

УДК 543.42

М.Ф. КЛЕЩЕВ, докт. техн. наук, НТУ «ХПІ»,
Т.Д КОСТИРКІНА, канд. хім. наук, НТУ «ХПІ»,
М.А. ФІЛІПОВА, студентка, НТУ «ХПІ»

ОПТИМАЛЬНІ УМОВИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФЕНІЛАЛАНІНУ

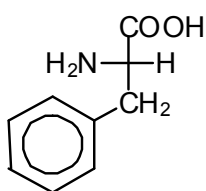
В статье приведены результаты исследований основных спектрофотометрических характеристик фенилаланину в ультрафиолетовой области и предложены условия определения: длина волны $\lambda = 257\text{--}258$ нм, среда 0,1–2 Н раствор NaOH, интервал концентраций – $1,0 \cdot 10^{-4}$ – $7,0 \cdot 10^{-3}$ Н

Приведено результати дослідження основних спектрофотометричних характеристик фенілаланіну в ультрафіолетовій області та запропоновано умови визначення: довжина хвилі $\lambda = 257\text{--}258$ нм, середовище 0,1–2 М розчин NaOH, інтервал концентрацій – $1,0 \cdot 10^{-4}$ – $7,0 \cdot 10^{-3}$ М

Are the results of research of basic spectrophotometric descriptions of fenylalanine resulted in an ultraviolet area and the terms of determination are offered: $\lambda = 258$ nm, an environment is 0,1–2 M solution of NaOH, interval of concentrations $(0,1\text{--}7,0) \cdot 10^{-3}$ M

Постановка проблеми. В природі існує біля 300 амінокислот, які мають різний вміст в біосфері. Найпоширенішими є 20 амінокислот, що входять до складу білків і складають універсальні компоненти усіх клітин. До цих найпоширеніших амінокислот відноситься і фенілаланін – неполярна незамінна нейтральна амінокислота, що використовується в синтезі та як лікарський засіб: вона впливає на настрій, зменшує біль, поліпшує пам'ять, пригнічує апетит і застосовується у лікуванні артриту, депресії, болю під час менструації, мігрені, ожиріння, хвороби Паркінсона [1]. Виробляється фенілаланін мікробіологічним або хімічним синтезом. При цьому необхідно мати надійні і прості методи визначення фенілаланіну в сировині, напівпродуктах і готовій продукції та методи аналізу препаратів на основі цієї кислоти.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Фенілаланін (2-аміно-3-фенілпропіонова кислота):



можна визначити хроматографічним, титрометричним чи спектрофотометричним методами [2–5]. Фенілаланін, як похідна сполука бензолу, для якого характерні три смуги

поглинання, при 180, 203 і 256 нм [7], має дещо зсунені у довгохвильову область максимуми: 191, 205 і 257 нм [6]. Що стосується спектрофотометричного методу визначення фенілаланіну за його поглинанням в ультрафіолетовій (УФ) області спектру, то найповніші дані є в роботі [6]. Авторами цієї роботи пропонується визначати фенілаланін при рН 5,2–9,5 в невеликому інтервалі концентрацій $0,5 \cdot 10^{-3}$ – $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Постановка задачі та її рішення. Метою цієї роботи є розширення діапазону визначуваних концентрацій фенілаланіну за інтенсивністю поглинання в УФ області. Для цього потрібно дослідити спектрофотометричні характеристики фенілаланіну в широкому інтервалі кислотності та концентрації цієї амінокислоти та стабільність аналітичного сигналу при зберіганні розчинів аналіту. Для дослідження спектрофотометричних характеристик фенілаланіну готували розчини потрібних концентрацій та кислотності цієї амінокислоти і отримували спектри поглинання цих розчинів та визначали зміну величини аналітичного сигналу при їх зберіганні. Враховуючи той факт, що для розчинення амінокислоти використовувалася вода, що є універсальним розчинником при спектрофотометрії амінокислот і має нижню межу пропускання 210 нм [8], нами для роботи була вибрана близька УФ область спектру в інтервалі 220–400 нм. Вихідний 0,01 М розчин фенілаланіну готували за точною наважкою амінокислоти. Розчини менших концентрацій готували методом розбавлення вихідного розчину. Для отримання розчинів амінокислоти з рН < рІ використовували розчин хлоридної кислоти, з рН > рІ – розчин натрію гідроксиду. Для роботи використовували спектрофотометр СФ-26 правильність роботи якого перевірялася за стандартними розчинами калію діхромату [9] та рН-метр рН-340, градуйований за стандартними буферними розчинами згідно з інструкцією до приладу. Для роботи використовували кювети з товщиною поглинаючого шару 1 см.

Досліджувалися найважливіші показники, що складають спектрофотометричні аналітичні характеристики амінокислот: стійкість розчину в часі, вплив рН на максимум поглинання, оптимальна концентрація розчину. Спектри поглинання розчинів фенілаланіну знімали при температурі вимірювання в інтервалі 13–28 °С. Оскільки фенілаланін є цвіттерлітом, що дисоціює як по основному, так і по кислотному механізму і має ізоелектричну точку рІ = 5,91, спектрофотометричні характеристики фе-

нілаланіну вивчали в областях існування фенілаланіну в катіонній, аніонній формі і у вигляді цвіттерліту Спектр поглинання водного розчину фенілаланіну (рис. 1) має максимум поглинання при 257–258 нм, що співпадає з літературними даними [7].

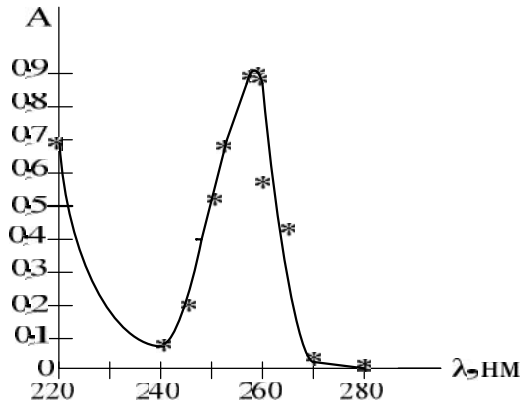


Рис. 1. Спектр поглинання водного розчину фенілаланіну:
 $C = 0,005 \text{ M}$; $\text{pH } 5,87$; $l = 1 \text{ см}$

При зміні кислотності розчинів фенілаланіну від кислого (2 М НСІ) і до лужного середовища (2 М NaOH), максимум поглинання практично не змінюється і є в області 257–258 нм.

При спектрофотометричних дослідженнях одним із основних показників є стійкість аналітичного сигналу в процесі зберігання розчинів (рис. 2).

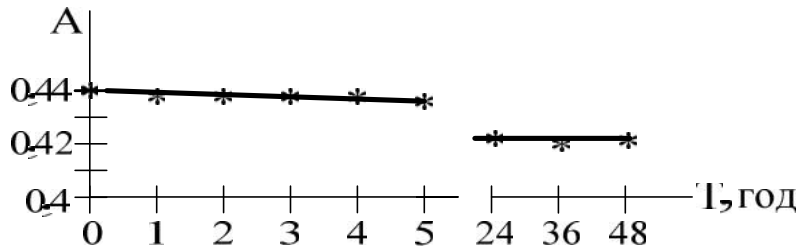


Рис. 2. Стійкість в часі розчину фенілаланіну: $C = 0,0025 \text{ M}$; $\text{pH } 5,20$

Оптична густина водного розчину фенілаланіну з часом незначно падає: через перші 5 год на 0,005, через 48 год – на 0,02. Аналогічні дані отримано і для кислого середовища. При вивченні часу установлення рівноваги при розчиненні фенілаланіну та стабільності аналітичного сигналу найкращі показники отримано в лужному середовищі: оптична густина розчинів фенілаланіну в 0,1 М; в 1 М і в 2 М розчинах NaOH практично не змінюється впродовж перших 2 год, що можна пояснити незмінністю кількості часточок, що поглинають електромагнітне випромінювання, в цьому середовищі які, хоч і в незначних кількостях, появля-

ються в нейтральному і кислому середовищі за рахунок утворення міжмолекулярних та внутрішньо-молекулярних водневих зв'язків чи переходу амінокислоти в мезомерну форму. Ці дані показують, що при будь-якій кислотності розчини фенілаланіну можна використовувати для аналізу впродовж кількох годин, оскільки їх аналітичний сигнал практично не змінюється, що зручно для роботи, найкращим середовищем для спектрофотометричного визначення фенілаланіну можна вважати 0,1–2 М розчин NaOH, де досягається найбільше значення молярного коефіцієнта поглинання розчинів. Для визначення оптимальних значень рН визначення фенілаланіну була досліджена залежність оптичної густини розчинів від рН (рис. 3).

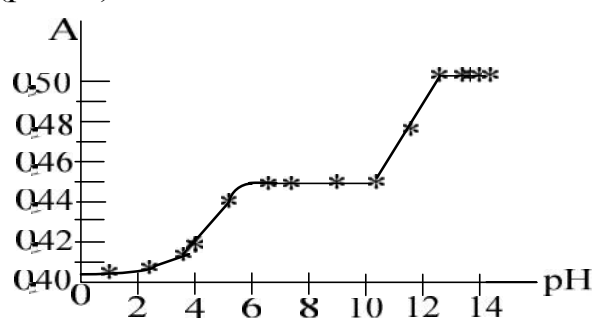


Рис. 3. Залежність оптичної густини розчинів фенілаланіну від рН:
 $C = 0,0025 \text{ М}$; $\lambda = 257 \text{ нм}$; $l = 1 \text{ см}$

Як видно із рис. 3, в інтервалах рН 1–3; 5–9; 12,5–14,5 оптична густина має постійне, хоч і неоднакове, значення. В кислому середовищі аналітичний сигнал знижується, а в лужному – підвищується. Розраховано молярні коефіцієнти поглинання при довжині хвилі 258 нм, які становлять для водного розчину фенілаланіну 178 ± 21 , для кислого розчину (0,1 М HCl) 164 ± 19 і для лужного розчину (0,1 М NaOH) 206 ± 12 л/моль·см. Така залежність вказує на значення рН існування переважно однієї із форм цвіттерліту фенілаланіну (Phe^{\pm}): Phe^+ при рН 1–3, Phe^{\pm} при рН 5–9 і Phe^- при рН 12,5–14,5. При вивченні часу установаження рівноваги при розчиненні цвіттерліту фенілаланіну та стабільності аналітичного сигналу найкращі показники отримано в лужному середовищі: оптична густина розчинів фенілаланіну в 0,1 М; в 1 М і в 2 М розчинах NaOH практично не змінюється впродовж 2 год, що можна пояснити незмінністю кількості часточок, що поглинають електромагнітне випромінювання, в цьому середовищі які, хоч і в незначних кількостях, появляються в нейтральному і кислому середовищі за рахунок утворення міжмолекулярних та внутрішньомолекулярних водневих зв'язків чи переходу амінокислоти в мезомерну форму. Оптимальним середовищем для спектрофотометри-

чного визначення фенілаланіну можна вважати 0,1–2 М розчин NaOH. Для визначення робочого інтервалу концентрацій фенілаланіну досліджували залежність оптичної густини від концентрації розчинів при оптимальних умовах, що були визначені вище, і будували градувальний графік та розраховували градувальну функцію. Для цього готували методом розбавлення в 2 М розчинах NaOH серію розчинів концентраціями $1,0 \cdot 10^{-4}$ – $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³, використовуючи вихідний розчин фенілаланіну з концентрацією $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ і вимірювали оптичну густину цих розчинів при довжині хвилі $\lambda = 258$ нм (рис. 4).

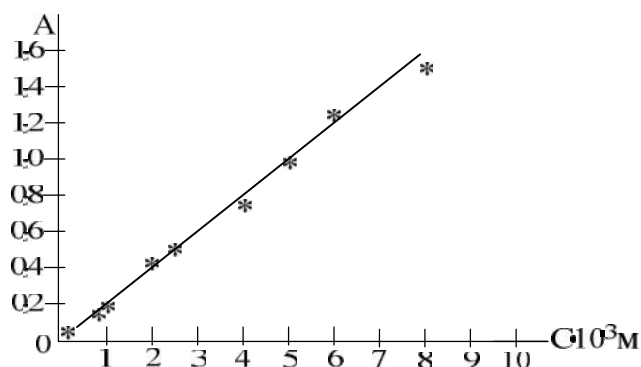


Рис. 4. Градувальний графік для визначення фенілаланіну в 2 М розчині NaOH:
 $\lambda = 258$ нм; $l = 1$ см; $n=3$; $y = 192,5 x$

Як видно із рис. 4, прямолінійна залежність аналітичного сигналу від концентрації ($y = 192,5x$) спостерігається в інтервалі концентрацій $1,0 \cdot 10^{-4}$ – $7,0 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³. При підвищенні концентрації фенілаланіну в розчинах, починаючи з $8,0 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ їх оптична знижується і спостерігається відхилення від основного закону світло поглинання, що можна пояснити міжмолекулярною взаємодією часточок аналіту при високих його концентраціях.

Висновки. На основі результатів дослідження спектрофотометричних характеристик фенілаланіну встановлено оптимальні умови спектрофотометричного визначення фенілаланіну в ультрафіолетовій області спектру: робоча довжина хвилі $\lambda = 257$ – 258 нм, середовище 0,1–2 М розчин NaOH, інтервал концентрацій – $1,0 \cdot 10^{-4}$ – $7,0 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³. Ці дані дають можливість визначити фенілаланін у водних розчинах та можуть бути використані для розроблення методик визначення фенілаланіну в суміші інших амінокислот.

Список літератури: 1. Анохіна Г. Особливо важливі для життя / Г. Анохіна // Здоров'я і довголіття. – 2010. № 30. – С. 4. 2. Филиппович Ю.Б., Практикум по общей биохимии. / Ю.Б. Филиппович, Т.А. Егорова, М.И. Севастьянова. – М.: Просвещение. 1982. – 311 с. 3. Нове

методы анализа амінокислот, пептидов и белков. Пер с англ. Под ред. Овчинникова Ю.А. М.: Мир. 1974. – 461 с. **4.** Державна фармакопея України. Харків / [розроблено Державним підприємством «Науково-експертний фармакопейний центр»]. Харків : РІРЕГ, 2001. – 531 с. **5.** *Крешков А.П.* Основы аналитической химии / А.П. Крешков. – Т.3. М.: Химия, 1976. – 472 с. **6.** *Котова Д.Л.* Спектрофотометрическое определение аминокислот в водных растворах. Учебное пособие / Д.Л. Котова, Т.А. Крысанова, Т.В. Елисеева. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2004.– 55 с. **7.** *Берштейн И.Я.* Спектрофотометрический анализ в органической химии / И.Я. Берштейн, Ю.Л. Каминский. – Л.: Химия, 1975. – 232 с. **8.** *Свердлова О.В.* Электронные спектры в органической химии / О.В. Свердлова. Л.: Химия. – 248 с.

Поступила в редколлегию 24.05.11