого цинка с плотностью 1,555 г/см³) брался в количестве от 50 до 100 г, что соответствовало 22,5—45,0 г керогена. Серная кислота бралась по отношению к концентрату сланца в количестве 10:1.

В гидролизате, после отделения от нерастворимой части, определялось общее содержание азота по Къельдалю, аммиачный и диаминокислотный азот определялись по методике А. Н. Белозерского и Н. И. Проскурякова [3].

Для определения аммиачного азота проба гидролизата обрабатывалась окисью магния под уменьшенным давлением, в пределах 10—20 мм рт. ст. Отгонка аммиака производилась не выше 40°.

После отделения сульфата магния в фильтрате определялся диаминокислотный

* Сообщение второе.

азот. Для этого фильтрат подкислялся соляной кислотой и к нему добавлялся насыщенный водный раствор фосфорновольфрамвокислого натрия (4 г на 5 мл). Раствор с белым осадком, образующимся с диаминокислотами, после нагревания в течение часа на водяной бане оставлялся еще на 72 часа при комнатной температуре. Затем его фильтровали через беззольный фильтр (синяя лента). Осадок на фильтре тщательно промывали 2%-ной соляной кислотой, подсушивали на воздухе и вместе с фильтром переносили в колбу Кьельдаля для обычного определения азота.

Фосфорновольфрамвокислый натрий не взаимодействует с моноаминокислотами, при этом анализе они определяются по разности между общим азотом и суммой аммиачного и диаминокислотного азота.

При проведении опытов гидролиза и последующего анализа гидролизатов на вышеуказанные формы азота выявились большие расхождения между параллельными определениями. Тщательное проведение самого гидролиза (в закрытой аппаратуре с установлением поглотителя на аммиак), точная выдержка температуры и времени гидролиза не дали необходимой сходимости между параллельными опытами. Поскольку при опубликовании исследований по определению форм азота в тех или иных ископаемых не упоминалось о том, что между параллельными определениями не имеется обычной сходимости, то было проделано много разных вариантов гидролиза, в том числе и анализ с добавлением определенного количества известного азотсодержащего вещества.

В просмотренной нами литературе только в «Практическом руководстве по биохимии растений» 1934 г. А. Р. Кизеля [4] указывается, что определение форм азота в гидролизатах белков дает колеблющиеся результаты в параллельных определениях из-за мелких трудноучитываемых условий гидролиза. На опыте определения форм азота в гидролизате керогена диктионемового сланца (55% минеральной части) это полностью подтвердилось. В связи с этим, из многочисленных трудоемких анализов, были взяты только результаты более близкие между собой и из них выведены средние значения, которые и приведены в табл. 1.

Средние значения для отдельных форм азота показывают, что по меньшей мере 25—30% гидролизованного азота оказывается уже в форме

аммиака, тем самым устанавливалось, что в условиях опыта из керогена освобождаются неустойчивые в кислой среде азотсодержащие соединения, отщепляющие его в виде аммиака. Кроме того результаты показали, что в составе гидролизата, помимо ранее установленного моноаминокислотного азота (бумажной хроматографией), порядка 30% его находится в виде диаминокислотной формы. Хотя при анализе отдельных гидролизатов имелись расхождения, однако во всех случаях устанавливалось наличие всех трех форм азота. Это обязывало возвратиться к более тщательным качественным поискам аминокислот в гидролизате, в частности необходимо было выяснить ранее неустановленные основные аминокислоты (диаминокислоты).

Таблица 1

Результаты анализа форм азота в кислотных гидролизатах диктионемового сланца (при 100—105°)

	Время гидролиза, часы			Средние значения
	24	48	24*	
<i>Формы азота на гидролизованную часть, %</i>				
1. Аммиачный азот	31,0	26,8	27,2	28,3
2. Диаминокислотный азот	25,6	33,0	33,8	30,8
3. Моноаминокислотный азот (по разности)	43,4	40,2	39,0	40,9
<i>От исходного азота, %</i>				
1. Выход гидролизованного азота	18,0	14,0	17,0	16,3
2. Негидролизованного азота в остатке	80,0	83,0	81,0	81,3
3. Расхождение между исходным азотом и суммой его после гидролиза	2,0	3,0	2,0	2,4

* Анализ проведен с добавлением аргинина, глутаминовой кислоты и шавелевокислого аммония.

Второй этап качественного анализа кислотных гидролизатов керогена диктионемового сланца

На втором этапе качественных анализов аминокислотного состава гидролизатов исследование проводилось на концентрате сланца флотационного обогащения.* Считая на абсолютно сухое вещество концентрат содержал 48,6% золы прокаливания и 0,5% минеральной CO_2 .

Элементарный состав керогена был следующим **: С — 69,9%, Н — 6,9%, N — 2,1%, S — 2,2% и O_2 (по разности) — 18,9%.

Гидролиз керогена осуществлялся 6HCl при 105° в течение 24 часов.

Навеска концентрата сланца соответствовала 264,7 г керогена. Кислота бралась к концентрату в отношении 10:1. Первичный гидролизат содержал большое количество солей и был сильно окрашен. Соляная кислота из гидролизата отгонялась в вакууме при температуре не выше 45° . Сухой остаток снова растворялся в воде и отгонка повторялась. После трехкратного повторения вышеуказанных операций сухой остаток был растворен в воде и перенесен в стакан, где объем раствора был доведен до 1,5 л. Для удаления солей железа и алюминия раствор обрабатывался водным аммиаком (1:1) до pH раствора 7,1—7,5 (5). После 24-часового отстаивания гидраты окисей железа и алюминия отделялись фильтрованием. Осадок на фильтре тщательно промывался подогретой дистиллированной водой. Раствор и промывные воды подвергались дистилляции в вакууме. Остаток после дистилляции представлял собой белую с слегка желтоватым оттенком массу. Для окончательного обессоливания остаток растворялся в 150 мл бидистиллированной воды и затем очищался на колонке с катионитом КУ-2 в Н-форме. Элюирование аминокислот производилось 2н водным раствором аммиака. Последний удалялся из элюата выпариванием в вакууме. Конечный объем аминокислот был доведен до 12 мл.

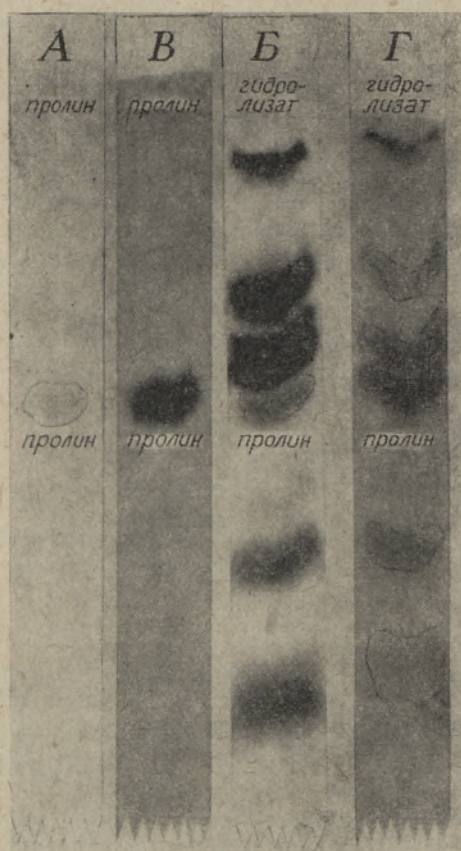


Фото 1. Нисходящая хроматография. Растворитель — *n*-бутанол, ледяная уксусная кислота, вода (4:1:5).

аминокислот хранился в холодильном шкафу при температуре около 4° .

* Обогащение произведено аспирантом В. И. Ерусенко на аппаратуре и с помощью сектора обогатительных процессов Института химии АН ЭССР.

** Анализ произведен В. И. Ерусенко.

На первом этапе качественной бумажной хроматографии оставались неидентифицированными пятна веществ, реагировавших с нингидрином. Одно из них предположительно можно было отнести за счет пролина. Однако недостаточная очистка гидролизатов от солей затрудняла идентификацию. Обессоленные растворы аминокислот, к тому же с более высокой концентрацией последних, позволили приступить к выяснению наличия пролина.

Для хроматографирования была использована одномерная нисходящая бумажная хроматография [2]. Для контроля брался раствор чистого пролина с концентрацией 10 $\mu\text{г}$. В качестве растворителя использовалась смесь *n*-бутанола, ледяной уксусной кислоты и бидистиллированной воды (4:1:5). Хроматографирование осуществлялось на полосах хроматографической бумаги Шлейхер и Шелл размером 50×4 см. На 2 полосы наносился гидролизат в количестве 0,1 мл, а на две другие — свидетель в количестве 0,02 мл. Процедура хроматографирования производилась, как описано ранее [2]. Одна пара хроматограмм (гидролизата и контрольная) проявлялись 2%-ным раствором нингидрина в ацетоне [6], вторая пара 2%-ным раствором изатина в этиловом спирте [7]. Пятна, соответствующие по величине R_f и окраске пролину, были получены на обеих хроматограммах гидролизата керогена. Нингидрин образовал желтое пятно, которое при высушивании хроматограмм (при 60°) переходило в коричневатое. Изатин дал ярко синюю окраску. Полученные хроматограммы приведены на фото 1. Таким образом, кроме ранее установленных алифатических и ароматических аминокислот в гидролизате керогена диктионемового сланца была идентифицирована гетероциклическая аминокислота (пирролидин-2-карбоновая).

Для установления диаминокислот были опробованы различные виды бумажной хроматографии. Круговая бумажная хроматография [8] не дала положительных результатов. Положительное, но недостаточное яркое пятно, соответствующее (в сравнении со свидетелями) только аргинину было получено при одномерной нисходящей хроматографии на бумаге «Ленинградская медленная» с фенольно-буферным растворителем (рН буфера 12, соотношение 1:1). Снимок хроматограммы приведен на фото 2. Более интенсивная окраска пятна аргинина была получена при применении двухмерной восходящей хроматографии [9, 10], где в качестве растворителя в одном направлении использовалась смесь метанола, бидистиллированной воды и пиридина, в отношении соответственно 80:20:4. Во втором направлении разделение

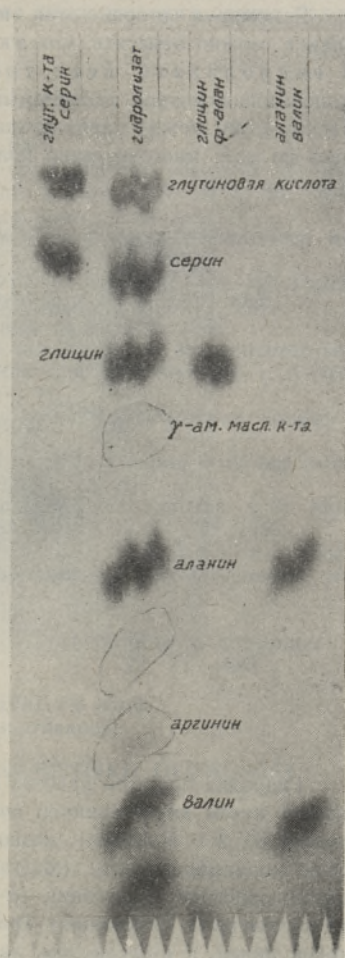
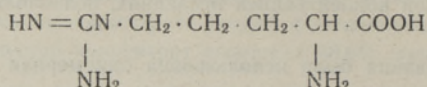


Фото 2. Нисходящая хроматография. Растворитель фенолбуферный раствор (1:1). Проявитель — 2%-ный раствор нингидрина.

производилось смесью *n*-бутанола, метилэтилкетона, бидистиллированной воды и диэтиламина, в соотношениях 40:40:20:5. Проявление производилось 1%-ным раствором нингидрина. Снимок хроматограммы приведен на фото 3. Сравнение двухмерной хроматограммы с картой Редфилда [9] показало, что на двухмерной хроматограмме из

числа идентифицированных установлено 10 аминокислот, не обнаружена только γ -аминомасляная кислота, вероятно из-за ее низкой концентрации в смеси.

Следовательно, из диаминокислот, как при одномерной, так и двухмерной хроматографии был установлен только аргинин (α -амино- δ -гуанидиновалерьяновая кислота)



Как следует из формулы аргинина, он отличается высоким содержанием азота (32,2%). При нисходящей хроматографии с растворителями крезол-буфер вблизи стартовой линии, с *n*-бутанолом, ледяной уксусной кислотой, бидистиллированной водой (4:1—5) обычно выше аргинина (ближе к стартовой линии) оставалось неидентифицированное пятно соединения, которое реагировало как с нингидрином, так и изатином (см. фото 1). Возможно это пятно соответствует тоже основной аминокислоте, но с более длинной углеродной цепью, чем аргинин, как, например α , ϵ — диаминопимелиновая кислота, выделенная из ряда бактерий [1].

Резюмируя второй этап исследований гидролизатов керогена диктионемового сланца, можно отметить, что экспериментально показано присутствие в гидролизате всех трех форм азота, т. е. кроме ранее установленной моноаминокислотной, также аммиачной и диаминокислотной. Несмотря на значительные расхождения между параллельными анализами, диаминокислотная форма устанавливалась во всех многочисленно полученных гидролизатах.

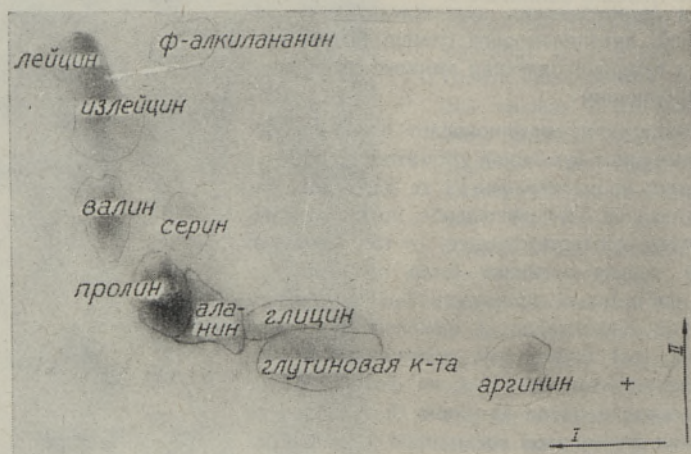


Фото 3. Двухмерная восходящая хроматография.
Проявитель — 1%-ный раствор нингидрина.

Гидролиз большой навески керогена (264,7 г) и тщательное обессоливание гидролизата путем двухстадийной очистки (с использованием при доочистке ионообменной смолы КУ-2 в Н-форме), позволили дополнительно идентифицировать гетероциклическую моноаминокислоту (пирролидин-2-карбоновую-пролин), а также установить одну диаминокислоту — аргинин (α -амино- δ -гуанидиновалерьяновая кислота). Кроме того, на одномерных нисходящих хроматограммах, элюировавшихся крезолом, вблизи стартовой линии, и *n*-бутанолом, ледяной уксусной кислотой, бидистиллированной водой (4:1:5), недалеко от стартовой линии, оставалось неидентифицированное пятно соединения (или нескольких), реагировавшего как с нингидрином, так и с изатином. Судя по литературным данным и содержанию диаминокислотной формы азота в гидролизате (около 30%), можно допустить, что оно относится к основным более длинноцепочным аминокислотам, чем установленный аргинин.

В итоге двух этапов исследований, качественной бумажной хроматографии сернокислых и солянокислых гидролизатов керогена диктионемового сланца было установлено 11 аминокислот и одно неидентифицированное пятно. Установленные кислоты относятся к следующим классам:

- алифатические моноаминокарбоновые кислоты — глицин, аланин, лейцин, изолейцин, валин и γ -аминоасляная кислота;
- алифатическая оксиаминокарбоновая кислота — серин;
- алифатическая моноаминодикарбоновая кислота — глутаминовая;
- алифатическая диаминокарбоновая кислота — аргинин;
- гетероциклическая аминокислота — пролин;
- ароматическая аминокислота — фенилаланин.

Состав дополнительно установленных аминокислот еще раз подтверждает участие в структуре керогена диктионемового сланца продуктов частичного разложения, характерных для широко распространенных белков как в мире животных, так и растений.

Результаты количественного анализа смесей аминокислот и примерное определение доли азотсодержащих структурных элементов в керогене диктионемового сланца будут приведены в сводной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Майстер, Биохимия аминокислот, ИЛ, М., 1961.
2. Л. Наппа, А. С. Фомина, К вопросу об азоте органического вещества диктионемового сланца. Изв. АН ЭССР, Сер. физ.-мат. и техн. наук, № 3, 195—204, 1960.
3. А. Н. Белозерский и Н. И. Проскуряков, Практическое руководство по биохимии растений, М., 1951.
4. А. Р. Кизель, Практическое руководство по биохимии растений, отд. III. Белки и продукты их гидрологического распада и превращения, М.—Л., 1934.
5. И. М. Кольтгоф, Е. Б. Сендэл, Количественный анализ, М., 1938.
6. В. Л. Кретович, Ж. В. Успенская, Синтез фенилаланина из фенилпиридиноградной кислоты в гомогенатах из проростков гороха. Биохимия, т. XXIII, вып. 2, 1958.
7. А. Н. Бояркин, Разноцветное проявление аминокислот на бумажных хроматограммах. Физиология растений, т. 3, вып. 4, 1956.
8. K. V. Giri, N. A. N. Rao, A technique for the identification of amino acids separated by circular paper chromatography. Nature, 169, 923, 1952.
9. R. R. Redfield, Two dimensional paper chromatographic systems with high resolving power for amino acids. Biochem. et Biophys. Acta 10, 344, 1953.
10. Н. М. Сисакян, Э. Н. Везингер, П. Г. Гаркави, Г. Я. Кивтян, Простой метод разделения аминокислот распределительной хроматографии на бумаге. ДАН АН СССР, т. 46, вып. 2, 1954.

Институт химии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
27. IV 1963

DIKTÜONEEMAKILDA ORGAANILISE AINE LÄMMASTIKU OLEMUSEST

(II osa)

L. Nappa

A. Fomina,

keemiateaduste doktor

Resümees

Artiklis esitatakse lämmastikuühendite vormide määramise andmed diktüoneemakilda kerogeeni väävelhappelistes hüdrolüsaatides ning monoamiino- ja diamiinohapete kvalitaatiivse paberchromatograafia teise etapi tulemused. Eri lämmastikuvormide keskmised väärtused olid järgmised: ammoniakaalset lämmastikku 28,3%, diamiinohappelist lämmastikku 30,8%, monoamiinohappelist lämmastikku (vahest) 41,1%. Lisaks varem iden-

tifitseeritud amiinohapetele [2] identifitseeriti veel heterotsükliline amiinohape proliin ja alifaatne diamiinohape arginiin. Üldse identifitseeriti 11 amiinohapet ja tehti kindlaks identifitseerimata ühend (või ühendid), mis reageerib nii ninhüdriniga kui ka isatiiniga — arvatavasti diamiinohape, millel on pikem süsinikuahel kui arginiinil.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Keemia Instituut

Saabus toimetusse
26. IV 1963

ZUR FRAGE VOM STICKSTOFF DES ORGANISCHEN TEILS DES DIKTYONEMASCHIEFERS

Mitteilung II

L. Nappa, A. Fomina

Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurden die Formen der Stickstoffverbindungen des Diktyonemaschiefers in Hydrolysaten der Schwefelsäure untersucht und die zweite Etappe der qualitativen Untersuchungen der Mono- und Diaminosäuren durchgeführt.

Die Durchschnittswerte der Stickstoffverbindungen waren: ammoniakalischer Stickstoff 28,3%, diaminosäurischer Stickstoff — 30,8% und monoaminosäurischer Stickstoff 41,1% (aus dem Unterschied).

Zusätzlich zu den früher identifizierten Aminosäuren wurden noch zwei identifiziert: eine heterozyklische — Prolin — und eine aliphatische — Arginin.

Im allgemeinen wurden 11 Aminosäuren identifiziert, ausserdem eine nicht identifizierte Verbindung gefunden, die sowohl mit Ninhydrin als auch mit Isatin reagiert — wahrscheinlich eine Diaminosäure mit längerer Kohlenstoffkette als Arginin.

Institut für Chemie
der Akademie der Wissenschaften der Estnischen SSR

Eingegangen
am 26. April 1963