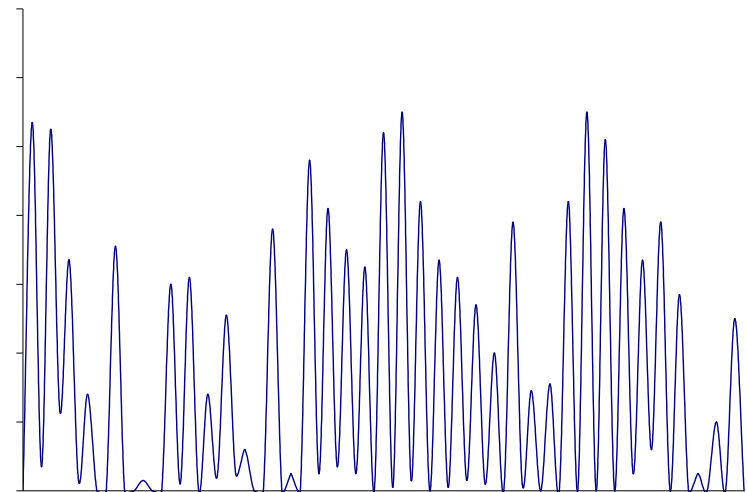


Міністерство освіти та науки України
Дніпропетровський національний університет

Сорочан О.О.,
Штеменко Н.І.

МЕТОДИ АНАЛІЗУ АМІНОКИСЛОТ



Дніпропетровськ
2005

Міністерство освіти і науки України
Дніпропетровський національний університет

Кафедра біофізики та біохімії

Сорочан О.О., Штеменко Н.І.

МЕТОДИ АНАЛІЗУ АМІНОКИСЛОТ

Ухвалено вченою радою університету як
навчально-методичний посібник

Дніпропетровськ

2005

ББК 28.072
УДК 577

Рецензенти: д-р біол. наук, професор О.З. Бразалук
д-р біол. наук, доцент Т.М. Сатарова

Сорочан О.О., Штеменко Н.І. Методи аналізу амінокислот:
Навч.-метод. посіб. – Д.: РВВ ДНУ, 2005. – 60 с.

Докладно подано розширений матеріал з методів аналізу амінокислот.

Призначений для студентів біологічних спеціальностей національного університету. Можуть бути також корисними для студентів, що навчаються за медичними спеціальностями.

Навчальне видання
Ольга Олександрівна Сорочан, Наталія Іванівна Штеменко

МЕТОДИ АНАЛІЗУ АМІНОКИСЛОТ

Навчально-методичний посібник

Підписано до друку Формат 60x84/16. Папір
друкарський. Друк плоский. Ум. друк. арк. Ум. фарбо-відб.
Обл.-вид. арк..
Тираж 100 пр. зам. №
Друкарня ДНУ, вул. Наукова, 5, м. Дніпропетровськ, 49050

© Сорочан О.О., Штеменко Н.І., 2005

ЗМІСТ

Вступ	4	3.2 Екстракція амінокислот із мозку тварин	45
1. Амінокислотний аналіз	5	3	
1.1 Іонообмінна хроматографія	5	4.1 Визначення окремих амінокислот	46
1.1.1 Аналіз вільних амінокислот	6	4.1.1 Визначення кількості триптофану	46
1.1.2 Аналіз білкових амінокислот	14	4.2 Визначення кількості гістидину	47
1.2 Високоєфективна рідинна хроматографія	18	4.3 Визначення кількості тирозину	48
1.3 Метод газо-рідинної хроматографії	20	4.4 Визначення фенілаланіну	49
1.4 Метод тонкошарової хроматографії	23	4.5 Визначення сірковмісних амінокислот	49
1.4.1 Принцип методу	23	4.6 Визначення гліцину	51
1.4.2 Підготовка хроматографічної камери	27	4.7 Визначення аргініна	51
1.5 Середньовольтовий горизонтальний електрофорез	30	4.8 Визначення орнітину	52
1.6 Нінгідринний тест	36	4.9 Визначення імінокислот (проліна і гідроксипроліна)	52
2. Методи екстракції амінокислот із рослинних тканин	37	4.10 Визначення вільного аміноазоту	53
2.1 Екстракція амінокислот із зерна рослин	37	5 Активація іонообмінної смоли	56
2.2 Екстракція амінокислот із вегетативних органів рослин	39	Список рекомендованої літератури	57
2.3 Екстракція амінокислот із кориневих виділень	41		
3 Методи екстракції амінокислот із тваринних тканин	44		
3.1 Екстракція амінокислот із крові	44		
3.1.1 Підготовка плазми крові до аналізу	44		
3.1.2 Гемоліз еритроцитів	44		

ВСТУП

Амінокислотний склад білків або фізіологічних рідин належить до найважливіших біохімічних характеристик, які необхідні як для наукових досліджень, так і для вирішення практичних питань.

Разподіл і аналіз амінокислот та їх похідних використовують при визначенні складу пулу вільних амінокислот, амінокислотного складу білків, секвенуванні пептидів, а також з метою діагностики порушень амінокислотного та білкового обмінів при гострих та патологічних станах, та під впливом ксенобіотиків.

У даному посібнику представлені сучасні методи, які використовують у лабораторній практиці для екстракції, розподілення, ідентифікації та кількісного визначення амінокислот. Представлено хроматографічні, спектрофотометричні, колориметричні та електрофоретичні методи.

1 Амінокислотний аналіз

1.1 Іонообмінна хроматографія

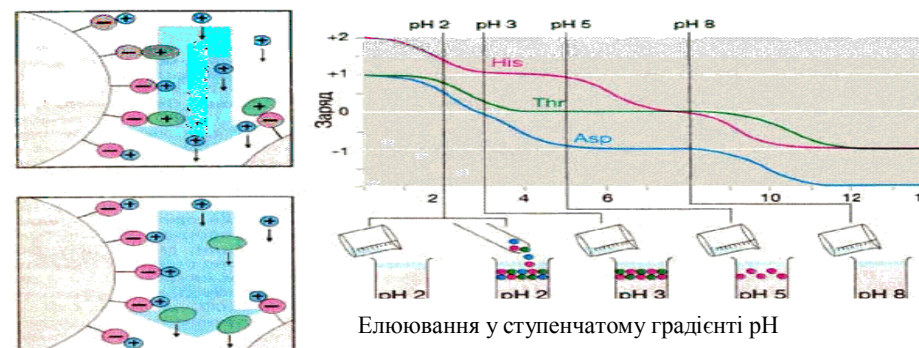
При низьких значеннях рН сумарний заряд молекули амінокислоти позитивний, а при високих значеннях рН – негативний. При певних значеннях рН середовища молекула не несе заряду – ця точка є ізоіонною та для кожної амінокислоти вона різна.

На кислотно-основних властивостях амінокислот, тобто на відмінностях у величині та знаку електричного заряду молекули при різних значеннях рН, які можна передбачити виходячи з кривих титрування амінокислот, засновано самий ефективний метод амінокислотного аналізу – метод іонообмінної хроматографії. Основи методу схематично наведено нижче.

Низькі значення рН

Графіки дисоціації

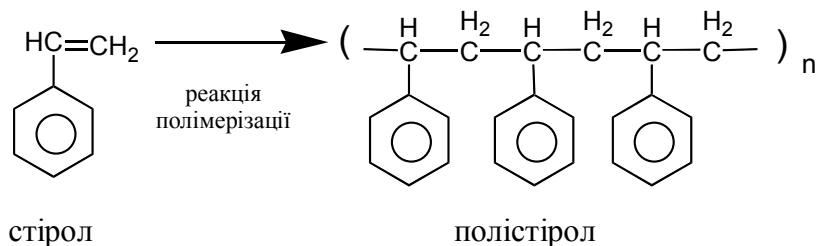
6



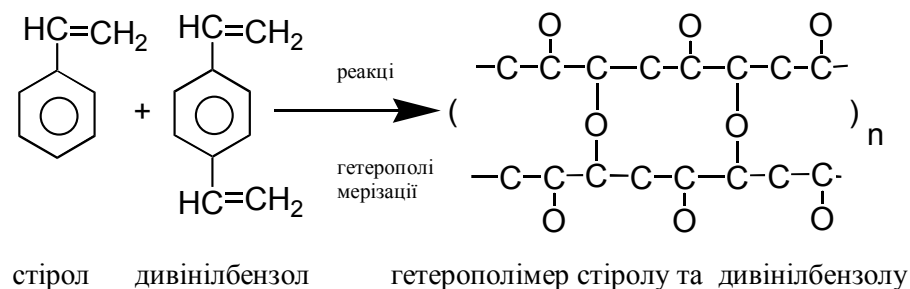
1.1.1 Ааліз вільних амінокислот

Основою методу є розділення суміші амінокислот на іонообмінній колонці. Колонка – це довга скляна трубка, яка заповнена гранулами синтетичної смоли, яка містить негативно заряджені групи.

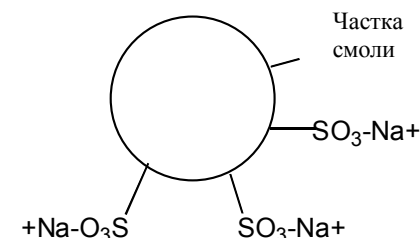
Розглянемо, наприклад, отримання одного з найпоширеніших катіонітів – смоли на основі стіролу і дивінілбензолу:



Полістірол – розчинний полімер. Але при конденсації стірола з дивінілбензолом утворюються поперечні зшивки (зв'язки між довгими ланцюгами), внаслідок чого утворюється нерозчинна смола:

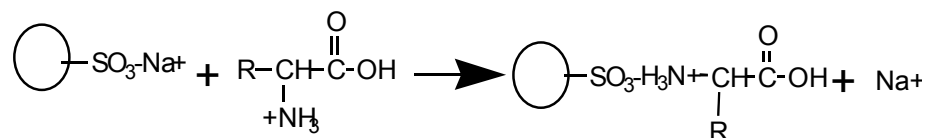


Змінюючи відносну кількість мономерів, можна регулювати ступінь зшивання. Таким чином утворюється трьохмірний каркас із гідрофобних бензольних ядер. Тепер в цей каркас поміщують негативно заряджені сульфгідрильні групи, тобто сульфурують смолу. Наступний етап обробка смоли водою, в разі чого відбувається процес набухання (молекули води входять в каркас і утворюють труднощі для проходження низькомолекулярних сполук). Частина смоли являє собою закріплені негативно заряджені групи:



Смоли із зв'язаними аніонними групами називаються катіонітами, або катіонообмінними, а смоли, зв'язані з катіонними групами – аніонітами, або аніонообмінними. Спочатку катіонообмінну колонку “нагружають” іонами натрію, потім на поверхню колонки наносять ки слай (рН 3,0) розчин суміші амінокислот і повільно пропускають його через

колонку. При рН 3,0 амінокислоти – це катіони, які несуть позитивний заряд, але які розрізняються по ступені іонізації. Проходячи через колонку, позитивно заряджені амінокислоти витісняють іони натрію:



Амінокислоти, які мають при рН 3,0 найбільший позитивний заряд (лізін, аргінін і гістидин) особливо активно приймають участь в обміні і внаслідок цього міцно зв'язуються із смолою. Амінокислоти, які при рН 3,0 мають найменший позитивний заряд (глутамінова і аспарагінова кислоти), зв'язуються із смолою в найменшому ступені. Всі інші амінокислоти несуть середній по величині позитивний заряд і характеризуються середньою міцністю зв'язування із смолою. Вимивання амаінокислот проводять різними буферними розчинами з постійно зростаючим значенням рН (від 3,25 до 5,28). Різні амінокислоти, таким чином, із різною швидкістю пересуваються по колонці, що залежить від величини їх рІ, рK_{+NH₃}, рK_R, а також від їх здатності адсорбуватись на частках смоли.

Аспарагінова та глутамінова кислоти будуть проходити через колонку з найбільшою швидкістю, а гістидин, аргінін і лізін – з найменшою.

Процеси розділення амінокислот в іонообмінній хроматографії не можна звести тільки до іонного механізму. Наприклад, молекули тирозину та фенілаланіну, які мають бензольні кільця, виходять майже останніми (перед ІV групою) не тому, що мають найбільше значення рІ, а тому, що бензольні ядра амінокислот зв'язуються з бензольними кільцями смоли за рахунок Ван-дер-Ваальсових сил.

Розчин, який виходить з колонки, поступає в проточний реактор, де до розчину певної амінокислоти додають нінгідрин, отримують синьо-фіолетове забарвлення і вимірюють кількість кожної амінокислоти фотометричним способом.

Порядок виходу амінокислот:

Асп, Тре, Сер, Глу, Про, Глі, Ала, Цис, Вал, Мет, Іле, Лей, Тір, Фен, Ліз, Гіс, аміак, Арг

Обговорені принципи лежать в основі сучасних автоматичних амінокислотних аналізаторів.

Зразок – білковий гідролізат, або суміш вільних амінокислот, яка виділена з фізіологічної рідини, попадає в

аналізатор (рис.1) через особливу систему вводу і за допомогою насосу подається на колонку, яка заповнена катіонообмінником.

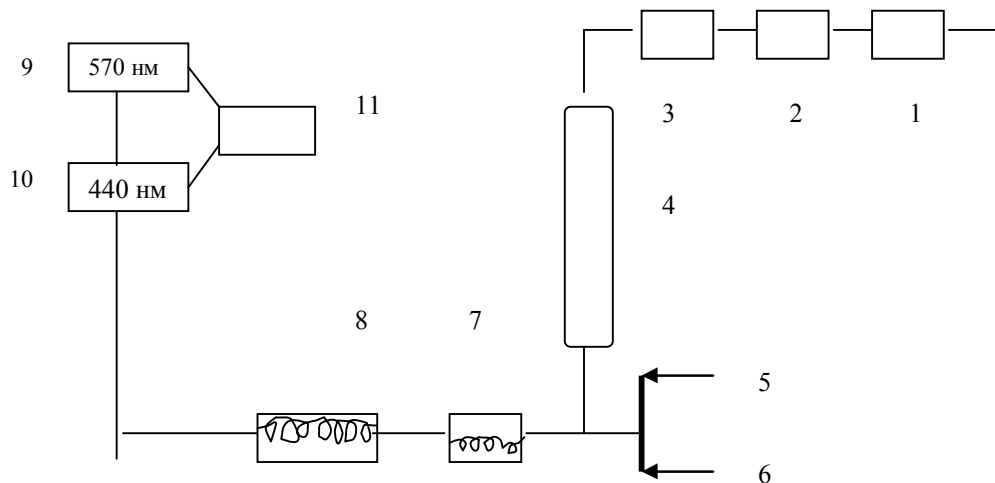


Рис.1 Схема будови амінокислотного аналізатора (1 – градієнтна камера, 2 – система подачі зразка, 3 – насос, 4 – іонообмінна колонка, 5 – азот, 6 – нінгідрин, 7 – кип’ятильник, 8 – охолоджуючий змійовик, 9, 10 – колориметри, 11 – самописець)

Після проходження через колонку амінокислоти поступають в змійовиковий реактор, де при кип’ятінні реагують з нінгідрином. Інтенсивно забарвлений продукт реакції поступає в колориметр, де при 540 нм та 440 нм вимірюється інтенсивність забарвлення. Сигнал з фотоколориметра поступає на реєстраційний прилад (самописець, обчислювальний інтегратор,

ЕОМ). Запис реєстраційного приладу представляє собою амінограму. Час виходу амінокислоти характеризує якісно, а площа піка – кількісно кожну амінокислоту. Отримані дані автоматично передаються на самописець, який їх реєструє у вигляді хроматограми (рис.2).

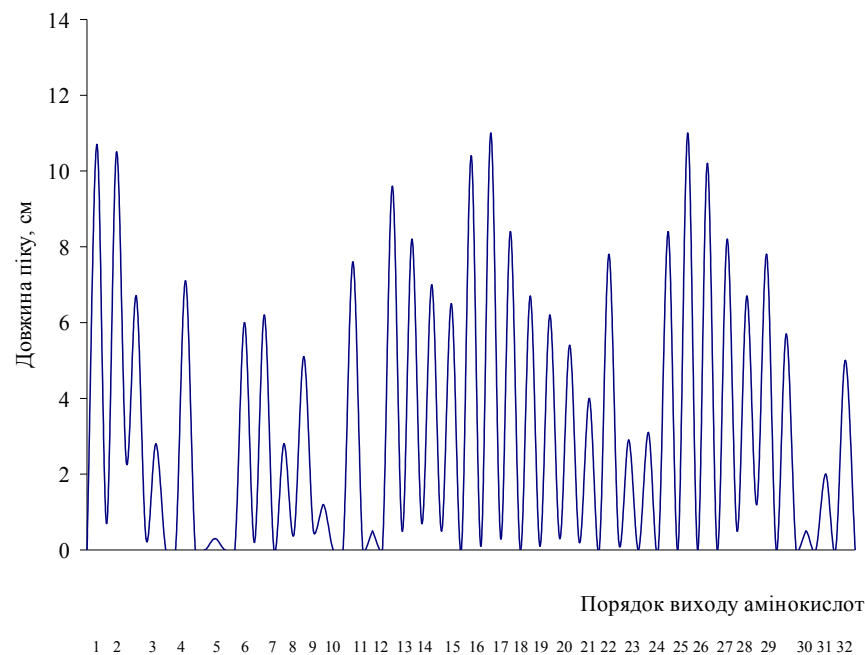


Рис. 2 Хроматограма стандартної суміші вільних амінокислот (Biochem, НДР): 1–фосфосерин, 2 – таурин, 3 – мочевина, 4–аспарагінова кислота, 5 – оксіпролін, 6 – треонін, 7 – серин, 8 – аспарагін, 9 – глутамінова кислота, 10 – глутамін, 11 –

α-аміноадіпінова кислота, 12 – пролін, 13 – гліцин, 14 – аланін, 15 – α-аміномасляна кислота, 16 – валін, 17 – ½ цистина, 18 – метіонин, 19 – цистеїн, 20 – ізолейцин, 21 – лейцин, 22 – тирозін, 23 – фенілаланін, 24 – β-аланін, 25 – β-аміноізомасляна кислота, 26 – γ-аміномасляна кислота, 27 – аміак, 28 – орнітин, 29 – лізин, 30 – гістидін, 31 – триптофан, 32 – аргінін

На рис.2 зображено хроматограму стандартної суміші амінокислот.

Результати аналізу представляють в мг%, в % від суми амінокислот або у ммоль/мл (молярна концентрація) за сучасною міжнародною системою одиниць (табл.1).

Питання і задачі:

1. В чому полягає основний принцип іонообмінної хроматографії?
2. Принцип роботи амінокислотного аналізатора.
3. На яких властивостях амінокислот засновано розподілення їх суміші?
4. Чому найшвидше крізь колонку проходять асп та глу, а найповільше гіс та арг?

Вміст амінокислот в зерні кукурудзи лінії Р346

Амінокислота	S піка	мг%	% до суми	ммоль/мл
Асп	522076	627,12	6,28	47,15
Тре	279254	289,56	2,90	24,33
Сер	614271	423,78	4,26	40,36
Глу	1856619	2179,89	21,84	148,29
Про	263320	1398,90	14,01	121,64
Глі	432588	286,68	2,87	45,50
Ала	1206763	851,73	8,53	95,70
1/2Цис	57818	101,83	1,02	8,42
Вал	432542	397,40	3,98	33,96
Мет	108440	146,57	1,47	9,84
Іле	238040	318,23	3,19	24,29
Лей	1312162	1564,87	15,68	119,46
Тір	184879	377,67	3,78	19,17
Фен	270666	513,29	5,14	31,11
Гіс	145144	275,35	2,76	17,76
Ліз	115255	228,98	2,29	15,68
Сума		9981,85		802,17

Аналіз білків та пептидів потребує попереднього гідролізу зразків з метою руйнування пептидних зв'язків. Стійкість пептидних зв'язків по відношенню до гідроліза залежить від роду амінокислоти і структури білку. Амінокислоти, які виділяють із пептидних зв'язків, можуть в результаті розкладання змінюватися під дією гідролізуючого реактиву або других компонентів реакційної суміші. Тому неможливо отримати абсолютні дані про вміст амінокислот при однакових умовах гідролізу. Для повноти інформації проводять гідроліз при різних температурах і часі утримання, а для визначення триптофану проводять гідроліз гідроокис'ю барія.

Якщо перед гідролізом зразок не звільнюється від вільних амінокислот, то отримують дані про сумарний вміст амінокислот (вільних і зв'язаних) в зразку.

Аналіз складу білкових амінокислот проводять на амінокислотному аналізаторі ААА 339 (ЧРСР) у режимі гідролізатів.

Гідроліз білків проводять хлористоводневою кислотою за методом [14]. Це засіб гідролізу, який найчастіше застосовується. Його проводять із застосуванням 6н НСІ, отриману розведенням

концентрованої кислоти дистильованою водою в співвідношенні 1:1. Гідроліз проводять в спеціальних пробірках з герметичними пробками.

50 мг зразку містять на дно пробірки так, щоб матеріал не залишався на її стінках. У пробірку додають 3 мл 6н НСІ. Пробірку ретельно загвинчують пробкою із тефлоновою прокладкою.

Пробірку вносять у блок гідролізації і залишають при температурі 110⁰С протягом 24 годин. По закінченні гідролізу пробірки охолоджують. Вміст пробірки під тягою фільтрують в колбу із шліфом. Кислота випаровується у вакуумному роторному випарювачі при 40⁰С. Сухий залишок розчиняють в необхідному об'ємі дозаційного буферу та аналізують.

Зразки, які після гідролізу не аналізують, залишають закритими і розраховують у холодильник або морозильну камеру.

Амінокислотний аналіз гідролізатів проводять на автоматичному аналізаторі амінокислот. Аналізатор працює в режимі гідролізатів. На аналітичну колонку подається 100 мкл зразка. Для елюції готують три натрієвих буферних розчина. Нінгідрінова реакція проходить при температурі 100⁰С. Оптична щільність продукту реакції, яка кількісно прямопропорційна концентрації речовини в розчині, визначається при 520 нм.

Калібровку приладу проводять за результатами 2-3 аналізів стандартної суміші амінокислот. Розраховують кількість амінокислот за стандартною процедурою.

Вміст амінокислот в невідомому аналізованому зразку розраховується за формулою:

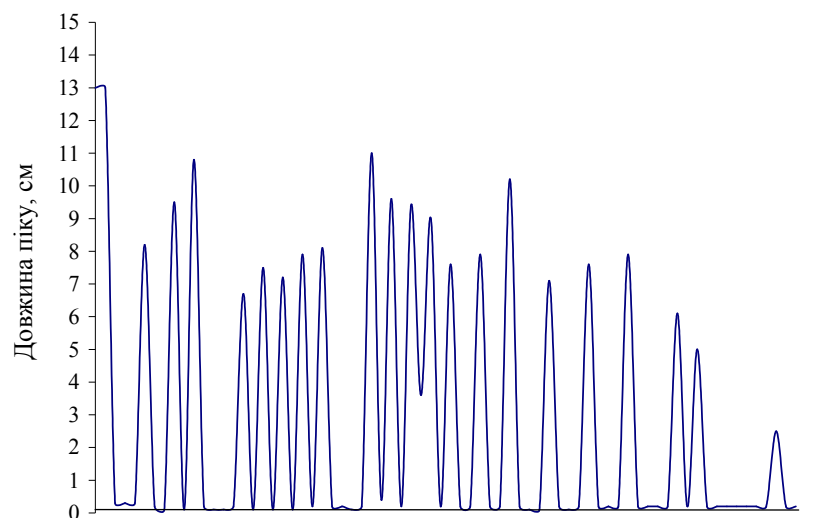
$$\text{мг \%} = \frac{S_{\text{оп.}} \cdot K \cdot M_{\text{в}}}{S_{\text{ст.}}}, \text{ де}$$

$S_{\text{оп.}}$ – площа піку амінокислоти в зразку,

$S_{\text{ст.}}$ – площа піку амінокислоти в стандартній суміші,

K – коефіцієнт, урахувавши масу і розведення зразка,

$M_{\text{в}}$ – молекулярна маса амінокислоти.



Порядок виходу амінокислот

Результати розраховувань вносять в бланк. Розраховується також сумарний вміст амінокислот в аналізованому зразку.

На рис. 3 зображено хроматограму стандартної суміші білкових амінокислот.

Існують інші методи амінокислотного аналізу, які мають набагато менше значення ніж метод іонообмінної хроматографії.

17

Рис. 3 Хроматограма стандартної суміші вільних амінокислот (Chema, ЧРСР): 1 – аланін, 2 – гліцин, 3 – валін, 4 – β-аланін, 5 – треонін, 9 – серин, 10 – γ-аміномасляна кислота, 11 – аспарагінова кислота + аспарагін, 12 – глютамінова кислота + глютамін, 13 – фенілаланін, 14 – лізин, 15 – тирозин, 16 – триптофан, 17 – метионін, 18 – гістидин, 19 – аргінін

18

Питання і задачі:

1. В чому полягає різниця між визначенням вільних амінокислот та білкових амінокислот методом іонообмінної хроматографії?

2. Розрахуйте, яка кількість гіс міститься у білку, якщо $S_{ст}$ дорівнює 154346, $S_{оп}$ 145144, K 0,1?
3. Розрахуйте, яка кількість асп міститься у білку, якщо $S_{ст}$ дорівнює 496347, $S_{оп}$ 522076, K 0,5?
4. Підготовка дослідної проби до амінокислотного аналізу.

1.2 Високоєфективна рідинна хроматографія

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) є розподільною хроматографією, яка заснована на різній полярності розподільних речовин. Якщо на інертний носій нанести малополярну нерухому фазу, а потім суміш неполярних речовин, то вони будуть утримуватися носієм за рахунок гідрофобної взаємодії. Якщо таку колонку промити сумішшю полярних розчинників (рухомою фазою), тоді компоненти суміші будуть переміщуватися із різною швидкістю у залежності від їх полярності. Спочатку будуть елюватися гідрофільні речовини, які слабо взаємодіють із нерухомою фазою, а потім гідрофобні речовини.

19

В перших варіантах розподільної хроматографії гідрофільною була нерухома фаза, а гідрофобною — рухома.

Сучасна модифікація метода носить назву звернуто-фазова хроматографія (ЗФХ).

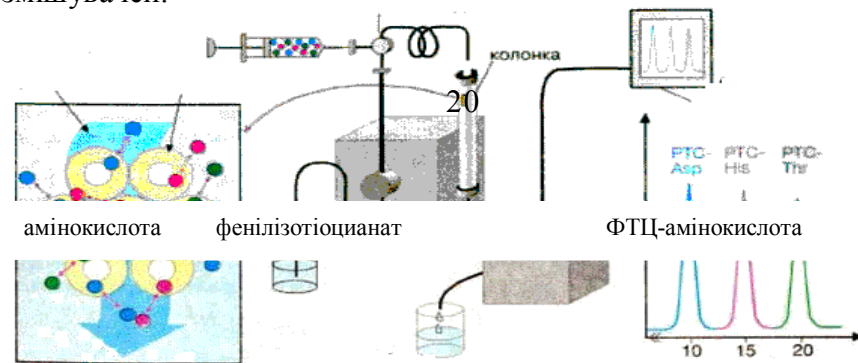
Спочатку при взаємодії із фенілізотіоціанатом отримують похідні амінокислот. ФТЦ-амінокислоти малополярні і завдяки поглинання в УФ-області спектра їх можна визначити у елюаті фотометрично.

У якості нерухомої фази використовують дрібні частки силікагелю (діаметром 5 мкм) із привитими вуглеводними ланцюгами (лігандами).

Використання дрібнодисперсних носіїв дозволяє підвищити якість розділення, однак при цьому зростає механічний супротив колонки. Тому високоєфективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) проводять у капілярах або колонках, які виконані із нержавіючої сталі, а елюент подають за допомогою насосів високого тиску.

У якості елюентів використовують системи розчинників із збільшуючою концентрацією ацетонітрила (CH_3CN).

Склад рухомої фази, а також, і якість розділення оптимізують за допомогою програміруємих градієнтних змішувачей.



1.3 Метод газо-рідинної хроматографії

Аналіз вільних амінокислот можна проводити методом газо-рідинної хроматографії на газовому хроматографі Chrom 5 (ЧРСР) зображеному на рис.4.

Для газохроматографічного аналізу використовують триметилсилільні похідні амінокислот, отримані за методом Герке.

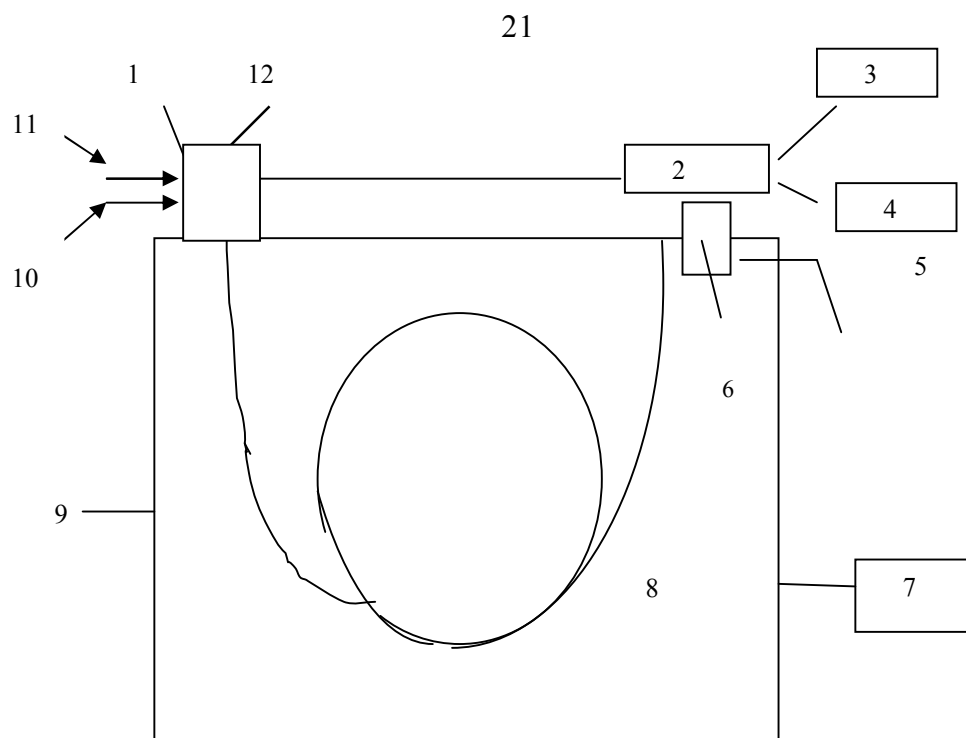


Рис.4 Схема будови газового хроматографа (1 – детектор, 2 – посилювач, 3 – самописець, 4 – інтегратор, 5 – газ-носій, 6 – місце введення проби, 7 – регулятор температури термостату, 8 – хроматографічна колонка, 9 – термостат, 10 – повітря, 11 – водень, 12 – запальний прилад)

Водний розчин, що містить 0,5-6 мг амінокислот, випаровують в хроматографічній пробірці в току азоту при 70⁰С.

Сліди H₂O видаляють азеотропною відгонкою із дихлорметаном (2x0,5мл), потім додають 250 мкл ацетонітрила, який містить внутрішні стандарти, і 250 мкл O,N-бис-(триметилсиліл)-ацетаміда на 1 мг суміші амінокислот. Закрити пробірку витримують 2,5 год при 150⁰С, охолоджують і суміш хроматографують.

Для газохроматографічного розподілення триметилсилільних похідних використовують неполярні рідинні фази. Щоб запобігти розкладанню зразків в інжекторі, їх вводять безпосередньо в колонку.

Для розподілення суміші триметилсилільних похідних амінокислот використовують: 1) колонка

довжиною 6м при внутрішньому діаметрі 2мм; 2) нерухома фаза 10% OV-11 на супелкорті, розмір часток 100-120 меш; 3) газ-носії азот, швидкість потоку 20 мл/хв. Початкова температура 110⁰С, програмоване збільшення температури до 154⁰С із швидкістю 2⁰С/хв, потім до 285⁰С зі швидкістю 5⁰С/хв. Температура інжектора 275⁰С, детектора 300⁰С. Ідентифіковані сполуки показані на рис. 3.

23

Питання і задачі:

1. Поясніть чому для визначення амінокислот у суміші методом тонкошарової хроматографії використовують триметилсилільні похідні?
2. Основні складові газового хроматографа.
3. Порівняйте нерухомі носії, які використовуються у іонообмінній та газо-рідинній хроматографії.

1.4 Метод тонкошарової хроматографії

1.4.1 Принцип методу

Тонкошарова хроматографія представляє собою один з

методів кількісного та якісного визначення амінокислот в різних тканинах рослин та тварин. Тонкошарову хроматографію проводять на платівках Silufol або на хроматографічному папері (ватман 1-4, FN 2-5 або ленинградська).

Суміш амінокислот розчиняють у 0,5 мл суміші мурашина кислота – оцтова кислота – вода в об'ємних відношеннях 7:5:13 [7]. На платівку Silufol або хроматографічний папір наносять 0,02 - 0,03 г стандартного розчину (Схема, ЧРСР).

24

Хроматограму закріплюють у лодочці для низхідної хроматографії і поміщують у хроматографічну камеру (рис.5), попередньо насичену парами води і органічного розчинника.

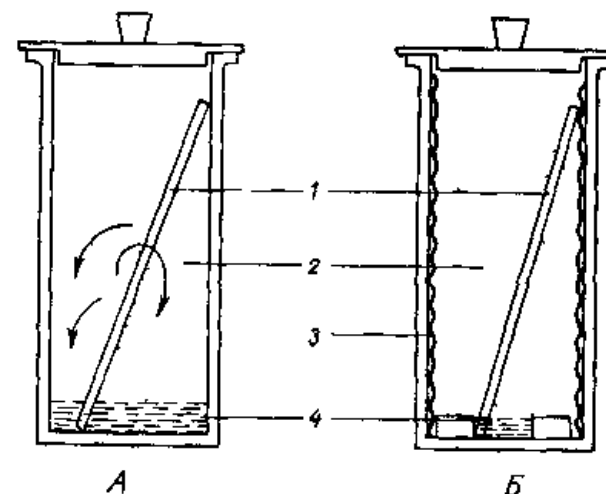


Рис.5 Хроматографічна камера та її насичення парами розчинника

А Камера с рідкою фазою, яку налито на дно

Б Камера, стінки якої устлани фільтрувальним папіром, змоченому рідкою фазою, для створення рівномірно насиченої парами розчинника атмосфери

1 — платівка с нанесеним шаром адсорбента;

2 — пари розчинника,

3 — змочена розчинником фільтрувальний папір;

4 — багатокомпонентний розчинник.

25

В якості розчинників для хроматографії амінокислот використовують систему: н-бутиловий спирт – оцтова кислота – вода (4:1:5). Компоненти суміші старанно струшують 5-10 хвилин і після розшарування використовують верхній прошарок.

Проявлення хроматограм проводять 1% водним розчином нінгідрину, який наливають у ванночку і рівномірно насичують їм хроматограму. Потім її висушують під тягою і витримують у темноті при кімнатній температурі 12 годин. В цих умовах із нінгідрином реагують всі α -амінокислоти (інші амінокислоти дають реакцію при більш високій температурі – біля 100°C). Для прискорення проявлення хроматограм при якісній хроматографії, останні поміщують в термостат при

60°C . Визначення амінокислот на виявленій хроматограмі проводять за допомогою денситометру ДО-1М (Україна). Визначають кількість амінокислот у кожній пофарбованій плямі. Вимір проводять із використанням візуального світлофільтра з пропусканням в області 510 – 640 нм. Також проводять вимір величини R_f (переміщення зони компонента, що хроматографується):

$$R_f = \frac{\text{відстань, яку пройшов компонент}}{\text{відстань, яку пройшов фронт розчинника}}$$

26

Величина R_f залежить від багатьох факторів: типу хроматографічного паперу, природи компонента, складу рухомої фази, умов експерименту тощо. Однак при сталих усіх параметрів хроматографування, значення R_f визначається тільки індивідуальними властивостями кожного компонента.

Для кращого розділення сполук із близькими значеннями R_f проводять хроматографування у декількох (зазвичай двох) системах розчинників, пропускаючи другий розчинник в тому ж напрямі, що й перший. Це призводить до уплощення плям розділяємих сполук і їх кращого розділення. Більш повне розділення досягається (у напрямі перпендикулярному першому) при двомірній хроматографії. При повторному розділенні у

системах розчинників положення плями на хроматограмі встановлюють шляхом визначення значень коефіцієнту відносної швидкості руху R_{st} , де

$$R_{st} = \frac{\text{відстань аналізованої сполуки від старту}}{\text{відстань стандарту від старту}}$$

Отриманні значення R_{st} є більш точними, ніж величина R_f .

Спочатку проводять вимірювання стандартної суміші амінокислот (Схема, ЧРСП), потім кожної окремої

27

амінокислоти (“Союзреактив”, СРСП). Після чого проводять вимірювання зразків із невідомим складом амінокислот.

1.4.2 Підготовка хроматографічної камери

Зазвичай проводять всхідну тонкошарову хроматографію, використовуючи скляні хроматографічні камери із кришками, які забезпечують герметичність [12]. Розчинник наливають на дно камери та поміщують у нього нижній край хроматографічної платівки (рис.5).

При використанні тонкошарової хроматографії враховують особливість, яка не спостерігається при колоночній хроматографії,

— випарювання розчинника із верхнього шару, у разі якого збільшується час міграції даної речовини. Із розчинника складного вмісту, в першу чергу випарюються найбільш леткі компоненти, що призводить до зміни вихідного співвідношення компонентів суміші. Інтенсивність випаровування знижується в напрямку від країв до центру платівки, тому виникає викривлення фронту розчинника, та в результаті величина R_f на краях хроматограми буде більше, ніж в центрі. Випаровування розчинника при тонкошаровій хроматографії погіршує визначення

28

величини R_f . Для того щоб вирішити цю проблему, слід постійно підтримувати у камері атмосферу насичених парів. Це досягається вистиланням стінок камери фільтровальним папіром, який змочений розчинником, або зменшенням до мінімуму об'єма хроматографічної камери (сендвіч-камера).

Існує декілька засобів подальшого поліпшення розділення при тонкошаровій хроматографії. Наприклад, можна повторно подавати той же самий розчинник на платівку або, перервав хроматографію на визначеному етапі, після того як розділяемі речовини вже мігрували на деяку відстань, висушити платівку, а потім продовжувати хроматографію із другим розчинником.

Для довготривалої хроматографії Бреннером та ін. [13]

запропонована спеціальна камера, представлена на рис. 6.

У цьому приборі хроматографічна платівка розташована горизонтально, а розчинник подається на один край платівки за допомогою фітилей із фільтровального паперу. Майже вся поверхня платівки закрита кришкою, за виключенням полоски шириною 2 см на протилежному по відношенню до сосуда із розчинником кінці.

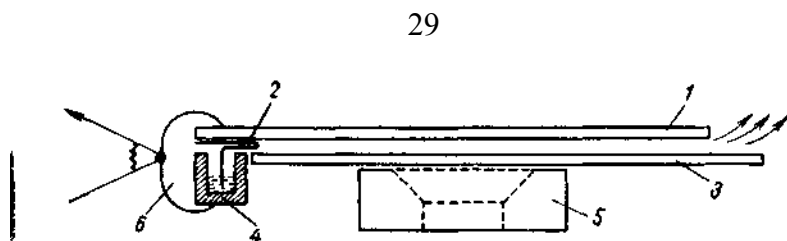


Рис.6 Схема горизонтальної хроматографічної камери Бреннера (BN-камера)

- 1- покриваюча платівка
- 2- фітіль із фільтровального паперу, який подає розчинник на шари адсорбента;
- 3- платівка, яка використовується для шару адсорбента;
- 4-резервуар для розчинника;

5- корковий круг, який підтримує камеру,

6- пружиний зажим

Розчинник випарюється із вільної поверхні цього кінця платівки, чим і забезпечується постійний потік елюента, і тому хроматографію можна вести тривалий час.

Питання і задачі:

1. Які речовини використовують у якості розчинників для розділення суміші амінокислот?

30

2. Підготовка хроматографічної камери до аналізу.

3. В чому полягають недоліки та переваги даного методу перед іншими при визначенні амінокислот?

4. Що таке величина R_f , і за якою формулою проводять її обчислення?

5. Яким засобом отримують та обчислюють значення R_{st} ?

1.5 Середньовольтовий горизонтальний електрофорез

Амінокислоти у розчині знаходяться у вигляді цвіттеріонів. Їх заряд, який визначається ступінню

дисоціації карбоксильних, аміногруп та бічних радикалів, залежить від рН розчину. Використовуючи метод електрофорезу на папері, вдається провести розділення окремих груп амінокислот. Складні суміші амінокислот можуть бути розділені за допомогою електрофорезів, які проводять при різних значеннях рН у взаємоперпендикулярних напрямках або комбінацією електрофореза і хроматографії [7].

31

Порядок підготовки реактивів наступний:

1. Готують буферний розчин: мурашина кислота-оцтова кислота-вода_{дист} у співвідношеннях 52:29:919, рН 1,9 (не менше 2 л).
2. Суміші А і Б амінокислот із заданою концентрацією – кожна по 50 мМ у суміші мурашина кислота-оцтова кислота-вода_{дист} (7:5:13). Суміш А – рівні об'єми розчинів тир, фен, глу, лей, сер, ала, арг і ліз. Суміш Б – рівні об'єми розчинів асп, тре, про, вал, ала, глі і гіс.
3. Розчин для зафарбовування: 0,2% розчин нінгідрина на суміші: 95 мл ацетона, 4 мл води_{дист}, 1 мл льодяної

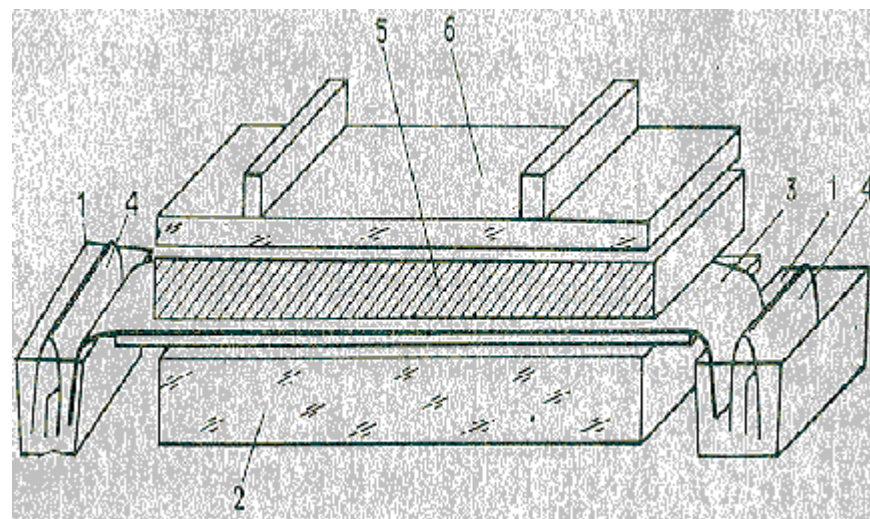
оцтової кислоти (Увага! Готують перед використанням).

4. Розчин для закріплення окраски: 10 мл водного насиченого розчину CuNO_3 змішують із 0,2 мл азотної кислоти і 100 мл ацетона. Отриману суміш відфільтровують.
5. Розчин для елюції амінокислот із паперу: 500 мл етанолу змішують із 0,2 мл насиченого водного розчину CuSO_4 .

32

Для електрофорезу використовують хроматографічний папір: ватман 1, ватман 3 ММ, папір FN3, FN4, FN5.

Вирізають листи хроматографічного паперу розміром 20x60 см²⁰. Розмір електрофореграми залежить від конструкції прибора (рис.7).



На відстані 10-20 см від одного із країв паперу простим олівцем проводять лінію старту і відмічають на ній 5-6 крапок із інтервалом 2,5-3,5 см. Папір кладуть на Рис. 7. Схема прибора для середньовольтового електрофорезу на папері: 1 – електродні відсіки; 2 – охолоджуюча плита; 3 – пакет із поліетилену, у якому знаходиться хроматографічний папір; 4 – фітиль із фільтровального паперу; 5 – подушка із паралону; 6 – прижимна кришка

амінокислоти у пятні повино складати 50-150 нмоль.

Зразки наносять на папір капіляром або мікропіпеткою, періодично підсушуючи зону нанесення. Після нанесення зразків папір, починаючи із країв, зволожують буферним розчином. При цьому слідкують за тим, щоб папір зволожувався рівномірно, а фронти буферного розчину, який пропитує папір зліва і зправа від

лінії старту, співпали точно на лінії старта. Збиток буфера видаляють фільтровальним папіром. Збиткове зволоження папіра погіршує розділення. Папір розташовують у спеціальний поліетиленовий пакет і кладуть на охолоджену плитку прибора для електрофорезу. Контакти

електрофореграми із електродними відсіками забезпечуються за допомогою паперових фітилей, змочених у буферному розчині. Зверху на електрофореграму накладають подушку із паралона, яка спеціальною кришкою придавлює папір до охолодженої плитки і забезпечує ефективний відток тепла, яке виділяється при електрофорезі. Прибор закривають кришкою із пластмаси і підключають до джерела електричного струму. Електрофорез проводять 1,5-2,5 год при напрузі поля 20В/см. Після закінчення електрофорезу папір винімають, висушують у потоці теплого повітря і профарбовують нінгідрином як описано у п.1.4.1.

При необхідності можна провести кількісне визначення деяких амінокислот у дослідному зразку, наприклад ала і глі, які добре відділяються від інших амінокислот. Для кількісного визначення ала і глі на електрофореграму, крім

дослідного зразка, наносять різні кількості цих амінокислот у концентрації 20-140 нмоль. Після закінчення електрофорезу, профарбовування і фіксації вирізають плями відповідних амінокислот, змільчують ножицями, поміщують у пробірки і приливають 3-5 мл розчину для елюції.

35

Проби до колориметрування необхідно періодично встряхувати і держати у темному місці. Елюати починають колориметрувати, коли у розчин повністю переходить краска із найбільш інтенсивно зафарбованих плям (звичайно 30-60 хв). Визначення проводять при 500 нм. Для контролю вирізають чисту ділянку хроматограми на тому ж рівні, що й проявлені плями, і обробляють його так само, як і дослідні зразки. Для визначення кількості амінокислоти використовують калібрувальний графік.

Питання і задачі:

1. Які властивості амінокислот дозволяють визначати їх методом середньовольтного горизонтального електрофорезу?
2. Які реактиви застосовують при визначенні амінокислот в дослідній суміші вищеописаним методом?

3. Який прибор використовують для проведення середньовольтного горизонтального електрофорезу? В чому полягають особливості його роботи?
4. Поясніть послідовність отримання хроматограми дослідного зразка методом середньовольтного горизонтального електрофорезу?

36

1.6 Нінгідриновий тест

Загальний вміст амінокислот визначають за допомогою нінгідринового тесту [11]. Даний тест ґрунтується на кольоровій реакції амінокислот із нінгідрином, внаслідок якої утворюється продукт, забарвлений в синьо-фіолетовий колір, що кількісно є прямо пропорційно концентрації амінокислоти в розчині.

Відбирають по 1 мл досліджуваних розчинів, додають по 1 мл 1% водного розчину нінгідрина, витримують на водяній бані протягом 6 хв. Охолоджують і вимірюють поглинання розчину в областях 440 і 570 нм. Вимірювання оптичних густин проводиться на приладі Specord M-40 (Німеччина). Розраховують оптичну густину 1 мл розчину на 100 мг зразка. За контроль беруть H_2O дист+нінгідрин в

співвідношенні 1:1. За калібрувальним графіком визначають концентрацію кожної амінокислоти в зразку.

Калібрувальний графік будують за результатами, які були отримані при вимірюванні оптичної густини продукту

37

нінгідринової реакції із стандартною сумішшю амінокислот (Schema, ЧССР) та з 1, 0,1, 0,01, і 0,001 % розчинами аланіну.

Питання і задачі:

1. Для визначення яких амінокислот використовується нінгідриновий тест?
2. Опишіть метод будовання калібрувального графіку для амінокислот.
3. За допомогою якого прибору визначається кількість амінокислот при проведенні нінгідринового тесту?

2 Методи екстракції амінокислот із рослинних тканин

2.1 Екстракція вільних амінокислот із зерна рослин

Екстракцію вільних амінокислот із зерна злакових проводять за [7]. Зразок масою 5 г заливають 100 мл води, додають по 2 краплі толуолу і струшують протягом 1 год.

Суміш витримують в холодильнику протягом 17-20 год при температурі 4-5⁰С. Потім суміш центрифугують протягом 5-10 хв при 4 тис. об/хв, рідину над осадом зливають, а осад екстрагують ще 5-6 разів із наступним центрифугуванням.

38

При такій екстракції у розчин переходять всі вільні амінокислоти. Екстракти змішують та випаровують у вакуумі до 50 мл. Температура екстракту при випаровуванні не повинна перевищувати 50⁰С. Екстракт охолоджують. Потім проводять очистку екстракту одним із методів:

1. Екстракт, в якому містяться амінокислоти, переносять в ділильну воронку. Туди ж для осаду білків додають трьохкратну кількість хлороформу. Суміш струшують протягом 5 хв. Потім воронку із сумішшю витримують у прохолодному приміщенні протягом 16-20 год. При такій обробці білки випадають в осад; верхній воднево-спиртовий шар, який містить очищені амінокислоти, відділяють, випаровують та використовують для аналізу.

2. Розчин амінокислот пропускають через іонообмінник (див.п.5).

Екстракт амінокислот розводять водою до 50 мл і пропускають через приготовлену хроматографічну колонку із

швидкістю 1 мл/хв. При пропусканні розчину електронейтральні молекули і аніони в колонці не затримуються, а амінокислоти та катіони адсорбуються іонообмінником, обмінюючись на H^+ -іони.

39

Колонку промивають 40 мл води, яку потім відкидають і приступають до вимивання амінокислот. Амінокислоти вимивають, пропускаючи через колонку 50 мл 6н розчину NH_4OH із швидкістю 1 мл/хв. Потім колонку промивають 30 мл води. Аміачні і промивні води збирають в окрему колбу, а потім відкидають.

Отриманий розчин амінокислот випаровують в вакуумі, додаючи 20 мл води і знову випаровують для видалення слідів аміаку. Таке випаровування проводять тричі.

Метод 2 є набагато ефективнішим, проте застосовується тільки тоді, коли необхідно позбавитись від низькомолекулярних речовин органічної природи з наступним використанням метода ГРХ амінокислот.

2.2 Екстракція вільних амінокислот із вегетативних органів рослин

Екстракцію вільних амінокислот з вегетативних органів рослин можна проводити двома методами:

1) за [11]. В цьому методі 100 г розмеленого сухого матеріалу, загорнутого в паперовий фільтр занурюють в пари

40

70 % киплячого етилового спирту із зворотнім холодильником на 3 год з наступним охолодженням і відділенням білків і пігментів сумішшю хлороформу і води (1:1) у ділильній воронці. Суміш добре струшують і залишають на 18 год при кімнатній температурі. Верхній шар, який містить суміш вільних амінокислот, відокремлюють в ділильній воронці, випаровують і в подальшому використовують для визначення загальної суми, якісного і кількісного аналізу вільних амінокислот;

2) за [7]. Зразки по 5-10 г розтирають в ступці, переносять в колбу, заливають 10 г 80% розчином спирту і кип'ятять 5 хв. Суміш охолоджують і гомогенізують протягом 10 хв, після чого залишки клітин видаляють центрифугуванням при 2-3 тис. об/хв протягом 5 хв. Центрифугат зливають, а осад ще тричі екстрагують і гомогенізують з 80 % розчином спирту, відбираючи спиртовий розчин після кожного центрифугування. Внаслідок такої обробки в екстракти

переходять всі амінокислоти. Екстракти змішують і видаляють із них спирт випаровуванням у вакуумі.

41

Обидва методи майже не відрізняються один від одного за ефективністю. Після отримання суміші амінокислот далі проводять очищення, як це було описано вище.

2.3 Екстракція амінокислот із корневих виділень

Для вивчення амінокислотного складу корневих виділень використовують установку, як показано на рисунку 8.

Вона складається з: 1) воронки циліндричної форми, у нижній частині якої є краник, що регулює подачу води; 2) воронки, наповненої на 2 - 3 см піском, який попередньо пройшов очищення (промивається проточною водою, ацетоном і пропікається 2 години в муфельній печі для видалення органічних залишків); 3) іонообмінної колонки, заповненої на 2 см іонітом і промитої 15 мл дистильованої води; у нижньої колонки є краник, за допомогою якого регулюється швидкість проходження рідини; 4) воронки, в яку збирають промивні розчини.

Насіння пророщують при кімнатній температурі протягом 15 діб, при кімнатній температурі, рослини поливають дистильованою водою.

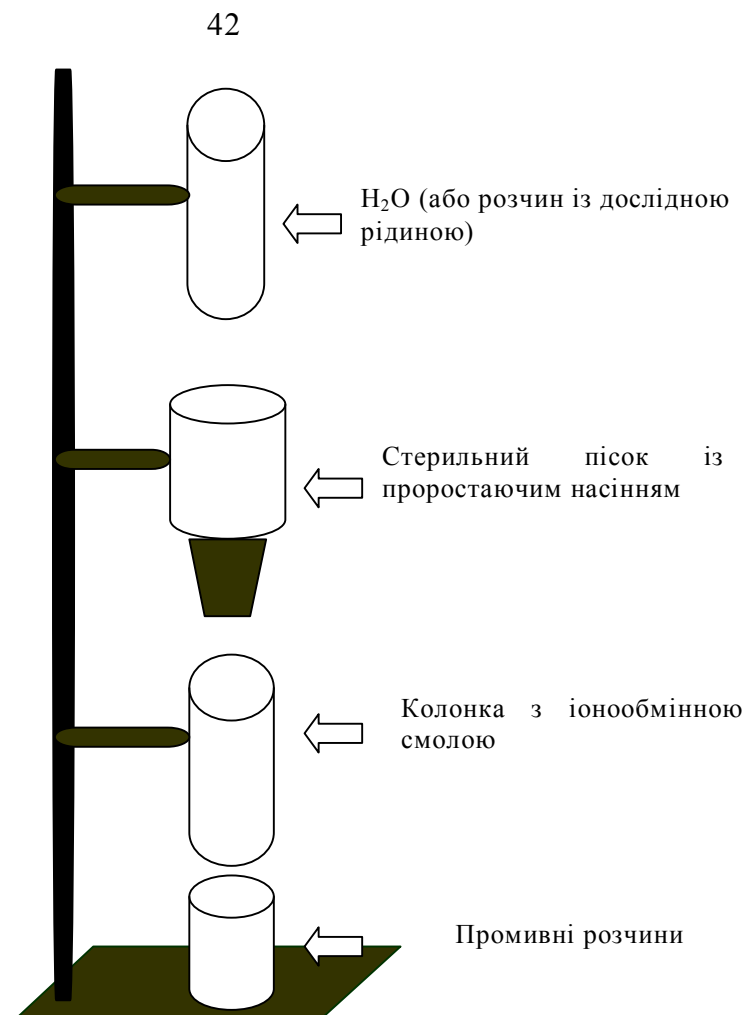


Рис. 8 Установа для збору корневих виділень

43

Розчин, який містить корневі виділення, надходить на колонку з іонообмінною смолою, де вільні амінокислоти сорбуються на частки смоли. Після закінчення експерименту амінокислоти вимивають поступовим витисненням 6N розчином аміаку з наступним його випаровуванням.

Після випаровування зразки аналізують одним із вищеописаних методів.

Питання і задачі:

1. Якої послідовності необхідно дотримуватися для екстракції вільних амінокислот із зерна рослин?
2. В чому полягають особливості екстракції вільних амінокислот із вегетативних органів?
3. Які реагенти використовують для вилучення амінокислот із різних органів рослин?
4. Яку установку використовують для отримання ексудату рослин?

44

3 Методи екстракції амінокислот із тваринних тканин

3.1 Екстракція амінокислот із крові

3.1.1 Підготовка плазми крові до аналізу

Плазму крові отримують за [17]: цільну кров центрифугують при 2000 об/хв протягом 5 хв, після чого відбирають верхній шар та використовують для біохімічного аналізу.

3.1.2 Гемоліз еритроцитів

Гемоліз еритроцитів проводять за [16]. Для осадження білків готують гемолізат у розведенні 1:10 (на 1 мл пробі: 0,1 мл крові + 0,9 мл дистильованої води) та додають 50 % розчин сульфасаліцилової кислоти у розрахунку 10 % від об'єму пробі. Перемішують скляною паличкою. Центрифугують протягом 20 хв при 2000 об/ хв. Для дослідження відбирають супернатант. Для очищення від сумішей білків, ліпідів, тощо зразок пропускають

через іонообмінну колонку за [Плешков]. Із отриманою сумішшю проводять амінокислотний аналіз одним із методів описаних вище.

45

3.2 Екстракція амінокислот із мозку тварин

Екстракція вільних амінокислот з мозку тварин проводять за [18]. Невеликі зразки тканин (сира маса 5-0,5 мг) ретельно гомогенізують в 0,05 м NaHCO₃, рН10 протягом 5 хв. Концентрація, яка найбільш підходить для екстракції є 1 мкг нервової тканини на 10 мкл. Потім суміш центрифугують при 45000 об/хв протягом 15 хв, надосадну рідину переносять в другу пробірку, її білки осаджують додаванням однакової кількості холодного ацетону в розчин. Потім ставлять на 30 хв у морозильну камеру (-20⁰С). Розчину дають відтаяти і знову центрифугувати при 20000 об/хв протягом 30 хв. Надосадну рідину переносять в чисту пробірку, ацетон видаляють випаровуванням в вакуумі на водяній бані при температурі 50⁰С.

Питання і задачі:

1. Опишіть методи екстракції вільних амінокислот із цільної крові тварин.
2. В чому полягає особливість екстракції амінокислот із мозку тварин?

3. Які реагенти і чому використовують для екстракції амінокислот із тканин тварин?

46

4 Визначення окремих амінокислот

4.1 Визначення кількості триптофану

Принцип методу полягає в тому, що внаслідок реакції з п-диметиламінобензоальдегідом (п-ДАБА) отримують продукт синього кольору [16].

Реактиви, що використовують наступні: 5 % ДАБА, 1 % нітрит натрію, концентрована соляна кислота (HCl), триптофан (сухий), NaOH, фізіологічний розчин, фільтри з синьою смугою.

Визначення триптофану проводять наступним чином:

До 0,6 мл експериментальної проби додають реактив Ерліха – 0,2 мл 5 % ДАБА в 2 мл HCl_к. Перемішують та залишають на 5 хв при кімнатній температурі.

Далі в пробірку додають краплю 1 % нітриту натрію. Змішують та фільтрують крізь складчастий фільтр. Фотометрують на ФЕКІ у кюветі на 10 мм при червоному світлофільтрі.

Контрольна проба: 0,6 мл дистильованої води, 0,2 мл 5 % ДАБА, 2 мл HCl_к, обробляють так само як і зразки.

Калібровка: 30 мг триптофану розчиняють у 1 % NaOH. Готують розведення в 2, 4, 6, 8, 10 разів.

47

4.2 Визначення кількості гістидину

Принцип методу полягає в тому, що гістидин у реакції зі специфічними реактивами дає червоне забарвлення розчину. За інтенсивністю забарвлення визначають кількість гістидину в розчині [16].

Реактиви, що використовують для аналізу наступні: 1 % сульфанілова кислота в 1 мл HCl, 5 % водневий розчин NaNO₂, 15 % водневий розчин Na₂CO₃, сухий гістидин, фізіологічний розчин.

Визначення гістидину проводять наступним чином:

У пробірку з гемолізатом розведенням 1:10 (2 мл) чи плазмою (0,25 мл) додають 0,5 мл 1 % розчину сульфанілової кислоти та 0,5 мл 5 % розчину NaNO₂. Витримують доки не з'являються червоні плями. Перемішують розчин та вимірюють на ФЕК при довжині хвилі 570 нм проти холостої проби (2 мл (0,25 мл) фіз. розчину + 0,5 мл 5 % розчину NaNO₂ + 0,5 мл 1 % розчину сульфанілової кислоти + 0,1 мл 15 %-го розчину Na₂CO₃).

Розрахунок кількості гістидину проводять за калібрувальним графіком з розведенням: 1,0; 0,7; 0,01; 0,02.

48

4.3 Визначення кількості тирозину

Принцип методу визначення полягає в тому, що тирозин у реакції зі специфічними реактивами дає червоне забарвлення розчину [16].

Реактиви, що використовують для визначення тирозину: 0,1 % розчин α -нітрозо- β -нафтола, 10 % розчин HNO_{3(k)} в ацетоні, фізіологічний розчин, сухий тирозин.

Порядок проведення аналізу наступний:

В термостійку пробірку занурюють 2 мл гемолізату еритроцитів (1:10) чи 0,25 мл плазми, додають 0,25 мл 0,1 % розчин α -нітрозо- β -нафтола в ацетоні. Витримують 5 хв при кімнатній температурі. Потім додають 0,75 мл 10 % концентрованої HNO₃. Прогрівають на водяній бані протягом 25 хв, доки не з'являється червоне забарвлення розчину. Охолоджують, перемішують. Вимірюють інтенсивність забарвлення на ФЕК у кюветі з товщиною 10 мм при довжині хвилі 570 нм проти холостої проби (2 мл (0,25 мл) фіз. розчину + 0,25 мл 0,1 %-го розчину α -нітрозо- β -нафтола +

0,75 мл 10 % розчину $\text{HNO}_3(\text{к})$. Визначають кількість тирозину за калібрувальним графіком.

Розведення готують: 0,01; 0,02; 0,05; 0,08; 0,1; 0,2.

49

4.4 Визначення фенілаланіну

Принцип методу полягає в утворенні стійкого кольору дослідної рідини при взаємодії фенілаланіну із 10 % розчином NaHCO_3 [7].

Спочатку проводять реакцію із 0,25 % розчином нінгідрину в ацетоні. Прогрівають 5 хв при 100^0C на водяній лазні або із метою отримання більш світлого фону витримують при кімнатній температурі протягом декількох годин. Потім додають розчин NaHCO_3 . Вимірюють інтенсивність забарвлення на спектрофотометрі при довжині хвилі 570 нм проти холостої проби.

4.5 Визначення сірковмісних амінокислот

Проводять декількома способами за [7]: 1) реакція із тетраїодидом платини; 2) реакція із азид-йодом; 3) реакція із нітропрусидом.

1. Проводять реакцію взаємодії дослідного зразка із 0,002 М платинохлороводневої кислоти : 1 М KI : 2 М HCl : ацетон

(4:0,25:0,4:76). Потім додають декілька крапель концентрованої HCl . Утворюється розчин рожевого кольору.

50

Вимірюють інтенсивність забарвлення на спектрофотометрі при довжині хвилі 520 нм проти холостої проби. Для отримання більш значного зафарбовування (темно-коричневий колір) 0,002 М розчин платинохлороводневої кислоти можна замінити на 0,002 М розчин PdCl_2 у 0,1 М HCl .

2. У дослідний зразок додають 0,025 М розчин I_2 у 50 % етанолі, який містить 1,5 % NaN_3 . Розчин залишають на 60 хв для взаємодії усіх сірковмісних амінокислот. Отримують розчин забарвлений у світло-коричневий колір. Вимірюють інтенсивність забарвлення на спектрофотометрі при довжині хвилі 590 нм проти холостої проби.

3. Спочатку готують розчин, який містить 1,5 г нітропрусида натрія у 5 мл 1 М H_2SO_4 : 95 мл MeOH : 10 мл 28 % NH_3 . Фільтрують. Додають у дослідний розчин, після чого утворюється червоне забарвлення за рахунок взаємодії із SH -групами. Потім додають 2 % розчин NaCN у 95 % MeOH . Ця реакція призводить до розщеплення $-\text{S}-\text{S}-$ зв'язків цим реагентом і визиває появу червоного кольору через проміжок часу від декількох секунд до 10 хв. Вимірюють інтенсивність

забарвлення на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм проти холостої проби.

51

4.6 Визначення гліцина

Принцип методу заснований на взаємодії гліцина із *o*-фталевим альдегідом [7]. Для цього проводять реакцію із 0,2 % розчином *o*-фталевого альдегіда у ацетоні. Прогрівують при 50⁰ С протягом 10 хв. Вимірюють інтенсивність забарвлення на спектрофотометрі при довжині хвилі 365 нм проти холостої проби.

4.7 Визначення аргініна

Дослідний зразок додають до 0,1 % розчину 8-гідроксихіноліна в ацетоні [7]. Потім додають розчин броду (0,2 мл Br₂ у 100 мл 0,5 М NaOH). При взаємодії із аргініном та іншими гуанідинами розвивається помаранчево-червоний колір. Вимірюють інтенсивність забарвлення на спектрофотометрі при довжині хвилі 500 нм проти холостої проби.

52

4.8 Визначення орнітина

Проводять реакцію із 0,2 % розчином ваніліна у ацетоні, а потім із 0,1 % розчином КОН у етанолі. Кип'ячать при 110⁰ С протягом 10 хв. Орнітин дає червоне забарвлення розчину [7].

4.9 Визначення імінокислот (проліна і гідроксипроліна)

Проводять реакцію із 0,2 % розчином ізатина у н-бутанолі, який містить 4 % оцтової кислоти. Кип'ячать при 105⁰ С протягом 15 хв [7]. Пролін і гідроксипролін дають стійке синє зафарбовування. Багато амінокислот дають такий колір у тому ж діапазоні кольорів. Для того, щоб розрізнити пролін і гідроксипролін, до розчину додають реагент Ерліха (див. розд. 4.1). Усі кольори, які даються ізатином зникають, окрім зафарбовування проліна і гідроксипроліна, яке переходить із синього у світло-вишневе. Вимірюють інтенсивність забарвлення на спектрофотометрі при довжині хвилі 550 нм проти холостої проби.

4.10 Визначення вільного аміноазоту

Принцип методу [5] полягає у наступному: кількість аміноазоту визначають колориметричним способом за інтенсивністю забарвлення комплексу, який утворюється при взаємодії аміногруп з нінгідриновим реактивом.

Реактиви, що використовують для визначення загального аміноазоту: 0,04 н розчин оцтової кислоти, 1% водневий розчин нінгідрину.

Проведення аналізу складається з кількох етапів:

1. Осадження білків. У центрифужні пробірки вносять по 0,5 мл сироватки крові та 0,5 мл розчину оцтової кислоти, пробірки закривають пробками та вміщують їх у холодну водяну баню. Воду в бані доводять до кипіння. Зразки кип'ячать протягом 5 хв. Потім пробірки охолоджують.

2. Фільтрування. До вмісту пробірок додають по 1 мл дистильованої води, перемішують та фільтрують розчин у мірну пробірку на 10 мл. Центрифужну пробірку та фільтр змивають ще 2 рази, кожний раз брали по 1 мл дистильованої води.

3. Реакція з нінгідрином. До фільтрату додають 0,5 мл розчину нінгідрина. Вміст пробірок перемішують та проводять інкубацію у киплячій бані протягом 20 хв.

Потім пробірки охолоджують у воді 5 хв при кімнатній температурі, потім розчин у пробірках доводять дистильованою водою до 10 мл.

Паралельно ставлять контрольну та стандартну проби.

Контрольна проба: до 3 мл дистильованої води додають 0,5 мл розчину оцтової кислоти, 0,5 мл розчину нінгідрину, після перемішування кип'ячать 20 хв. Далі контрольні зразки обробляють, як і дослідні.

4. Колориметрія. Щільність зразків виміряють на ФЕКі при зеленому світлофільтрі ($\lambda=540$ нм) у 5 мм кюветі. Результати порівнюють з аналогічними даними контрольного зразка та води.

5. Розрахунок. Його проводять за формулою, використовуючи дані екстинції дослідної та стандартної проб:

$$\frac{E_{\text{дос}} - C_{\text{дос}}}{E_{\text{ст}} - C_{\text{ст}}}$$

$$C_{\text{дос}} = (E_{\text{дос}} C_{\text{ст}}) / E_{\text{ст}}$$

де $E_{\text{дос}}$ та $E_{\text{ст}}$ – значення екстинцій дослідної та стандартної проб;

$C_{ст}$ – кількість мікрограм азоту у 0,5 мл стандартного розчину аланіну.

55

Стандартний розчин аланіну з концентрацією 12,86 мг/ 100 мл містить 64 мкг аланіну у 0,5 мл. Молекулярна вага аланіну – 90 г, одна молекула названої амінокислоти містить 1 атом N (14 г). З відношення 90/14-6,4 можливо визначити, що 64 мкг аланіну вміщують 10 мкг N.

Стандартний розчин аланіну обробляють так само, як і сироватку крові.

Для переведення результатів у нову систему одиниць (г/л) кількість мікрограм N помножують на 2000 (для перерахування кількості мкг азоту на 1 л біологічної рідини) та ділять на 10^6 (для переведення мкг у г). Отже, якщо використовувалось 0,5 мл сироватки крові, то кінцева формула має такий вигляд:

$$X_{г/л} = C_{дос}0,002, \text{ або}$$

$$X_{г/л} = C_{дос}/500,$$

де X – кількість аміноазоту в сироватці крові (г/л); $C_{дос}$ – кількість аміноазоту (мкг) у 0,5 мл сироватки.

В нормі концентрація аміноазоту в сироватці крові складає 0,020-0,050 г/л.

Питання і задачі:

1. Опишіть принцип методу визначення триптофану у дослідних зразках.

56

2. Які властивості гістидину використовують для його кількісного визначення?

3. Поясніть специфічність реакцій, які використовують для кількісного визначення тирозину.

4. Опишіть послідовність реакцій при визначенні загального аміноазоту.

5. Якими основними методами користуються для визначення азотвміщуючих речовин?

5 Активація іонообмінної смоли

Для очищення екстрактів амінокислот використовують катіоніт КУ-2 [6]. Для активації 10 г катіоніту з 300 мл 1н HCl струшують протягом 2 год, після чого на фільтрі відмивають від кислоти дистильованою водою до нейтральної реакції. В результаті такої обробки катіоніт насичують H^+ -іонами. Після цього іонообмінну смолу перемішують з водою і переносять в хроматографічну колонку, в нижню частину якої був вставлений

невеликий тампон із скляної вати. Довжина колонки 25 см, діаметр 1,5 см.

57

Питання і задачі:

1. Який тип катіоніту використовують для вилучення амінокислот із дослідних зразків?
2. Опишіть порядок проведення активізації катіоніту. Поясніть для якої мети проводять дану процедуру.

Список рекомендованої літератури

1. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию: В 2-х т.Т.1.-М.: Мир, 1986.- 393 с.
2. Справочник биохимика: Пер. с англ. / Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.- М.: Мир, 1991.- 544 с.
3. Измайлов С.Ф. Азотный обмен в растениях. -М.:Мир, 1986.-652с.
4. Кретович В.Л. Биохимия растений - М.: Высшая школа, 1986.- 593 с.
5. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т.: Пер. с англ. -М.: Мир, 1985.-Т.2.-368 с.

6. Методичні вказівки до вивчення курсу “Клінічна біохімія” / Ушакова Г.О., Лепьохін Є.О. – Д.: ДДУ, 1995. – 55 с.
7. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. - М.:Колос, 1968.-183 с.

58

8. Практикум по общей биохимии/ Ю.Б.Филиппович , Т.А. Егорова, Г.А.Севастьянова/ Под ред. Ю.Б.Филипповича - М.:Наука, 1975.- 318 с.
9. Штеменко Н.И. Аминокислоты кукурузы. – Днепропетровск: Изд-во ДГУ.-1993.-196 с.
10. Хроматография . Практическое приложение метода В 2-х частях. Ч.1 Пер.с англ. /Под ред. Э.Хефтмана. -М.: Мир, 1986-336с.
11. Sung TM, Lambert RJ Ninhydrin color test for screening modified endosperm opaque-2 maize// Cereal Chem.J.-1983.- № 60.- P.83-84.
12. Chothia C. Amino acid residue must be at least 95 % buried within the interior of the protein structure in order to be counted as buried. Average for 12 proteins.// J. Mol. Biol.- Vol.105, N1.- 1976.-P.36-45.
13. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. В 2-х т. – М.: Мир,1981

14. Васильев А.Н. Теоретические основы хроматографических методов в биохимическом анализе – К.: Вища школа, 1979.

59

15. Инструкция по эксплуатации автоматического анализатора аминокислот ААА Т-339.–Прага: Микротехна, 1981.
16. Практическая химия белка/ Под ред.А. Дарбе.- М.: Мир, 1989.-623с.
17. Исследование системы крови в клинической практике / Под ред. Г.И. Козенца и В.А. Макарова. М., 1997. 215 с.
18. Осборн Н.Н. Микрохимический анализ нервной ткани. – М.: Медицина, 1978.-262с.

59

15. Инструкция по эксплуатации автоматического анализатора аминокислот ААА Т-339.–Прага: Микротехна, 1981.
16. Практическая химия белка/ Под ред.А. Дарбе.- М.: Мир, 1989.-623с.
17. Исследование системы крови в клинической практике / Под ред. Г.И. Козенца и В.А. Макарова. М., 1997. 215 с.
18. Осборн Н.Н. Микрохимический анализ нервной ткани. – М.: Медицина, 1978.-262с.

Міністерство освіти і науки України
Дніпропетровський національний університет

Кафедра біофізики та біохімії

Сорочан О.О., Штеменко Н.І.

МЕТОДИ АНАЛІЗУ АМІНОКИСЛОТ

Ухвалено вченою радою університету як
навчально-методичний посібник

Дніпропетровськ

2005

ББК 28.072
УДК 577

Рецензенти: д-р біол. наук, професор О.З. Бразалук
д-р біол. наук, доцент Т.М. Сатарова

Сорочан О.О., Штеменко Н.І. Методи аналізу амінокислот:
Навч.-метод. посіб. – Д.: Друкарня ДНУ, 2005. – 59 с.

Докладно подано розширений матеріал з методів аналізу амінокислот.

Призначений для студентів біологічних спеціальностей національного університету. Можуть бути також корисними для студентів, що навчаються за медичними спеціальностями.

Навчальне видання
Ольга Олександрівна Сорочан, Наталія Іванівна Штеменко

МЕТОДИ АНАЛІЗУ АМІНОКИСЛОТ

Навчально-методичний посібник

Формат 60x84/16. Папір друкарський. Друк плоский. Ум. друк.
арк. Ум.фарбо-відб. Обл.-вид. арк..

Тираж 100 пр.

Друкарня ДНУ, вул. Наукова, 5, м. Дніпропетровськ, 49050

© Сорочан О.О., Штеменко Н.І., 2005

58

8. Практикум по общей биохимии/ Ю.Б.Филиппович , Т.А. Егорова, Г.А.Севастьянова/ Под ред. Ю.Б.Филипповича - М.:Наука, 1975.- 318 с.
9. Штеменко Н.И. Аминокислоты кукурузы. – Днепрпетровск: Изд-во ДГУ.-1993.-196 с.
10. Хроматография . Практическое приложение метода В 2-х частях. Ч.1 Пер.с англ. /Под ред. Э.Хефтмана. -М.: Мир, 1986-336с.
11. Sung TM, Lambert RJ Ninhydrin color test for screening modified endosperm opaque-2 maize// Cereal Chem.J.-1983.- № 60.- P.83-84.
12. Chothia C. Amino acid residue must be at least 95 % buried within the interior of the protein structure in order to be counted as buried. Average for 12 proteins.// J. Mol. Biol.- Vol.105, N1.- 1976.-P.36-45.
13. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. В 2-х т. – М.: Мир,1981

14. Васильев А.Н. Теоретические основы хроматографических методов в биохимическом анализе – К.: Вища школа, 1979.