

14.2

## Спектрофотометрическое определение концентрации L-лизина в водно-органических растворах

© Ю.А. Нащекина,<sup>1,2</sup> К.Е. Курдюкова,<sup>3</sup> И.М. Зорин,<sup>3</sup> Н.А. Михайлова,<sup>1</sup> А.Ю. Билибин<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН,  
194064 Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,  
194021 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии,  
198504 Санкт-Петербург, Россия  
e-mail: yuliya.shved@gmail.com

(Поступило в Редакцию 18 января 2018 г.)

Изучены условия спектрофотометрического определения L-лизина при реакции с нингидрином в водном растворе диметилсульфоксида. В результате спектрофотометрических исследований раствора L-лизина и нингидрина было выявлено два максимума поглощения при длинах волн 420 и 500 nm. Показано, что pH реакционной среды оказывает влияние на интенсивность окраски образующегося продукта реакции. Наиболее стабильные продукты нингидриновой реакции образованы при pH 8–9. Соотношение фаз в водно-органическом растворе практически не влияет на значение оптической плотности. При изучении спектров поглощения продуктов реакции производных L-лизина — N<sup>α</sup>-вос-лизина и N<sup>ε</sup>-z-лизина с нингидрином показано, что в нингидриновую реакцию вступает α-аминогруппа.

DOI: 10.21883/JTF.2018.09.46425.31-18

Многие современные лекарственные препараты содержат в своем составе аминокислоты [1–4]. Количественное изменение содержания α-аминокислот в таких биологических жидкостях как сыворотка, плазма крови или моча свидетельствуют о заболеваниях почек или печени [5]. Одна из важных аминокислот в организме человека — L-лизин, которая играет важную роль в организме, в том числе в процессах кроветворения, обмене кальция и мышечной деятельности. Недостаток лизина в организме может привести к повреждению сосудов глаз, выпадению волос, анемии, развитию усталости и т. д.

Для анализа содержания аминокислот, в том числе и лизина, широко используют фотометрические методы, основанные на реакции с нингидрином [6]. Установлено, что нингидрин специфичен к алифатическим или алициклическим первичным аминогруппам. Вторичные, третичные и четвертичные амины, амиды и аминозамещенные ароматические соединения дают слабую реакцию или не дают вовсе [7].

Показано, что для большинства α-аминокислот при взаимодействии с нингидрином образуют комплексы, которые имеют пурпурную окраску или окраску Румана (по имени открывшего ее ученого). Соединения α-аминокислот и нингидрина мало растворимы в воде и растворимы в органических растворителях — диметилсульфоксиде (ДМСО), метилцелозольве и ацетоне.

Нингидриновый метод анализа очень чувствителен к любым факторам, поэтому для каждого объекта требуется оптимизация условий определения точного содержания аминокислоты.

Из литературных данных известно, что наиболее высокие и стабильные значения оптической плотности

наблюдали во время проведения нингидриновой реакции с аминокислотами при температуре 100°C в течение 15 min. Более длительное нагревание приводит к разложению продуктов реакции со значительным снижением оптической плотности. При нагревании реакционной смеси менее 15 min значения оптической плотности в первые несколько минут незначительно возрастают, а затем наблюдается их резкое снижение [8]. Помимо температуры и времени проведения реакции на стабильность окрашенного комплекса исследуемой аминокислоты и нингидрина может влиять состав реакционной среды и ее pH.

Так, например, наиболее часто в хроматографических методах анализа лизина используют 0.2%-й раствор нингидрина в ацетоне, а саму реакцию проводят в водной среде. Помимо ацетона, для количественного определения аминокислот с помощью аминокислотных анализаторов в качестве растворителя используют ДМСО [9]. По сравнению с ацетоном ДМСО имеет ряд преимуществ: данный растворитель нелетучий, имеет невысокую токсичность, взрыво- и пожаробезопасен, что обеспечивает удобство его использования.

Несмотря на то что нингидриновая реакция с аминокислотами уже давно исследуется, механизм взаимодействия L-лизина, который имеет в своем составе две реакционно-активные аминогруппы в α- и ε-положениях, не известен [10].

Цель настоящей работы — поиск оптимальных условий спектрофотометрического определения L-лизина с помощью нингидринового реагента в водном растворе ДМСО, а также исследование взаимного влияния аминокислот L-лизина на нингидриновую реакцию.

## Экспериментальная часть

К 2.5 ml водного раствора L-лизина (Sigma, США) в концентрации 2 g/l добавляли 0.5 ml свежеприготовленного 0.2%-го раствора нингидрина (Sigma, США) в ДМСО (Sigma, США) и нагревали в течение 15 min при температуре 100°C. После полного охлаждения продукт нингидриновой реакции разбавляли водой до получения значений оптической плотности максимумов поглощения от 0.2 до 1.1. В качестве раствора сравнения использовали воду, к которой добавляли раствора нингидрина в ДМСО. Для оценки взаимного влияния аминогрупп в L-лизине проводили спектрофотометрические измерения производных L-лизина — N<sup>α</sup>-вос-лизина и N<sup>ε</sup>-Z-лизина (Sigma, США). Измерение оптической плотности анализируемых растворов проводили на спектрофотометре UV-1700 Pharma Spec, SHIMADZU.

## Результаты и их обсуждение

Для раствора L-лизина в концентрации 2 g/l с нингидрином в ДМСО был измерен спектр поглощения продуктов нингидриновой реакции. В результате спектрофотометрических исследований анализируемого раствора было выявлено два максимума поглощения на длинах волн 420 и 500 nm (рис. 1).

Известно, что каждая молекула имеет определенный набор возбужденных квантовых состояний, которые отличаются значением энергии. Интенсивно поглощаются кванты света, энергия которых равна энергии возбуждения молекулы. В зависимости от природы вещества изменяется характер поглощения. Зависимость светопоглощения от концентрации определяемого вещества выражается через закон Бугера–Ламберта–Бера

$$\lg I/I_0 = A_\lambda = \varepsilon_\lambda l c, \quad (1)$$

где  $I_0$  — интенсивность исходного излучения,  $I$  — интенсивность излучения, прошедшего через образец,

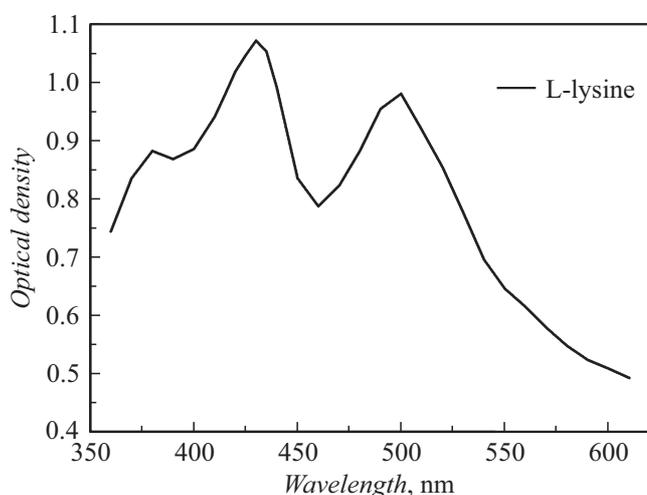


Рис. 1. Спектр поглощения продукта нингидриновой реакции с лизином.

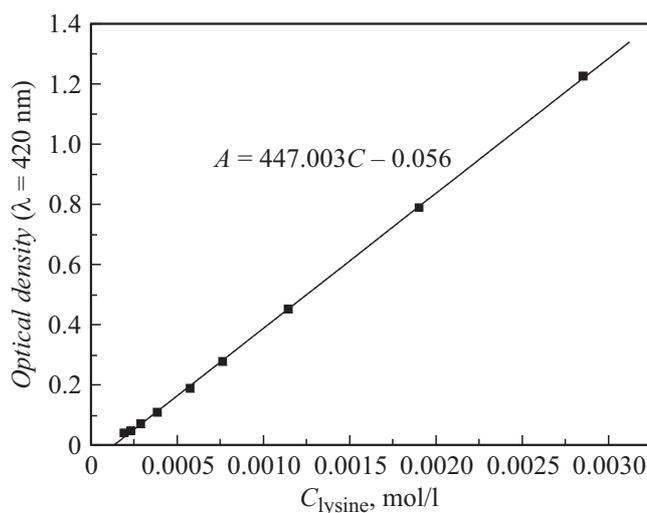


Рис. 2. Градуировочный график для фотометрического определения концентрации продукта нингидриновой реакции с лизином.

Таблица 1. Зависимость оптической плотности от содержания ДМСО в анализируемом растворе

Соотношение ДМСО–вода	Оптическая плотность
100% ДМСО	0.389
10:1	0.395
1:1	0.380
1:10	0.384
100% вода	0.030

$A_\lambda$  — оптическая плотность раствора,  $c$  — концентрация,  $l$  — толщина поглощающего слоя,  $\varepsilon_\lambda$  — молярный коэффициент светопоглощения при данной длине волны.

С целью выявления подчинения закону светопоглощения продуктов реакции лизина с 0.2%-м раствором нингидрина в ДМСО при длине волны 420 nm исследовали зависимость светопоглощения от концентрации лизина.

На рис. 2 приведен график, который демонстрирует взаимодействия лизина с 0.2%-м раствором нингидрина в ДМСО на длине волны 420 nm в интервале концентраций  $(2.3–28.5) \cdot 10^{-4}$  mol/l и подчиняется закону светопоглощения.

При исследовании влияния pH и содержания воды на величину оптической плотности результаты эксперимента показали, что отношение ДМСО и воды практически не влияет на оптическую плотность, однако присутствие ДМСО является необходимым — в чистой воде нингидриновая реакция анализируемого раствора практически не проходит (табл. 1).

В сильноокислых и сильнощелочных средах оптическая плотность заметно ниже по сравнению с растворами с умеренными значениями pH. Кроме того, в сильнощелочных средах образуется осадок, что затрудняет проведение фотометрического анализа. Наиболее целесообразно

**Таблица 2.** Зависимость оптической плотности от pH реакционной среды

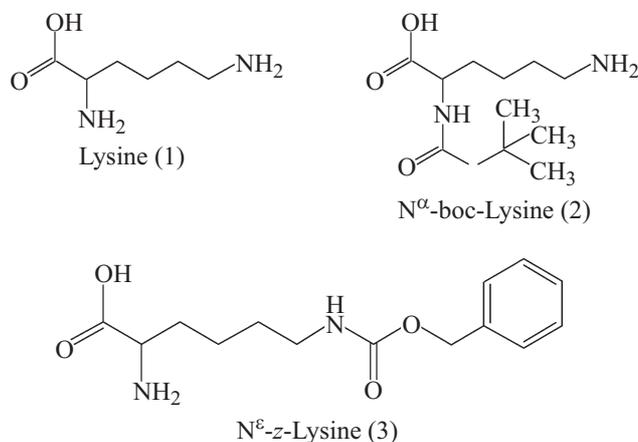
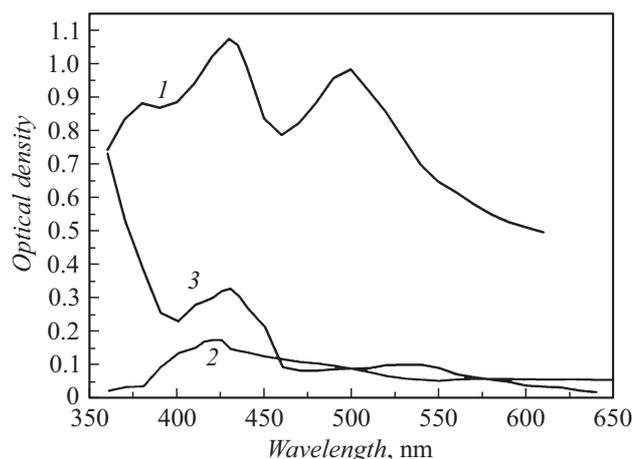
pH реакционной среды	2.6	3.6	4.4	8.7	9.1	9.7	13.2
Оптическая плотность	0	0.022	0.158	0.395	0.386	0.324	0.100 (осадок)

проводить реакцию в интервале pH 8.0–9.0, в таких условиях окраска образующегося продукта реакции наиболее стабильна, а значения оптической плотности — воспроизводимы (табл. 2).

Известно, что нингидрин взаимодействует с первичной аминогруппой, а в аминокислоте L-лизин их две — в  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -положениях, важно выяснить с какой именно аминогруппой аминокислота взаимодействует с нингидрином с образованием комплекса Румана [7] (рис. 3).

Для выявления реакционно-активной по отношению к нингидрину аминогруппы было проведено сравнение спектров поглощения комплексов лизина и его производных с нингидрином при блокировании одной из двух аминогрупп (рис. 4).

Продукт взаимодействия лизина с нингидрином характеризуется двумя максимумами поглощения при 420 и 500 nm (рис. 4). Продукт взаимодействия  $N^{\alpha}$ -вос-защищенного лизина с нингидрином — одним максимумом поглощения при 420 nm. Продукт взаимодействия  $N^{\epsilon}$ -Z-защищенного лизина с нингидрином — двумя максимумами при 430 и 620 nm. Из полученных спектров можно сделать вывод, что  $\alpha$ -аминогруппа L-лизина вступает в нингидриновую реакцию с образованием промежуточных соединений и комплекса Румана, что характеризуется двумя максимумами поглощения — при 420 и 500 nm (620 nm — для  $z$ -защищенного лизина).  $\epsilon$ -аминогруппа лизина реагирует с нингидрином как обычные амины, и реакция останавливается на стадии образования комплексов желтой окраски с максимумом поглощения при 420 nm.

**Рис. 3.** Химические структуры лизина, его производных и комплекса Румана.**Рис. 4.** Спектры поглощения продуктов нингидриновой реакции с лизином (1),  $N^{\alpha}$ -вос-лизином (2),  $N^{\epsilon}$ -z-лизином (3).

Таким образом, показано, что спектр поглощения комплекса L-лизина и нингидрина имеет два максимума — 420 и 500 nm. При исследовании влияния pH показано, что максимальное значение оптической плотности анализируемого раствора достигается при pH 8–9. Анализ спектров поглощения продуктов реакции нингидрина с производными лизина —  $N^{\alpha}$ -вос-лизином и  $N^{\epsilon}$ -z-лизином продемонстрировал, что в реакцию с нингидрином вступает аминогруппа в  $\alpha$ -положении. В то время как аминогруппа в  $\epsilon$ -положении не вступает в реакцию с нингидрином в подобранных нами условиях с образованием окрашенных продуктов, пригодных для фотометрического определения.

Работа выполнена на средства гранта РФФ № 14-50-00068.

## Список литературы

- [1] Государственная фармакопея СССР. XI изд. М.: Медицина, 1989. 400 с.
- [2] Киселева Т.Л., Фролова Л.Н., Баратова Л.А. и др. // Хим. фарм. журн. 1998. № 2. С. 47–51.
- [3] Яковлева Е.В., Костенишкова З.П., Баратова Л.А. и др. // Фармация. 2002. № 5. С. 11–14.
- [4] Копытко Я.Ф. // Хим. фарм. журн. 2003. № 7. С. 12–14.
- [5] Разводовский Ю.В., Дорошенко Е.М. // Хим. фарм. журн. 2003. № 1. С. 6–7.
- [6] Зенкова Е.А., Дегтярев Е.В. // Хим. фарм. журн. 2000. № 3. С. 31–33.
- [7] Khan A.A. // J. Indian Chem. Soc. 1989. N 7. P. 454–456.
- [8] Симонян А.В., Саламатов А.А., Покровская Ю.С., Аванесян А.А. // Использование нингидриновой реакции для количественного определения  $\alpha$ -аминокислот в различных объектах: Методические рекомендации. 2007. Волгоград. 106 с.
- [9] Шилова И.В., Краснов Е.А., Барановская Н.В. // Хим. фарм. журн. 2002. № 11. С. 36–38.
- [10] Friedman M. // J. Agric. Food Chem. 2004. Vol. 52. N 3. P. 385–406. DOI: 10.1021/jf030490p