

В. Л. КРЕТОВИЧ и А. А. БУНДЕЛЬ

### ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИКАРБОНОВЫХ АМИНОКИСЛОТ В РАСТЕНИИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 15 VI 1948)

Роль дикарбонových аминокислот в растении чрезвычайно велика. Из них образуются аспарагин и глютамин, они являются необходимым звеном при реакции ферментативного переаминирования и играют первостепенную роль при синтезе аминокислот (1, 2). Поэтому их количественное определение имеет весьма большое значение при изучении обмена растительной клетки. Между тем, применяемый в настоящее время метод определения дикарбонových аминокислот по Фореману весьма трудоемок и неточен.

Классические исследования М. Цвета (3) положили начало широчайшему применению хроматографического метода в органической и биологической химии. Виландом (4) было указано на возможность отделения дикарбонových аминокислот от других аминокислот путем обменной адсорбции на окиси алюминия. Далее Виланд применил этот принцип к исследованию белковых гидролизатов (5, 6).

Нами был разработан, применительно к растительным объектам, хроматографический метод определения суммы дикарбонových аминокислот. Принцип его заключается в пропускании водного экстракта из инактивированного кипящим этиловым спиртом растительного материала через колонку из  $Al_2O_3$ , обработанную слабой соляной кислотой, и последующем элюировании адсорбированных дикарбонových аминокислот раствором щелочи.

Стандартизованная по Брокманну окись алюминия имеет щелочную реакцию и не адсорбирует аминокислот из нейтрализованного раствора. При обработке же ее водным раствором соляной кислоты она становится аниотропной и способной связывать кислоты в виде солей. Соляная кислота, применявшаяся для предварительной обработки адсорбента, вытесняется дикарбонowymi аминокислотами. Нейтральные (кроме цистина) и основные аминокислоты проходят свободно через «кислую» колонку, в то время как аспарагиновая и глютаминовая кислоты при пропускании через такую колонку водных растворов и натриевых солей задерживаются окисью алюминия. Элюирование дикарбонových аминокислот из адсорбата производят слабым раствором калийной щелочи. Цистин, хотя и совершенно не обладает кислыми свойствами, но, повидимому, образует труднорастворимую алюминиевую соль.

Учет дикарбонových аминокислот в элюате может производиться различными способами. Виланд и Вирт (7) определяют их колориметрически по окрашиванию с нингидрином. Этот метод, однако, не точен. Шрамм и Примозиг (8) применили более точный микрометод Кьельдаля. Тот же способ был использован Дарлингом (9). Дарлинг, однако, совершенно не считается с возможностью адсорбции на колонке цисти-

на. Оказалось также, что применяемые им количества адсорбента недостаточны для адсорбции дикарбоновых аминокислот из растительных экстрактов. Первоначально нами было испытано определение дикарбоновых аминокислот в чистом растворе, содержавшем 2 мг глютаминовой кислоты и 4 мг аспарагиновой кислоты в 6 мл (0,38 мг азота аспарагиновой кислоты и 0,21 мг азота глютаминовой кислоты). В элюате из колонки, содержащей 2 г окиси алюминия, было обнаружено, за вычетом поправки на реактивы, 0,60 мг азота. Однако проверка «обнаруживаемости» дикарбоновых аминокислот, прибавленных к растительным экстрактам, показала, что 2 г окиси алюминия недостаточны, и поэтому во всех дальнейших опытах мы применяли 4 г адсорбента. С другой стороны, мы отказались от применявшегося Дарлингом осаждения белков трихлоруксусной кислотой, поскольку сильно кислая реакция вызывает гидролиз глютамина и образование свободной глютаминовой кислоты.

Опыты по выяснению «обнаруживаемости» дикарбоновых аминокислот, прибавленных к растительному материалу, проводились с корнем сахарной свеклы, проростками пшеницы и люпина, молодыми листьями фасоли и ивы. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты определения дикарбоновых аминокислот, прибавленных к вытяжкам из различных растительных объектов

	N дикарбоновых аминокислот в мг				
	корень св.клы	проростки пшеницы	проростки люпина	листья фасоли	листья ивы
Прибавлено к экстракту . . . . .	0,53	0,55	0,65	0,63	0,66
Обнаружено . . . . .	0,55	0,49	0,61	0,56	0,63

Ввиду значительного содержания в растениях глютамина и аспарагина нас интересовало поведение амидов при хроматографическом определении дикарбоновых аминокислот. При этом было установлено, что аспарагин совершенно не адсорбируется окисью алюминия и полностью уходит из колонки с промывными водами. Поскольку имеются указания о наличии в растениях свободного цистина<sup>(10)</sup> и поскольку цистин также задерживается колонкой из  $Al_2O_3$ , мы сочли необходимым ввести промывание адсорбированных колонкой веществ водой, насыщенной  $H_2S$ . При этом происходит восстановление цистина в цистеин, который, при последующем промывании водой полностью удаляется из колонки. Результаты промывания сероводородной водой колонки, через которую пропускался чистый раствор цистина, приведены в табл. 2.

Как показали наши опыты, промывание сероводородной водой не сказывается на способности дикарбоновых аминокислот к адсорбции. Так, получив вытяжку из фиксированных кипячением с этиловым спиртом молодых листочков ивы и прибавив к ней смесь глютаминовой и аспарагиновой кислоты с содержанием азота 0,66 мг, мы обнаружили после промывания колонки сероводородной водой и элюирования 0,68 мг азота дикарбоновых аминокислот. С другой стороны, мы испытывали влияние промывания сероводородной водой на адсорбированные из растительного экстракта, естественно присутствующие в нем дикарбоновые аминокислоты. Для этого вытяжка из проростков люпина

пропускалась через колонку из  $Al_2O_3$  и промывалась в одной пробе 100 мл чистой воды, насыщенной  $H_2S$ , и 50 мл чистой дистиллированной воды. В обоих случаях в 2 мл вытяжки было обнаружено 0,37 мг азота дикарбоновых аминокислот.

Таблица 2

Адсорбция цистина окисью алюминия при различных условиях промывания

Промывание	N цистина в мг		
	взято	найдено	
		в колонке	в промывных водах
Водой . . . . .	0,42	0,16	0,30
Сероводородной водой . . .	0,43	0,002	0,41

На основании вышеприведенных опытов мы остановились на следующей методике определения суммы дикарбоновых аминокислот.

Свежий растительный материал в количестве, соответствующем 2 г сухого вещества, инактивируется в фарфоровой чашке кипящим 96% этиловым спиртом в течение 5 мин., часть спирта при этом испаряется, а остаток его удаляют фёном. Сухой материал растирают в ступке, переносят количественно в ту же фарфоровую чашку, заливают 30 мл дистиллированной воды, хорошо размешивают и оставляют на 30 мин. при  $20^\circ$ . Отфильтровывают через бумажный фильтр на маленькой воронке Бюхнера. К определенному количеству фильтрата (обычно 2—4 мл) прибавляют каплю спиртового раствора фенолфталеина, нейтрализуют 0,05 N КОН до слабо розового окрашивания и переносят в адсорбционную трубку с окисью алюминия, приготовленной следующим образом. 4 г стандартизованной по Брокманну окиси алюминия обрабатываются 12 мл N HCl в течение 5 мин. при непрерывном встряхивании. Оставляют в покое на 10—15 мин., сливают мутную жидкость, прибавляют 40—50 мл дистиллированной воды, хорошо взбалтывают, дают осесть осадку, сливают; таким образом промывают декантацией до потери кислой реакции на лакмус. Приготовленные навески адсорбента оставляют в тех же колбочках, в которых велась их обработка, под слоем воды.

Для хроматографирования служит адсорбционная стеклянная трубка 50 см длиной и 7—8 мм внутреннего диаметра, с сужением на расстоянии 12 см от нижнего конца. На сужении располагают маленький кусочек гигроскопической ваты; трубка укрепляется в резиновой пробке в колбе Бунзена и зажимается в штативе. Приготовленный адсорбент во взмученном с водой состоянии помещают в трубку. Дают воде просочиться под влиянием силы тяжести или с небольшим разрежением, пока над поверхностью  $Al_2O_3$  не останется небольшого количества воды. Вносят в трубку испытуемый раствор и просасывают его через колонку со скоростью одной капли в 2 сек. (при всех операциях надо строго следить за тем, чтобы поверхность адсорбента была все время покрыта раствором). Промывают колонку 50 мл насыщенной  $H_2S$  дистиллированной воды и 50 мл обычной дистиллированной воды. При этом через адсорбционную колонку проходят все нейтральные аминокислоты в том числе и цистеин, образующийся из цистина при действии  $H_2S$ . Выливают промывные воды из приемника, споласкивают его. Для элюирования адсорбированных дикарбоновых аминокислот в адсорбционную трубку вносят 3 мл 3 N КОН и затем 30 мл

0,05 N КОН, которые просасываются в приемник. Жидкость из колонки отсасывают досуха. В приемнике находятся соли дикарбоновых аминокислот. Раствор количественно переносят в колбу Кьельдаля, определяют азот в микроаппарате Парнаса — Вагнера. Результаты выражают в миллиграммах азота дикарбоновых аминокислот на 1 г сухого вещества. Параллельно проводят контроль на реактивы в тех же точно условиях, только вместо экстракта вносят такое же количество воды.

Мы провели определение свободных дикарбоновых аминокислот, естественно присутствующих в экстрактах из растительного материала, и получили данные, представленные в табл. 3.

Таблица 3

Содержание свободных дикарбоновых аминокислот в растительном материале (в мг на 1 г сухого вещества)

Корень свеклы	Проростки		Листья	
	пшеница	люпин	фасоль	ива
0,69	2,76	5,5	7,85	0,75

Описанный нами метод отличается точностью, быстротой и не требует сложной аппаратуры. Он может быть также применен для определения дикарбоновых аминокислот в гидролизатах белков.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии Наук СССР

Поступило  
15 VI 1948

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. Браунштейн, Усп. совр. биохим., **1**, 40 (1947). <sup>2</sup> В. Кретович и А. Бундель, ДАН, **59**, № 9 (1947). <sup>3</sup> М. Цвет, Хромофиллы в растительном и животном мире, Варшава, 1910. <sup>4</sup> T. Wieland, Hoppe-Seyler's Z., **273**, 24 (1942). <sup>5</sup> T. Wieland, Naturwissenschaften, **30**, 333 (1942). <sup>6</sup> T. Wieland, Ber., **75**, 1001 (1942). <sup>7</sup> T. Wieland u. L. Wirth, Ber., **76**, 823 (1943). <sup>8</sup> G. Schramm u. J. Primosigh, Ber., **76**, 373 (1943). <sup>9</sup> S. Darling, Acta physiologica scandinavica, **10**, fasc. 1, 91 (1945). <sup>10</sup> C. Dent, W. Stepka and F. Steward, Nature, **160**, 682 (1947).