



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 543.42.062:547.466.2:547.441

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД  
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФИРОВ АМИНОКИСЛОТ  
В СМЕСИ, СОДЕРЖАЩЕЙ СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Швядас В.-Ю. Б., Галаев И. Ю., Березин И. В.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Как было показано ранее [1], *о*-фталевый альдегид можно использовать для количественного определения аминокислот спектрофотометрическим методом. При исследовании рН-зависимости реакции было обнаружено, что с уменьшением рН среды молярный коэффициент экстинкции продукта взаимодействия аминокислоты с *о*-фталевым альдегидом и скорость взаимодействия уменьшаются, и было предположено, что это уменьшение связано с протонированием аминогруппы аминокислоты [1].

Представляло интерес исследовать взаимодействие *о*-фталевых альдегидов с соединениями, близкими по структуре к аминокислотам, но отличающимися значением рК аминогруппы, например, эфирами аминокислот. Если ухудшение взаимодействия *о*-фталевых альдегидов с аминокислотами при уменьшении рН среды действительно обусловлено протонированием аминогруппы, можно ожидать, что в определенных условиях (главным образом при подходящем значении рН среды) удастся определить с помощью *о*-фталевых альдегидов одно из таких соединений в присутствии другого, например эфир аминокислоты в присутствии свободной аминокислоты.

В качестве модельной системы была выбрана смесь триптофана и этилового эфира триптофана (отметим, что соответствующие значения рК аминогруппы в этом случае составляют 9,4 и 7,6).

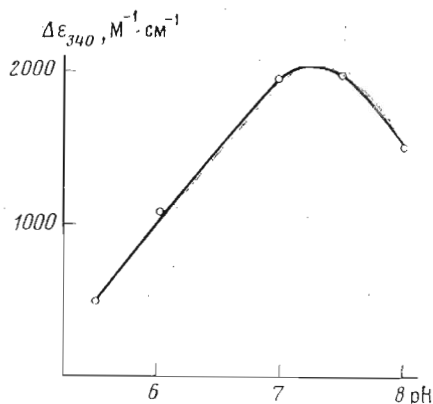
Было обнаружено, что в исследуемом интервале рН 5,5—8,0 молярный коэффициент экстинкции ( $\epsilon_{340}$ ) продукта взаимодействия *о*-фталевых альдегидов с этиловым эфиром триптофана больше соответствующего значения  $\epsilon_{340}$  для производного триптофана. На рисунке представлена зависимость разностного молярного коэффициента экстинкции этих продуктов.

Кинетические параметры реакции гидролиза этилового эфира *L*-триптофана, катализируемой  $\alpha$ -химотрипсином  
рН 5,0; 25°, 0,1 М КСI

Метод сложения	Кинетические параметры	
	$K_m$ , мМ	$k_{кат}$ , с <sup>-1</sup>
Титриметрический С использованием <i>о</i> -фталевых альдегидов	23±7	8±1
	17±3	9±1

Наличие ощутимого различия в поглощении (см. рисунок) позволяет при помощи *o*-фталевого альдегида определять эфир аминокислоты в смеси, содержащей свободную аминокислоту. Такой метод необходим, например, при слежении за гидролизом эфиров аминокислот со свободной аминогруппой\*.

С использованием вышеописанного метода были определены кинетические параметры реакции гидролиза этилового эфира триптофана, катализируемой  $\alpha$ -химотрипсином. Изучение кинетики ферментативной реакции проводили также титриметрическим методом. Результаты, полученные этими двумя методами, удовлетворительно согласуются между собой (см. таблицу).



Зависимость от pH разностного молярного коэффициента экстинкции (340 нм) для продуктов взаимодействия этилового эфира *L*-триптофана и *L*-триптофана с *o*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола

### Экспериментальная часть

$\alpha$ -Химотрипсин марки Б «Реахим». Этиловый эфир *L*-триптофана получен по методу [2]. Описание остальных реагентов дано в работе [1]. Стандартный реагент готовили следующим образом: к 12 мл 0,1 М фосфатного буфера прибавляли 0,5 мл этанольного раствора меркаптоэтанола (раствор получали при добавлении 5 мкл меркаптоэтанола к 1 мл этанола) и 0,5 мл этанольного раствора *o*-фталевого альдегида (концентрация 10 мг/мл). Измерение оптической плотности проводили при 340 нм через 20 мин после смешения 0,25 мл исследуемого раствора и 0,25 мл реагента на анализаторе скоростей реакций «Gemsac» (подробнее см. [1]). За гидролизом этилового эфира *L*-триптофана следили также с помощью самопишущего pH-ста (Radiometer TTT-1с, Дания), титруя щелочью (0,006 М КОН) образующуюся в реакции кислоту. Все эксперименты проводили при pH 5,0 в 0,1 М растворе KCl при температуре  $25 \pm 0,2^\circ$ . Объем ячейки составлял 5 мл.

При определении этилового эфира *L*-триптофана с помощью *o*-фталевого альдегида реакцию проводили следующим образом: из реакционной смеси (0,1 М фосфатно-ацетатный буфер, pH 5,0;  $25^\circ$ ) через 5 мин отбирали пробы по 15 мкл и добавляли их в 0,6 мл дистиллированной воды. Скорость ферментативной реакции при этом падала примерно в 1500 раз и за промежуток времени до определения концентрации этилового эфира *L*-триптофана (несколько часов) степень гидролиза в разбавленном растворе составляла менее 1%. В холостом опыте было показано также, что поглощением продукта взаимодействия *o*-фталевого альдегида с  $\alpha$ -химотрипсином в условиях эксперимента можно пренебречь.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Швядас В.-Ю. К., Галаев И. Ю., Березин И. В. (1978) Биоорг. химия, 4, 19—25.
2. Werbin H., Palm A. (1951) J. Amer. Chem. Soc., 73, 1382.

Поступило в редакцию  
12.VII.1977

\* Наиболее удобно вести определение эфира триптофана при pH 6,0, так как в этих условиях поглощение продукта взаимодействия триптофана с *o*-фталевым альдегидом гораздо меньше, чем в области максимального значения разностного молярного коэффициента экстинкции.

A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION  
OF AMINO ACID ESTERS IN MIXTURES WITH FREE AMINO ACIDS

SHVYADAS V.-J. K., GALAEV I. Y., BEREZIN I. V.

*M. V. Lomonosov State University, Moscow*

A new method for quantitative assay of amino acid esters in the presence of free amino acids has been developed. The method is based on spectrophotometric registration of the product of interaction between amino acid ester and *o*-phthalaldehyde in the presence of mercaptoethanol. The kinetic parameters of the  $\alpha$ -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of *L*-tryptophan ethyl ester were determined and found to be the same as those determined by titration.

---