

М.Ф. КЛЕЩЕВ, д-р техн. наук, проф. НТУ «ХП», Харків;
Т.Д. КОСТИРКІНА, канд. хім. наук, проф. НТУ «ХП», Харків;
О.О. ВАРАНКІНА, канд. техн. наук, доц. НТУ «ХП», Харків;
Н.Ю. МАСАЛІТІНА, асистент НТУ «ХП», Харків;
А.В. ГРИШКОВСЬКА, студентка НТУ «ХП», Харків

ДОСЛІДЖЕННЯ ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ СПЕКТРОФОТО- МЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АМІНОКИСЛОТ

Приведено результати дослідження основних спектрофотометричних характеристик фенілаланіну та триптофану в ультрафіолетовій області та запропоновано оптимальні умови їх визначення: середовище – 0,01–2 М розчин NaOH; $\lambda=258$ нм для фенілаланіну та 280 нм для триптофану, інтервал концентрацій $(0,1-8,0)10^{-3}$ М для фенілаланіну, $(0,1-2,0)10^{-4}$ М для триптофану.

Ключові слова: амінокислоти, фенілаланін, триптофан.

Вступ. Амінокислоти поступають в організм людей та тварин з їжею, головним чином у вигляді харчового білку, займають центральне місце в азотистому обміні і забезпечують синтез в організмі його власних білків і нуклеїнових кислот, ферментів, багатьох коферментів, гормонів та інших біологічно активних речовин. Найпоширенішими є 20 амінокислот, що являються основною структурною частиною молекул білків та можуть існувати у незв'язаному вигляді. До цих найпоширеніших амінокислот відносяться фенілаланін та триптофан.

Аналіз останніх досліджень та літератури. Фенілаланін (2-аміно-3-фенілпропіонова кислота) та триптофан $C_{11}H_{12}N_2O_2$ (α -аміно-3-індолілпропіонова кислота) – це неполярні амінокислоти (рис.1). Фенілаланін використовується в синтезі та як лікарський засіб: зменшує біль, поліпшує пам'ять, пригнічує апетит і застосовується у лікуванні артриту, депресії, мігрені, ожиріння, хвороби Паркінсона. Триптофан використовується в якості добавки до харчових продуктів та як лікарський засіб: сприяє синтезу в головному мозку серотоніну, одного з найважливіших нейромедіаторів, який необхідний тим, хто страждає від безсоння, депресії

і для стабілізації доброго настрою [1 – 4].

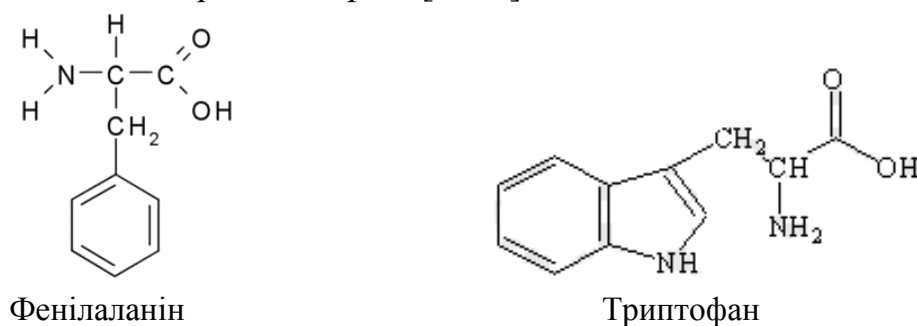


Рис. 1. Структурні формули фенілаланіну та триптофану

В промисловості ці амінокислоти виробляють мікробіологічним методом, виділяючи їх із культуральних середовищ визначених штамів мікроорганізмів, чи отримують із гідролізатів білків або хімічним синтезом. У всіх цих випадках необхідно мати надійні і прості методи визначення амінокислот.

Фенілаланін і триптофан можна визначити хроматографічним, титриметричним чи спектрофотометричним методами [5 – 12]. Найпростішим методом визначення цих амінокислот, що потребує найменше часу та реактивів, є спектрофотометричний за поглинанням в ультрафіолетовій (УФ) області спектру. Найповніші дані про цей метод є в роботі [8], авторами якої пропонується визначати фенілаланін при рН = 5,2 – 9,5 в інтервалі концентрацій $(0,5 - 5,5) \cdot 10^{-3}$ М і триптофан при рН = 3,0 – 9,2 в інтервалі концентрацій $(0,4 - 1,5) \cdot 10^{-4}$ М.

Мета досліджень, постановка проблеми. Метою цієї роботи є розширення діапазону визначуваних концентрацій фенілаланіну та триптофану за інтенсивністю поглинання в УФ області. Для цього досліджувалися спектрофотометричні характеристики водних розчинів амінокислот в широкому інтервалі кислотності та концентрації в інтервалі довжин хвиль 220 – 400 нм. Досліджувалися такі характеристики: спектри поглинання, вплив рН на максимум поглинання, оптимальна концентрація розчину та стабільність аналітичного сигналу при зберіганні розчинів.

Матеріали досліджень. Для розчинення амінокислот використовувалася вода, що є універсальним розчинником при спектрофотометрії амінокислот і має нижню межу пропускання 210 нм [10]. Для роботи була вибрана близька УФ область спектру в

інтервалі 220 – 400 нм. Вихідні 0,01 М розчини готували за точними наважками амінокислот, розчини менших концентрацій – розбавленням вихідних розчинів. Для отримання розчинів амінокислоти з $pH < pI$ використовували розчин хлоридної кислоти, з $pH > pI$ – 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 роботи приладу. Використовували кювети з товщиною поглинаючого шару 1 см. Спектри поглинання розчинів амінокислот знімали при температурі вимірювання рН в інтервалі 15 – 25 °С.

Результати досліджень. Спектри поглинання амінокислот при різній кислотності водних розчинів представлені на рис. 2.

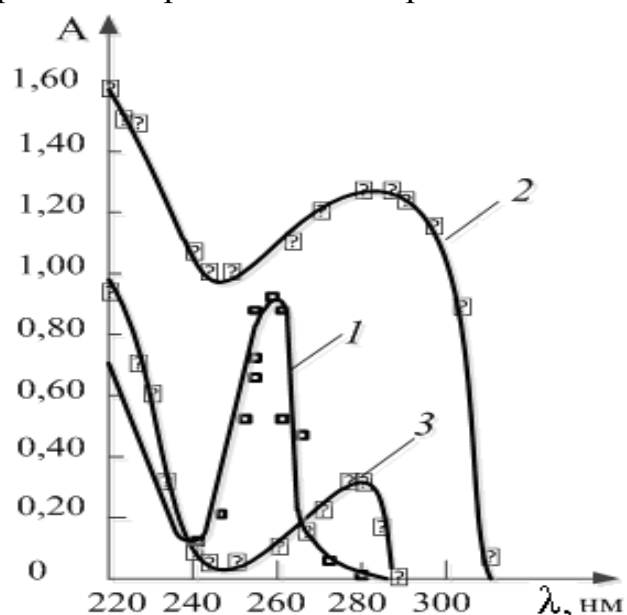


Рис. 2. Спектр поглинання фенілаланіну (1) та триптофану (2, 3): 1 – водний розчин фенілаланіну, $C = 5 \cdot 10^{-3}$ М; 2 – розчин триптофану в 0,1 М НСl, $C = 5 \cdot 10^{-5}$ М; 3 – водний розчин триптофану, $C = 5 \cdot 10^{-5}$ М.

Як видно із рис. 2, спектр поглинання фенілаланіну має максимум поглинання при 257 – 258 нм, а триптофану – в області 278 – 282 нм, що близько до літературних даних [10]. При вивченні залежності абсорбції розчинів амінокислот від рН в областях рН існування амінокислот в катіонній, аніонній формі і у вигляді цвіттерліту знайдено, що в широкому інтервалі рН, від кислого (2 М НСl) і до лужного середовища (3 М NaOH),

максимуми поглинання практично не змінюється і є в областях, що вказані вище. При спектрофотометричних дослідженнях одним із основних показників є стійкість аналітичного сигналу в процесі зберігання розчинів (рис. 3). Як видно з рис. 3, оптична густина розчину фенілаланіну з часом незначно падає: через перші 5 год на 0,005, через 48 год – на 0,02, тобто перші п'ять годин практично не змінюється.

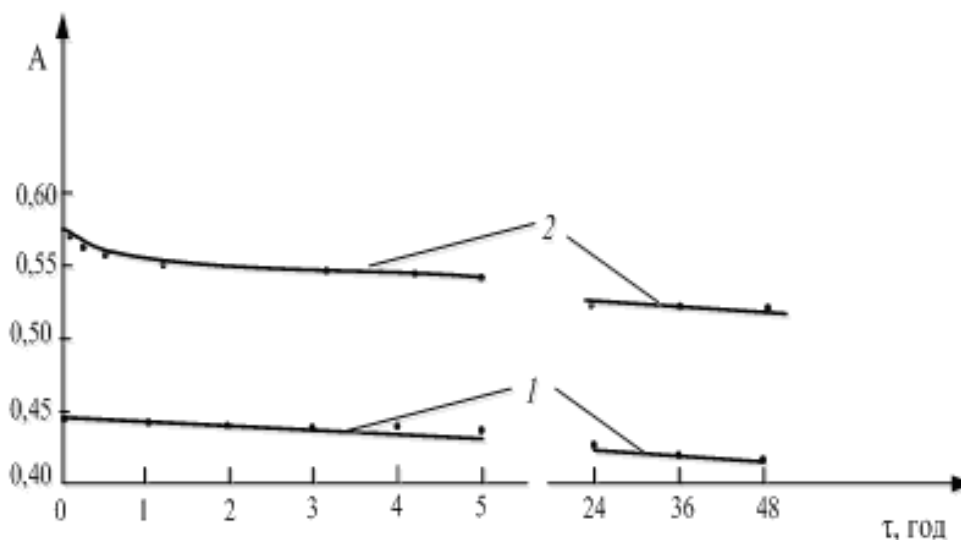


Рис. 3. Стійкість в часі амінокислот в 2 М розчині NaOH: 1 – фенілаланін, $C = 2,5 \cdot 10^{-3}$ М; 2 – триптофан, $C = 5 \cdot 10^{-5}$ М.

Оптична густина розчину триптофану з часом незначно падає: за перші 0,5 год на 0,02, а потім за наступні 4,5 год на 0,01 і через 48 год зменшується на 0,07 одиниць в порівнянні з початковим значенням. Тобто, можна вважати, що через 0,5 год після розбавлення оптична густина розчину триптофану впродовж п'яти годин практично не змінюється.

Для визначення оптимальних значень рН визначення амінокислот досліджувалися залежності оптичної густини розчинів від рН (рис. 4). Як видно із рис. 4, для фенілаланіну в інтервалах рН = 1 – 3; 5 – 9; 12,5 – 13 М NaOH оптична густина має постійне, хоч і неоднакове, значення. Аналогічна картина має місце для триптофану в інтервалах рН = 3 – 9; 12–13 М NaOH. Така залежність вказує на існування переважно однієї із форм цвіттерлітів амінокислот при різних значеннях рН. Довжини хвиль максимального поглинання практично однакові при різній кислотності розчинів для кожної амінокислоти, але інтенсивність поглинання різна.

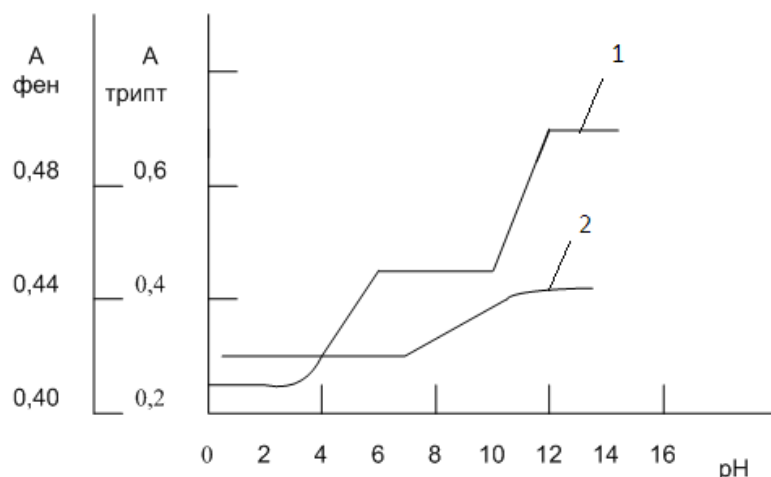


Рис. 4. Залежність оптичної густини розчинів фенілаланіну (1) та триптофану (2) від рН розчину: 1– фенілаланін: $C=2,5 \cdot 10^{-3}$ М; $\lambda = 257$ нм; 2– триптофан: $C=5 \cdot 10^{-5}$ М; $\lambda=280$ нм.

Розраховано молярні коефіцієнти поглинання в кислій, нейтральній і лужній областях, що становлять для фенілаланіну 164 ± 18 ; 178 ± 22 ; 206 ± 20 відповідно, а для триптофану 5600 ± 190 при рН = 5,9 та 8800 ± 205 в 2 М розчині NaOH. Ці дані показують доцільність визначення фенілаланіну і триптофану в лужному середовищі.

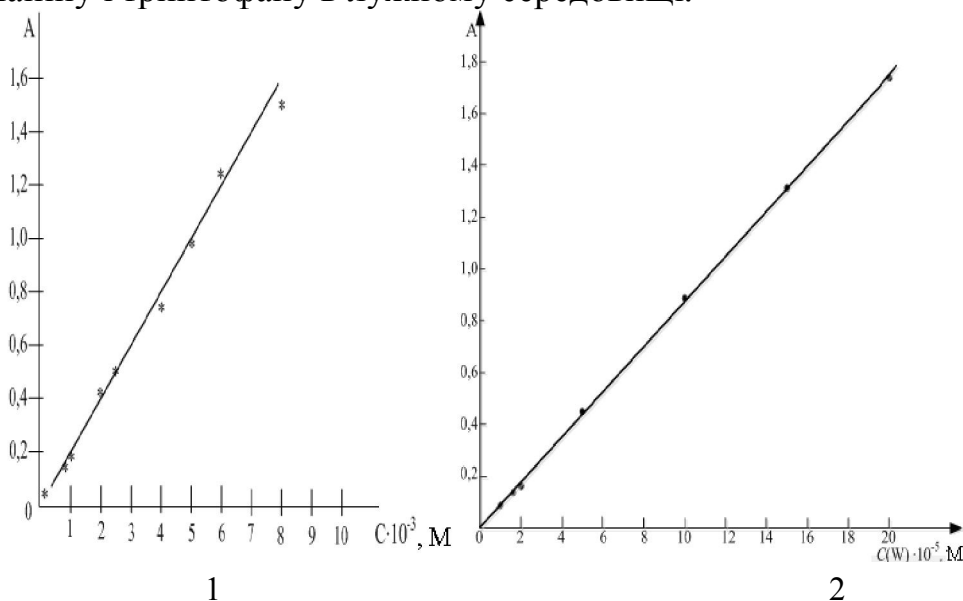


Рис. 5. Градувальні графіки для визначення фенілаланіну (1) та триптофану (2) в 2 М розчині NaOH: 1 – $\lambda = 258$ нм, $y = 192,5x$; 2 – $\lambda = 280$ нм, $y = 8596,6x$.

Отримані результати дали можливість оптимальними умовами визначення цих амінокислот вважати: середовище 0,01–2 М розчин NaOH; $\lambda = 258$ для фенілаланіну та 280 нм для триптофану, інтервал концентрацій $(0,1 - 8,0) \cdot 10^{-3}$ М для фенілаланіну та $(0,1 - 2,0) \cdot 10^{-4}$ М для

триптофану. Для побудови градувальних функцій розведенням готували серії розчинів амінокислот у воді, використовуючи вихідні розчини концентрацією $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³. На рис.5 приведено градувальні графіки для визначення фенілаланіну та триптофану. Градувальні функції для визначення фенілаланіну і триптофану при тих же умовах, але в середовищі 0,01 М розчину NaOH практично співпадають із наведеними на рис. 4.

Висновки. Таким чином, в роботі запропоновано оптимальні умови визначення фенілаланіну та триптофану: середовище 0,01 – 2 М розчин NaOH; $\lambda = 258$ для фенілаланіну та 280 нм для триптофану; інтервал концентрацій $(0,1 - 8,0) \cdot 10^{-3}$ М для фенілаланіну та $(0,1 - 2,0) \cdot 10^{-4}$ М для триптофану. Визначення амінокислот в лужному середовищі дає можливість розширити діапазон визначуваних концентрацій фенілаланіну і триптофану спектрофотометричним методом.

Список літератури: 1. Державна фармакопея України. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 531 с. 2. Большая медицинская энциклопедия. – М.: Медицина, 1986. – С. 1091 – 1099. 3. Досон Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Єлліот, У. Джонс. – М.: Мир. – 554 с. 4. Анохіна Г. Особливо важливі для життя / Г. Анохіна // Здоров'я і довголіття, 2010, № 30. – С. 4. 5. Филиппович Ю. Б. Практикум по общей биохимии / Ю.Б. Филиппович, Т.А. Егорова, М.И. Севастьянова. – М.: Просвещение, 1982. – 311 с. 6. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков / Пер. с англ. / Под ред. Овчинникова Ю.А. – М.: Мир, 1974. – 461 с. 7. Крешков А.П. Основы аналитической химии. Т. 3. / А.П. Крешков. – М.: Химия. – 472 с. 8. Котова Д.Л. Спектрофотометрическое определение аминокислот в водных растворах / Д. Л. Котова, Т.А. Крысанова, Т.В. Елисеева. – Уч. пособие. Воронеж: Воронежский государственный университет, 2004. – 55 с. 9. Бабко А. К. Фотометрический анализ. Общие сведения и аппаратура / А.К. Бабко, А.Т. Пилипенко. – М.: Химия, 1968. – 387 10. Свердлова О.В. Электронные спектры в органической химии / О.В. Свердлова, Э. Штерн, К. Тиммонс. – М.: Мир, 1974. – 296 с.

Надійшла до редколегії 19.09.2013

УДК 543.42

Дослідження оптимальних умов спектрофотометричного визначення амінокислот / Клещев М.Ф., Костиркіна Т.Д., Варанкіна О.О., Масалігіна Н.Ю., Гришковська А.В. // Вісник НТУ «ХП». Серія: Інноваційні дослідження в наукових роботах студентів. – Х.: НТУ «ХП». – 2013. – № 55 (1028). – С. 125–130. Бібліогр.: 10 назв.

Приведены результаты исследования основных спектрофотометрических характеристик фенилаланина и триптофана в ультрафиолетовой области и предложены оптимальные условия их определения: среда – 0,01 – 2 М раствор NaOH; $\lambda = 258$ нм для фенилаланина и 280 нм для триптофана, інтервал концентрацій $(0,1 - 8,0) \cdot 10^{-3}$ М для фенилаланина $(0,1 - 8,0) \cdot 10^{-3}$ М и $(0,1 - 2,0) \cdot 10^{-4}$ М для триптофана.

Ключевые слова: аминокислоты, фенилаланин, триптофан.

The results of spectrophotometric study of the basic characteristics of phenylalanine and tryptophan in the ultraviolet region are given. The optimal conditions (environment – 0,01–2 M solution of NaOH; $\lambda = 258$ nm for phenylalanine and 280 nm for tryptophan; concentration range $(0,1 - 8,0) \cdot 10^{-3}$ M for phenylalanine and $(0,1 - 2,0) \cdot 10^{-4}$ M for tryptophan) are determined.

Keywords: amino acids, phenylalanine, tryptophan.