

В. Н. ОРЕХОВИЧ и А. А. ТУСТАНОВСКИЙ

**МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРЕИДОВ (ЦИТРУЛЛИНА И ДР.)  
И ТРИПТОФАНА В ЦЕЛЬНЫХ БЕЛКАХ**

(Представлено академиком А. Д. Сперанским 5 V 1949)

В течение последних 10 лет различные исследователи (1-3) безуспешно пытались доказать наличие уреидов и разработать метод определения этих соединений в белках. Хотя почти все авторы, принимавшие участие в этой работе, и наблюдали порозовение белков при нагревании их в крепкой кислоте в присутствии оксимов диацетила, они все же не смогли разгадать механизм и природу реакции. В конце концов, было высказано предположение, что диацетильная реакция с белками неспецифична для уреидов. Однако нам казалось, что такое заключение ошибочно и что необходимо продолжать работу по расшифровке этой загадочной реакции.

Мы начали нашу работу с выяснения вопроса о том, какие из известных  $\alpha$ -аминокислот дают цветную реакцию с диацетилмоноксидом. Оказалось, что из 20 аминокислот только 2 — триптофан и цитруллин — образуют в крепкой серной или соляной кислоте с диацетилмоноксидом цветные соединения и только желтого цвета. Смесь же всех 20 аминокислот в этих условиях окрашивается в розовый цвет. Пришлось предпринять длительную и трудоемкую работу по изучению различных комбинаций аминокислот. Удалось установить, в конце концов, что розовая или, вернее, пурпуровая окраска развивается только в тех случаях, когда в анализируемом растворе одновременно присутствуют триптофан и цитруллин либо иной уреид типа  $R-NH-CO-NH_2$ , причем триптофан и уреид реагируют в определенных молярных отношениях, так, например, 3 моля цитруллина связывают 1 моль триптофана. Растворы, в которых триптофан и цитруллин находятся в отношениях 1:3, окрашиваются в чистый пурпуровый цвет. При избытке триптофана развивается красно-желтая, оранжевая или желтая окраска, при недостатке — ослабленная пурпуровая, розовая или желтая окраска.

На основе этой реакции нами были разработаны титриметрические методы определения мочевины, цитруллина и других уреидов в тканях и жидкостях организма и, кроме того, микрометод определения триптофана и уреидов в цельных белках. Описанию этого последнего метода и посвящена настоящая статья.

1. Определение уреидов в белках, свободных от триптофана. Так как интенсивность окраски растворов увеличивается прямо пропорционально количеству триптофана и цитруллина, находящихся в данном растворе в определенных отношениях, то, имея в своем распоряжении белок, свободный от триптофана, мы можем не только с большой точностью определить по количеству добавлен-

ного триптофана содержание цитруллина в данном белке, но и получить стандарт, необходимый для определения триптофана в белках. В связи с тем, что разработанный нами метод очень чувствителен (можно определять меньше 1  $\gamma$  триптофана), необходимо приготовить белок, абсолютно свободный от цитруллина или от триптофана. Среди большого числа исследованных нами препаратов белков (кроме белков типа протаминов, не пригодных для стандарта) только проколлаген кожи 3-недельных цыплят не содержит даже следов триптофана. Этот белок, выделенный в кристаллической форме по методу, разработанному в нашей лаборатории (<sup>5</sup>, <sup>6</sup>), и был использован для стандарта.

### Техника определения.

А. Ориентировочный анализ. В 15—20-миллилитровую колбочку было внесено 10 мг сухого препарата проколлагена кожи цыплят, затем было добавлено 0,45 мл воды, далее 1,10 мл концентрированной фосфорной (орто) кислоты и, наконец, 0,1 мл 5% водного раствора диацетилмоноксима. Смесь нагревалась на кипящей водяной бане в продолжение 10 мин. Затем колбочка со смесью погружалась на 1 мин. в холодную воду и добавлялось 3,35 мл раствора нитрита натрия в концентрированной фосфорной кислоте (на 250 мл фосфорной кислоты 2,5 мл 0,18% раствора нитрита натрия). Через 1 мин. добавлялась 1 капля 0,18% раствора нитрита натрия. Смесь при этом оставалась бесцветной, что указывало на отсутствие триптофана в данном белке.

Б. Определение уреидов. В 4 эрленмейеровские колбочки вносилось по 10 мг белка, затем добавлялось: в колбочку № 1—0,15 мл, № 2—0,10 мл, № 3—0,05 мл и № 4—0,00 мл воды; во все колбочки — по 1,10 мл фосфорной кислоты, по 0,1 мл раствора диацетилмоноксима и, наконец, последовательно 0,30; 0,35; 0,40 и 0,45 мл М/4000 водного раствора триптофана. Смесь нагревалась 10 мин. на кипящей водяной бане и охлаждалась. В каждую колбочку добавлялось 3,35 мл смеси фосфорной кислоты и нитрита натрия и через 1 мин. — 1 капля 0,18% раствора нитрита натрия. В колбочке № 1 раствор окрасился в пурпурово-розовый цвет, в колбочке № 2 в интенсивно пурпуровый цвет и в колбочках №№ 3 и 4 в оранжевый и желтый. Так как наиболее интенсивная пурпуровая окраска развивается только в том случае, когда добавленный триптофан полностью связывает имеющийся в белке цитруллин, то для расчетов было принято во внимание содержание триптофана в колбе № 2. В эту колбочку мы добавили 18  $\gamma$  триптофана и, следовательно, в 10 мг проколлагена содержится (в белке цитруллин реагирует с триптофаном в отношениях 1:1)  $18 \times 0,86 = 15,5 \gamma$  цитруллина, что соответствует (с учетом влажности и золы) 0,18—0,20%.

В. Получение стандартной кривой при добавлении нарастающих количеств триптофана к проколлагену кожи цыплят. Навески проколлагена кожи цыплят в 10, 30, 50, 70 и 100 мг обрабатывались по методу, описанному выше, причем количества внесенного триптофана были оптимальными в отношении содержания цитруллина в каждой взятой навеске, т. е. 18, 53, 90, 126 и 180  $\gamma$ , соответственно. Интенсивность окраски растворов определялась с помощью абсорбциометра Спеккера (при желто-зеленом фильтре). Полученные результаты см. в табл. 1.

Как видно из приведенных данных, между количеством триптофана, связанного полностью цитруллином белка, и интенсивностью развивающейся окраски существует строгая линейная зависимость (0,01 шкалы абсорбциометра соответствует 2,1  $\gamma$  триптофана). Это послужило основанием использования проколлагена кожи цыплят в каче-

Таблица 1

Количество белка в мг	Количество цитруллина в навеске белка в $\gamma$ , связанного триптофаном	Количество добавленного триптофана в $\gamma$	Показания абсорбциометра
10	15	18	0,08
30	46	53	0,26
50	77	90	0,41
70	108	126	0,61
100	155	180	0,86

стве стандарта при определении и триптофана и цитруллина в белках одновременно.

2. Определение цитруллина и триптофана в белках, содержащих триптофан в больших количествах, чем это необходимо для полного связывания цитруллина. Если в используемом белке содержится более 1% триптофана, то целесообразнее брать в анализ не 10, а 5 мг белка. Констатировать „избыток“ триптофана в белке (наличный цитруллин способен связать только часть триптофана) следует по прописи, указанной в разделе „ориентировочный анализ“. В том случае, когда имеется небольшой избыток триптофана, разовьется желто-розовая окраска, а при значительном избытке — желто-зеленая с красноватым оттенком. В табл. 2 приводится схема анализа препарата казеина (белок был растворен в 0,1 N NaOH), концентрация белка 10 мг в 1 мл раствора.

Таблица 2

№№ колб	0,005 M раствор мочевины в мл	Фосфорная кислота в мл	Раствор дицетилона в мл	Раствор казеина в мл	Смесь фосфорной кислоты и нитрита натрия в мл	Окраска раствора
1	0,05	1,30	0,1	0,5	3,10	Розовая с фиолетовым оттенком
2	0,08	1,36	0,1	0,5	2,95	Пурпуровая
3	0,10	1,40	0,1	0,5	2,90	Интенсивно пурпуровая
4	0,15	1,50	0,1	0,5	2,75	
5	0,20	1,60	0,1	0,5	2,60	Оранжевая

Наиболее интенсивная пурпуровая окраска развилась в колбочке № 3. С помощью абсорбциометра Спеккера мы установили, что интенсивность поглощения равна 0,268, что соответствует 56,3  $\gamma$  триптофана. Учитывая влажность и зольность препарата, находим, что исследуемый казеин содержит 1,26% триптофана. При определении другими методами (4) найдено 1,2%. Определив содержание триптофана, легко высчитать и содержание цитруллина. В колбочку № 3 было добавлено 0,1 мл 0,005 M растворов мочевины, или 30  $\gamma$  мочевины. Мочевина реагирует с триптофаном в отношении 4:1 и, следовательно, этим количеством мочевины можно связать  $30 \times 0,85$ , или 25,5  $\gamma$  триптофана. Так как триптофана во взятой пробе содержится 56,3  $\gamma$ , то цитруллином, имеющимся в белке, связывается  $56,3 - 25,5 = 30,8 \gamma$  триптофана. Отсюда находим количество цитруллина в пробе  $30,8 \times 0,86 = 26,5 \gamma$ . В 100 г белка (с учетом золы и влажности) 0,57% цитруллина. Расчет ведется по формуле  $X = (T - M \times 0,85) \times 0,86$ , где  $T$  — количество триптофана в пробе;  $M \times 0,85$  — количество триптофана,

связанного добавленной мочевиной ( $M$ ), а 0,85 и 0,86—коэффициенты, выражающие молярные отношения мочевины и цитруллина, соответственно, в реакции с триптофаном.

3. Определение уреидов триптофана в белках, содержащих триптофана меньше, чем это необходимо для связывания имеющегося в белке цитруллина. Ход анализа тот же, что и в случае, описанном выше. Выяснив предварительно вопрос о „недостатке“ или „избытке“ триптофана, переходим к анализу. Приводим в табл. 3 схему анализа проколлагена кожи крысы.

Таблица 3

№№ колб	Взято проколлагена в мг	Добавлено воды в мл	Добавлено фосфорной кислоты в мл	Добавлено дицилм-оксида в мл	Добавлено $M/400$ раствора триптофана в мл	Добавлено фосфорнитритной смеси в мл	Показание по спектру	Окраска
1	10	0,2	1,0	0,1	0,20	3,50	0,067	Розовая с фиолетовым оттенком
2	10	0,15	1,0	0,1	0,25	3,50	0,070	То же
3	10	0,10	1,0	0,1	0,30	3,50	0,078	»
4	10	0,05	1,0	0,1	0,35	3,50	0,09	Пурпуровая
5	10	—	1,0	0,1	0,40	3,50	0,07	Красно-желтая

В колбочке № 4 развилась наиболее яркая пурпуровая окраска. Интенсивность поглощения равна 0,09, что соответствует  $19\gamma$  триптофана. Добавлено было  $18\gamma$  триптофана, следовательно, в 10 мг белка содержалось  $19-18=1\gamma$  триптофана, или 10 мг % (наличие таких малых количеств триптофана в белке объясняется присутствием в этом препарате неотделимых примесей). Цитруллина в белке:  $19 \times 0,86 = 16\gamma$ , или 0,18% (с учетом золы и влажности). Формула расчета для триптофана, содержащегося в пробе, принимает простой вид:  $X = T - T_1$ , где  $T$  — количество триптофана, содержащегося в анализируемой смеси, а  $T_1$  — количество добавленного триптофана в  $\gamma$ . Формула для расчета содержания цитруллина в пробе:  $X = T \times 0,86$ .

Все приведенные в данной статье расчеты сделаны нами для цитруллина. Однако у нас нет пока достаточных оснований утверждать, что из уреидов только цитруллин может входить в состав белков. Необходимо учесть также, что мы определяли только те соединения, уреидные группы которых освобождаются в условиях реакции. В процессе гидролиза белков в определенных условиях уреидные группы освобождаются дополнительно. Пользуясь предложенным методом, нам удалось количественно определить содержание уреидов в 26 из 30 обследованных животных, растительных и бактериальных препаратов белков. В 4 белковых препаратах не удалось обнаружить уреидов.

Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
4 IV 1949

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> W. R. Fearon, Biochem. Journ., 33, 902 (1939). <sup>2</sup> A. G. Gornall and A. Hunter, ibid., 35, 650 (1941). <sup>3</sup> R. M. Archibald, Journ. Biol. Chem., 156, 121 (1944). <sup>4</sup> M. J. Hoop and D. B. Jones, ibid., 157, 153 (1945). <sup>5</sup> А. А. Тустановский, Биохимия, 12, 286 (1947). <sup>6</sup> В. Н. Орехович, А. А. Тустановский, К. Д. Орехович и Н. Е. Плотникова, там же, 13, 55 (1948).