



УДК 543.42.062 : 547.466.2 : 547.441

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АМИНОКИСЛОТ С *о*-ФТАЛЕВЫМ
АЛЬДЕГИДОМ: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТА РЕАКЦИИ**

Шведас В.-Ю. К., Галаев И. Ю., Березин И. В.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Разработан новый количественный метод определения α -аминокислот, основанный на спектрофотометрической регистрации продукта взаимодействия аминокислоты с *о*-фталевым альдегидом. Найдены оптимальные условия проведения реакции и показана возможность применения данной методики для определения практически всех природных аминокислот, за исключением пролина и оксипролина, в растворах с концентрацией выше $2 \cdot 10^{-5}$ М. Воспроизводимость определения составляет $\pm 2\%$.

о-Фталевый альдегид сравнительно недавно стал известен как реагент, дающий флуоресцирующие продукты с различными биологически активными соединениями, содержащими аминогруппу, например гистамином [1—3], гистидином и пептидами [4—6], 3-, 5-, 3,5-замещенными индолами [7], производными гидразина [8], спермидином [9], серотонином [10], аргинином и атматинном [11], глутатионом [12]. *о*-Фталевый альдегид используется также для определения пептидов после хроматографии [13, 14]. Подобные методики позволяют, как правило, определять количества исследуемых соединений на уровне нанogramмов. Взаимодействие *о*-фталевого альдегида практически со всеми природными аминокислотами, кроме пролина и цистеина, в присутствии меркаптоэтанола приводит к образованию флуоресцирующих продуктов [15, 16] с возбуждением при 340 нм и флуоресценцией при 455 нм. Известно также, что в некоторых условиях *о*-фталевый альдегид может давать цветные продукты с гистидином, триптофаном, глицином, аргинином (но не с другими аминокислотами), солями аммония и папаверином [17—21] и использоваться для проявления хроматограмм [18, 19] или специфического определения глицина в присутствии других аминокислот в гидролизате белков [20]. Тем не менее в литературе до сих пор не обсуждалась возможность использования *о*-фталевого альдегида для количественного спектрофотометрического определения аминокислот. Кроме того, в литературе отсутствуют данные о кинетике реакций взаимодействия аминокислот с *о*-фталевым альдегидом, необходимые для выбора оптимальных условий определения аминокислот.

В настоящей работе проведено детальное кинетическое исследование модельной реакции взаимодействия валина с *о*-фталевым альдегидом, а также найдены оптимальные условия проведения количественного определения аминокислоты спектрофотометрическим методом. Показано, что предложенный метод может быть использован при определении большинства α -аминокислот.

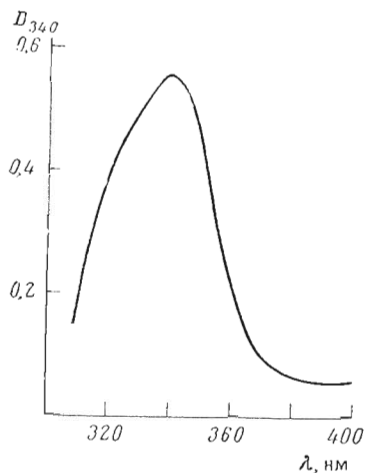


Рис. 1

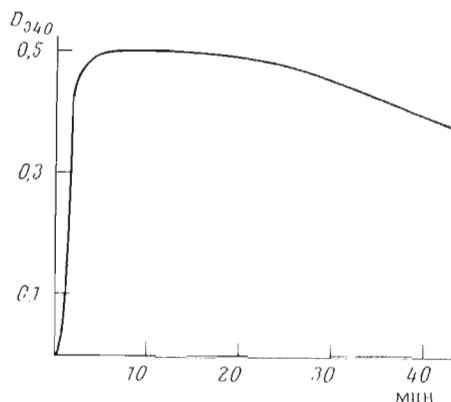


Рис. 2

Рис. 1. Разностный УФ-спектр между раствором продуктов взаимодействия *о*-фталевого альдегида с валином и раствором реагента

Рис. 2. Зависимость оптической плотности от времени при взаимодействии валина (0,16 мМ) с *о*-фталевым альдегидом

Разностный УФ-спектр растворов исходных реагентов и продуктов реакции при взаимодействии аминокислот с *о*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола имеет ярко выраженный максимум при 340 нм (рис. 1). Представляет интерес выяснить возможность спектрофотометрического определения аминокислот с использованием *о*-фталевого альдегида. Для этой цели были найдены оптимальные условия проведения модельной реакции определения валина.

Взаимодействие аминокислот с *о*-фталевым альдегидом протекает весьма эффективно, и даже в разбавленных растворах при комнатной температуре время практически полного протекания реакции измеряется минутами (рис. 2). Кинетика реакции взаимодействия валина с *о*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола подчиняется кинетике реакции второго порядка; значение бимолекулярной константы скорости этой реакции составляет $38 \pm 6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Предельное значение оптической плотности прямо пропорционально концентрации аминокислоты в реакционной смеси (рис. 3), что указывает на возможность количественного спектрофотометрического определения аминокислоты с использованием *о*-фталевого альдегида. Линейный характер представленной зависимости (рис. 3) сохраняется до 0,3 мМ концентрации валина в исходном растворе. Таким образом, описанная методика позволяет определять аминокислоту в растворах с концентрацией 0,02—0,3 мМ.

Кроме того, было изучено влияние pH и меркаптоэтанола на взаимодействие аминокислоты с *о*-фталевым альдегидом. Найдено, что присутствие меркаптоэтанола в интервале концентраций 0,3—1,2 мМ, практически не влияя на скорость протекания реакции, в значительной степени определяет величину коэффициента экстинкции образующегося продукта (рис. 4). Полученные данные позволяют сделать следующий важный вывод: чувствительность предлагаемого метода зависит от концентрации меркаптоэтанола, однако на практике не имеет смысла увеличивать концентрацию реагента в растворе выше 0,6 мМ.

Значение pH в реакционной смеси влияет главным образом на скорость взаимодействия аминокислоты и *о*-фталевого альдегида (рис. 5) и мало отражается на значении коэффициента экстинкции образующегося продукта (рис. 6). Кривая зависимости псевдомолекулярной константы

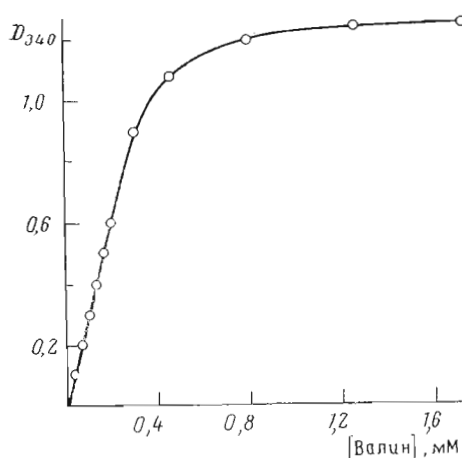


Рис. 3

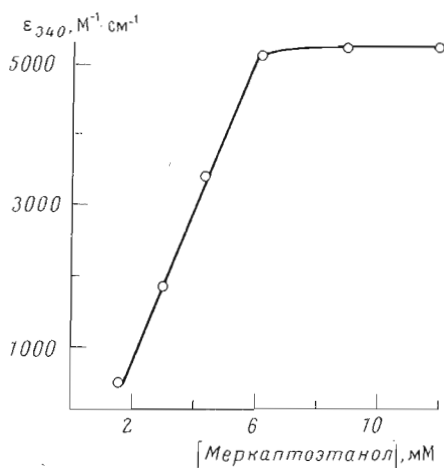


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость предельного значения оптической плотности (взаимодействие аминокислоты с *о*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола) при 340 нм от концентрации валина

Рис. 4. Зависимость значения разностного молярного коэффициента экстинкции для продукта реакции (взаимодействие аминокислоты с *о*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола) при варьировании концентрации меркаптоэтанола в стандартном растворе реагента

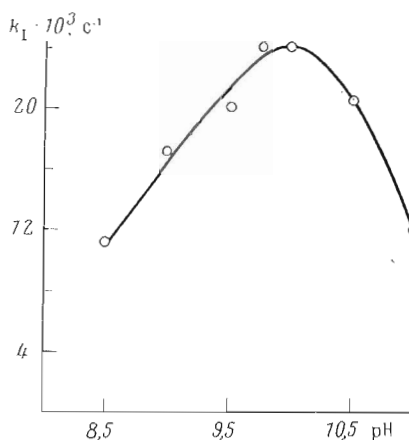


Рис. 5

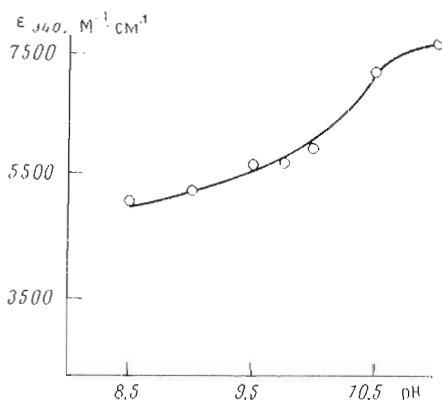


Рис. 6

Рис. 5. pH-Зависимость псевдомономолекулярной константы скорости (концентрация валина 0,05 мМ)

Рис. 6. pH-Зависимость значения разностного молярного коэффициента экстинкции для продукта взаимодействия аминокислоты с *о*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола

скорости от pH (рис. 5) имеет колоколообразный вид с максимумом в области pH 9,7—10,0. Уменьшение скорости взаимодействия *о*-фталевым альдегидом с аминокислотой при понижении pH раствора связано, по-видимому, с протонированием аминогруппы. Что касается падения скорости взаимодействия при pH выше 10, то имеющихся в настоящее время данных недостаточно, чтобы объяснить это явление (неизвестен химизм взаимодействия аминокислот с *о*-фталевым альдегидом).

С учетом вышесказанного были найдены оптимальные условия определения валина с использованием *о*-фталевым альдегидом (более подробно

Значения разностных молярных коэффициентов экстинкции при 340 нм (ϵ_{340}) для продуктов реакции и бимолекулярных констант скорости (k_{II}) реакции взаимодействия аминокислот с *о*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола

Аминокислота	ϵ_{340} , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	k_{II} , $M^{-1} \cdot c^{-1}$	Аминокислота	ϵ_{340} , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	k_{II} , $M^{-1} \cdot c^{-1}$
Глицин	5000±100	>500	Аргинин	5700±200	58±6
Аланин	5400±100	40±2	Гистидин	4800±100	42±4
Валин	5600±100	38±6 *	Глутаминовая кислота	4900±100	64±3
Норвалин	5300±100	88±4	Цистеин	1550±70	34±2
Лейцин	4800±100	60±20	Триптофан	4700±100	38±4
Норлейцин	6400±200	38±2	Метионин	5200±100	80±4
Изолейцин	5000±200	57±1	Серин	5500±100	44±6
Фенилаланин	5700±100	38±2	Тирозин	5200±100	33±1
С-Фенилглицин	5300±100	40±4	Треонин	5200±100	20±2
α -Аминомасляная кислота	5800±100	54±6	Аспарагиновая кислота	4800±100	44±2
Лизин	8800±200	100±20	Аспарагин	4600±100	39±1
Орнитин	6600±200	50±2			

* Значение бимолекулярной константы скорости в случае валина, определенное также в условиях равенства концентраций аминокислоты и *о*-фталевого альдегида (см. «Экспер. часть»), составило $27 \pm 2 M^{-1} \cdot c^{-1}$, что удовлетворительно согласуется со значением константы, определенным обычным методом.

см. «Экспер. часть»). Кроме того, была изучена возможность определения указанным методом и других аминокислот.

Сравнение значений коэффициента экстинкции для продуктов взаимодействия ряда аминокислот с *о*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола (таблица) показывает, что большинство аминокислот в этой реакции образует спектрофотометрически идентичные продукты. Наиболее сильное отклонение наблюдается в случае цистеина, значение коэффициента экстинкции продукта взаимодействия которого с *о*-фталевым альдегидом приблизительно в 3 раза меньше, чем в случае других аминокислот. Не обнаружено взаимодействия *о*-фталевого альдегида с пролином и оксипролином. Эти результаты хорошо согласуются с флуориметрическими данными [15], согласно которым пролин и цистеин в реакции с *о*-фталевым альдегидом не образуют флуоресцирующего продукта. Обнаружено взаимодействие *о*-фталевого альдегида с солями аммония, коэффициент экстинкции образующегося продукта составляет $1470 \pm 90 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ и по своему значению близок к коэффициенту экстинкции цистеина.

Изучена также кинетика реакций взаимодействия аминокислот с *о*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола *. Сопоставление кинетических констант (таблица) показывает, что все аминокислоты, за исключением глицина, реагируют примерно одинаково (значения бимолекулярных констант скорости различаются всего в 2—3 раза).

По сравнению с наиболее широко распространенной методикой количественного определения аминокислот с использованием нингидрина [22] предлагаемая методика позволяет количественно определять аминокислоты в растворах с концентрацией на порядок ниже. Кроме того, предлагаемый метод выгодно отличается от нингидринового метода меньшей трудоемкостью и большей скоростью анализа, так как в данном случае исключается стадия кипячения и выдерживания проб после разбавления. Указанные преимущества особенно очевидны при проведении большого числа определений.

* В отсутствие меркаптоэтанола в условиях эксперимента взаимодействия аминокислот, кроме цистеина, с *о*-фталевым альдегидом не происходит. При инкубировании *о*-фталевого альдегида с цистеином в отсутствие меркаптоэтанола происходит медленное взаимодействие, значение бимолекулярной константы скорости для которого составляет $0,8 \pm 0,2 M^{-1} \cdot c^{-1}$ (в присутствии меркаптоэтанола оно равно $34 \pm 2 M^{-1} \cdot c^{-1}$).

Кроме нингидринового метода в последнее время все более широкое распространение получает метод определения аминокислот с использованием флуорескамина [23—26]. Однако сравнение чувствительности флуорескаминового метода и метода с использованием *о*-фталевого альдегида затруднено, так как в первом случае анализ выполняется на аминокислотном анализаторе, где аминокислоты разделяются на колонке и элюируются в виде пиков. Оба метода, по-видимому, близки по чувствительности: флуорескаминовый метод позволяет определять до 10 нмоль [24], а метод с использованием *о*-фталевого альдегида — до 5 нмоль (0,25 мл 0,02 мМ раствора). Тем не менее *о*-фталевый альдегид более доступен и может быть в отличие от флуорескамина растворен в водных растворах, что является определенным преимуществом при работе с автоматическими дозаторами.

Таким образом, по сравнению с известными в настоящее время методиками количественного определения аминокислот, основанными на спектрофотометрической регистрации, предлагаемая методика с использованием *о*-фталевого альдегида отличается большей чувствительностью, простотой и высокой скоростью проведения анализа.

Экспериментальная часть

В работе использовали: *о*-фталевый альдегид (Koch Light, Англия); меркаптоэтанол (Merck, ФРГ); норлейцин, тирозин, орнитин, лизин, аргинин, серин и оксипролин (Reanal, Венгрия); α -аминомасляную кислоту, триптофан, аланин, лейцин и глицин (Реахим-4); метионин, норвалин, валин, аспарагиновую кислоту, аспарагин, цистеин, гистидин и фенилаланин — препараты из набора аминокислот «Химреактивкомплект»; *С*-фенилглицин (Sigma, США); пролин (VEB Arzneimittelwerk, ГДР); треонин (Chemapol, ЧССР). Остальные реактивы и соли — отечественного производства марки х.ч. и ч.

Стандартный раствор реагента приготавливали следующим образом: к 30 мл 0,1 М боратного буфера, pH 9,7, добавляли 0,5 мл этанольного раствора *о*-фталевого альдегида концентрации 10 мг/мл и 0,5 мл этанольного раствора меркаптоэтанола, полученного при добавлении 5 мл меркаптоэтанола к 1 мл этанола. Реагент стабилен в течение дня. Спиртовой раствор *о*-фталевого альдегида хранили при комнатной температуре в темном сосуде более месяца. Измерения оптической плотности при 340 нм проводили с помощью 16-кюветного скоростного анализатора «Gemsaes» (Electronucleonics, США) с тефлоновым ротором с 16 ячейками, разделенными на 3 камеры каждая. В первую и вторую ячейки заливали микропипеткой по 0,25 мл анализируемого раствора аминокислоты и реагента соответственно. После заполнения ротор помещали в измерительный блок, где при быстром вращении содержимое камер переносится в соответствующие термостатируемые измерительные ячейки прибора, дополнительно перемешивается пробуюлькиванием воздуха, после чего начинается измерение оптической плотности через определенные промежутки времени. В каждой ячейке возможно проведение до 20 измерений оптической плотности (интервал между двумя измерениями 5—99 с, интервал перед первым измерением 10—999 с). Все измерения оптической плотности проводили относительно разбавленного в 2 раза (см. методику определения) стандартного раствора реагента.

Константу скорости реакции второго порядка между аминокислотой и *о*-фталевым альдегидом определяли двумя способами:

а) находили константу скорости реакции псевдопервого порядка при 10—20-кратном избытке *о*-фталевого альдегида по сравнению с аминокислотой из зависимости оптической плотности от времени по методу Гугенгейма [27]. Затем из зависимости константы скорости реакции псевдопервого порядка от концентрации *о*-фталевого альдегида по тангенсу угла наклона прямой определяли значение бимолекулярной константы

скорости. Математическую обработку экспериментальных данных проводили по методу наименьших квадратов с учетом статистических весов полученных значений констант скорости реакции псевдопервого порядка при определении значения бимолекулярной константы скорости. Все расчеты * осуществляли на компьютере РДР 8/Е;

б) константу скорости реакции второго порядка определяли из кинетической кривой, полученной в условиях равенства концентраций аминокислоты и *о*-фталевого альдегида, с использованием уравнения [27]:

$$1/(a - x) - 1/a = k_{II}t,$$

где a — концентрация аминокислоты в начальный момент времени; x — концентрация аминокислоты, вступившей в реакцию в момент времени t , определенная по образованию продукта; k_{II} — константа скорости реакции второго порядка. В координатах $1/(a - x) \div t$ тангенс угла наклона прямой численно равен значению бимолекулярной константы скорости.

Разностный УФ-спектр между раствором продукта взаимодействия *о*-фталевого альдегида с валином и раствором реагента получали на двухлучевом самопишущем спектрофотометре «Hitachi-124» при концентрации валина $2 \cdot 10^{-4}$ М.

Количественное определение аминокислот проводили следующим образом: смешивали равные объемы исследуемого раствора аминокислоты и стандартного раствора реагента и определяли значение оптической плотности реакционной смеси при 340 нм через 5–10 мин, но не позднее, чем через 20 мин после смешивания. Концентрацию аминокислоты определяли с использованием заранее полученной калибровочной кривой. Следует обратить внимание на тот факт, что при длительном инкубировании реакционной смеси более 20 мин наблюдается протекание побочных реакций, сопровождающееся уменьшением оптической плотности раствора.

Все эксперименты, в том числе кинетические исследования, были выполнены при $25 \pm 0,1^\circ$ в термостатируемой ячейке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shore P. A., Burkhalter A., Cohn V. H. (1959) J. Pharmacol. and Exp. Ther., 127, 182–186.
2. Gerber D. (1970) Anal. Biochem., 34, 500–505.
3. Håkanson R., Rönnberg A. L., Sjölund K. (1972) Anal. Biochem., 47, 356–369.
4. Håkanson R., Rönnberg A. L., Sjölund K. (1974) Anal. Biochem., 59, 98–109.
5. Håkanson R., Johansson H., Rönnberg A. L. (1971) Acta physiol. scand., 83, 427–429.
6. Piquilloud Y., Reinharz A., Roth A. (1970) Biochim. et biophys. acta, 206, 136–142.
7. Maickel R. P., Miller F. P. (1966) Anal. Chem., 38, 1937–1938.
8. Weeks R. W., Yasuda S. K., Dean B. J. (1976) Anal. Chem., 48, 159–161.
9. Håkanson R., Rönnberg A. L. (1973) Anal. Biochem., 54, 353–361.
10. Somerville B., Hinterberger H. (1975) Clin. chim. acta, 65, 399–402.
11. Cohn V. H., Shore P. A. (1961) Anal. Biochem., 2, 237–241.
12. Cohn V. H., Lyle J. (1966) Anal. Biochem., 14, 434–440.
13. Mendes E., Gavelanes J. G. (1976) Anal. Biochem., 72, 473–479.
14. Torres A. R., Alvarez V. L., Sandberg L. B. (1976) Biochim. et biophys. acta, 434, 209–214.
15. Roth M. (1971) Anal. Chem., 43, 880–882.
16. Schwabe C., Catlin J. C. (1974) Anal. Biochem., 61, 302–304.
17. Zimmerman W. (1930) Z. physiol. Chem., 189, 4–6.
18. Patton A. R., Foreman E. M. (1949) Science, 109, 339–340.
19. Curzon G., Giltrow J. (1954) Nature, 173, 314–315.
20. Patton A. R. (1935) J. Biol. Chem., 108, 267–272.
21. Wachsmuth H., Denissen R., Von Koeckhoven L. (1969) J. Pharm. Belg., 14, 386–391.

* Авторы приносят благодарность сотруднику кафедры химической энзимологии А. С. Белоусову за составление программ при статистической обработке экспериментальных данных.

22. Moore S., Stein W. H. (1948) J. Biol. Chem., 176, 367—388.
23. Felix A. M., Terkelsen G. (1973) Arch. Biochem. and Biophys., 157, 177—182.
24. Felix A. M., Toome V., De Bernardo S., Weigle M. (1975) Arch. Biochem. and Biophys., 168, 601—608.
25. Udenfriend S., Stein S., Böhlen P., Dairman W., Leimgruber W., Weigle M. (1972) Science, 178, 871—872.
26. Stein S., Böhlen P., Stone J., Dairman W., Udenfriend S. (1973) Arch. Biochem. and Biophys., 155, 203—212.
27. Березин И. В., Клесов А. А. (1976) Практический курс химической и ферментативной кинетики, с. 20—22, Изд-во «Московский университет».

Поступила в редакцию
16.V.1977

**INTERACTION OF AMINO ACIDS WITH *o*-PHTHALALDEHYDE:
A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR QUANTIFYING THE REACTION
PRODUCT**

SHVYADAS V.-Y. K., GALAEV I. Y., BERESIN I. V.

M. V. Lomonosov State University, Moscow

A new method for assay of α -amino acids based on spectrophotometric registration of the products of their interaction with *o*-phthalaldehyde was developed. Optimal conditions for this reaction were found and the possibility of its application for quantifying almost all naturally occurring amino acids (except for proline and hydroxyproline) was demonstrated. The reproducibility of the method is $\pm 2\%$.
