

В. Л. КРЕТОВИЧ и А. А. БУНДЕЛЬ

## РАЗДЕЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСПАРАГИНОВОЙ И ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

(Представлено академиком А. И. Опариным 4 V 1950)

В связи с работами по белковому обмену растений мы столкнулись с необходимостью определения дикарбоновых аминокислот, являющихся одними из важнейших метаболитов как в животном, так и в растительном организме. Поскольку существующие методы определения дикарбоновых аминокислот громоздки и не отличаются большой точностью, а также мало пригодны для серийных определений, мы разработали и применили для этой цели хроматографический микрометод обменной адсорбции дикарбоновых аминокислот на аниотропной окиси алюминия <sup>(1)</sup>. Этот метод дает возможность с небольшой затратой времени и весьма точно суммарно определять азот дикарбоновых аминокислот.

Однако суммарное определение дикарбоновых аминокислот недостаточно при исследовании целого ряда вопросов азотистого обмена. Еще до сего времени распространен взгляд, согласно которому роль аспарагиновой и глутаминовой кислот и их амидов в обмене растений одинакова. Это в значительной мере объясняется отсутствием удобных и точных методов раздельного определения как дикарбоновых аминокислот, так и амидов. Однако в настоящее время имеются указания, что обе эти аминокислоты и их амиды значительно отличаются по своей роли в белковом обмене и дыхании тканей. Так например, ранее нами показано существенное различие скорости переаминирования аспарагиновой и глутаминовой кислот в растительных тканях <sup>(2)</sup>. В нашей лаборатории также установлено, что глутаминовая кислота гораздо быстрее подвергается окислению гомогенизированными проростками, чем аспарагиновая <sup>(3)</sup>.

Показано, наконец, что глутаминовая и аспарагиновая кислоты совершенно по-разному используются в процессе синтеза соответствующих амидов в живых растительных тканях <sup>(4)</sup>.

В связи со всеми этими фактами возникает настоятельная потребность в методе раздельного определения аспарагиновой и глутаминовой кислот. До последнего времени не существовало простого, быстрого и точного метода их раздельного определения, пригодного для проведения серийных анализов. Изящный метод определения аспарагиновой и глутаминовой кислот в животных тканях предложен недавно С. Мардашевым и В. Мамаевой <sup>(5)</sup>. Эти авторы использовали для отделения дикарбоновых аминокислот от амидов разработанный нами хроматографический метод, при котором аспарагин и глутамин совершенно не поглощаются окисью алюминия и полностью уходят из колонки с промывными водами.

Однако, метод Мардашева и Мамедовой требует для своего осуществления наличия аппарата Варбурга и препаратов специфических бактериальных декарбоксилаз. Манометрический метод определения аспарагиновой кислоты, предложенный А. Браунштейном, В. Немчинской и Г. Вилениной<sup>(6)</sup>, достаточно точен, но также требует наличия препаратов сукциноксидазы, аппарата Варбурга, весьма большого количества последовательных операций и не сопровождается параллельным определением глутаминовой кислоты в той же пробе.

Мы использовали для раздельного определения аспарагиновой и глутаминовой кислот принцип хроматографического метода, примененного нами в работе<sup>(1)</sup>. Отличие от предыдущей методики заключается в применении для последовательного раздельного элюирования глутаминовой и аспарагиновой кислот соответствующих элюирующих растворов. Адсорбированная на окиси алюминия глутаминовая кислота при элюировании кислотой быстрее передвигается по колонке, чем аспарагиновая. При применении в качестве элюирующего раствора соответствующего количества 0,5 *N* уксусной кислоты, глутаминовая кислота элюируется полностью, в то время как аспарагиновая кислота передвигается при этом книзу на незначительное расстояние. После надлежащего промывания водой аспарагиновая кислота легко элюируется раствором щелочи.

Предлагаемая нами методика раздельного определения аспарагиновой и глутаминовой кислот сводится к следующему.

Отдельные пробы свежего растительного материала, соответствующие приблизительно 1 г сухого вещества, фиксируются в фарфоровых чашках кипящим 96% этиловым спиртом. Дальнейшая обработка пробы и получение из нее экстракта производят так, как это описано в нашей работе<sup>(1)</sup>. Там же описано приготовление аниотропной окиси алюминия. Однако для раздельного определения берут большее количество сухого порошка окиси алюминия (10 г), которое обрабатывается 30 мл 6 *N* HCl с последующим отмыванием ее до pH 2,5—2,7.

В наших опытах мы пользовались безводной окисью алюминия, стандартизованной по Брокману\*. Различные образцы адсорбента могут сильно различаться по своей способности к обменной адсорбции из водных растворов. Поэтому при работе с новыми образцами Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> следует проверять их адсорбционную активность. Рауэн и Вольф<sup>(7)</sup> предложили обозначать активность препаратов Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> следующим образом: препарат имеет одну единицу активности, если 1 г сухого адсорбента связывает 1 мг глутаминовой кислоты.

Согласно указаниям этих авторов, можно повысить адсорбционную активность Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в 2,7—3,4 раза путем нагревания ее с хлористым алюминием; наибольшая активность получается при нагревании 30 г Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с 25 г AlCl<sub>3</sub> в течение 24 час. при 700°.

Для хроматографирования берется стеклянная трубка 60 см длины и 8—10 мм внутреннего диаметра. Температурный оптимум для адсорбции дикарбоновых аминокислот лежит при 16—18°. 2—4 мл полученной из испытуемого материала и нейтрализованной вытяжки<sup>(1)</sup> вносят в адсорбционную трубку с адсорбентом и просасывают через колонку. Когда над поверхностью окиси алюминия остается столбик жидкости высотой 2—3 мм, начинают промывание колонки 50 мл дистиллированной воды, насыщенной сероводородом, и затем 50 мл обычной дистиллированной воды. Выливают из приемника промывные воды, споласкивают, вновь присоединяют его к колонке и элюируют адсорбированную

\* В последующих опытах мы применили для адсорбции отечественную безводную окись алюминия марки «Главхимреактив, Сталинский завод химреактивов», просеянную через тонкое шелковое сито. Этот препарат обрабатывался так же как и окись алюминия, стандартизованная по Брокману.

глутаминовую кислоту промыванием колонки 55 мл 0,5 *N* уксусной кислоты и затем 20 мл дистиллированной воды. При промывании, а также при отъединении приемника необходимо следить, чтобы поверхность адсорбента все время была покрыта жидкостью. Переносят количественно элюат, содержащий глутаминовую кислоту, в колбу для сжигания. Вновь присоединяют приемник к той же адсорбционной колонке и элюируют аспарагиновую кислоту 5 мл 3 *N* КОН и затем 40 мл 0,05 *N* КОН; отсасывают жидкость из колонки досуха. Этот элюат, содержащий аспарагиновую кислоту, также количественно переносят в колбу для сжигания, прибавляют ускоритель (смесь  $K_2SO_4$  и  $CuSO_4$ ), 3 мл серной кислоты (уд. вес 1,84) и после сжигания определяют обычным путем раздельно азот аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты в микроприборе для отгонки аммиака.

Необходимо проводить контрольные определения на содержание азота в применяемых для элюирования реактивах и воде. Для того чтобы учесть и то количество азота, которое при данных условиях может вымываться из окиси алюминия, пропускают элюирующие растворы и воду через трубку, вновь заполненную тем же количеством адсорбента (55 мл 0,5 *N* уксусной кислоты и 20 мл воды и отдельно 5 мл 3 *N* КОН и 40 мл 0,05 *N* КОН). Перед пропусканием элюирующих растворов адсорбент в трубке промывается так же, как и в опыте, 50 мл сероводородной воды и 50 мл дистиллированной воды, причем эти промывные воды отбрасываются. Эти две поправки вычитаются соответственно из данных по содержанию азота аспарагиновой и глутаминовой кислот, которые затем перечисляются на 1 г сухого вещества. Умножая это количество мг азота на 9,5, получают содержание аспарагиновой кислоты и на 10 505 глутаминовой кислоты в мг на 1 г сухого вещества.

Пользуясь этой методикой, мы исследовали содержание свободной аспарагиновой и глутаминовой кислот, присутствующих в растительном материале. Для этого были взяты 4-дневные этиолированные проростки люпина и молодые растеньица пшеницы, выросшие на свету (стебельки и листочки). Полученные данные приведены в табл. 1.

Таблица 1

Содержание свободных аспарагиновой и глутаминовой кислот в растительном материале

Исследованный материал	Аспарагиновая кислота		Глутаминовая кислота	
	в мг на 1 г сухого вещества			
	азот	кислота	азот	кислота
Этиолированные проростки люпина . . . . .	2,71	25,75	2,00	21,01
Листья и стебли пшеницы . . .	2,57	24,49	3,20	33,62

Из табл. 1 видно, что как аспарагиновая, так и глутаминовая кислоты присутствуют в энергично развивающихся тканях почти в одинаковых, довольно значительных количествах, причем в проростках люпина их количества одинаковы, а в молодых растеньицах пшеницы преобладает глутаминовая кислота. Чрезвычайно интересно то обстоятельство, что этиолированные проростки люпина, в которых накапливаются очень большие количества аспарагина и практически отсутствует глутамин, содержат все же значительное количество глутаминовой кислоты. Это еще раз указывает на то, что глутаминовая кислота играет особенно важную роль в белковом обмене. Поскольку она подвергается особенно

быстрым превращениям, она не успевает накапливаться в заметных количествах в виде глутамина.

Наши анализы также показали, что суммированное количество азота, полученное при раздельном определении аспарагиновой и глутаминовой кислот, совпадает с количеством их азота, суммарно определенным в тех же вытяжках.

Далее, воспользовавшись вытяжками из тех же объектов, мы провели опыты по «обнаруживаемости» прибавленных к этим вытяжкам аспарагиновой и глутаминовой кислот. Из полученных в этих определениях результатов вычитались соответственные данные для естественно присутствующих в вытяжках аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также поправки на реактивы. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Раздельное определение аспарагиновой и глутаминовой кислот, прибавленных к вытяжкам

	Этилированные проростки люпина				Листья и стебли пшеницы			
	Аспарагиновая кислота		Глутаминовая кислота		Аспарагиновая кислота		Глутаминовая кислота	
	в миллиграммах							
	азот	кислота	азот	кислота	азот	кислота	азот	кислота
Прибавлено к 2 мл вытяжки	0,421	4,00	0,19	2,00	0,421	4,00	0,19	2,00
Обнаружено . . . . .	0,400	3,80	0,20	2,10	0,450	4,27	0,18	1,89
Ошибка в % от количества прибавленной аминокислоты	-4,97		+5,26		+6,89		-5,26	

Как видно из табл. 2, ошибка определения равна приблизительно 5% при содержании азота той или иной дикарбоновой аминокислоты меньше 0,5 мг во взятой для адсорбции пробе. При работе с большими количествами процент ошибки может быть значительно уменьшен. Следует отметить, что в условиях данной методики можно количественно разделить до 10 мг глутаминовой и 10 мг аспарагиновой кислоты.

Предлагаемый нами метод раздельного количественного определения дикарбоновых аминокислот может оказаться весьма полезным при изучении азотистого обмена растений и исследовании соответствующих ферментных систем.

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

Поступило  
14 IV 1950

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. Кретович и А. Бундель, ДАН, 61, 861 (1948).
- <sup>2</sup> В. Кретович и А. Бундель, ДАН, 66, 901 (1949).
- <sup>3</sup> В. Кретович и Т. Дроздова, ДАН, 63, 167 (1948).
- <sup>4</sup> В. Кретович и З. Евстигнеева, ДАН, 66, 429 (1949).
- <sup>5</sup> С. Мардашев и В. Мамаева, Доклад в Менделеевском обществе, 23 II 1950.
- <sup>6</sup> А. Браунштейн, В. Немчинская и Г. Виленкина, Биохимия, 11, 501 (1946).
- <sup>7</sup> H. Raue и L. Wolf, Hoppe-Seyler's Zs., 283, 233 (1949).