

С. Р. МАРДАШЕВ и Л. А. СЕМИНА

ПРЕПАРАТИВНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО АСПАРАГИНА ИЗ ПЕЧЕНИ

(Представлено академиком А. Д. Сперанским 29 IV 1950)

Обнаружение авторами настоящей работы⁽¹⁾ аспарагина в объектах животного происхождения показало, что это вещество является нормальной составной частью животного организма. Вслед за этим С. Р. Мардашев и В. В. Мамаева⁽²⁾ при помощи разработанного ими метода количественно определили содержание аспарагина в печени и почках кролика.

Однако в экспериментальных доказательствах, приведенных нами, отсутствовало весьма важное заключительное звено, а именно, препаративное выделение аспарагина, который был обнаружен хроматографическим анализом. Это и побудило нас предпринять работу по выделению аспарагина в кристаллическом виде из объектов животного происхождения.

Материалом для выделения аспарагина служила свежая печень крупного рогатого скота. Для выделения аспарагина мы воспользовались методическими приемами, примененными Дамодараном⁽³⁾ и Уссингом⁽⁴⁾, внося в них ряд изменений.

3 кг печени, освобожденной от соединительной ткани, измельчалось в гомогенизаторе с 2,5 л дистиллированной воды в течение 3 минут при комнатной температуре. Белки осаждались прибавлением к гомогенату 1,2 л 20% трихлоруксусной кислоты. Полнота осаждения белков проверялась. Осадок белка отделялся на бюкнеровской воронке и промывался 4 л дистиллированной воды, подогретой до 40°. Для этого осадок небольшими порциями растирался в ступке с водою. Промывные воды прибавлялись к фильтрату. Всего было получено 8 л такого раствора. Трихлоруксусная кислота удалялась из раствора многократной экстракцией эфиром в делительной воронке при энергичном взбалтывании. Экстракция продолжалась до слабо кислой реакции раствора на лакмус. При этом раствор попутно освобождался также от жира и других веществ, растворимых в эфире. Затем раствор концентрировался в 10 раз упариванием его в вакууме при 40°. При этом выпадал небольшой осадок белка, который удалялся центрифугированием.

Удаление основных аминокислот и пептидов. Охлажденный до 0° прозрачный центрифугат подкислялся в H_2SO_4 (5% по объему) и к нему прибавлялся до полноты осаждения 20% раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты в 5% H_2SO_4 . Осадок отцентрифугировался, промывался два раза небольшим количеством раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты. Промывные воды присоединялись к центрифугату и избыток фосфорно-вольфрамовой кислоты в растворе удалялся кристаллическим $Ba(OH)_2$.

Осадок фосфорно-вольфрамата бария отделялся в центрифуге. К прозрачному центрифугату добавлялся раствор H_2SO_4 до полного удаления $Ba(OH)_2$ при нейтральной или слабо кислой реакции. Сернокислый барий удалялся центрифугированием и промывался дистиллированной водой. Центрифугат и промывные воды упаривались под вакуумом при 40° до 400 мл. Если фосфорно-вольфрамовая кислота не была удалена полностью, то она вновь осаждалась $Ba(OH)_2$ и после удаления избытка $Ba(OH)_2$ серной кислотой раствор упаривался, как указано выше.

Удаление свободных дикарбоновых аминокислот. К 400 мл полученного раствора, освобожденного от гексоновых оснований и пептидов, добавлялся насыщенный раствор $Ba(OH)_2$ до резко щелочной реакции на лакмус. Затем прибавлялось 3 объема 96° этилового

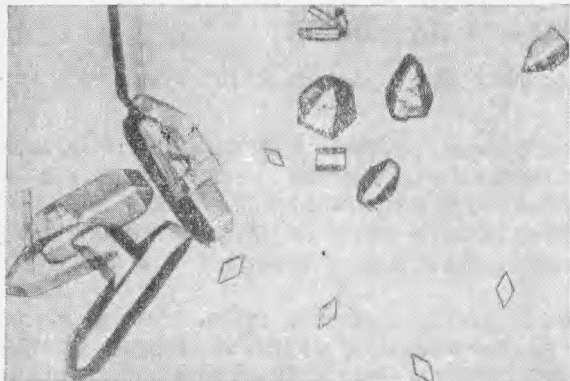


Рис. 1. Кристаллы аспарагина, выделенного из печени

спирта и раствор оставлялся на 2 часа при комнатной температуре. После этого выпавший осадок бариевых солей дикарбоновых аминокислот удалялся центрифугированием, промывался два раза 96° этиловым спиртом, который присоединялся после центрифугирования к основному центрифугату. Раствор нейтрализовался серной кислотой до pH 7,0, с последующим удалением и промыванием $BaSO_4$, после чего центрифугат упаривался в вакууме при 40° до 300 мл.

Дробная кристаллизация и выделение аспарагина. К 300 мл раствора по каплям добавлялся 25% раствор уксуснокислой окиси ртути. При этом выпадал осадок и реакция раствора на лакмус была резко кислая. Осадок отцентрифугировался, промывался 3 раза небольшим количеством дистиллированной воды (осадок 1). К центрифугату добавлялся по каплям 10% раствор $NaOH$ и уксуснокислая ртуть так, чтобы реакция среды была слабо кислой. Выпавший при этом осадок так же отделялся центрифугированием и промыванием, как и в первом случае (осадок 2).

Эти два осадка обрабатывались в дальнейшем порознь, причем 1-го по объему было в 3 раза больше, чем 2-го. Осадки размешивались с дистиллированной водой и разрушались током H_2S . Осадок сернистой ртути удалялся фильтрованием и промывался дистиллированной водой на фильтре. Избыток H_2S удалялся из фильтрата просасыванием воздуха, затем добавлялся NH_3 до нейтральной реакции на лакмус.

После этого фильтрат упаривался в вакууме при 40° до тех пор, пока не начинали выпадать кристаллы. Тогда отгонка прекращалась и растворы, соответствующие осадку 1 или 2, оставлялись на холоде. На следующий день в обоих растворах выпали кристаллы, характерные для тирозина, причем в растворе осадка 2 его было очень немного. Тирозин был удален фильтрованием через стеклянный фильтр G_3 , а фильтраты оставлены на холоде для дальнейшей кристаллизации. При стоянии на холоде из этих растворов стали выпадать кристаллы загрязненного лейцина. Они также отделялись фильтрованием.

Фильтраты вновь были оставлены на холоде; по консистенции они

напоминали сироп. Количество их равнялось: для раствора из 1 осадка 3 мл, для раствора из 2 осадка 1 мл.

После нескольких дней нахождения этих растворов на холоде кристаллизации не наблюдалось. Тогда к 1 мл 2-го раствора (осадок 2) в пробирке было добавлено 4 мл 96° этилового спирта, все подогрето на водяной бане до растворения и оставлено на холоде до следующего дня. На следующий день в пробирке образовалось два слоя и крупные кристаллы, плотно приставшие к стенкам пробирки. Пипеткой осторожно был снят верхний спиртовой слой, кристаллы остались на стенках, а густая масса (объемом в 0,3 мл) капилляром была перенесена в маленький стаканчик и оставлена на холоде.

Через сутки вся эта масса закристаллизовалась и под микроскопом были видны кристаллы самой разнообразной формы. К этой массе кристаллов было добавлено несколько капель 50% этилового спирта при комнатной температуре. Часть кристаллов при этом растворилась, а другая часть осела на дно. Жидкость с кристаллов была снята капилляром, кристаллы еще два раза промыты холодным 50% этиловым спиртом, а затем растворены в горячем 50% этиловом спирте, после охлаждения которого на дно стаканчика выпали тяжелые кристаллы. При исследовании этих кристаллов под микроскопом выяснилось, что они имеют характерную для аспарагина форму, по преимуществу ромбическую, а иногда неправильную (см. рис. 1).

Кристаллы были отделены от маточного спиртового раствора, промыты эфиром и высушены в вакуум-эксикаторе над парафином. Выход 7 мг.

Хроматографический анализ показал, что окрашенное пятно на фильтровальной бумаге после нанесения раствора этих кристаллов действительно соответствует пятну аспарагина (см. табл. 1 и рис. 2).

Определение общего азота по Кьельдалю и температуры плавления в препарате выделенного нами кристаллического аспарагина дало следующие результаты:

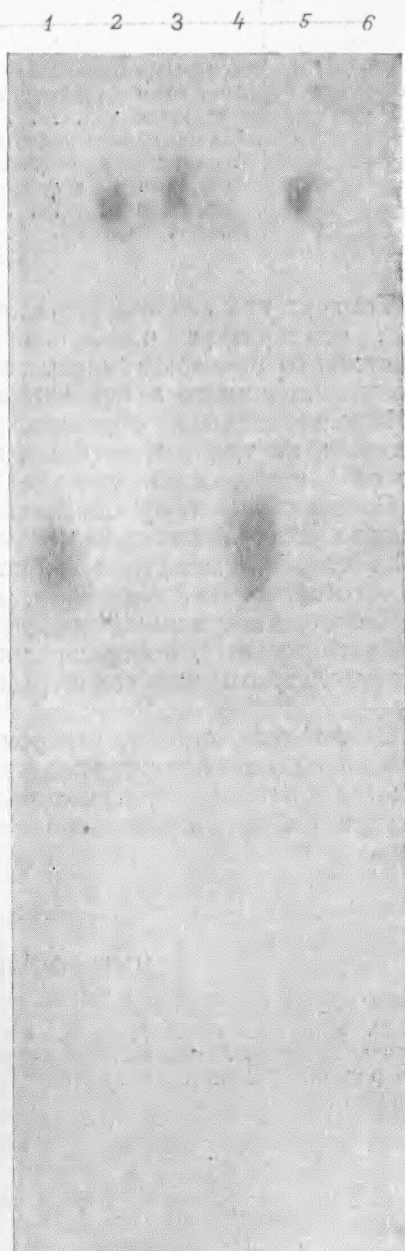


Рис. 2. Хроматограмма: 1 — продажный аспарагин, 2 — продажный аспарагин + аспарагиназа (*B. cadaveris*, pH 8,0), 3 — аспарагиновая кислота, 4 — аспарагин из печени, 5 — аспарагин из печени, + аспарагиназа, 6 — аспарагиназа

Найдено %: N 18,40
 $C_4H_8O_2N_2 \cdot H_2O$. Вычислено %: N 18,66

Таблица 1

№№ на хрома- тограмме	Растворитель фенол + NH ₃	A	B	R _F
1	Аспарагин продажный	16,5	38,7	0,42
2	Аспарагин продажный + ас- парагиназа	5,0	38,7	0,13
3	Аспароголиновая кислота . . .	4,5	38,9	0,12
4	Аспарагин из печени	16,0	39,0	0,41
5	Аспарагин из печени + ас- парагиназа	4,7	39,0	0,12
6	Аспарагиназа	0	0	0

Температура плавления (разложения) выделенного аспарагина 228—230°; температура плавления многократно перекристаллизованного продажного препарата аспарагина 227—229°; температура плавления смеси выделенного и продажного препаратов аспаргина 228—230°.

При дальнейшей обработке 1-го раствора кристаллов аспарагина выделить не удалось, хотя анализ раствора на хроматограмме показал, что он там имеется в довольно большом количестве.

Совокупность полученных нами данных, опубликованных ранее (^{1,2}), а также сообщенных в настоящей работе, не оставляет никаких сомнений в том, что аспарагин является нормальной составной частью животного организма.

В свете этих данных* выделение аспарагина из гемолимфы личинок майского жука (⁴) потеряло „уникальное“ значение и является только доказательством широкого распространения аспарагина в животном мире.

Несомненно, однако, что обнаружение аспарагина в объектах животного происхождения представляет огромный интерес для сравнительной биохимии и сравнительной физиологии (⁵). Главная задача состоит сейчас в том, чтобы выяснить роль аспарагина в животном мире.

Поступило
27 IV 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. Р. Мардашев и Л. А. Семина, *Вопр. мед. химии*, **1**, 67 (1949).
² С. Р. Мардашев и В. В. Мамаева, *Биохимия*, **15** (1950). ³ N. M. Damodaran, *Biochem. Journ.*, **26**, 235 (1934). ⁴ H. Ussing, *Nature*, **155**, 481 (1945); *Acta physiol. scandinav.*, **11**, 61 (1946). ⁵ X. С. Коштойац, *Усп. совр. биол.*, **21**, 289 (1946).