

«УТВЕРЖДАЮ»

Председатель Комитета по здравоохранению

Администрации Волгоградской области

Заслуженный врач РФ

Е.А. Анищенко

«21» июля 2007 г



Комитет по здравоохранению Администрации Волгоградской области
Волгоградский государственный медицинский университет

**Использование нингидриновой реакции
для количественного определения α -аминокислот
в различных объектах**

Методические рекомендации

Волгоград, 2007

А.В. Симонян, А.А. Саламатов, Ю.С. Покровская, А.А. Аванесян.

Использование нингидриновой реакции для количественного определения α -аминокислот в различных объектах:

Методические рекомендации. – Волгоград, 2007.

Разработан доступный метод спектрофотометрического количественного определения α -аминокислот в лекарственном сырье, субстанциях и препаратах. Метод разработан на основании исследования спектральных характеристик продуктов нингидриновой реакции и оптимизации условий ее проведения.

Методические рекомендации предназначены для научных и практических работников, занимающихся исследованиями содержания аминокислот в различных объектах: лекарственных препаратах, растительном сырье, биологических жидкостях и др., а также в научно-исследовательской работе студентов и аспирантов.

Материалы методических рекомендаций могут быть использованы также в лекционных курсах и лабораторных занятиях при подготовке врачей, провизоров, лаборантов, интернов разных специальностей.

Рекомендовано к изданию УМК фармацевтического факультета ВолГМУ (протокол № 3 от 8 февраля 2007 г).

Рецензент:

В.А. Лиходед – зав. кафедрой фармацевтической технологии с курсом биотехнологии Башкирского государственного медицинского университета, док. фарм. наук, профессор.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| Биологическая активность аминокислот..... | 6 |
| Методы анализа аминокислот..... | 12 |
| Исследование спектральных характеристик продуктов реакции α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне..... | 37 |
| Оптимизация условий реакции α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне..... | 47 |
| Исследование реакции α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в диметилсульфоксиде..... | 54 |
| Исследование реакции α -аминокислот с 0,2 % водным раствором нингидрина..... | 56 |
| Изучение спектральных характеристик продуктов реакции α -аминокислот с 0,2 % водным раствором нингидрина..... | 58 |
| Оптимизация условий проведения реакции α -аминокислот с 0,2 % водным раствором нингидрина..... | 63 |
| Разработка методики количественного определения глицина в таблетках..... | 69 |
| Разработка методики количественного определения суммы α -аминокислот в шроте яблок..... | 72 |
| Количественное определение суммы α -аминокислот в промышленных отходах бобов какао..... | 88 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 97 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 98 |

ВВЕДЕНИЕ

Аминокислоты в организме человека, животных и растений играют важную роль в биосинтезе ряда других биологически активных соединений, различных пептидов и белков.

По содержанию аминокислот можно судить о скорости протекания различных биохимических процессов. Содержание аминокислот в тканях и жидкостях организма может служить нормативным показателем при диагностике различных патологических нарушений и заболеваний.

Современное здравоохранение использует ряд лекарственных средств и препаратов, созданных на основе аминокислот и содержащих очищенную сумму аминокислот, пептидов, белков.

На основании вышеизложенного актуальной задачей медицины и фармации является разработка доступных и удобных методов количественного анализа аминокислот в различных объектах. Существующие способы анализа, несмотря на высокую точность определения, имеют значительные недостатки: длительность приготовления рабочих растворов, их токсичность (потенциометрическое титрование в неводной среде), использование дорогого оборудования (ГЖХ, ВЭЖХ). В ряде работ для количественного определения α -аминокислот разработаны методики, основанные на фотоколориметрическом определении продуктов их взаимодействия с нингидрином при длинах волн 440-490 и 570 нм. При этом для разделения и идентификации α -аминокислот используют дорогостоящие аминокислотные анализаторы, которые практически недоступны для большинства лабораторий. Вместе с тем, следует отметить, что продукты реакции α -аминокислот с нингидрином характеризуются невысокой стабильностью оптической плотности во времени.

В качественном анализе аминокислот широко используется нингидриновая реакция. Мы изучили возможность ее использования для количественного анализа α -аминокислот с использованием метода спектрофотометрии.

На этом основании нами изучены спектральные характеристики продуктов нингидриновой реакции. Оптимизированы условия проведения этой реакции с целью получения стабильных результатов анализа.

Итогом работы явилась разработка доступного, относительно простого способа количественного анализа α -аминокислот в различных объектах.

Методика может быть использована в обычных лабораториях, исключает применение дорогостоящего оборудования, высокотоксичных, летучих и взрывоопасных реактивов.

Авторы.

Биологическая активность аминокислот

В современной медицине для диагностики, лечения и профилактики многих заболеваний широко используются лекарственные средства, содержащие аминокислоты [9, 11, 13, 15, 19, 22, 33, 41–43, 49, 54, 55, 61, 62, 64, 67, 70, 73].

Установлено, что биологической активностью в организме человека и животных обладают лишь L-изомеры, а D-изомеры аминокислот не перерабатываются ферментными системами, кроме того, некоторые из них токсичны для человека и животных. Исключением в этом отношении является метионин, у которого биологически активными являются как D-, так и L-изомеры [12].

В биологических жидкостях суммарное содержание α -аминокислот поддерживается на постоянном уровне. Изменение в содержании свободных α -аминокислот в сыворотке и плазме крови, а также моче свидетельствует о нарушении функции печени, почек [12, 42, 43].

Синтез коллагена – основного белка соединительной ткани определяется содержанием α -аминокислот (пролина, лизина) и их гидроксипроизводных. При патологических состояниях, сопровождающихся нарушением синтеза коллагена, наблюдается снижение количества отдельных α -аминокислот в сыворотке крови [32].

Установлено, что большинство α -аминокислот обладают широким спектром биологической активности. Так, лизин, треонин, фенилаланин, тирозин, аспарагин, глутамин, глицин, серин, аргинин являются исходными веществами для синтеза антител, гормонов, ферментов и других веществ. Они участвуют в метаболизме сахаров и органических кислот (аланин), способствуют снижению уровня холестерина в крови (метионин, триптофан, лизин, аргинин), выведению тяжелых металлов из организма (метионин, цистеин), росту и восстановлению

тканей (гистидин, изолейцин, лейцин, глицин, серин, пролин). α -Аминокислоты могут служить источником энергии на клеточном уровне (валин, лейцин, изолейцин, глутамин). Серусодержащие аминокислоты (метионин, цистеин) являются донорами серы, которая предотвращает нарушения формирования волос, кожи и ногтей. Они также играют важную роль в создании вторичной структуры белков за счет образования дисульфидных мостиков [12].

В обзоре [11] рассмотрена биологическая роль L-аргинина и основных продуктов его метаболизма – азота оксида, агматина и полиаминов, участвующих во многих биохимических реакциях *in vivo*.

Так, установлено, что агматин (продукт декарбоксилирования аргинина) связывается с α_2 -адренергическими и имидазолиновыми рецепторами и оказывает выраженный гипотензивный эффект.

В результате окисления аргинина *in vivo* образуется азота оксид – один из ключевых регуляторов клеточного метаболизма, обладающий широким спектром биологической активности: снижение артериального давления, ингибирование агрегации тромбоцитов, участие в иммунной защите организма (цитотоксический и противовоспалительный агент).

Еще один биосинтетический путь трансформации L-аргинина связан с синтезом полиаминов, которые играют важнейшую роль в клеточной пролиферации млекопитающих. Нарушенный полиаминовый метаболизм может быть существенным фактором канцерогенеза, а снижение концентрации полиаминов приводит к блокаде роста метастазных опухолевых клеток *in vivo* и *in vitro*. Установлено, что азота оксид и полиамины оказывают противоположные эффекты на регуляцию канцерогенеза и, т.к. они образуются из одного предшественника, возможно существование единого механизма регулирования относительных скоростей их синтеза. Так, имеются данные о том, что блокирование NO-синтазного пути может приводить к возникновению предопухолевых изменений за счет снижения высвобождения азота оксида. С этих позиций перспективным

направлением медицины является поиск ингибиторов полиаминного синтеза, как потенциальных противоопухолевых средств.

Автор подчеркивает, что не только метаболиты L-аргинина, но и сама эта аминокислота обладает отчетливой биологической активностью. Так, введение аргинина приводит к усилению высвобождения различных гормонов (инсулин, соматотропин), вазодилатации, увеличению тока плазмы и скорости фильтрации через почки. Кроме того, L-аргинин усиливает сосудорасширяющий эффект, в том числе и в коронарных артериях, при гиперхолестеринемиях, сахарном диабете. При этом полагают, что хотя при введении аргинина повышается количество образующегося азота оксида, определяющим является не только этот фактор, но и его непрягая антиоксидантная активность, т.к. при введении аргинина снижается высвобождение супероксид-анион-радикала в эндотелии и, как следствие, улучшается макро- и микроциркуляция крови [11].

В настоящее время разрабатывают композиции, содержащие аргинин, для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Так, патентуется пероральные и топикальные лекарственные средства в качестве вазорелаксантов и вазодилататоров, в состав которых входит L-аргинин и женьшень, стимулирующие образование азота оксида, эффективные, соответственно в суточных дозах 100–300 мг и 50–200 мг. Для повышения терапевтического эффекта, в эти лекарственные препараты вводят экстракт *Ginkgo biloba*, L-аланин, глутаминовую кислоту и L-лизин [70].

Несмотря на эффективность лекарственных средств аргинина, необходимо учитывать сопряженность параллельного синтеза азота оксида и полиаминов, и осуществлять постоянный мониторинг содержания аргинина в организме.

α -Аминокислоты и их производные играют также важную роль в регуляции ЦНС. Центральное место в метаболизме нейромедиаторов головного мозга занимает кислота глутаминовая, вступающая в разнообразные реакции и взаимодействующая с продуктами цикла трикарбоновых кислот. Кислота глутами-

новая является предшественником ГАМК. В настоящее время известно, что ГАМК принимает участие во многих обменных процессах мозговой ткани: влияет на транспорт и утилизацию глюкозы, дыхание и окислительное фосфорилирование, метаболизм главных источников энергии, участвует в регуляции осмотических процессов, обладает антигипоксическим действием. Кроме того, ГАМК является метаболическим предшественником ряда продуктов, которые обладают как возбуждающим (глутамат, кислота 2,4-диаминомасляная), так и тормозящим (кислота γ -амино- β -оксимасляная) действием. Кроме того, ГАМК также участвует в регуляции моторной активности, поддержании судорожного порога, формировании эмоционального поведения [42].

Лекарственные средства, содержащие кислоту глутаминовую, применяют при заболеваниях, сопровождающихся нарушениями функции ЦНС: после травм мозга, после перенесенных кровоизлияний или при воспалительных заболеваниях головного мозга, при эпилепсии (преимущественно малых припадков) [33]. Кроме того, кислота глутаминовая снижает процессы перекисного окисления липидов (особенно в сочетании с аевитом) и повышает эффективность лечения больных бронхиальной астмой, особенно в сочетании с глюкокортикоидами [13].

Триптофан обладает способностью нормализовать дисбаланс в системе центральных моноаминов и нейроактивных аминокислот головного мозга (таурин, 5-окси-L-триптофан, дофамин, серотонин) на фоне субхронической интоксикации фенобарбиталом [43].

Лекарственные препараты, содержащие метионин применяют для лечения и профилактики заболеваний печени: цирроза печени, диабете [33].

Кроме того, в литературе имеются данные о гепатопротекторной активности L-аланина. Так, запатентован способ лечения первичного цирроза печени пероральными лекарственными формами (порошки, гранулы, таблетки, капсулы, сиропы), которые содержат в качестве активного компонента L-аланин или

его соли, эффективно снижающие в суточных дозах 5–30 г уровень билирубина и трансаминазы в сыворотке крови. Данные лекарственные средства характеризуются низкой токсичностью и отсутствием побочных эффектов даже при длительном применении [73].

Для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки применяют гистидин и препараты на его основе [33]. Обнаружена способность гистидина снижать уровень алкогольной интоксикации за счет образования оснований Шиффа между аминокислотой и продуктом окисления этанола – ацетальдегидом, оказывающим токсическое действие на ЦНС [39]. Лекарственные препараты, содержащие цистеин, а также смесь аминокислот (вицеин) задерживают развитие катаракты [33].

При заболеваниях, сопровождающихся белковой недостаточностью (гипопротеинемиях и истощении организма, при интоксикациях различной этиологии, лучевой болезни), а также с целью улучшения метаболических и репаративных процессов в послеоперационном периоде широко применяют суммарные лекарственные препараты α -аминокислот для парентерального питания, представляющие собой гидролизаты природных белковых продуктов животного происхождения [33]. Для усиления регенеративных процессов в организме (в частности, для лечения травм и ожогов, параличей, диареи, поражений печени) также разработаны высококалорийные пероральные лекарственные средства, содержащие аргинин, глутамин, пролин, лейцин, изолейцин, валин в комплексе с витаминами и микроэлементами [64]. Запатентовано средство для детского питания, в состав которого входят свободные α -аминокислоты, и нуклеотиды, предназначенное для детей, страдающих аллергией к коровьему молоку [67].

Перспективными и более доступными источниками выделения субстанций, содержащих α -аминокислоты, являются объекты растительного, а также иного природного происхождения, в частности мумие – сложная по составу смолоподобная субстанция, добываемая в некоторых горных районах мира

[19, 31]. Установлено, что α -аминокислоты, наряду с другими БАВ, входящими в состав разного сырья, обеспечивают проявление широкого спектра биологической активности [1, 7, 19, 20, 23, 27, 30, 31, 41, 47, 48]. Так, трава княжика сибирского (*Astragalus sibiricus*), экстракт мумие сухого обладают выраженным адаптогенным и ноотропным действием [1, 19]. Пыльца акации белой и некоторых видов горных цветов обладает ранозаживляющим, гиполипидемическим, противоопухолевым действием и улучшает обменные процессы в организме [23].

Важным источником растительных полипептидов и α -аминокислот являются бобы сои, используемые в лечебно-диетическом питании. Так, в опытах *in vivo* установлено отчетливое гипохолестеринемическое действие соевых бобов, которое исследователи связывают с высоким содержанием в сырье аспартата, глицина и цистеина (содержание данных аминокислот в белках сои в 2 раза превышает аналогичный показатель животного белка казеина) [56].

В последние десятилетия в опытах *in vivo* установлена радиопротекторная активность некоторых природных α -аминокислот и их производных. Так, у собак при внутрибрюшинном и внутривенном введении L-цистеина в дозах 500 и 820 мг/кг наблюдается радиозащитный эффект без серьезных токсических проявлений. Однако более выраженным радиопротекторным действием обладает D-цистеин. По мнению авторов это обусловлено медленным метаболизмом и более пролонгированным действием чужеродных организму D-изомеров α -аминокислот, по сравнению с L-формами. Триптофан менее активен, чем цистеин, однако его метаболиты, образующиеся в организме (серотонин, триптофон, 5-метокситриптамин) относят к одним из наиболее активных радиопротекторных средств. Также установлено, что калия и магния аспартаты при облучении стимулируют пролиферацию клеток и их дифференциацию в тимусе, селезенке и костном мозге [41]. Следует отметить важность продолжения исследований о радиопротекторной активности малотоксичных суммарных субстанций природ-

ного происхождения, содержащих аминокислоты в сочетании с другими биологически активными веществами (в частности, флаваноидами, органическими кислотами).

В настоящее время запатентованы технологии композиций, содержащих L-аминокислоты, для диагностики заболеваний. Так, разработана контрастная среда для перорального введения, предназначенная для проведения ядерно-магнитной диагностики печени. Она включает физиологически приемлемое соединение марганца (II) и одну или несколько L-аминокислот (аланин, валин, лейцин, триптофан), присутствие которых усиливает захват марганца (II) и один из витаминов группы D. Состав контрастной среды обеспечивает активный транспорт компонентов через стенку желудка и их концентрирование в печени для диагностического анализа [61].

Таким образом, α -аминокислоты и лекарственные препараты на их основе обладают разнообразными видами фармакологической активности. С этих позиций, важной и несомненно актуальной задачей современного химико-фармацевтического анализа является разработка точных и доступных методов количественного определения α -аминокислот в субстанциях, лекарственных формах и растительном сырье. Кроме того, представляет интерес оптимизация условий повышения суммарного выхода аминокислот из отходов промышленной переработки растительного сырья с целью создания на основе выделенных субстанций лекарственных средств, характеризующихся широким спектром действия в сочетании с низкой токсичностью.

Методы анализа аминокислот

В настоящее время существует ряд методов количественного определения аминокислот в лекарственном растительном сырье, в лекарственных препаратах и биологических жидкостях [1–10, 14, 16–32, 34–38, 40, 44–46, 49–55, 57–60, 63, 65, 66, 68, 69, 72].

Из всего многообразия методов количественного определения аминокислот в различных объектах, можно выделить четыре основные группы: хроматографические, спектрофотометрические, титриметрические и электрохимические методы анализа.

За последние десятилетия достигнуты значительные успехи в области ГЖХ аминокислот. Предложен метод ГЖХ с использованием микронабивных колонок, позволяющий за сравнительно короткое время разделять практически полностью 17 важных в биологическом отношении α -аминокислот [6].

Разработана методика определения аминокислот с помощью ГЖХ в образцах сыворотки, плазмы, мочи и спинномозговой жидкости, основанная на получении 2,3,4,5,6-пентафторбензоил-изобутиловых эфиров с последующим разделением на колонке из полидиметилсилоксана в режиме программирования температуры от 140 °С до 250 °С с пламенно-ионизационным детектором. Время хроматографического разделения составляет 28 мин. В результате исследований удалось разделить 27 аминокислот [69].

В последнее время для анализа аминокислот в различных объектах широко используется ВЭЖХ, характеризующаяся высокой точностью определения и большой производительностью. Существенным недостатком данного метода анализа, как и для ГЖХ, является дороговизна оборудования и недоступность для большинства лабораторий.

Несмотря на многообразие методик ВЭЖХ в анализе аминокислот, наиболее экспрессным и доступным является обращено-фазовый вариант ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием. Для успешного разделения и детектирования аминокислоты переводят в гидрофобные и поглощающие свет производные, т.е. проводят предколоночную дериватизацию. В качестве реагентов для дериватизации применяют ортофталевый альдегид, нафталин-2,3-дикарбоксиальдегид, 9-флуоренилметилхлороформиат [55].

Разработана методика количественного определения L-цистина, L-глутаминовой кислоты и глицина в лекарственном препарате «Элтацин», обладающего антиоксидантной активностью в сочетании с антиангинальным эффектом [55]. Глутаминовую кислоту и глицин определяли методом обращено-фазовой ВЭЖХ после предколоночной дериватизации с реагентом ортофталевый альдегид / N-ацетил-L-цистеин (ОФА / НАЦ). Дериватизация цистеина, по данным авторов, затруднена из-за нестабильности самой аминокислоты и образующихся производных. Поэтому, анализ цистеина проводили методом броматометрического титрования. Установлено, что присутствие в образце значительных количеств цистеина не мешает определению продуктов дериватизации глицина и глутаминовой кислоты с ОФА / НАЦ. Метод характеризуется высокой воспроизводимостью и точностью определения.

Предложена методика анализа с предколоночной дериватизацией аминокислот фенилизотиоцианатом. Хроматографическое разделение проводят с использованием в качестве подвижной фазы метанола и фосфатного буферного раствора с рН 5,5. Детектирование осуществляют при длине волны 254 нм [63].

Исследована возможность использования 4,7-фенантролин-5,6-диона (фанхинона) в качестве флуорогенного реагента-метки для предколоночного образования его производных с целью разделения и количественного анализа аминокислот методом ВЭЖХ. Не обладающий собственной флуоресценцией, фанхинон реагирует с аминогруппами аминокислот (при 68 °С в течение 160 мин), образуя иминохинолы, флуоресценцию которых измеряют при длине волны 460 нм. Выделенные производные идентифицировали по $T_{пл}$, ИК-, масс-, и ПМР-спектрам. ВЭЖХ проводили на хроматографе с флуоресцентным детектором и колонкой при градиентном элюировании смесями: раствор триэтиламина - фосфатный буфер (рН 3) - метанол. В качестве внутреннего стандарта использовали хинидин. Данный метод достаточно перспективен в условиях крупных

лабораторий и может быть предложен для анализа аминокислот в готовых лекарственных формах [66].

Разработана методика ВЭЖХ с потенциометрическим биосенсором для количественного определения лизина. Биосенсор сконструирован прикреплени-ем, содержащей лизиноксидазу, мембраны к ионно-селективному NH_4^+ - электроду. Генерируемые при ферментативной деградации лизина ионы аммония детектируют потенциометрически [65].

Разработана высокочувствительная методика определения аминокислот и глюкозы, не требующая предварительной подготовки пробы. Было изучено поведение удерживания аминокислот и глюкозы на колонке с использованием в качестве элюента растворов натрия гидроксида и натрия ацетата. Установлено, что при изменении концентрации раствора щелочи (используемого в качестве элюента), изменяется время удерживания аминокислот и глюкозы – оно становится больше для аминокислот, чем для глюкозы. Это различие используют для их разделения. При изменении концентрации раствора натрия ацетата, время удерживания у дикарбоновых аминокислот (аспарагиновой и глутаминовой) становится больше, чем у аминокислот, содержащих одну карбоксильную группу. Данное различие используют для разделения аминокислот. Точность разработанного метода составила 88,3–104,6 % [37].

Несмотря на широкое внедрение методов ГЖХ и ВЭЖХ, анализ аминокислот с помощью ТСХ в настоящее время используется также довольно широко. Наиболее часто для проявления хроматограмм используют свежеприготовленные растворы нингидрина (описание методик указано ниже), однако в анализе отдельных аминокислот нередко применяют более специфичные реагенты. Так, разработан хроматоденситометрический экспресс-метод анализа в культуральных жидкостях триптофана. ТСХ проводили на пластинках «Сорбфил». Хроматографию осуществляли в системе пропанол-2 – 25 % раствор аммония гидроксид (7:3) в течение 25 мин. Хроматограммы высушивали при комнатной

температуре и 15 мин выдерживали при 120 °С. Для обнаружения пятен на хроматограммах использовали специфический реагент – 4-диметиламинобензальдегид (4-ДМАБА), избирательный к индольному кольцу триптофана, в виде 0,5 % этанолового раствора с добавлением 5 % кислоты серной концентрированной. После проявления хроматограмм способом погружения в тефлоновую кювету со свежеприготовленным раствором 4-ДМАБА, их выдерживали в течение 5–7 мин при температуре 110 °С. Сканирование пятен триптофана проводили при длине волны 625 нм на компьютерном видеоденситометре. Разработанный метод, несмотря на высокую точность определения и производительность, специфичен по отношению к триптофану [25].

Кроме того, для анализа α -аминокислот в биологических жидкостях, лекарственных препаратах, продуктах питания широко используются методы капиллярного электрофореза, основанные на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля [36, 38]. Поскольку аминокислоты имеют цвиттерионный характер, они могут быть разделены с использованием буферных растворов электролитов с соответствующим значением рН, чаще всего используют нейтральные и основные разделяющие буферные растворы [58]. Имеются данные о повышении эффективности разделения и анализа аминокислот при добавлении в буферный раствор β -циклодекстрина [21].

С целью повышения специфичности и чувствительности метода капиллярного электрофореза для анализа отдельных α -аминокислот используют их предварительную дериватизацию, с последующим разделением в кварцевом капилляре и спектрофотометрическим определением продуктов реакции. Так, в качестве дериватирующих агентов используют 9-флуоренилметилформиат, 9-(2-карбазол)-этилхлорформиат, цианиновый краситель [38, 44, 71]

Перспективность метода обусловлена такими его достоинствами, как экспрессность анализа, простота подготовки пробы, небольшой расход реактивов, простота аппаратного оформления [51].

Спектрофотометрические методы основаны на способности аминокислот или продуктов их взаимодействия с определенными реагентами поглощать в УФ-области спектра. Эта группа методов наиболее широко используется в настоящее время для количественного анализа α -аминокислот.

Растворы ароматических аминокислот (триптофана, фенилаланина, тирозина) поглощают в диапазоне 240–300 нм. На этом основании разработаны экспресс-методы их количественного определения, отличающиеся простотой. Однако, вследствие того, что максимумы светопоглощения этих аминокислот близки, то в процессе количественного определения отдельных ароматических аминокислот возможны ошибки анализа. Поэтому, в большинстве случаев, данный метод анализа является предварительным и требует дополнительного анализа с помощью ВЭЖХ, ГЖХ и аминокислотных анализаторов [52].

Разработан простой и точный спектрофотометрический метод анализа цистина (примеси цистеина в лекарственных препаратах), основанный на способности его солянокислых растворов к светопоглощению при длине волны 250 нм. При изучении аналитических возможностей метода, установлено, что цистеин в этой области не поглощает и не мешает определению цистина [2].

Учитывая важную биологическую роль цистеина (участие в реакциях трансаминирования, обмене серы в организме, в частности, в тканях хрусталика), разработка доступных методов его определения является важной аналитической задачей. Так, разработана методика количественной оценки цистеина в биологических жидкостях, основанная на его окислительно-восстановительной реакции с солями железа (III) в присутствии 1,10-фенантролина с последующим спектрофотометрическим определением продукта реакции. Методика характеризуется высокой точностью определения и простотой исполнения [72].

Иранские исследователи продолжили изучение реакции, описанной в работе [72] и предложили два аналитических метода, предназначенные для одновременного спектрофотометрического количественного определения кислоты аскорбиновой (Asc) и L-цистеина (Cys) в лекарственных препаратах: метод двух скоростей реакции (ДСМ) и дифференциально-кинетический метод (ДКМ). Оба метода основаны на способности кислоты аскорбиновой и цистеина количественно восстанавливать избыток Fe (III) до Fe (II), а последний образует в растворе окрашенный комплекс с фенантролином (Phen). Концентрацию комплексного соединения Fe (II)–Phen определяют по характеристическому поглощению при длине волны 510 нм. Первый метод (ДСМ) основан на определении констант скорости в двух точках, соответствующих преимущественному протеканию одной из двух реакций. Вторым методом (ДКМ) используют различие в кинетике реакций окисления кислоты аскорбиновой и цистеина при разных значениях pH. Установлено, что реакция Cys– Fe (III) описывается кинетическим уравнением первого порядка, тогда как кинетика взаимодействия Asc– Fe (III) соответствует двум последовательным реакциям. С использованием предложенных методов кислота аскорбиновая и цистеин могут быть определены с достаточно высокой точностью [59].

С целью определения суммарного содержания аминокислот в сыворотке крови был разработан спектрофотометрический метод количественной оценки продукта реакции аминокислот с альдегидом ортофталевым. Продукт реакции определяют спектрофотометрически в присутствии меркаптоэтанола при длине волны 340 нм. Метод характеризуется высокой чувствительностью и позволяет количественно определить все α -аминокислоты, за исключением цистина, пролина и оксипролина [8].

Согласно ФСП на лекарственные препараты аминокислот, из титриметрических методов количественного определения наиболее широко используется титрование в неводных растворителях.

Аминокислоты относятся к веществам, титрование которых в воде затруднено из-за слабых кислотно-основных свойств и/или малой растворимости.

Аминокислоты растворяют в кислоте уксусной ледяной, и полученный раствор титруют 0,1 М раствором кислоты хлорной. Титрование может быть проведено с индикатором (кристаллический фиолетовый), так и потенциметрически с использованием стеклянного электрода в качестве индикаторного. Параллельно проводят контрольный опыт [9].

Методика анализа характеризуется высокой точностью определения, не требует использования дорогостоящего оборудования. Однако данный метод имеет ряд существенных недостатков: использование агрессивных, высокотоксичных реагентов; для приготовления титранта используют ангидрид кислоты уксусной, оборот которого в РФ ограничен; длительность приготовления титранта (0,1М раствора кислоты хлорной – более 48 ч).

Для количественного анализа отдельных аминокислот используют также метод Кьельдаля, кислотно-основное и йодометрическое титрование [14, 22, 54].

В последние десятилетия все более широкое распространение получили электрохимические методы анализа аминокислот (особенно полярографические, потенциметрические и вольтамперометрические), вследствие высокой точности определения и производительности [18, 35, 57, 60].

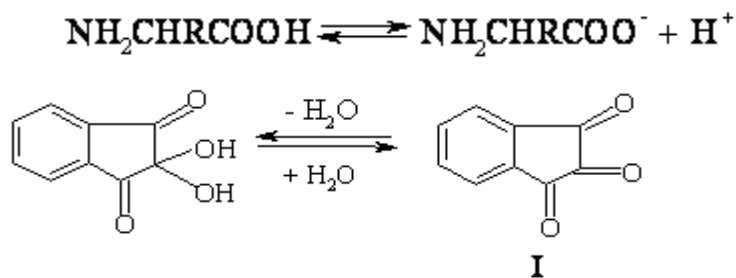
Следует отметить, что эти методы, как правило, являются строго специфичными, т.е. в оптимизированных условиях они позволяют определить лишь отдельные α -аминокислоты (например, полярографию используют для анализа аминокислот или продуктов их взаимодействия, способных к восстановлению или окислению на микроэлектродах). Так, разработан способ полярографического определения триптофана, основанный на электрохимическом восстановлении продуктов его взаимодействия с формальдегидом [35]. Предложена доступная методика полярографического количественного определения метионина в таблетках, основанная на способности метионина к окислению [18].

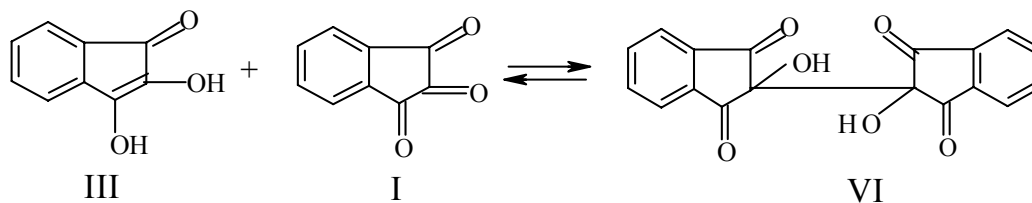
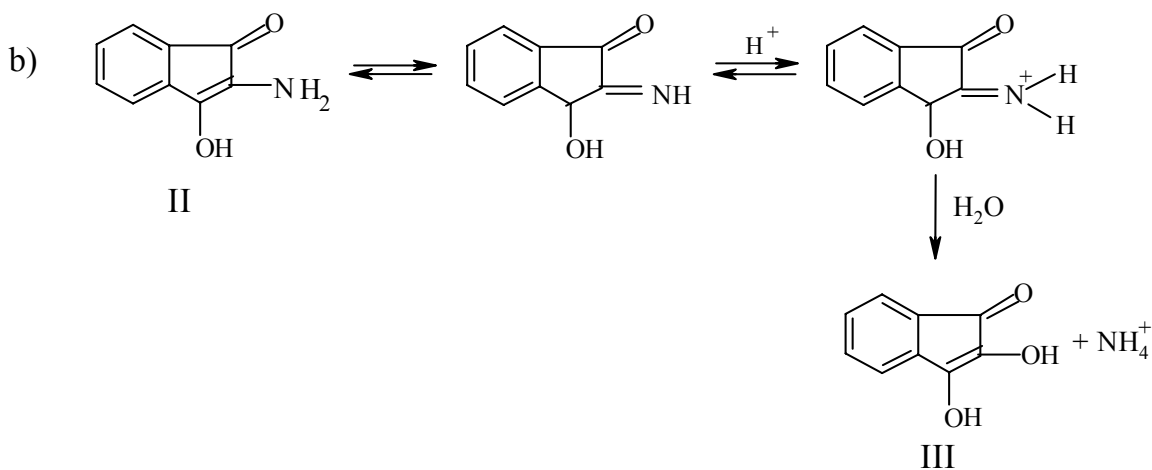
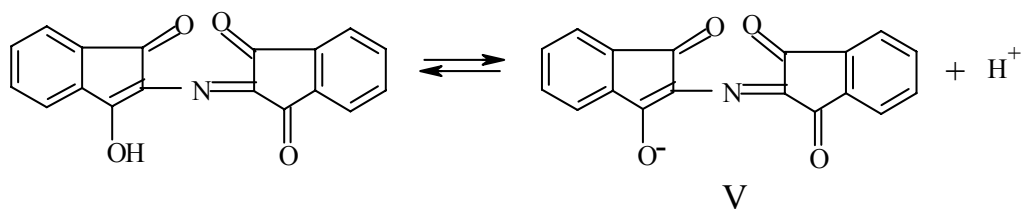
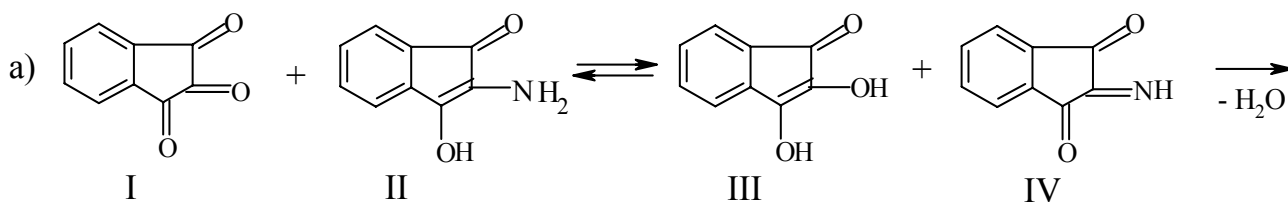
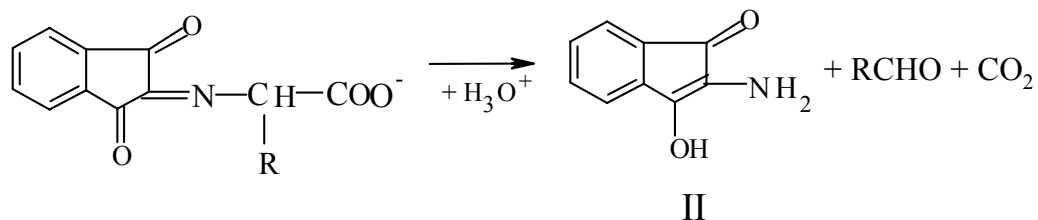
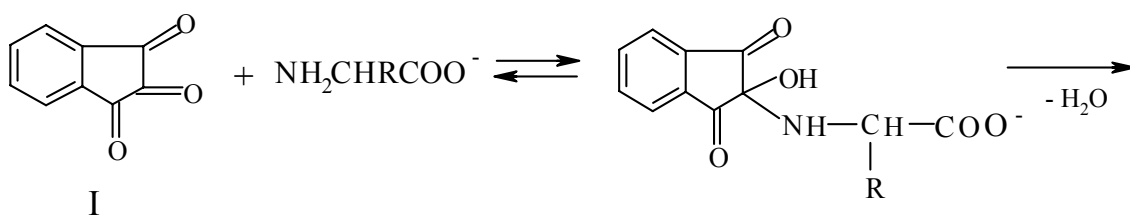
Для анализа аминокислот также широко используют методы, основанные на реакции с нингидрином [1, 3–5, 7, 14, 16, 17, 19, 20, 23–32, 34, 40, 45, 46 49, 50, 53, 68].

Данная реакция впервые была открыта Руманом. Позднее 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 вообще. Исключение – пролин, который образует с нингидрином окраску желтого цвета, как считают некоторые исследователи, благодаря раскрытию цикла. Аминокетоны первоначально с нингидрином образуют желтую окраску, которая переходит в пурпурную [50].

По данным В.П. Пахомова с соавт. модификация методик анализа аминокислот, основанных на нингидриновой реакции, осуществляется по двум основным направлениям. Первое связано с тем, что интенсивность окраски продуктов реакции с течением времени снижается, поэтому для стабилизации к реагенту добавляют различные органические растворители (этанол, диоксан, метилцелозольв) или используют модифицированный реагент с добавками солей Ni, Co, Cr. Второе направление связано со способами детектирования продуктов реакции: использование фотоэлектроколориметров, спектрофотометров, аминокислотных анализаторов [50].

Khan A. с соавторами изучили механизм нингидриновой реакции [68]:





На первой стадии реакции α -аминокислот с нингидрином (I) образуются углерода диоксид, альдегид и устойчивое промежуточное соединение – 2-аминоиндандион (II), участвующий в двух параллельных реакциях. В одной из них он реагирует с нингидрином до образования 2-гидроксииндандиона (III) и 2-иминоиндандиона (IV), которые, конденсируясь между собой, формируют дикетогидринденкетогидринамин (V). Во второй реакции 2-аминоиндандион в кислой среде подвергается гидролизу до аммиака и 2-гидроксииндандиона, последний, взаимодействуя с нингидрином, образует гидриндантин (VI).

Установлено, что характерная для большинства α -аминокислот пурпурная окраска (окраска Румана) обусловлена образованием дикетогидринденкетогидринамина (V), а также продукта параллельной реакции – гидриндантина (VI), который мало растворим в воде и растворим в органических растворителях – диметилсульфоксиде (ДМСО) и метилцелозольве. Поэтому, с целью повышения чувствительности реакции, по предположению авторов, наиболее рационально использовать растворы нингидрина в указанных растворителях. Максимальные значения оптической плотности продуктов реакции (при длине волны 575 нм) наблюдаются при соблюдении следующих условий ее проведения: температура реакционной смеси – 95 °С, pH – 5–6. Кроме того, реакцию необходимо проводить без доступа кислорода, в атмосфере азота [68].

Реакция аминокислот с нингидрином широко используется в хроматографических и спектрофотометрических методах анализа.

Одним из наиболее доступных методов качественного и количественного анализа аминокислот является хроматография на бумаге. Хроматографию проводят в системе растворителей: бутанол – кислота уксусная – вода (4:1:5). Полученную хроматограмму проявляют 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне. Количественное определение веществ после хроматографического разделения проводят денситометрически непосредственно на хроматограмме, либо после элюирования. Оптическую плотность продуктов реакции определяют на ФЭК-

56М с зеленым светофильтром [14]. Данный метод является доступным, не требует использования специального оборудования. Однако его главным недостатком является длительность анализа.

Хроматография в тонком слое сорбента широко применяется для качественного и количественного анализа аминокислот в различных объектах. В качестве адсорбента используют простой и доступный для серийных определений материал – порошковую целлюлозу, а в качестве реактивов для проявления аминокислот на хроматограмме – 2 % раствор нингидрина в метилцелозольве, 0,2 % этаноловые, 0,5 % ацетоновые растворы нингидрина [5, 7, 14, 32].

В настоящее время существует большое количество систем растворителей, используемых для разделения аминокислот методом ТСХ в различных объектах. Основной задачей при разработке новых методик анализа является выбор систем растворителей, обеспечивающих разделение всех исследуемых аминокислот, при этом пятна аминокислот (4–8 мм) должны быть равномерно распределены по всей хроматограмме [5].

Так, при изучении аминокислотного состава гомеопатических матричных настоек арники горной использованы следующие подвижные фазы [20]:

1) н-пропанол – вода (70:30); 2) хлороформ – метанол – 10 % раствор аммиака (40:40:20); 3) н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (40:10:5); 4) н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (40:10:10); 5) н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (40:10:20); 6) н-бутанол – диэтиловый эфир – ледяная уксусная кислота – вода (9:6:3:1).

Установлено, наиболее оптимальные условия разделения аминокислот настоек достигаются при использовании подвижной фазы 3: н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (40:10:5).

Предложена методика анализа α -аминокислот с помощью ТСХ, осуществляемая в следующих направлениях: 1) н-бутанол – кислота уксусная – ацетон – вода (35:15:35:20); 2) изобутанол – метилэтилкетон – ацетон – 12 % раствор ам-

миака (10:11:10:6) – два раза, затем еще раз эта же система растворителей, но в соотношении 10:11:10:8; 3) первое направление (система 1) [5].

Анализ водного извлечения лабазника шестилепестного методом ТСХ показал, что наиболее эффективное разделение аминокислот наблюдается при использовании системы 96 % этанол – концентрированный аммиак (16:4,5) [7].

Значительную трудность для анализа аминокислот методом ТСХ представляет оптимизация условий отделения анализируемых аминокислот от сопутствующих, поскольку в данном случае приходится оптимизировать не только качественный состав, но и количественные соотношения между компонентами систем растворителей. Так, разработана методика количественного определения L-лизина, L-гомосерина и α -треонина в культуральных жидкостях методом хроматоденситометрии на пластинках «Сорбфил». Для обнаружения аминокислот использовали 0,3 % раствор нингидрина (0,3 г нингидрина, перекристаллизованного с углем, растворяли в 99 мл ацетона и 1 мл кислоты уксусной ледяной). Сканирование пятен осуществляли на денситометре при длине волны 500 нм. Оптимизированы системы растворителей, позволяющие четко отделять, исследуемые аминокислоты от компонентов культуральных жидкостей:

- Для L-лизина: пропанол-1 – 25 % раствор аммония гидроксид (55:45);
- Для L-гомосерина: пропанол-2 – ацетон – 25 % раствор аммония гидроксид – вода (25:25:6:7);
- Для треонина: пропанол-2 – этилацетат – 25 % раствор аммония гидроксид – вода (20:20:1,5:2,5).

Авторы отмечают, что разработанная методика может быть эффективна при определении других аминокислот, а также коротких пептидов в биологических жидкостях при соответствующем подборе элюирующих систем [24].

Во многих случаях, исследуемые образцы (из растительного материала, биологические жидкости), наряду со свободными аминокислотами содержат пептиды, имеющие близкие значения R_f , что затрудняет анализ аминокислот.

Поэтому, при подготовке образцов проводят их очистку добавлением 95 % этанола, метанола, с последующим отстаиванием и центрифугированием [14, 28].

В последнее время с целью очистки от балластных ВМС также широко используют водные растворы сульфосалициловой кислоты, что наиболее удобно, т.к. супернатант можно сразу анализировать на содержание аминокислот без удаления реагента, что приводит к потерям некоторых аминокислот. Наиболее часто сульфосалициловую кислоту используют при подготовке образцов к анализу аминокислот методом ионообменной хроматографии при использовании аминокислотных анализаторов [19].

Установлено, что на результаты анализа аминокислот методом ТСХ влияют примеси солей. Поэтому при подготовке образцов к анализу производят обессоливание. Так, для определения свободных аминокислот в моче, образцы предварительно отстаивают при температуре – 4 °С в течение 24 ч. Кроме того, для анализа используют пластины, содержащие сильную ионообменную смолу Дауэкс 50 x 8, что позволяет повысить точность метода [28].

Метод ТСХ также используют для анализа связанных α -аминокислот, входящих в состав белков и пептидов. В этом случае проводят предварительный гидролиз образца с использованием кислоты хлороводородной. Так, разработана методика количественного определения лизина и оксилизина в сыворотке крови методом ТСХ с использованием системы: метанол – хлороформ – 17 % раствор аммиака (40:40:20). Хроматограмму проявляют нингидриновым реактивом, который готовят смешиванием 95 частей 0,5 % раствора нингидрина в ацетоне, 1 части кислоты уксусной ледяной и 4 частей воды [32]. Следует отметить, что используемая система растворителей строго специфична для лизина и оксилизина и не позволяет разделить другие аминокислоты.

Для количественного определения аминокислот, после их разделения в тонком слое сорбента, применяют метод элюирования в сочетании со спектрофотометрическим или фотоколориметрическим определением продуктов реак-

ции аминокислот с нингидрином [5, 14, 28, 32]. Так, в работе [32] описан метод Giri, наиболее часто используемый для анализа, который основан на использовании в качестве элюента 0,005 % раствора меди сульфата в 75 % этаноле. Последний добавляют к образцам вырезанных с хроматограммы пятен продуктов нингидриновой реакции, отстаивают при 37 °С в течение 15 мин, затем центрифугируют. Интенсивность светопоглощения определяют фотоколориметрически при длине волны 540 нм. Параллельно аналогичным образом обрабатывают стандартные образцы аминокислот, наносимые на пластину одновременно с исследуемым материалом.

С целью повышения чувствительности анализа аминокислот методом ТСХ предложен способ, предусматривающий дополнительную обработку проявленных пятен хроматограммы 2 % раствором нингидрина в метилцелозольве с последующим нагреванием при температуре 100 °С в течение 15 мин. Частицы целлюлозы и пузырьки воздуха удаляют центрифугированием, а продукты реакции определяют фотоколориметрически, как описано выше [5].

Модификацией рассматриваемых хроматографических методик анализа аминокислот является метод ТСХ в зафиксированном слое ионообменной смолы. Так, предложен способ количественного определения аминокислот на пластинках «Фиксион», которая содержит ионообменную смолу, нанесенную тонким слоем на полимерную основу, соединяя этим большую разрешающую способность ионного обмена с простотой тонкослойной хроматографии. Особое значение этот метод имеет для разделения свободных аминокислот при профилактическом обследовании детей для обнаружения нарушений аминокислотного метаболизма наследственного характера [4]. Предварительно осуществляли очистку исследуемых образцов от белковых примесей, мешающих проведению анализа. Разделение основных и ароматических аминокислот в сыворотке крови производили методом восходящей хроматографией в цитратном буфере со значением рН 5,23, при постоянной температуре (22 °С) в течение 3 ч. В качестве

проявителя хроматограммы использовали коллидин-нингидриновый реактив, состоящий из трех растворов:

№ 1 – 1 г нингидрина растворяли в смеси 100 мл ацетона и 10 мл кислоты уксусной ледяной; № 2 – 1 г кадмия ацетата растворяли в 100 мл 50 % раствора кислоты уксусной; № 3 – коллидин.

Перед анализом смешивали 100 мл раствора № 1, 1 мл раствора № 2 и 1 мл раствора № 3.

После проявления хроматограммы нингидриновым реактивом и испарения избытка ацетона, ее покрывали сухой стеклянной пластиной и помещали в термостат на 10–12 ч. Количественное определение проводили денситометрически, используя набор стандартных образцов аминокислот.

Предложенный метод, несмотря на длительность проведения, характеризуется достаточно высокой точностью определения и воспроизводимостью [4].

Метод ТСХ характеризуется высокой точностью определения, не требует использования дорогостоящего оборудования. Однако применение данного метода ограничено длительностью проведения анализа (в течение нескольких суток). Кроме того, продукт реакции аминокислот с нингидрином нестабилен во времени. Поэтому, при количественном определении аминокислот методом ТСХ, основанном на фотоколориметрии продукта реакции, следует учитывать временной фактор. В ряде случаев идентифицировать все зоны на хроматограммах методом ТСХ затруднительно, т.к. зоны некоторых аминокислот имеют близкие значения R_f [7, 20]. Поэтому в настоящее время метод ТСХ используют для предварительного анализа, более полные сведения о компонентном составе аминокислот в исследуемых объектах получают при использовании ГЖХ, ВЭЖХ, аминокислотных анализаторов.

Широкое распространение в анализе аминокислот получили аминокислотные анализаторы [1, 7, 19, 20, 23, 27, 29–31, 34]. Данный метод анализа основан на разделении аминокислот с помощью ионообменной хроматографии с по-

следующим фотоколориметрическим определением продуктов реакции с нингидрином. Образец, после предварительной очистки от высокомолекулярных балластных веществ, подают, с помощью буферного раствора, на колонку, заполненную ионообменником. При этом аминокислоты, вследствие различного сродства по отношению к иониту, имеют разное время удерживания на колонке. Последовательность выхода отдельных компонентов из колонны определяется как свойствами, так и температурой колонны и составом буферного раствора, являющегося элюентом.

После разделения смеси аминокислот на отдельные компоненты проводят их детекцию. Из ряда методов детектирования наиболее часто используют цветную реакцию аминокислот с нингидрином, продукт которой имеет синефиолетовый цвет (окраска Румана) [53, 68]. Поэтому, вытекающий из колонны буферный раствор, с разделенным на аминокислоты исследуемым образцом, смешивают с раствором нингидрина. Реакцию аминокислот с нингидрином обычно проводят в течение 4 мин при 100 °С. Интенсивность окраски продукта реакции определяют фотоколориметрически при двух длинах волн. α -Аминокислоты, имеющие первичную аминогруппу, образуют с нингидрином продукт пурпурной окраски, интенсивность которой измеряется при длине волны 570 нм, а вторичные амины (пролин и оксипролин) с нингидрином образуют продукты желтой окраски, интенсивность которой определяют при длине волны 440 нм [27, 30]. Результаты регистрируют в форме пиков абсорбции света элюатом из колонны по окончании цветной реакции. Причем, величина пика прямо пропорциональна концентрации данного вещества в растворе [29].

В настоящее время перспективным направлением фармации является оптимизация условий повышения выхода аминокислот из объектов природного происхождения, что позволяет увеличить ассортимент малотоксичных лекарственных средств с широким спектром фармакологической активности. Наиболее часто количественную оценку содержания аминокислот проводят с использова-

нием аминокислотных анализаторов, что обусловлено высокой точностью определения, производительностью, а также возможностью получения данных о количественной оценке, как суммарного содержания аминокислот, так и в отдельности.

Так, разработана технология выделения суммы аминокислот из экстракта мумие сухого, основанная на его многократном экстрагировании горячей водой, с последующей очисткой полученного извлечения от балластных веществ под действием этанола. Также оптимизированы условия проведения кислотного гидролиза экстракта мумие сухого, который осуществляют под действием 6 н. раствора кислоты хлороводородной при температуре 105 ± 1 °С в течение 24 ч. При этом установлено, что суммарное содержание аминокислот в различных образцах экстракта мумие сухого после гидролиза составило 1,8–11,8 %, что значительно превышает аналогичный показатель до гидролиза – 0,04–3,5 %. Кроме того, анализ гистограмм аминокислотных фракций свидетельствует о существовании строго определенного соотношения между аминокислотами, которое сохраняется от образца к образцу, независимо от месторождения сырья. Авторами предложено использовать показатель содержания связанных аминокислот (1,8–12 %) и суммы глицина и глутаминовой кислоты (не менее 35 %) в качестве одного из критериев оценки подлинности и доброкачественности экстракта мумие сухого [19].

Изучены условия повышения выхода аминокислот из травы люцерны посевной, обладающей гепатопротекторной, желчегонной, иммуномодулирующей, ранозаживляющей активностью. Установлено, что в результате 24 и 72 ч кислотного гидролиза исходного сырья 6 н. раствором хлороводородной кислоты при температуре 110 °С суммарный выход аминокислот составил 6,5 % и 6,95 % соответственно. При проведении щелочного гидролиза 3 н. раствором лития гидроксида в аналогичных условиях содержание суммы аминокислот составило 7,2 % и 4,3 % соответственно. Анализ гистограммы аминокислотного анализа

тора показал, что при кислотном гидролизе в наибольших количествах в сырье содержатся аспарагиновая (свободная и связанная – 0,45 и 1,03 % соответственно) и глутаминовая (преимущественно связанная – 0,95 %) аминокислоты. Щелочной гидролиз, в отличие от кислотного позволяет значительно увеличить выход глицина и орнитина (1,03 и 1,16 % соответственно), что, по мнению авторов, связано с выделением указанных аминокислот из белков или пептидов, легче гидролизующихся в условиях щелочного гидролиза. Кроме того щелочной гидролиз, также как и кислотный, способствовал увеличению выхода кислоты глутаминовой (0,99 %) [31].

Полученные данные говорят о перспективности использования кислотного и щелочного гидролиза для получения новых лекарственных средств природного происхождения с высоким содержанием α -аминокислот.

Применение аминокислотных анализаторов позволяет разделить исследуемый образец на отдельные компоненты и определить их количество быстро и с высокой точностью. Главным недостатком данного метода анализа является высокая стоимость оборудования, что делает его недоступным для большинства лабораторий.

Более доступными и простыми являются фотоколориметрические и спектрофотометрические методы анализа α -аминокислот, основанные на их взаимодействии с нингидрином. Так, В.А. Храмовым модифицирован метод определения диаминокислот по Чинарду [26]. Метод основан на образовании краснокоричневых продуктов взаимодействия диаминокислот с нингидрином с последующим фотоколориметрическим определением при длине волны 490 нм. Метод является специфичным: нейтральные аминокислоты, а также амины и диамины при рН 1 с нингидрином окрашенных продуктов не образуют. Несмотря на доступность и простоту данный метод не является универсальным для всех α -аминокислот и позволяет определить лишь диаминокислоты, из которых наи-

большее практическое значение имеет незаменимая аминокислота лизин. Кроме того, этим методом можно определить пролин.

Учитывая невысокую стабильность продуктов реакции аминокислот с нингидрином, разработан модифицированный способ количественного определения суммарного количества аминокислот в крови и других биологических жидкостях [3]. Метод основан на том, что нингидрин способен дезаминировать α -аминокислоты. Реакция, по сведениям авторов наиболее полно проходит при рН 5,4 на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Нингидрин-аммиачный комплекс разрушается кислотой хлороводородной при нагревании, а остаток нингидрина – водорода пероксидом. На этой стадии метода аминный азот находится в растворе в виде аммиака. Его перегоняют из щелочной среды и количественно определяют добавлением реактива Несслера с последующим фотометрическим определением при длине волны 475 нм. Предложенный метод достаточно специфичен – в реакции участвует лишь азот α -аминогрупп аминокислот. Однако данный способ анализа характеризуется громоздкостью (состоит из 6 стадий), связан с использованием токсичных и агрессивных реактивов: кислота хлорная, 30 % раствор водорода пероксид, реактив Несслера.

Под руководством Ярыгиной Т.И. исследованы спектры поглощения продуктов реакции кислоты аспарагиновой с нингидрином, полученных при значениях рН от 5,8 до 8,0. Они характеризуются двумя четко выраженными максимумами при длинах волн 400 ± 2 нм и 568 ± 4 нм и одним минимумом в области 455–460 нм, положение которых не зависит от рН буферного раствора и концентрации кислоты аспарагиновой. Интенсивность поглощения окрашенного продукта зависит от реакции среды, оптимальное значение рН составило 6,4. Разработана методика проведения реакции: нагревание раствора кислоты аспарагиновой с 1 % этаноловым раствором нингидрина в течение 30 мин, аналитическая длина волны составила 568 нм. При изучении зависимости светопоглощения продукта реакции от концентрации раствора кислоты аспарагиновой (в пределах

концентраций от 0,625 до 5 мкг/мл), авторы установили ее подчинение закону светопоглощения [40].

С целью изучения аналитических возможностей данной реакции, проведено количественное определение кислоты аспарагиновой в лекарственном препарате «Аспаркам». Авторами было установлено, что введение в реакционную смесь ионов магния в концентрациях, близких к его содержанию в «Аспаркаме» не влияет на величину оптической плотности. Ионы калия всегда присутствуют в реакционной среде (содержатся в добавляемом буферном растворе), на ход реакции не влияют. Растворы продуктов реакции калия и магния аспарагината с нингидрином подчиняются основному закону светопоглощения в пределах концентраций соединений 0,875–7 мкг/мл. Коэффициент корреляции калибровочных графиков составил 0,999–1,000. Методика отличалась хорошей воспроизводимостью, относительная ошибка среднего результата составила $\pm 2,25\%$ [45].

Авторы продолжили исследования по оптимизации условий нингидриновой реакции с целью расширения ее аналитических возможностей. В результате предложены методы количественного определения аминалона (γ -аминомасляной кислоты) в субстанции и в таблетках, кислоты аминокaproновой для инъекций, фенибута (4-амино-3-фенилбутановой кислоты) в таблетках. Методики анализа основаны на реакции данных аминокислот с 1 % этаноловым раствором нингидрина при 100 °С в течение 25 мин в среде фосфатного буферного раствора со значением pH 6,4–7,6 в присутствии 1 мг кислоты аскорбиновой. Продукты реакции охлаждают в искусственных условиях, разбавляют водой и определяют значение оптической плотности при длине волны 568 нм в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Авторы утверждают, что аскорбиновая кислота способствует восстановлению нингидрина, при этом повышается чувствительность реакции и стабильность образующегося окрашенного продукта [46].

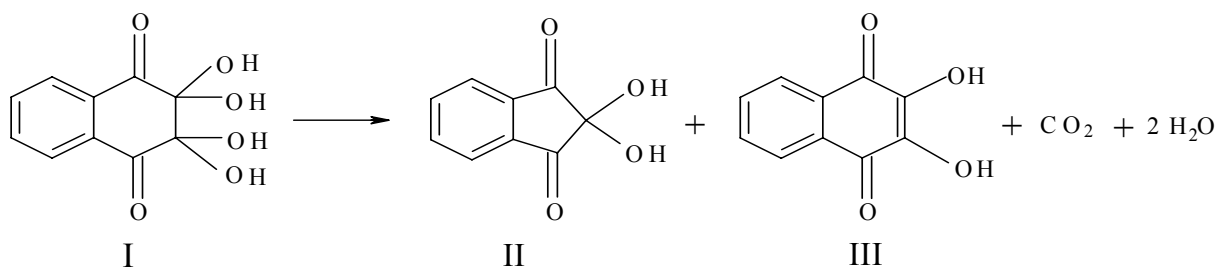
При исследовании нингидриновой реакции с фенибутом установлено, что спектр продукта характеризуется двумя четко выраженными максимумами поглощения при длине волны 400 ± 2 и 568 ± 4 нм, положение которых не зависит от рН буферного раствора и концентрации фенибута. Реакция среды существенно влияет на интенсивность поглощения, оптимальное значение рН – 6,4. Выбор длины волны 568 нм в качестве аналитической связан с более высокой стабильностью продукта реакции по сравнению с аналогичным показателем, измеряемым при длине волны 400 нм. Так, при длине волны 568 нм максимальная оптическая плотность достигается нагреванием реакционной смеси в течение 30 мин и остается постоянной при нагревании до 90 мин. Оптическая плотность при длине волны 402 нм увеличивается в течение всего периода нагревания. При изучении влияния природы растворителя нингидрина в ряду: этанол – метанол – ДМФА – вода – изопропанол установлено, что положение максимумов практически не меняется; интенсивность поглощения непосредственно зависит от применяемого растворителя. Наибольшее значение оптической плотности достигается при проведении реакции с этаноловым и метаноловым растворами нингидрина, затем она уменьшается в ряду ДМФА – вода – изопропанол. Оптимальной средой проведения реакции является этанол (20–30 % в реакционной смеси). Реакция количественно протекает при соотношении фенибут – нингидрин 1:20 (в моль). Дальнейшее увеличение избытка нингидрина не влияет на количество образующегося продукта. Оптимальный объем буферного раствора 4–6 мл; объем нагреваемой смеси не должен превышать 15 мл [49].

Разработанные методы анализа [40, 45, 46, 49] показывают возможность использования реакции с нингидрином для количественного определения аминокислот, имеющих различные положения аминогрупп в цепи. Кроме того, методы характеризуются высокой точностью и простотой исполнения, не требуют применения дорогостоящего оборудования.

Предложен спектрофотометрический метод анализа суммы свободных аминокислот различных видов пыльцы, основанный на взаимодействии с 2 % этаноловым раствором нингидрина с последующим спектрофотометрическим определением продукта реакции при длине волны 568 нм. Метод характеризуется высокой точностью определения, что позволяет проводить стандартизацию пыльцы по суммарному содержанию аминокислот [23].

В настоящее время нингидрин не производится отечественной промышленностью, что обуславливает его высокую стоимость. Вместе с тем, по данным Е.А. Зенковой с соавт. [16], перспективным источником получения нингидрина является 1,2,3,4-тетрагидро-1,4-диоксо-2,2,3,3-тетрагидроксинафталин (оксолин) – широко известный лекарственный препарат, обладающий противовирусной активностью [33].

В литературе описаны примеры использования оксолина в качестве цветного реагента для анализа аминокислот методом бумажной хроматографии. По сравнению с нингидрином он в десять раз менее токсичен (LD_{50} оксолина > 700 мг/кг, а LD_{50} нингидрина 78 мг/кг). Появление красно-фиолетового окрашивания пятен аминокислот на хроматограммах после проявления раствором оксолина с последующим нагреванием обусловлено образованием нингидрина *in situ*. При этом 1,2,3,4-тетрагидро-1,4-диоксо-2,2,3,3-тетрагидроксинафталин (I) разлагается на нингидрин (II), изонафтазарин (III) и диоксид углерода [16]:



Установлено, что по сравнению с нингидрином использование I как цветного реагента в анализе аминокислот и других биогенных аминов методом ТСХ приводит к значительному снижению чувствительности определения [16]. По

мнению авторов это обусловлено присутствием в реакционной смеси изонафтазарина (III), который способствует образованию окрашенного фона на хроматограмме и снижению точности определения.

На этом основании авторами оптимизированы условия и предложена методика получения нингидринового реактива, очищенного от изонафтазарина: 1 % раствор оксолина нагревают при температуре 90 °С, рН 5,0 в течение 1 ч. Полученную реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и обрабатывают 2 % раствором свинца ацетатом или 5 % раствором меди сульфата. Образующийся осадок (соль изонафтазарина) отделяют фильтрованием. Маточный раствор представляет собой 0,3 % водный раствор нингидрина [16, 17].

Установлено, что использование раствора меди сульфата для осаждения изонафтазарина более рационально, т.к. ионы свинца, в отличие от меди, образуют достаточно прочный комплекс с нингидрином и тем самым мешают проведению реакции с аминокислотами. Кроме того, доказано, что присутствие ионов меди в нингидриновом реактиве способствует повышению чувствительности обнаружения аминокислот на хроматограммах, а также обеспечивает высокую стабильность продукта реакции [17]. Полученный нингидриновый реактив авторы использовали не только для качественного, но и для количественного анализа. Так, разработана доступная методика анализа таблеток «Аминалона» методом спектрофотометрии продуктов реакции. На первом этапе были приготовлены этаноловые растворы стандартного и испытуемого образцов γ -аминомасляной кислоты. Затем проводили нингидриновую реакцию: к 2 мл стандартного и испытуемого растворов добавляли 4 мл нингидринового реактива, полученного по методике, указанной выше, и нагревали при температуре 90 °С в течение 10 мин. После искусственного охлаждения измеряли оптическую плотность продуктов реакции при длине волны 535 нм на спектрофотометре в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Авторы подчеркивают, что продукты реакции в присутствии ионов меди характеризуются высокой

стабильностью, а сама методика – точностью анализа ($\varepsilon = 3,77 \%$) и воспроизводимостью.

Таким образом, несмотря на широкую известность реакции нингидрина с α -аминокислотами и, казалось бы детальную ее изученность, отдельные аспекты практического применения данной реакции продолжают оставаться недостаточно разработанными.

С этих позиций представляет интерес изучение спектральных характеристик продуктов нингидриновой реакции 20-ти наиболее важных в биологическом отношении α -аминокислот, оптимизация условий ее проведения с целью разработки точного и доступного метода количественного определения α -аминокислот в растительном сырье, субстанциях и суммарных лекарственных препаратах.

Исследование спектральных характеристик продуктов реакции α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне

В соответствии с ГФ XI наиболее часто в хроматографических методах анализа α -аминокислот используют 0,2 % раствор нингидрина в ацетоне [5, 14]. На этом основании мы изучили спектры продуктов реакции для 20-ти α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне с целью создания нового метода количественного анализа аминокислот в различных объектах.

Нингидриновую реакцию проводили по методике, указанной в ФСП на кислоту глутаминовую в разделе «подлинность»: к 1 мл 2 % раствора α -аминокислоты прибавляют 1 мл свежеприготовленного 0,2 % раствора нингидрина в ацетоне и нагревают до появления сине-фиолетовой окраски [22]. Цистеин и тирозин, вследствие их низкой растворимости в воде, использовали в виде менее концентрированных 0,04 % растворов. После полного охлаждения продукты нингидриновой реакции каждой из 20-ти α -аминокислот разбавляли водой в различных соотношениях до получения значений оптической плотности максимумов поглощения от 0,4 до 1,0.

Исследование спектров поглощения в видимой области показало наличие двух максимумов в диапазонах длин волн 399–405 и 560–570 нм. Данная закономерность наблюдается для 19-ти из 20-ти α -аминокислот (рис. 1–4, табл. 1). Исключение составляет пролин, продукт реакции которого с нингидрином имеет один максимум поглощения в видимой области — при длине волны 416 нм, что объясняется отсутствием первичной аминогруппы в структуре данной α -аминокислоты.

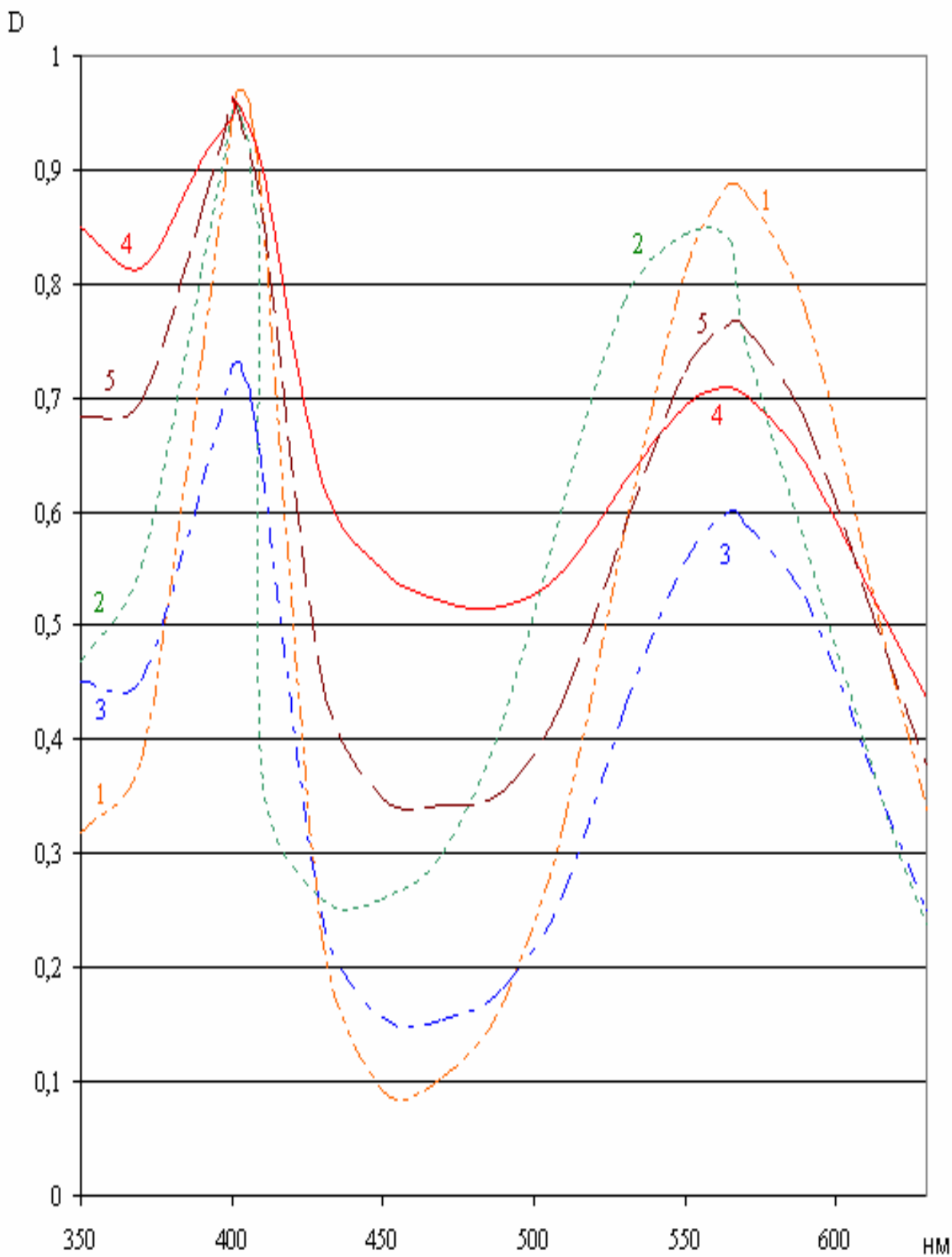


Рис 1. Видимая область спектра продуктов взаимодействия α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне:
1 – глицин; 2 – лейцин; 3 – глутамин; 4 – аргинин; 5 – тирозин.

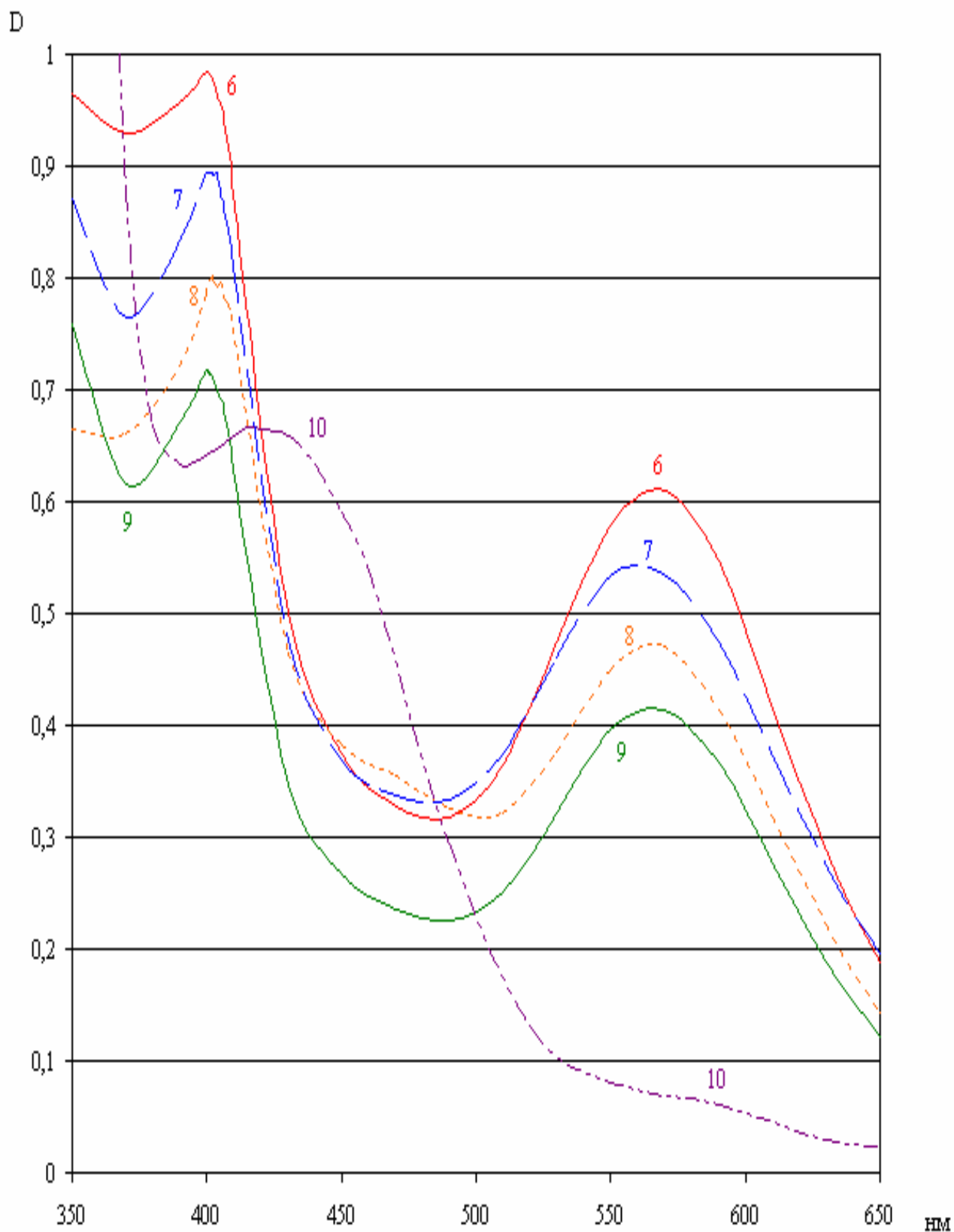


Рис 2. Видимая область спектра продуктов взаимодействия α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне:
6 – аспарагин; 7 – гистидин; 8 – лизин; 9 – цистеин; 10 – пролин

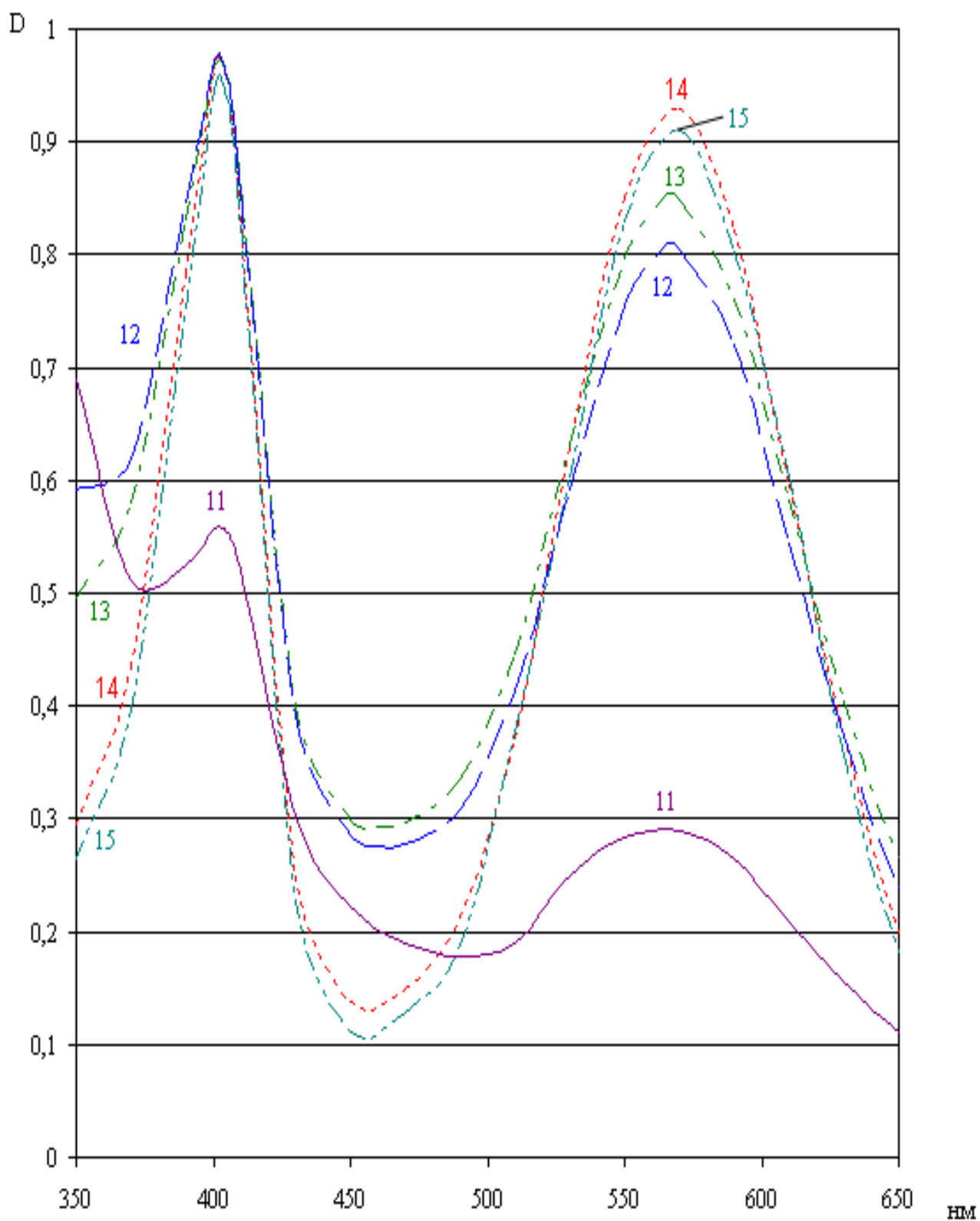


Рис 3. Видимая область спектра продуктов взаимодействия α-аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне:
11 – аспарагиновая кислота; **12** – фенилаланин; **13** – метионин;
14 – изолейцин; **15** – серин.

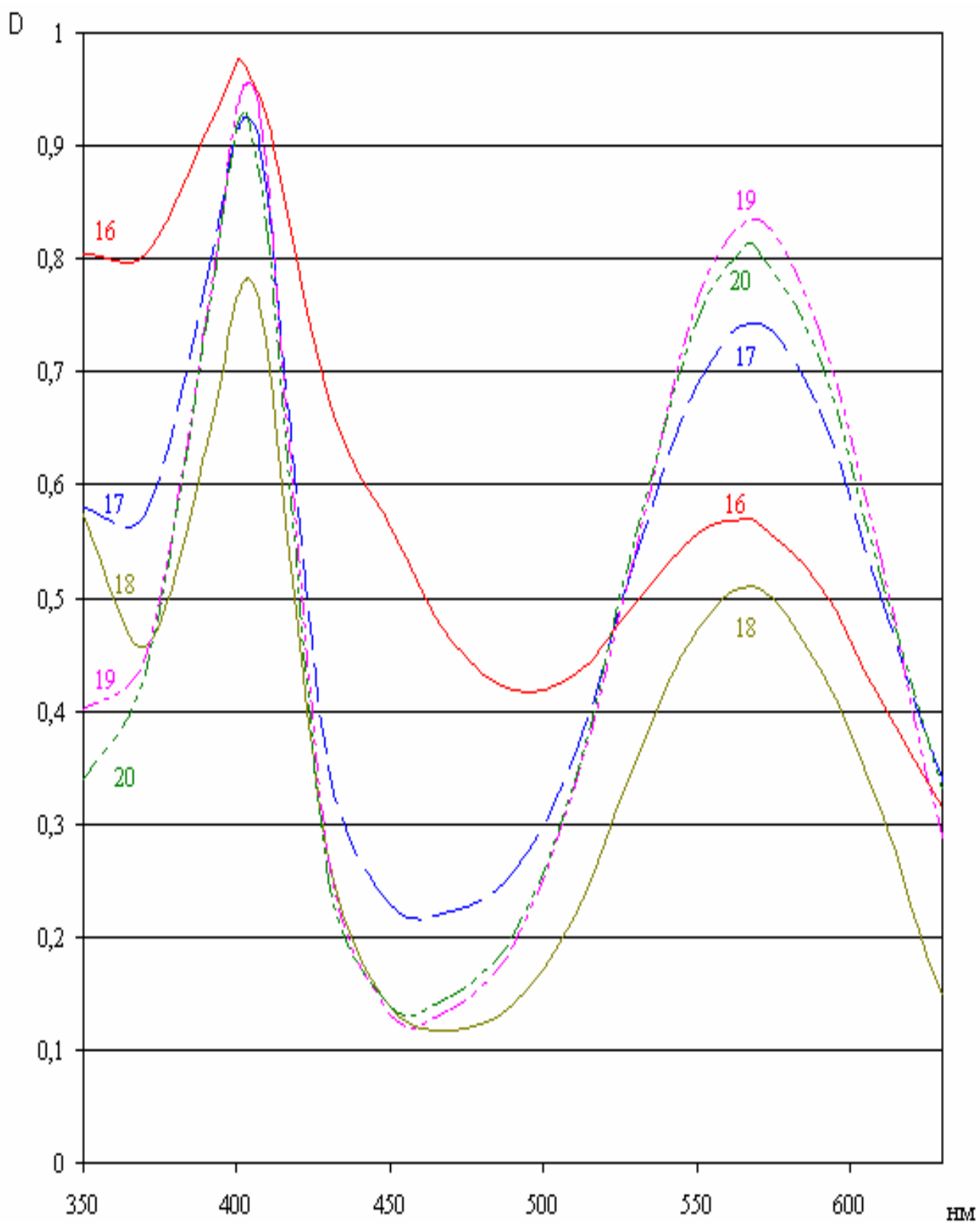


Рис 4. Видимая область спектра продуктов взаимодействия α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне:
16 – триптофан; 17 – валин; 18 – глутаминовая кислота;
19 – аланин; 20 – треонин.

Исследована также УФ-область спектра продуктов реакции 20-ти α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне и установлено, что все они также имеют два максимума поглощения в диапазонах длин волн 220–237 и 254–260 нм (рис. 5–8, табл. 1). Исключение составляет продукт реакции с пролином, максимумы поглощения которого составляют 299 и 343 нм.

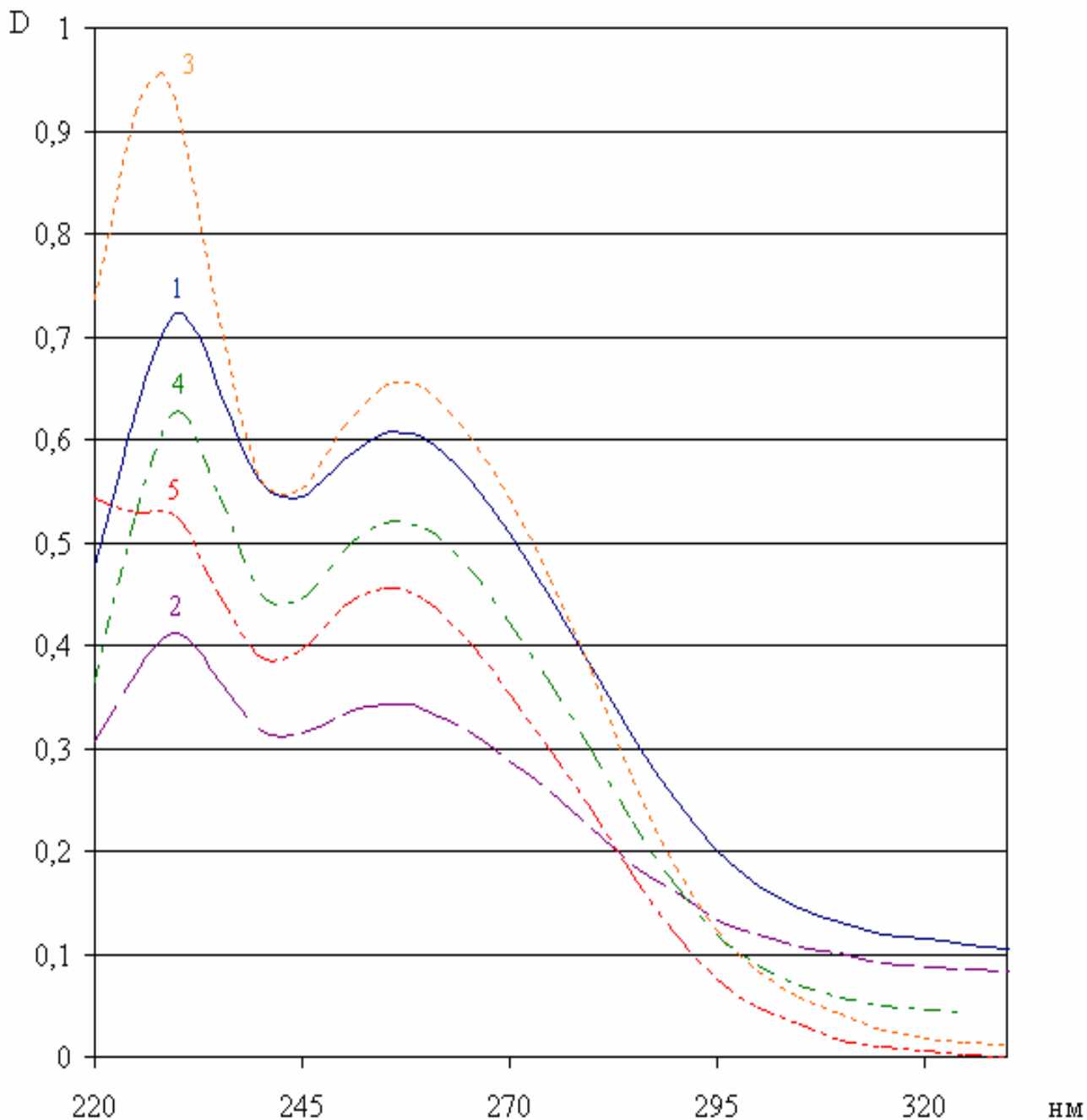


Рис 5. УФ-область спектра продуктов взаимодействия α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне:
1 – цистеин; 2 – аспарагин; 3 – тирозин; 4 – изолейцин; 5 – гистидин

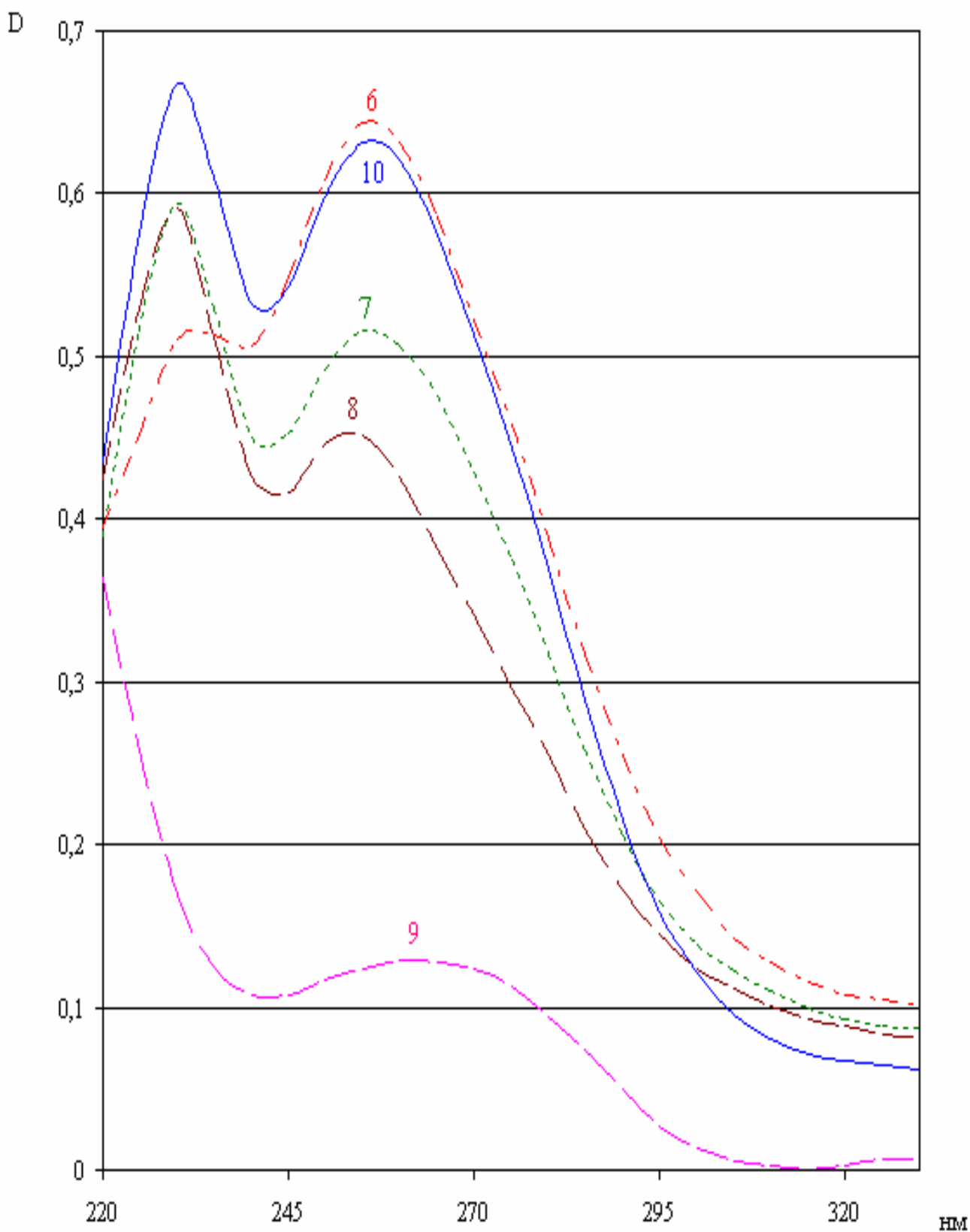


Рис 6. УФ-область спектра продуктов взаимодействия α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне:
6 – аргинин; **7** – аланин; **8** – метионин; **9** – триптофан; **10** – глицин

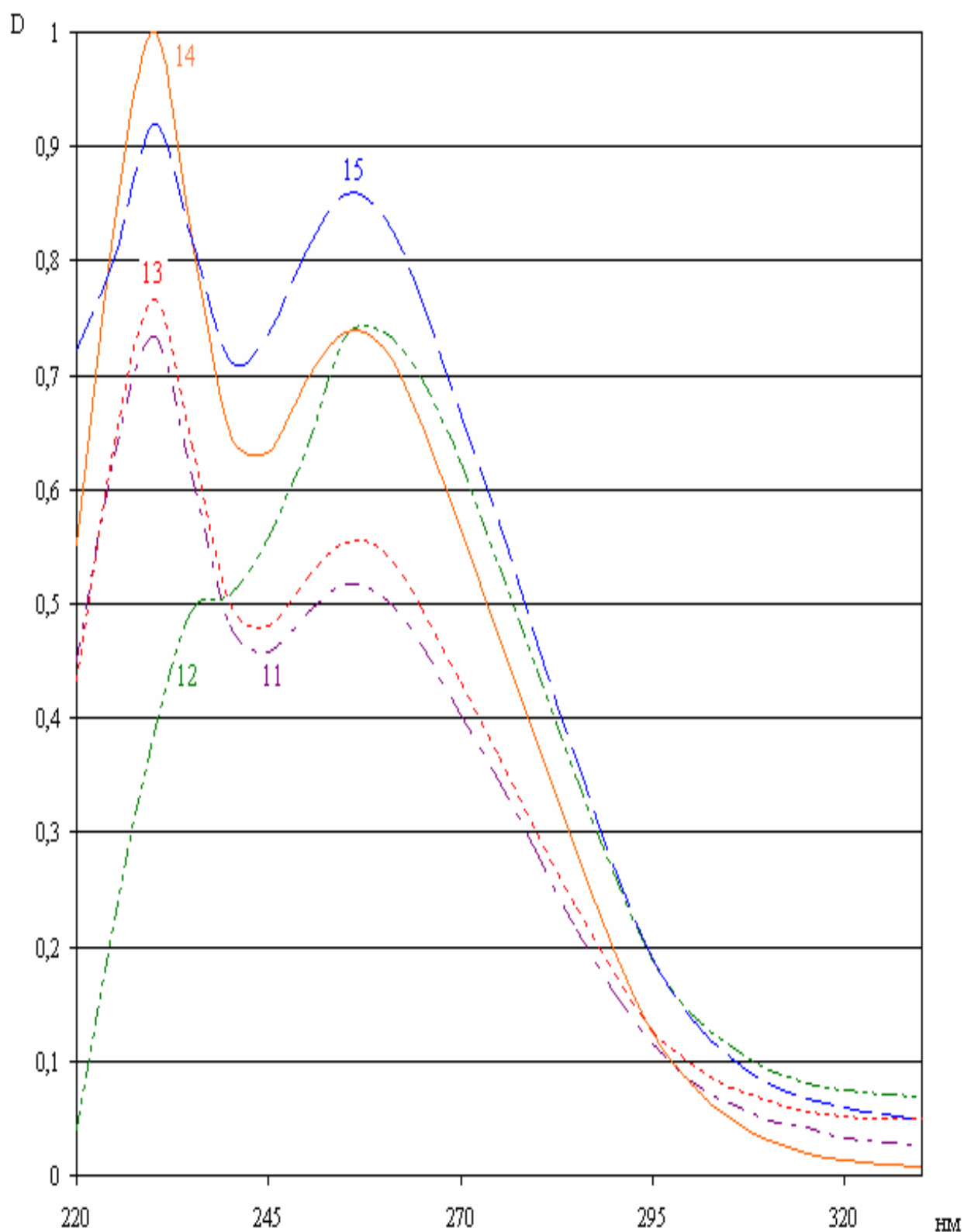


Рис 7. УФ-область спектра продуктов взаимодействия α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне:
11 – треонин; 12 – лейцин; 13 – глутаминовая кислота;
14 – глутамин; 15 – фенилаланин

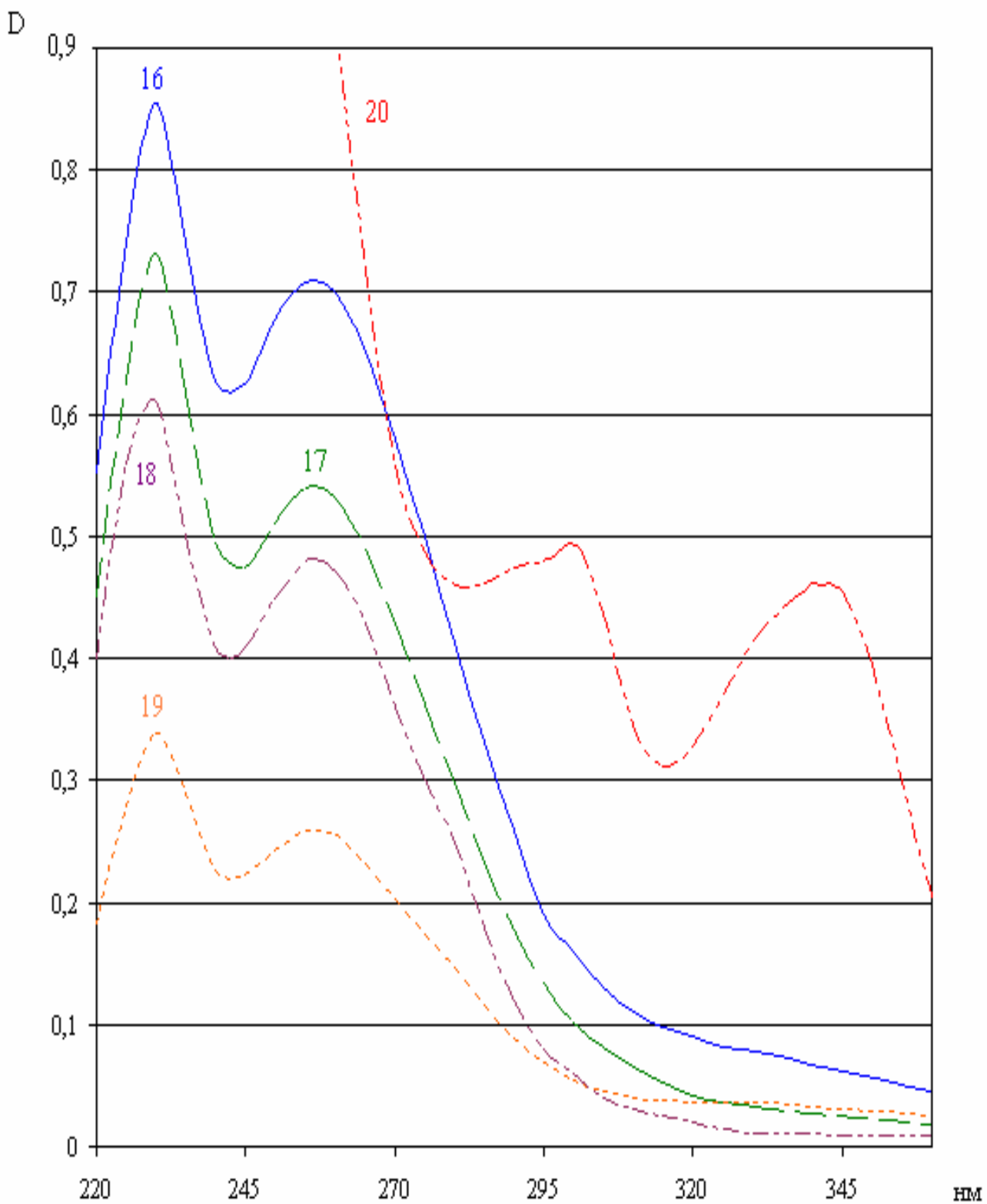


Рис 8. УФ-область спектра продуктов взаимодействия α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне:
16 – аспарагиновая кислота; 17 – валин;
18 – серин; 19 – лизин; 20 – пролин.

Таблица 1.

Характеристика спектров поглощения продуктов реакции
 α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне.

| № п/п | α -Аминокислота | Максимумы поглощения | |
|----------|------------------------|----------------------|-----------------|
| | | УФ-область | Видимая область |
| 1 | Аланин | 231, 251 | 401, 567 |
| 2 | Аргинин | 232, 256 | 400, 561 |
| 3 | Аспарагин | 231, 256 | 400, 568 |
| 4 | Аспарагиновая кислота | 230, 256 | 400, 564 |
| 5 | Валин | 230, 257 | 400, 560 |
| 6 | Гистидин | 229, 255 | 401, 568 |
| 7 | Глицин | 231, 256 | 401, 568 |
| 8 | Глутамин | 230, 256 | 401, 566 |
| 9 | Глутаминовая кислота | 230, 256 | 400, 568 |
| 10 | Изолейцин | 230, 257 | 399, 565 |
| 11 | Лейцин | 237, 258 | 400, 565 |
| 12 | Лизин | 230, 255 | 400, 565 |
| 13 | Метионин | 230, 254 | 401, 566 |
| 14 | Серин | 230, 256 | 401, 567 |
| 15 | Треонин | 230, 256 | 402, 567 |
| 16 | Тирозин | 228, 258 | 400, 567 |
| 17 | Триптофан | 229, 263 | 401, 568 |
| 18 | Цистеин | 230, 257 | 401, 566 |
| 19 | Фенилаланин | 230, 255 | 401, 564 |
| 20 | Пролин | 299, 343 | 416 |

В табл. 1 приведены максимумы поглощения (в видимой и УФ-области) продуктов взаимодействия 20-ти α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне. Из данных таблицы видно, что для большинства α -аминокислот характерны четыре максимума поглощения, два из которых находятся в УФ-области, в интервале длин волн 228–237 и 251–263 нм, и два – в видимой области, в диапазоне 399–402 и 560–568 нм.

Оптимизация условий реакции α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне

Как установлено нами выше, большинство продуктов реакции α -аминокислот с раствором нингидрина в ацетоне характеризуются единым максимумом поглощения при длине волны 400 нм, что обуславливает целесообразность использования данной длины волны в качестве аналитической. Нами установлено, что продукты реакции, проведенной по методике, указанной выше, характеризуются низкой стабильностью во времени (для большинства α -аминокислот значение оптической плотности в диапазоне длин волн 399–400 нм и интервале 1–2 ч после начала реакции снижается более чем на 15 %). Поэтому нами изучены оптимальные условия реакции в зависимости от соотношения между ее компонентами (навески и объема раствора α -аминокислоты, объема 0,2 % раствора нингидрина в ацетоне), продолжительности и температурного режима реакции. Для анализа мы использовали фенилаланин.

Влияние количественных соотношений между растворами фенилаланина и нингидрина на стабильность продукта реакции приведено в табл. 2. Реакцию проводили при температуре 100 °С в течение 10 мин (до образования темно-фиолетовой окраски). Продукты после полного охлаждения разбавляли водой и измеряли значение оптической плотности при длине волны 400 нм. О стабильности продуктов реакции мы судили по величине снижения оптической плотности, % за период 1–2 ч после начала реакции.

Таблица 2

Оптимизация количественных соотношений компонентов реакции

| № п/п | Соотношения компонентов реакции | | | Разведе- ние продук- та ре- акции * | D, при $\lambda=400$ нм | |
|----------|---------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------|
| | Фени- лала- нин, г | V _{р-ра} фенилала- нина, мл | V _{р-ра} нингидрина, мл | | Через 1 час | Приращение в течение от 1 до 2 часов, % |
| 1 | 0,02 | 1 | 1 | 1:6 | 0,72747 | 15 |
| 2 | 0,005 | 2,75 | 0,25 | – | 0,06456 | – |
| 3 | 0,005 | 2,5 | 0,5 | 1:3 | 0,60825 | 6,5 |
| 4 | 0,005 | 2,25 | 0,75 | 1:4 | 0,75645 | 12,5 |
| 5 | 0,005 | 2 | 1 | 1:5 | 0,75235 | 13,5 |
| 6 | 0,005 | 1,5 | 1,5 | 1:10 | 0,76256 | 14 |
| 7 | 0,005 | 2,25 | 0,5 | 1:3 | 0,57195 | 11 |
| 8 | 0,005 | 2,75 | 0,5 | 1:3 | 0,41382 | 9,5 |
| 9 | 0,004 | 2,5 | 0,5 | 1:3 | 0,51826 | 9 |
| 10 | 0,006 | 2,5 | 0,5 | 1:3 | 0,58310 | 10 |
| 11 | 0,005 | 2,5 | 0,75 | 1:3 | 0,59274 | 10,5 |
| 12 | 0,005 | 2,5 | 0,25 | 1:2 | 0,63057 | 8,5 |

*Здесь и далее – показывает соотношения между объемами продукта реакции до и после их разведения водой (мл).

На основании полученных данных нами установлены оптимальные соотношения между компонентами реакции: 2,5 мл 0,2 % раствора α -аминокислоты и 0,5 мл 0,2% свежеприготовленного раствора нингидрина в ацетоне. При соблюдении данных условий образуется наиболее стабильный продукт с максимальным значением оптической плотности при длине волны 400 нм.

Мы изучили также влияние продолжительности реакции во времени на величину и стабильность значения оптической плотности продукта (табл. 3). Реакцию проводили с учетом оптимизированных выше соотношений между ее компонентами при температуре 100 °С.

Таблица 3

Оптимизация продолжительности реакции во времени

| № п/п | Продолжительность реакции, мин | Разведение продукта реакции | D, при $\lambda=400$ нм | |
|----------|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|
| | | | Через 1 час | Приращение в течение от 1 до 2 часов, % |
| 1 | 2 | 1:2 | 0,32569 | 10 |
| 2 | 4 | 1:2 | 0,54934 | 9 |
| 3 | 6 | 1:3 | 0,48458 | 8,5 |
| 4 | 8 | 1:3 | 0,56588 | 8 |
| 5 | 10 | 1:3 | 0,60825 | 6,5 |
| 6 | 12 | 1:3 | 0,61945 | 6 |
| 7 | 14 | 1:3 | 0,62521 | 6 |
| 8 | 15 | 1:3 | 0,64187 | 4 |
| 9 | 16 | 1:3 | 0,62891 | 7 |
| 10 | 18 | 1:3 | 0,59476 | 8 |
| 11 | 20 | 1:3 | 0,54398 | 10 |

Анализ данных таблицы 3 показывает, что наиболее стабильный продукт с максимальным значением оптической плотности образуется при проведении реакции в течение 15 мин. Более длительное нагревание приводит к разложению продуктов реакции со значительным снижением оптической плотности. При нагревании реакционной смеси менее 15 мин величина оптической плотно-

сти вначале незначительно возрастает, а затем наблюдается резкое снижение ее значения.

Далее мы изучили влияние температурного режима реакции на стабильность значения оптической плотности продукта при длине волны 400 нм. Реакцию проводили в диапазоне температур от 50 до 110 °С в течение 15 мин (табл. 4).

Таблица 4

Оптимизация температурного режима реакции

| № п/п | t°, °С | Разведение продукта реакции | D, при λ=400 нм | |
|----------|------------|-----------------------------------|-----------------|--------------------------------------------|
| | | | Через 1 час | Приращение в течение от 1 до 2 часов, % |
| 1 | 50 | – | 0,0706 | – |
| 2 | 60 | – | 0,11835 | – |
| 3 | 70 | – | 0,25843 | 12 |
| 4 | 80 | 1:2 | 0,38956 | 8 |
| 5 | 90 | 1:3 | 0,48453 | 6 |
| 6 | 100 | 1:3 | 0,64187 | 4 |
| 7 | 110 | 1:3 | 0,55917 | 10 |

Мы установили, что при температуре ниже 70 °С реакционная смесь характеризуется отсутствием максимумов поглощения в диапазонах длин волн 399–402 и 560–570 нм а также характерной сине-фиолетовой окраски. Наиболее высокие и стабильные значения оптической плотности наблюдаются при проведении реакции с температурным режимом 100 °С (за период 1–2 ч после начала реакции значение оптической плотности при длине волны 400 нм снизилось на 4 %). Проведение реакции выше 100 °С нецелесообразно т.к. образующийся продукт нестабилен во времени.

Таким образом, нами установлены оптимальные условия проведения реакции α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне и на этом основании предлагается следующая методика анализа: к 2,5 мл 0,2 % раствора α -аминокислоты добавляют 0,5 мл 0,2 % раствора нингидрина в ацетоне и нагревают при температуре 100 °С в течение 15 мин (для лизина продолжительность реакции составляет 3–5 мин, т.к. более длительное нагревание приводит к разложению продукта реакции). После полного охлаждения продукт реакции разбавляют водой очищенной и спустя 1 ч после начала реакции определяют значение оптической плотности в диапазонах длин волн 399–402 нм на спектрофотометре в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

Данные условия проведения реакции мы использовали для большинства α -аминокислот, однако цистеин и тирозин вследствие их низкой растворимости в воде использовали в концентрации 0,04 % растворов по 2,5 мл.

С целью выявления подчинения закону светопоглощения продуктов реакции α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне при длине волны 400 нм нами исследована зависимость светопоглощения от концентрации α -аминокислоты (рис. 9).

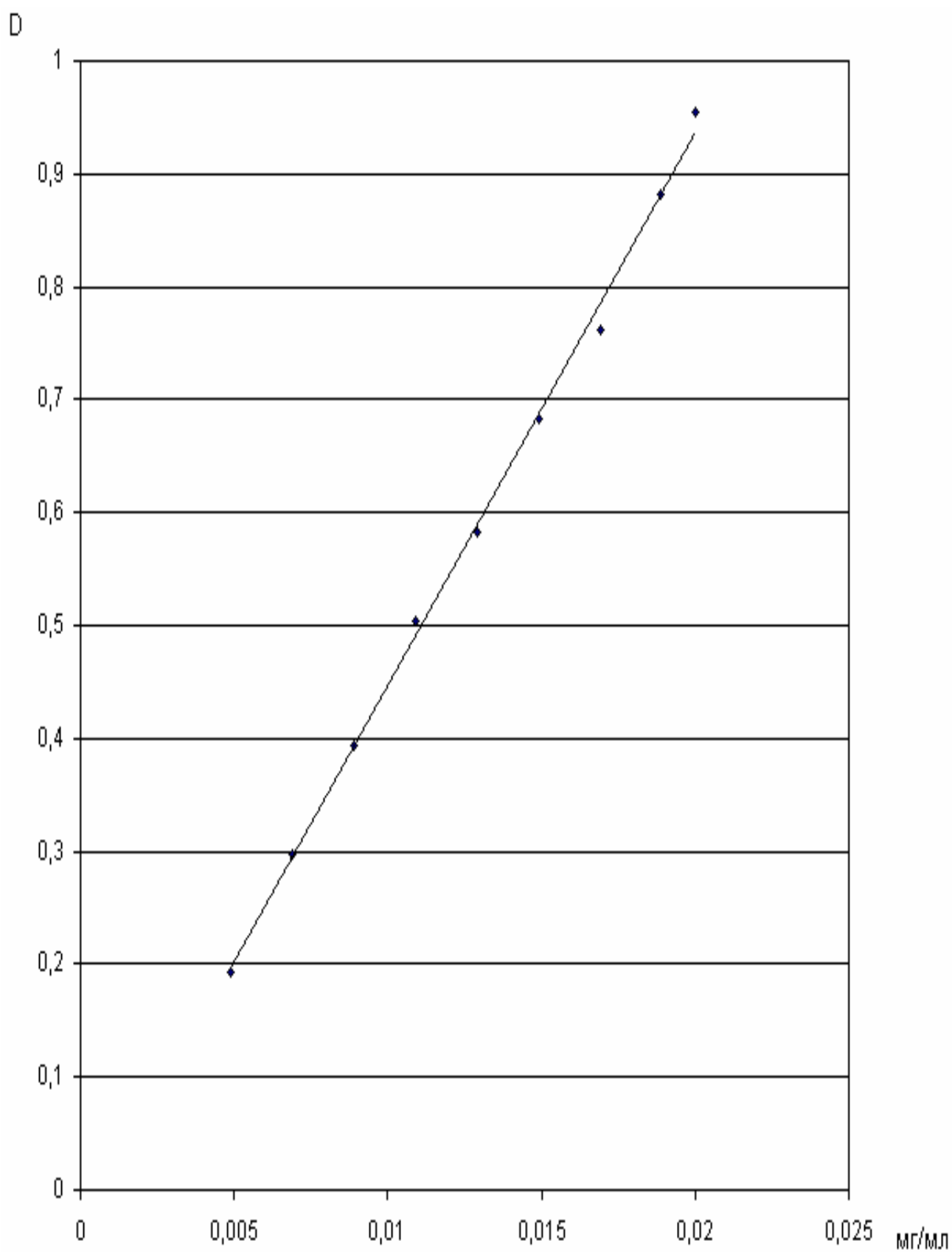


Рис 9. Калибровочный график продукта реакции метионина

На рис. 9 приведен калибровочный график, который показывает, что продукт взаимодействия метионина с 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне подчиняется закону светопоглощения при длине волны 400 нм в концентрациях от 0,005 до 0,02 мг/мл.

С целью установления аналитических возможностей нингидриновой реакции, нами проведен спектральный анализ раствора нингидрина в ацетоне после его нагревания при температуре 100 °С, без добавления раствора α -аминокислоты (табл. 5). Продукт реакции разбавляли водой до 100 мл.

Таблица 5.

Спектральный анализ 0,2 % ацетонового раствора нингидрина

| № п/п | λ , нм | D |
|-------|----------------|-----------------|
| 1 | 220–240 | 0,88340–0,82691 |
| 2 | 240–270 | 0,64921–0,59522 |
| 3 | 400–405 | 0,17690–0,16592 |
| 4 | 560–570 | 0,13250–0,1100 |

Спектральный анализ показал, что раствор нингидрина в ацетоне имеет светопоглощение в тех же диапазонах длин волн, что и продукты его реакции с α -аминокислотами. Возможно, при нагревании происходит взаимодействие ацетона с нингидрином, и образуются продукты, которые поглощают в УФ- и видимой области спектров. Таким образом, ацетоновый раствор нингидрина может быть использован для количественного определения α -аминокислот только при условии сравнительного анализа спектральных данных продукта реакции анализируемой α -аминокислоты и раствора нингидрина, что существенно усложняет проведение анализа. Кроме того, ацетон является летучим, токсичным и пожароопасным растворителем, что ограничивает его использование.

На этом основании нами изучены продукты нингидриновой реакции в нелетучем растворителе – диметилсульфоксиде (ДМСО).

Исследование реакции α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в диметилсульфоксиде

В следующей серии экспериментов в качестве растворителя для нингидрина мы использовали диметилсульфоксид (ДМСО). Растворы нингидрина в ДМСО часто используют для количественного определения аминокислот с помощью аминокислотных анализаторов [1]. Важно отметить, что ДМСО имеет преимущества по сравнению с ацетоном: данный растворитель нелетучий, имеет невысокую токсичность, взрыво- и пожаробезопасен, что обеспечивает удобство его использования.

В экспериментах, на основании ранее оптимизированных условий реакции, мы использовали 0,2 % раствор нингидрина в ДМСО.

Нами исследованы спектры поглощения продуктов реакции 20-ти α -аминокислот с 0,2 % раствором нингидрина в ДМСО в диапазонах длин волн 220–600 нм. Реакцию проводили в течение 15 мин при температуре 100 °С по методике, которую мы оптимизировали для проведения реакции с раствором нингидрина в ацетоне. После полного охлаждения продукты нингидриновой реакции каждой из 20-ти α -аминокислот разбавляли водой в различных соотношениях до получения значений оптической плотности максимумов поглощения от 0,4 до 1,0. Нами установлены три максимума поглощения при 250, 400 и 560–570 нм. Данная закономерность наблюдается для 18-ти из 20-ти α -аминокислот. Исключение составили продукты нингидриновой реакции с триптофаном и пролином, что объясняется особенностями структуры данных α -аминокислот. Продукт нингидриновой реакции триптофана в УФ-области имеет максимум поглощения при 272 нм, в видимой области спектра максимумы поглощений аналогичны другим α -аминокислотам. Продукт реакции раствора нингидрина в ДМСО с пролином окрашен в жёлтый цвет и имеет два максимума поглощения при длинах волн 300 и 340 нм, в видимой области спектра максимумы поглощения отсутствуют, однако имеется четкое плечо в широком диапазоне длин волн

520–600 нм, с достаточно интенсивным поглощением. Важно отметить, что продукты реакции большинства α -аминокислот имеют единые максимумы поглощения при 250 нм и 400 нм.

По аналогии с ацетоновым раствором нингидрина, нами изучена зависимость светопоглощения продукта реакции с 0,2 % раствором нингидрина в ДМСО от концентрации α -аминокислоты при длине волны 400 нм и установлено её подчинение закону светопоглощения Бугера – Ламберта - Бера (рис. 10).

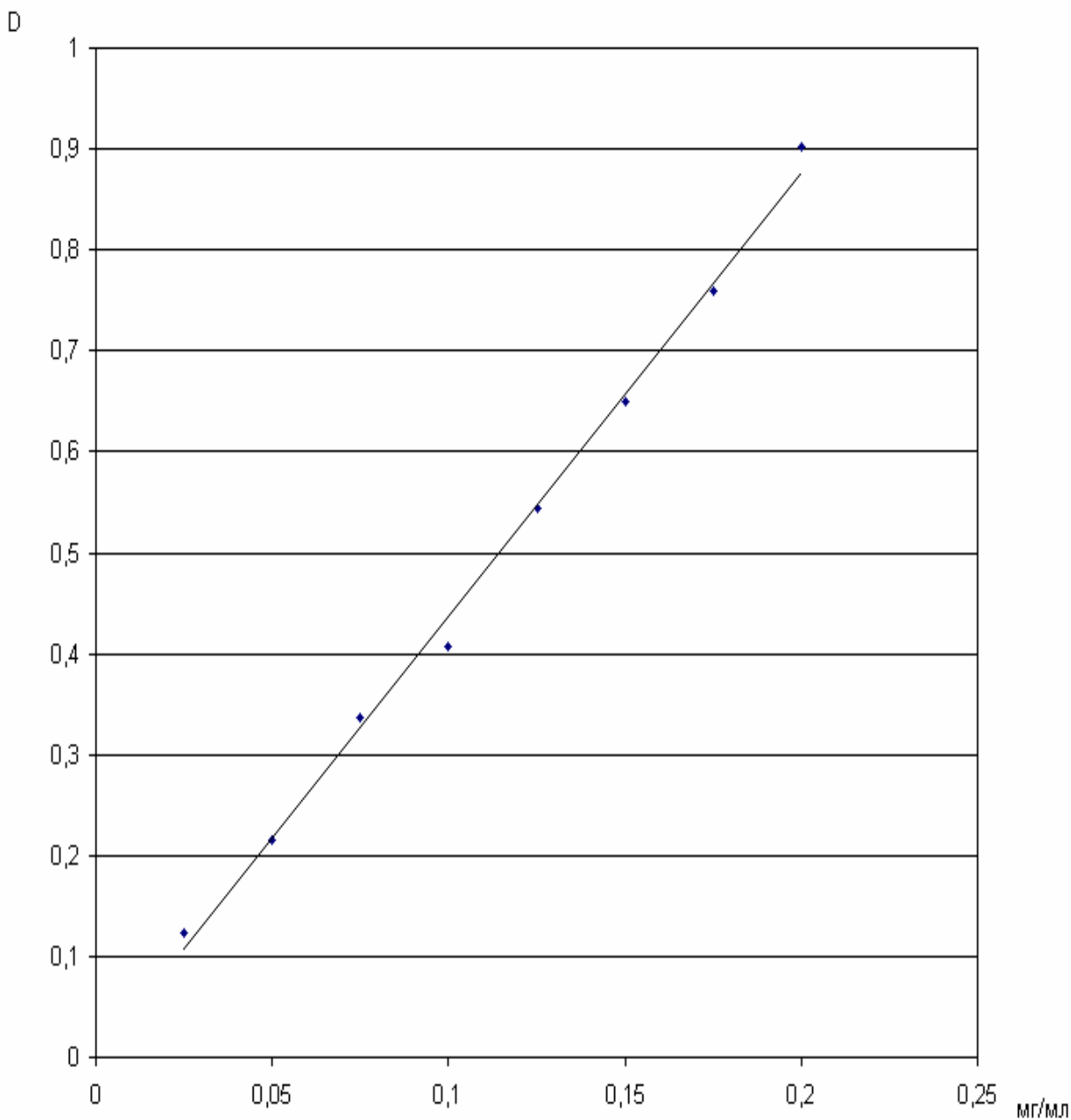


Рис 10. Калибровочный график продукта реакции глицина

На рис. 10 приведен калибровочный график, который показывает, что продукт реакции глицина с 0,2 % раствором нингидрина в ДМСО при длине волны 400 нм подчиняется закону светопоглощения в концентрации глицина от 0,025 до 0,2 мг/мл.

Для выяснения аналитических возможностей реакции нами изучены спектральные характеристики 0,2 % раствора нингидрина в ДМСО в условиях ее проведения, где вместо раствора α -аминокислоты добавляли равное количество воды. После полного охлаждения продукт реакции разбавляли водой до 100 мл (табл. 6).

Таблица 6.

Спектральный анализ 0,2 % раствора нингидрина в ДМСО

| № п/п | λ , нм | D |
|-------|----------------|---------|
| 1 | 250 | 0,86921 |
| 3 | 400 | 0,18491 |
| 4 | 560–570 | 0,20470 |

Спектральный анализ показал, что раствор нингидрина в ДМСО, также как и в ацетоне поглощает в тех же диапазонах, в которых имеют поглощение и продукты его реакции с α -аминокислотами, что существенно усложняет проведение анализа.

Исследование реакции α -аминокислот с 0,2 % водным раствором нингидрина

Для качественного и количественного анализа α -аминокислот достаточно часто используют водный раствор нингидрина [11, 27, 52]. На этом основании нами исследованы спектральные характеристики 0,2 % водного раствора нингидрина после его нагревания при температуре 100 °С в течение 15 мин и установлено, что водный раствор нингидрина имеет интенсивное поглощение в диа-

пазоне длин волн 220–300 нм, но совершенно не поглощает в диапазоне длин волн от 400 до 600 нм (рис. 11).

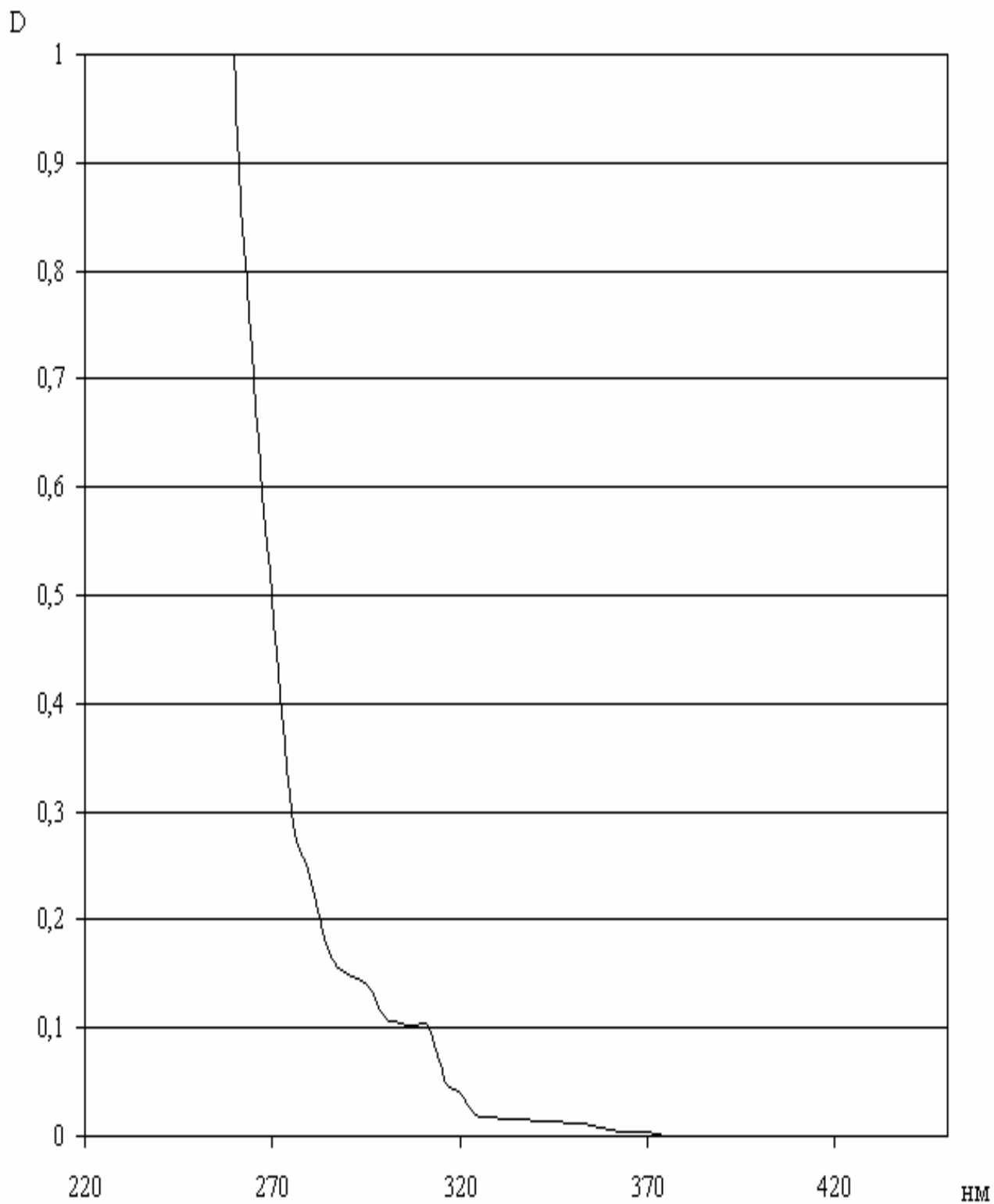


Рис 11. Спектр поглощения водного раствора нингидрина после нагревания при температуре 100 °С в течение 15 мин

Учитывая, что вода является наиболее доступным и безопасным растворителем, наиболее целесообразно проводить спектрофотометрическое исследование продуктов реакции с 0,2 % водным раствором нингидрина в видимой области спектра в диапазоне длин волн – от 400 до 600 нм.

Изучение спектральных характеристик продуктов реакции α -аминокислот с 0,2 % водным раствором нингидрина

Нами проведена нингидриновая реакция с 0,2 % водным раствором нингидрина по методике, указанной в ФСП на кислоту глутаминовую [22]. После полного охлаждения продукты нингидриновой реакции каждой из 20-ти α -аминокислот разбавляли водой в различных соотношениях до получения значений оптической плотности максимумов поглощения от 0,4 до 1,0. и изучали спектральные характеристики продуктов для 20-ти α -аминокислот в диапазоне длин волн 380–600 нм. Было установлено, что спектры поглощения имеют единый максимум при длине волны 400 ± 2 нм и в диапазоне длин волн 550–560 нм.

Исключение составляют продукты реакции с цистеином, пролином и гистидином. Продукт реакции с цистеином характеризуется низкой интенсивностью поглощения в видимой области и имеет максимум при длине волны 450 нм. Пролин – единственная α -аминокислота, в структуре которой отсутствует первичная аминогруппа, этим объясняется отсутствие характерного (при 400 нм) максимума поглощения в видимой области спектра. Однако в диапазоне 395-402 нм отмечается четкое плечо с достаточно интенсивным поглощением. Продукт реакции с гистидином имеет недостаточную интенсивность поглощения в видимой области спектра. Важно отметить, что большинство продуктов реакции характеризуются единым максимумом поглощения при 400 нм (рис. 12–15).

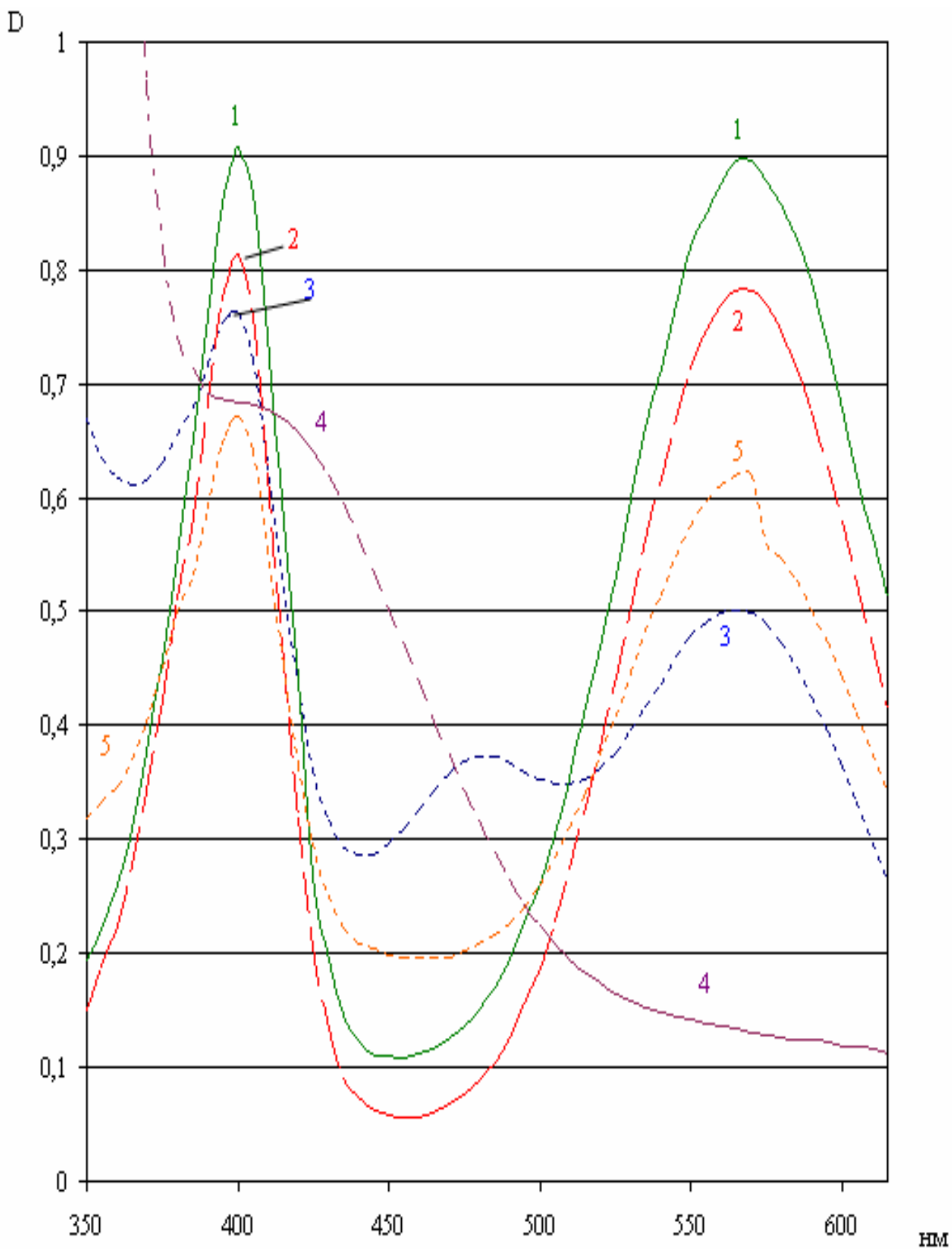


Рис 12. Спектры поглощения продуктов реакции α -аминокислот с 0,2 % водным раствором нингидрина:

1 – треонин; 2 – метионин; 3 – лизин; 4 – пролин; 5 – фенилаланин

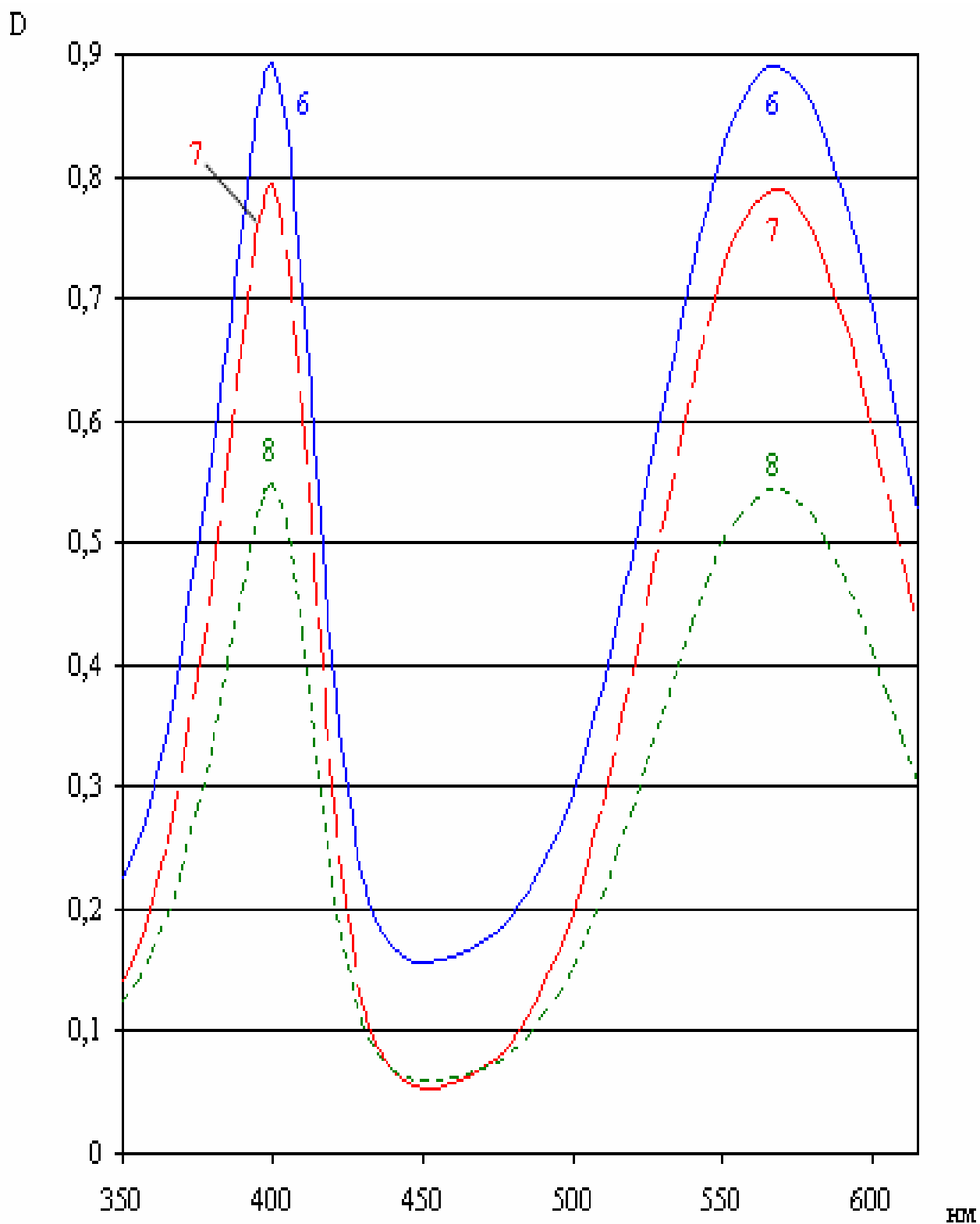


Рис 13. Спектры поглощения продуктов реакции α -аминокислот с 0,2 % водным раствором нингидрина:
6 – глутамин; **7** – серин; **8** – изолейцин.

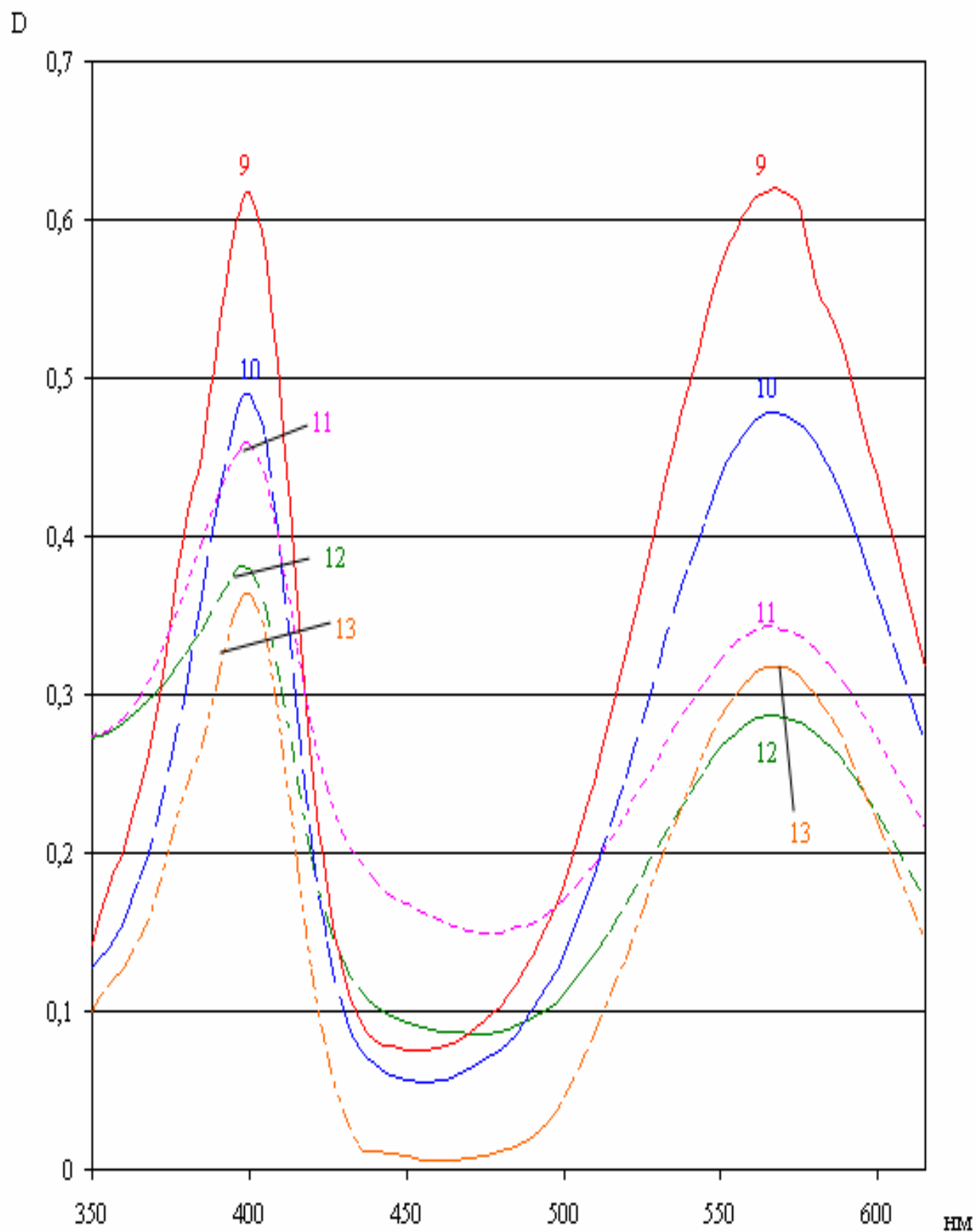


Рис 14. Спектры поглощения продуктов реакции α -аминокислот с 0,2 % водным раствором нингидрина:
9 – глицин; **10** – аргинин; **11** – триптофан; **12** – аспарагин; **13** – тирозин

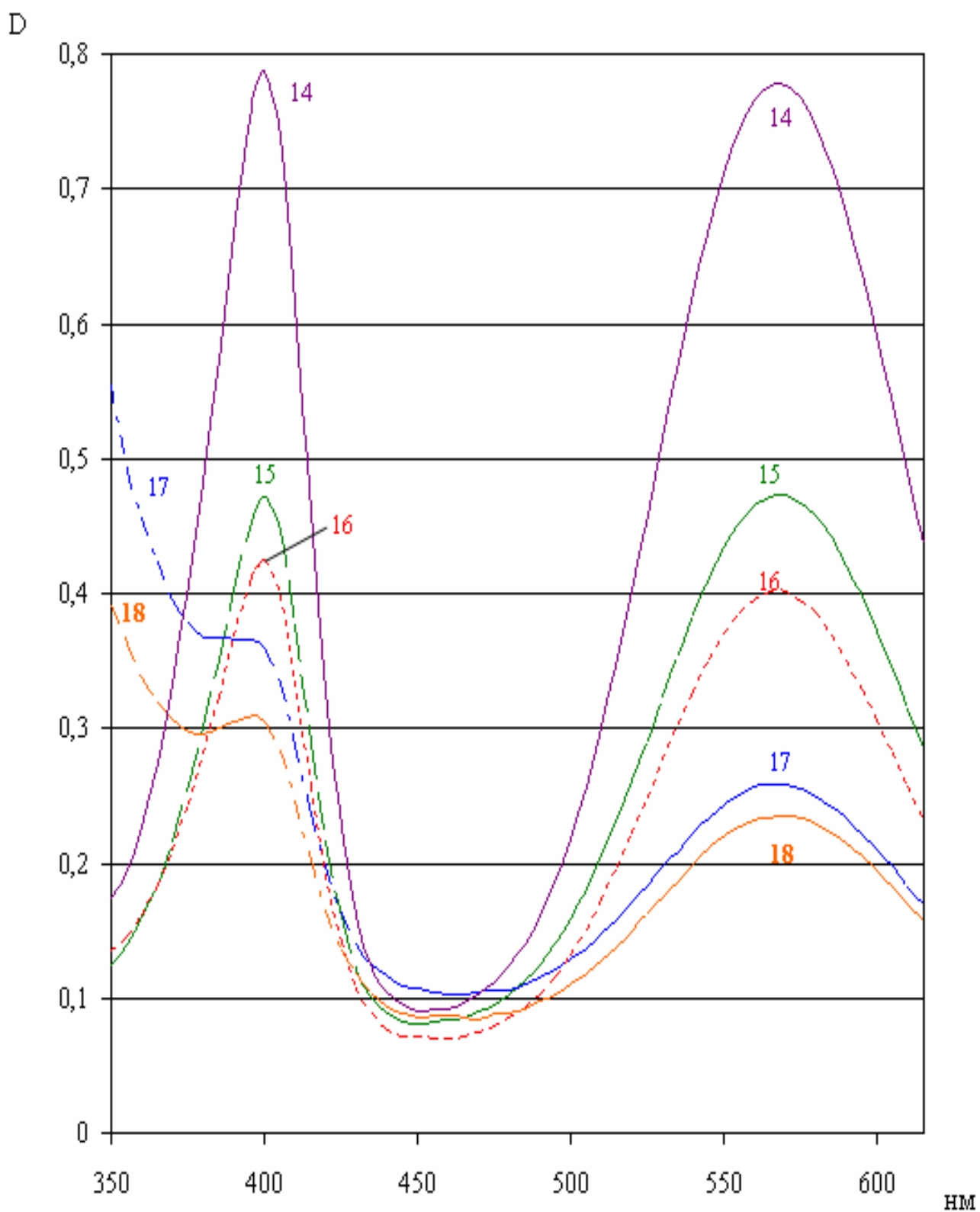


Рис 15. Спектры поглощения продуктов реакции α -аминокислот с 0,2 % водным раствором нингидрина:

14 – лейцин; 15 – аланин; 16 – валин; 17 – аспарагиновая кислота; 18 – глутаминовая кислота

Таким образом, наиболее целесообразно проводить реакцию с использованием водного раствора нингидрина с последующим определением оптической плотности её продукта при длине волны 400 нм.

Оптимизация условий проведения реакции α -аминокислот с 0,2 % водным раствором нингидрина

Нами изучено влияние важнейших факторов (соотношение компонентов реакции, продолжительность и температурный режим) на стабильность и значение оптической плотности при длине волны 400 нм продуктов взаимодействия α -аминокислот с водным раствором нингидрина. Для анализа мы использовали глицин.

При проведении реакции в условиях, указанных в ФСП на кислоту глутаминовую [22], нами установлено, что продукт реакции характеризуется низкой стабильностью значения оптической плотности при длине волны 400 нм во времени. Поэтому, мы провели оптимизацию количественных соотношений между компонентами. Реакцию проводили при температуре 100 °С в течение 15 мин. Продукты, после полного охлаждения, разбавляли водой.

Установлено, что наиболее стабильный продукт во времени наблюдается при проведении реакции между 1 мл 0,1 % раствором глицина и 1,1 мл 0,2 % водного раствора нингидрина (значение оптической плотности за период времени 1–2 ч после начала реакции снижается на 1 %) (табл. 7).

Таблица 7.

Оптимизация количественных соотношений компонентов реакции

| № п/п | Соотношения компонентов реакции | | | Разведение продукта реакции, мл | D, при $\lambda=400$ нм | |
|-----------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------|
| | Глицин, г | V _{р-ра} глицина, мл | V _{р-ра} нингидрина, мл | | Через 1 час | Прираще- ние в течение от 1 до 2 часов, % |
| 1 | 0,02 | 1 | 1 | До 50 | 0,61047 | 19 |
| 2 | 0,01 | 1 | 1 | до 100 | 0,33356 | 15 |
| 3 | 0,005 | 1 | 1 | до 100 | 0,34825 | 11 |
| 4 | 0,0025 | 1 | 1 | до 100 | 0,36545 | 7 |
| 5 | 0,001 | 1 | 1 | до 100 | 0,36835 | 2 |
| 6 | 0,0005 | 1 | 1 | до 50 | 0,36156 | 6 |
| 7 | 0,001 | 1,25 | 1 | до 100 | 0,33295 | 5 |
| 8 | 0,001 | 0,75 | 1 | до 100 | 0,37382 | 6 |
| 9 | 0,001 | 1 | 0,9 | до 100 | 0,34526 | 9 |
| 10 | 0,001 | 1 | 1,1 | до 100 | 0,38110 | 1 |
| 11 | 0,001 | 1 | 1,2 | до 100 | 0,38474 | 5 |
| 12 | 0,001 | 1 | 1,3 | до 100 | 0,38557 | 7 |

Нами также изучено влияние температуры, и продолжительности реакции во времени на стабильность продуктов. Установлено, что наиболее стабильные и высокие значения оптической плотности наблюдаются при проведении реакции в течение 20 мин при температуре 120 °С (табл. 8).

Таблица 8.

Оптимизация температурного режима и продолжительности реакции

| № п/п | t°, °C | Продолжи- тельность реакции, мин | Разведение продукта реакции | D, при $\lambda=400$ нм | |
|----------|------------|-------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------|
| | | | | Через 1 час | Приращение в течение от 1 до 2 часов, % |
| 1 | 80 | 15 | До 100 мл | 0,33638 | 5 |
| 2 | 90 | 15 | До 100 мл | 0,36167 | 2,5 |
| 3 | 100 | 15 | До 100 мл | 0,38110 | 1 |
| 4 | 110 | 15 | До 100 мл | 0,39667 | 1 |
| 5 | 120 | 15 | До 100 мл | 0,41112 | 1 |
| 6 | 130 | 15 | До 100 мл | 0,37312 | 4 |
| 7 | 120 | 25 | До 100 мл | 0,35289 | 5 |
| 8 | 120 | 22,5 | До 100 мл | 0,43140 | 2,5 |
| 9 | 120 | 20 | До 100 мл | 0,45056 | 0,5 |
| 10 | 120 | 17,5 | До 100 мл | 0,43273 | 1 |
| 11 | 120 | 12,5 | До 100 мл | 0,40105 | 3 |
| 12 | 120 | 10 | До 100 мл | 0,38908 | 2 |
| 13 | 120 | 7,5 | До 100 мл | 0,34934 | 5 |

Анализ данных табл. 8 показывает, что период времени 1–1,5 ч после начала реакции характеризуется максимальной стабильностью продукта: значение D остается постоянным с точностью до 0,001. При использовании растворов нингидрина в ацетоне и ДМСО стабильность продуктов реакции значительно ниже. Кроме того, как было описано выше, сам нингидрин в ацетоновом растворе и в растворе ДМСО имеет светопоглощение в тех же диапазонах, что и продукты его реакции с α -аминокислотами. Учитывая доступность и безопас-

ность, вода является наиболее рациональным растворителем для приготовления нингидринового реактива.

С целью изучения возможности взаимодействия нингидрина с водой, нами изучены спектральные характеристики 0,2 % водного раствора нингидрина в оптимизированных условиях проведения нингидриновой реакции (при температуре 120 °С в течение 20 мин), однако вместо раствора α -аминокислоты мы добавили равное количество воды. Установлено, что исследуемый раствор не поглощает в диапазоне длин волн 350–600 нм, в то время как продукты реакции α -аминокислот с водным раствором нингидрина имеют четкий максимум поглощения именно при 400 ± 2 нм, что позволяет использовать эту длину волны для количественной оценки α -аминокислот.

Таким образом, на примере глицина нами установлены оптимальные условия проведения нингидриновой реакции: к 1 мл 0,1 % раствора α -аминокислоты добавляют 1,1 мл 0,2 % водного раствора нингидрина и нагревают при температуре 120 °С в течение 20 мин. После полного охлаждения продукт реакции разбавляют водой до 100 мл и спустя 1 ч после начала реакции на спектрофотометре определяют значение оптической плотности при длине волны 400 нм в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

Нами установлено, что указанные выше условия проведения нингидриновой реакции являются наиболее оптимальными для большинства α -аминокислот.

Исключение составили следующие α -аминокислоты: цистеин, тирозин, аспарагиновая кислота и лизин. Цистеин и тирозин, вследствие их низкой растворимости в воде, мы использовали в виде менее концентрированных 0,04 % растворов, увеличив их объёмы до 2,5 мл. При этом 0,2 % водный раствор нингидрина добавляли в эквимольных количествах по отношению к указанным α -аминокислотам: 0,7 мл – к 2,5 мл 0,04 % раствора цистеина и 0,5 мл – к 2,5 мл 0,04 % раствора тирозина.

Продукты реакции аспарагиновой кислоты и лизина с 0,2 % водным раствором нингидрина отличаются невысокими значениями оптической плотности при длине волны 400 нм. Аспарагиновая кислота – дикарбоновая α -аминокислота, лизин – α -аминокислота содержащая в радикале первичную аминогруппу. По-видимому, за счёт наличия в указанных аминокислотах дополнительных карбоксильной и аминогрупп изменяется рН реакционной среды, что приводит к частичному разложению продуктов реакции. На этом основании мы увеличили объёмы реагентов в 2 раза, т.е. по 2,2 мл 0,2 % водного раствора нингидрина добавляли к 2 мл 0,1 % растворам аспарагиновой кислоты и лизина. Кроме того, для лизина, вследствие нестойкости продукта его реакции с нингидрином, оптимальная продолжительность нагревания составляет 2 мин. Спектры продуктов взаимодействия нингидрина с данными α -аминокислотами снимают на спектрофотометре без предварительного разведения.

На основании оптимизированных условий проведения реакции α -аминокислот с 0,2 % водным раствором нингидрина нами была изучена зависимость светопоглощения продукта реакции от концентрации α -аминокислоты при длине волны 400 нм (рис. 16). Установлено, что продукт взаимодействия глицина с 0,2 % водным раствором нингидрина подчиняется закону светопоглощения в концентрации от 0,005 до 0,025 мг/мл.

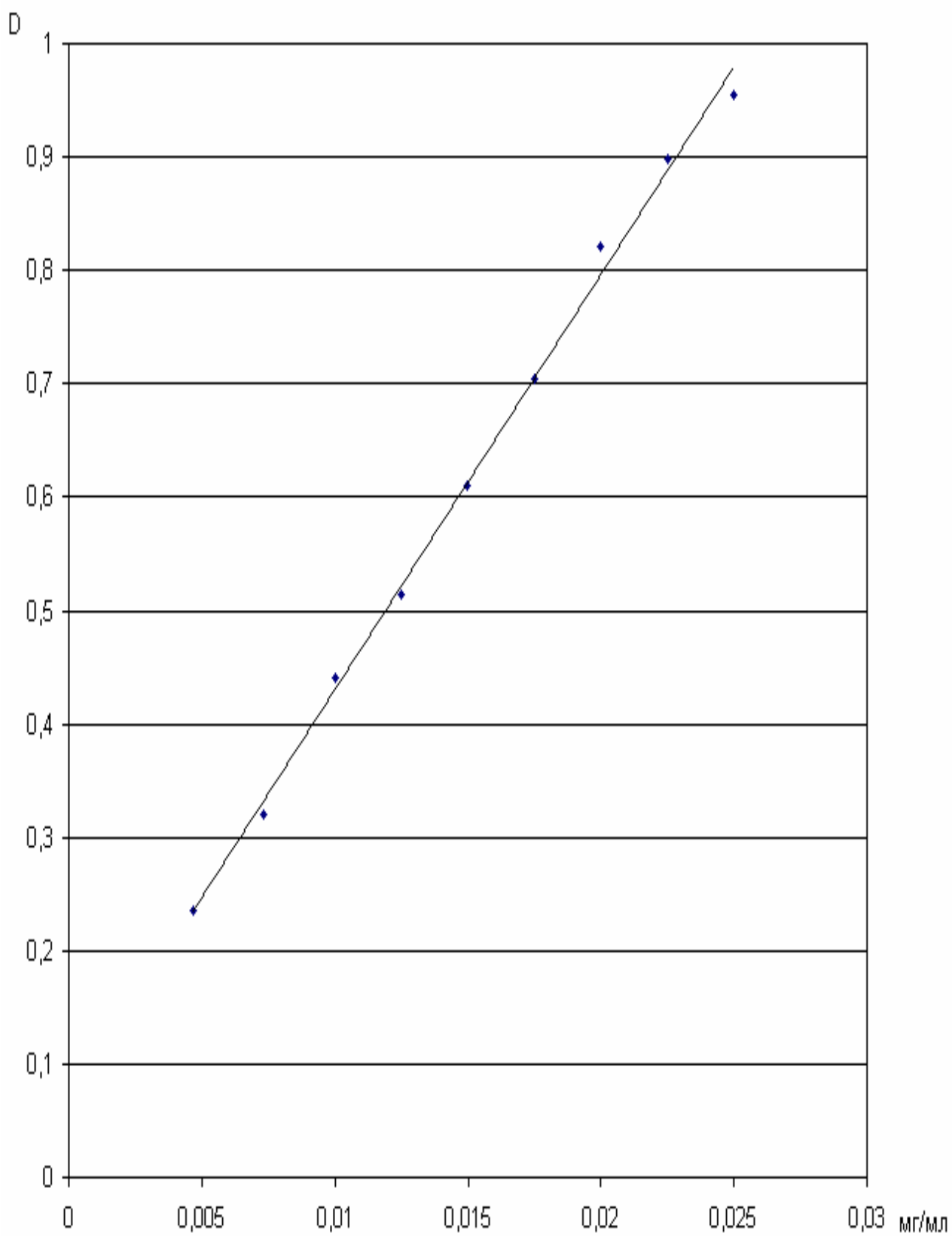


Рис 16. Калибровочный график продукта реакции глицина

Разработка методики

количественного определения глицина в таблетках

С целью подтверждения возможности использования реакции α -аминокислот с 0,2 % водным раствором нингидрина в количественном анализе нами проведено количественное определение глицина в таблетках.

В соответствии с ФСП на глицин таблетки сублингвальные 0,1 г одна таблетка имеет состав [10]:

Глицин 0,1

Метилцеллюлоза водорастворимая (марки МЦ 100) 0,001

Магния стеарат 0,001

Масса таблетки 0,102 г

Для количественного анализа 0,1 г (точная навеска) порошка из 20 растертых таблеток, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в горячей воде, после охлаждения раствор доводят водой до метки и фильтруют через стеклянный фильтр № 3. При этом из раствора удаляют магния стеарат, снижающий интенсивность светопоглощения продукта нингидриновой реакции и, как следствие – воспроизводимости результатов анализа.

При приготовлении раствора глицина из таблеток в него, наряду с основным веществом (глицином), переходит водорастворимая метилцеллюлоза. Поэтому нами были изучены спектральные характеристики 0,1 % раствора метилцеллюлозы в условиях проведения реакции с водным раствором нингидрина: к 1 мл 0,1 % раствора метилцеллюлозы прибавляли 1,1 мл 0,2 % водного раствора нингидрина. Полученную смесь нагревают при температуре 120 °С в течение 20 мин, после чего продукт реакции разбавляют водой до 100 мл и, спустя 1 ч после начала реакции, определяли оптическую плотность исследуемого образца при длине волны 400 нм.

Установлено, что метилцеллюлоза в условиях проведения реакции не поглощает при длине волны 400 нм, а значит, её присутствие в растворе α -аминокислот не влияет на ход реакции с водным раствором нингидрина.

На этом основании нами предложена следующая методика проведения количественного анализа: к 1 мл полученного из навески таблеток глицина раствора прибавляют 1,1 мл 0,2 % водного раствора нингидрина и нагревают при температуре 120 °С в течение 20 мин. После полного охлаждения продукт разбавляют водой до 100 мл и через 1 ч после начала реакции определяют оптическую плотность при длине волны 400 нм на спектрофотометре в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

Параллельно проводят реакцию свежеприготовленного 0,1 % раствора стандартного образца глицина с 0,2 % водным раствором нингидрина и определяют оптическую плотность в аналогичных условиях. Стандартный образец глицина получен многократной дробной кристаллизацией фармакопейного глицина из водно-этанольной смеси.

Содержание глицина в таблетках (X), % вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_x \cdot m_o \cdot (100 - W) \cdot 100 \%}{D_o \cdot m_x \cdot 100}, \text{ где}$$

D_x – оптическая плотность продукта реакции 0,1 % раствора глицина, приготовленного из таблеток, с 0,2 % водным раствором нингидрина;

D_o – оптическая плотность продукта реакции 0,1 % раствора стандартного образца глицина с 0,2 % водным раствором нингидрина;

m_o и m_x – средние массы навесок стандартного образца глицина и глицина из растёртых таблеток, соответственно, г;

W – остаточная влажность субстанции стандартного образца глицина (0,1 %);

На основании проведённых шести параллельных испытаний получены результаты, которые приведены в таблице 9.

Таблица 9.

Результаты количественного определения глицина в таблетках.

| № п/п | Навеска таблеток, г | Навеска глицина, стандарт, г | D, при $\lambda=400$ нм | | Содержание глицина в табл., % |
|-----------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| | | | глицин (табл.) | глицин (стандарт) | |
| 1 | 0,00098 | 0,00099 | 0,45 | 0,46626 | 97,4 |
| 2 | 0,00099 | 0,000995 | 0,4545 | 0,46188 | 98,8 |
| 3 | 0,000994 | 0,00101 | 0,45655 | 0,46717 | 99,2 |
| 4 | 0,00099 | 0,001 | 0,45879 | 0,46552 | 99,45 |
| 5 | 0,000995 | 0,00102 | 0,45941 | 0,4719 | 99,7 |
| 6 | 0,001 | 0,00103 | 0,45745 | 0,46976 | 100,2 |
| Статистическая обработка метода анализа | | $\langle x \rangle = 99,13 \%$; $s^2 = 0,93575$; $s = 0,9673$; $P = 95 \%$; $t(95 \%, 5) = 2,57$; $t_{\text{выч}}(95 \%, 5) = 2,2$; $\Delta x = 2,49$; $\varepsilon = 2,51 \%$ | | | |

В соответствии с ФСП допустимые нормы отклонений в количественном содержании глицина в таблетках составляют $\pm 10 \%$ [10]. На основании данных таблицы 9 видно, что все полученные результаты соответствуют допустимым нормам отклонений, а среднее значение количественного содержания глицина в таблетках составляет $99,13 \%$, что говорит о достаточно высокой точности метода. Кроме того, разработанный метод характеризуется достаточно высокой воспроизводимостью, относительная ошибка результата отдельного определения составила $\pm 2,51 \%$. Метод не требует дорогостоящего оборудования и реактивов и доступен для большинства лабораторий, что обуславливает перспективность его использования в количественном анализе α -аминокислот в лекарственных препаратах.

Разработка методики

количественного определения суммы α -аминокислот в шроте яблок

Нами изучена возможность использования нингидриновой реакции в количественном анализе суммы свободных α -аминокислот в шроте яблок. Кроме того, нами проведена оптимизация и оценка количественного содержания α -аминокислот в сырье после кислотного гидролиза.

Приготовление образца 1. 10,0 г сырья (точная навеска), высушенного до воздушно-сухого состояния шестикратно экстрагируют горячей водой по 1 ч при температуре 80–90 °С (гидромодуль 1:8). Полученные извлечения фильтруют, объединяют, переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводят водой до метки (далее – исходное извлечение или образец 1).

С целью изучения влияния балластных веществ на количественное содержание суммы α -аминокислот в шроте яблок, нами приготовлено водное извлечение, очищенное от балластных веществ (образец 2).

Образец 2. К 20 мл исходного извлечения (образца 1) добавляют трехкратный объем 96 % этанола для осаждения балластных ВМС и отстаивают в течение 10–12 ч при температуре 3–4 °С. Образующийся осадок отделяют центрифугированием, после чего извлечение сгущают до полного удаления этанола, переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят водой до метки.

Нами установлено, что продукты взаимодействия обоих образцов с 0,2 % водным раствором нингидрина характеризуются высокой стабильностью во времени: за период 1–1,5 ч после начала реакции их интенсивность светопоглощения при длине волны 400 нм снижается на 0,2–0,5 %.

Нами установлено, что из всех изученных α -аминокислот продукт взаимодействия пролина с нингидрином при длине волны 400 нм характеризуется наибольшей стабильностью (за период 1–1,5 ч после начала реакции интенсивность светопоглощения снижается на 0,2 %). На этом основании мы установили

предельные концентрации пролина в нингидриновой реакции, подчиняющиеся закону светопоглощения, а именно 0,016–0,072 мг/мл (рис 17).

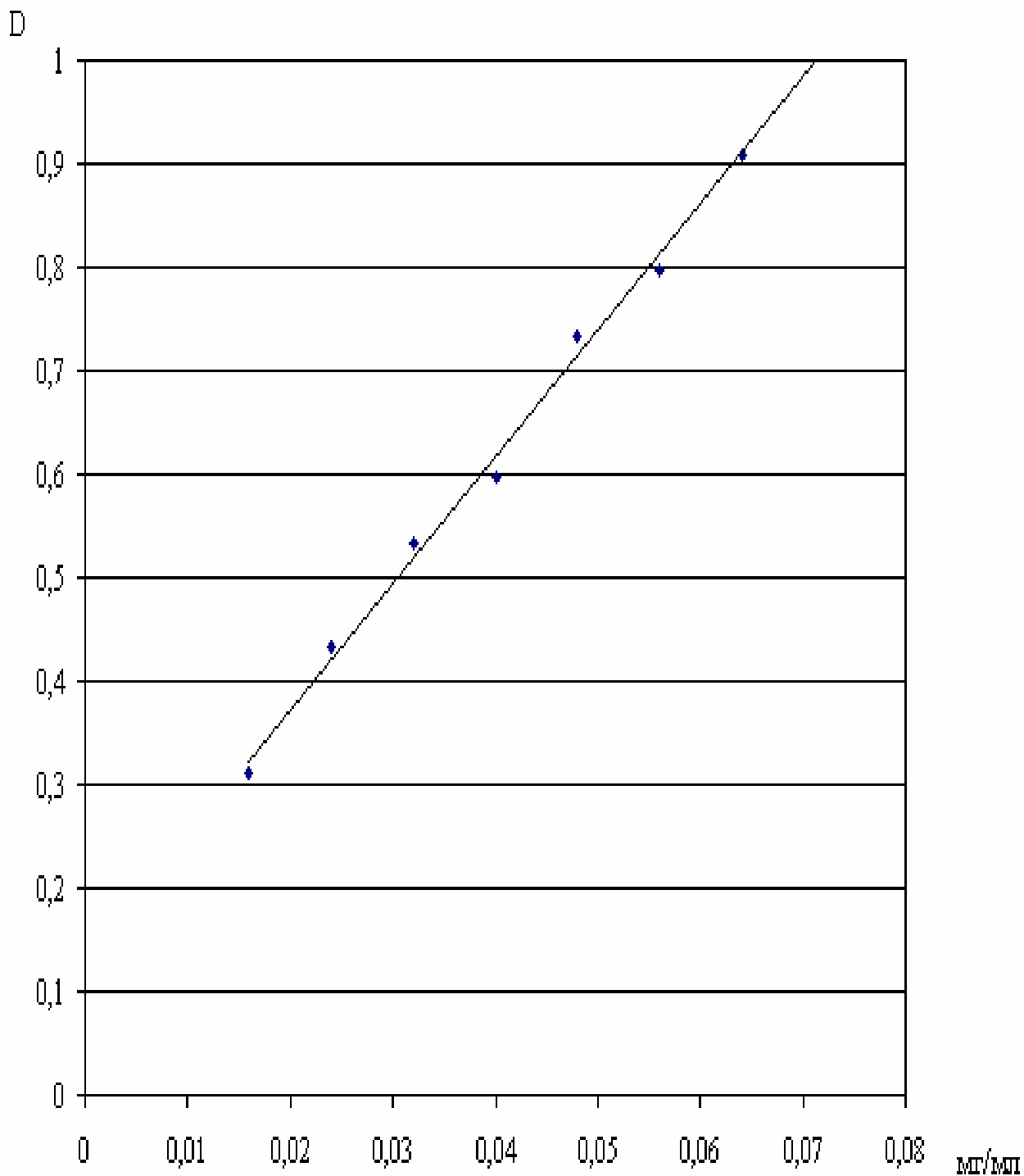


Рис 17. Калибровочный график продукта реакции пролина

На этом основании и с учетом ранее оптимизированных условий реакции с водным раствором нингидрина нами разработана методика проведения количественного определения α -аминокислот в шроте яблок.

К 1,5 мл исследуемых извлечений (образцы 1 и 2) добавляют 1,7 мл 0,2 % водного раствора нингидрина и нагревают при температуре 120 °С в течение 20 мин. После полного охлаждения отбирают по 2 мл каждого из продуктов реакции и разбавляют их водой: до 10 мл (образец 1) и до 5 мл (образец 2) и спустя 1 ч после начала реакции определяют оптическую плотность при длине волны 400 нм в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

Параллельно проводят реакцию 1,5 мл свежеприготовленного 0,017 % раствора стандартного образца пролина с 1,7 мл 0,2 % водного раствора нингидрина, после охлаждения отбирают 2 мл продукта реакции, разбавляют его водой до 5 мл и определяют оптическую плотность в аналогичных условиях. Стандартный образец пролина получен многократной дробной кристаллизацией пролина из этанольно-эфирной смеси.

Содержание суммы аминокислот в образцах относительно пролина вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_x \cdot m_o \cdot 100 \cdot a \cdot 100 \%}{D_o \cdot m_x \cdot (100 - W) \cdot b}, \quad \text{где}$$

D_x – оптическая плотность продуктов реакции исследуемых образцов с 0,2 % водным раствором нингидрина;

D_o - оптическая плотность продукта реакции 0,017 % раствора стандартного образца пролина с 0,2 % водным раствором нингидрина;

m_o и m_x – средние массы навесок стандартного образца пролина и шрота яблок, соответственно, г;

W – остаточная влажность шрота яблок (14,9 %);

a и *b* - разведения продуктов нингидриновой реакции исследуемых образцов и стандартного образца пролина, соответственно, мл.

На основании проведённых для каждого образца шести параллельных испытаний получены результаты, которые приведены в таблицах 10 и 11.

Установлено, что содержание суммы α -аминокислот в пересчете на пролин в исходном сырье составило 1,532 %, в сырье, очищенном от балластных ВМС, – 1,112 %.

Таблица 10.

*Результаты количественного определения
суммы свободных α -аминокислот в широте яблок.*

| № п/п | Навеска сырья, г | Навеска пролина, г | D, при $\lambda=400$ нм | | Содержание суммы аминокис- лот относительно пролина, % |
|----------|---------------------|-----------------------|-------------------------|---------|-----------------------------------------------------------------|
| | | | Водного извлечения | Пролина | |
| 1 | 0,030001 | 0,000249 | 0,40091 | 0,52065 | 1,502 |
| 2 | 0,030004 | 0,000237 | 0,42839 | 0,52149 | 1,525 |
| 3 | 0,029991 | 0,000239 | 0,42524 | 0,51986 | 1,532 |
| 4 | 0,029995 | 0,000241 | 0,42326 | 0,51932 | 1,539 |
| 5 | 0,029989 | 0,000238 | 0,43000 | 0,51911 | 1,545 |
| 6 | 0,029984 | 0,000236 | 0,43435 | 0,51903 | 1,548 |

*Результаты количественного определения
суммы свободных α -аминокислот
в шроте яблок, очищенном от балластных ВМС.*

| № п/п | Навеска сырья, г | Навеска пролина, г | D, при $\lambda=400$ нм | | Содержание суммы аминокислот относительно пролина, % |
|----------|---------------------|-----------------------|-------------------------|---------|---------------------------------------------------------------|
| | | | Водного извлечения | Пролина | |
| 1 | 0,024000 | 0,000249 | 0,46662 | 0,52000 | 1,094 |
| 2 | 0,023978 | 0,000241 | 0,48768 | 0,51984 | 1,108 |
| 3 | 0,023971 | 0,000239 | 0,49254 | 0,51848 | 1,113 |
| 4 | 0,023985 | 0,000244 | 0,48424 | 0,51824 | 1,117 |
| 5 | 0,023965 | 0,000237 | 0,49895 | 0,51817 | 1,119 |
| 6 | 0,023992 | 0,000245 | 0,48454 | 0,51821 | 1,122 |

В водном извлечении шрота яблок аминокислоты содержатся как в свободном, так и в связанном состоянии (в составе пептидов и белков). С целью повышения выхода суммы аминокислот из шрота яблок нами оптимизированы условия проведения кислотного гидролиза.

В качестве гидролизующего агента мы использовали раствор кислоты хлороводородной, обеспечивающей достаточно полное расщепление белков и пептидов водного извлечения до α -аминокислот. Кроме того, получаемые гидролизаты характеризуются высокой стабильностью, уменьшается вероятность их микробной контаминации, что является важным фактором при подготовке образцов к анализу.

На первом этапе исследований был изучен аминокислотный состав шрота яблок после кислотного гидролиза. Подготовка гидролизата, качественный и количественный анализ аминокислот осуществляли с помощью аминокислот-

ного анализатора «ААА 339» (ЧССР) на колонке (размеры 0,9 x 150 см), заполненной катионообменной смолой амберлит JR-120 [34]. На подготовительной стадии, исходное сырье подвергли кислотному гидролизу.

Подготовка компонентов для анализа.

Приготовление буферных растворов.

Готовят натрий цитратные буферные растворы: со значением рН 2,2 (для разведения гидролизата исследуемого образца и стандартного раствора α -аминокислот), а также – с рН 3,5; 4,25; и 9,45 (для разделения и анализа α -аминокислот исследуемого образца на аналитической колонке аминокислотного анализатора) (табл. 12).

Таблица 12.

*Состав буферных растворов для разделения и анализа α -аминокислот**

| № п/п | Компоненты буферных растворов | рН 3,5 | рН 4,25 | рН 9,45 | рН 2,2 |
|----------|----------------------------------|--------|---------|---------|--------|
| 1 | Кислота лимонная, г | 10,179 | 7,874 | 4,994 | 14,01 |
| 2 | Натрия хлорид, г | 14,341 | 18,263 | 4,181 | 11,69 |
| 3 | Натрия цитрат, г | 5,36 | 8,585 | 27,311 | — |
| 4 | Тиодигликоль, мл** | 5 | 5 | 2,5 | 20 |
| 5 | Бридж-35, мл*** | 3,2 | 3,2 | 3,2 | 3,2 |
| 6 | Кислота каприловая, г**** | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 7 | Натрия гидроксид, г | — | — | 4,0 | — |
| 8 | Кислота борная, г | — | — | 2,05 | — |

* Указаны количества компонентов для приготовления буферных растворов объемом

1 л

** Тиодигликоль – антиоксидант

*** Бридж-35 (Полиоксиэтилен (23)-лауриловый эфир) – неионогенный ПАВ. Добавляют к буферным растворам в последнюю очередь, после фильтрования

**** Кислота каприловая - консервант

Приготовление раствора нингидрина.

Нингидриновый реактив готовят с использованием метилцелозольва (20,0 г нингидрина растворяют в 750 мл метилцелозольва, затем добавляют 3,0 г гидриндантина; если раствор помутнеет, его фильтруют через стеклянный фильтр № 1; после этого добавляют 250 мл ацетатного буфера, рН 5,5^{*}; покрасневший раствор немедленно переносят в темную емкость с автоматической пипеткой, предварительно заполненной азотом).

**Методика приготовления ацетатного буферного раствора с рН 5,5*

307 мл кислоты уксусной ледяной помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, разбавляют равным количеством свежеперегнанной воды очищенной, добавляют 148 г натрия гидроксида, по крупинке и при интенсивном перемешивании. После охлаждения доводят объем раствора до метки водой.

Приготовление кислотного гидролизата шрота яблок.

Точную навеску образца шрота яблок (0,1 г) помещают на дно пробирки вместимостью 20 мл, так чтобы материал не оставался на ее стенках, добавляют 3–4 капли 96 % этанола, крупинку хлорида олова (II) и затем пипеткой – 6 н. раствор кислоты хлороводородной в двухсоткратном количестве по отношению к навеске сырья. Пробирку, отверстие которой запаивают, помещают в термостат и выдерживают при температуре 105 °С в течение 24 ч. По окончании гидролиза пробирку охлаждают, надрезают запаянный конец и разбивают. Гидролизат фильтруют, доводят водой до 20 мл и сгущают до сиропообразной консистенции при температуре не выше 50 °С. Затем полученный остаток разбавляют 4–5 мл свежеприготовленного натрий цитратного буферного раствора с рН 2,2 и фильтруют два раза: первый – через бумажный фильтр с синей лентой, второй – через стеклянный фильтр № 3 в пробирку вместимостью 10 мл и доводят до

метки данным буферным раствором. Приготовленный образец перемешивают и используют для анализа [34].

Приготовление стандартного раствора α -аминокислот (1:9)

для калибровки анализатора.

5 мл стандартного раствора α -аминокислот* помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки натрий цитратным буферным раствором с рН2,2.

* Состав стандартного раствора α -аминокислот приведен в таблице 13.

Таблица 13.

Состав стандартного раствора α -аминокислот

для калибровки анализатора

| № п/п | Наименование компонентов | Концентрация, ммоль/мл | № п/п | Наименование компонентов | Концентрация, ммоль/мл |
|----------|-----------------------------|---------------------------|----------|-----------------------------|---------------------------|
| 1 | Аланин | 2,5 | 10 | Метионин | 2,5 |
| 2 | Аммония хлорид | 2,5 | 11 | Фенилаланин | 2,5 |
| 3 | Аргинин | 2,5 | 12 | Пролин | 2,5 |
| 4 | Кислота аспарагиновая | 2,5 | 13 | Кислота глутаминовая | 2,5 |
| 5 | Цистин | 1,25 | 14 | Серин | 2,5 |
| 6 | Гистидин | 2,5 | 15 | Треонин | 2,5 |
| 7 | Изолейцин | 2,5 | 16 | Тирозин | 2,5 |
| 8 | Лейцин | 2,5 | 17 | Валин | 2,5 |
| 9 | Лизин | 2,5 | 18 | Глицин | 2,5 |

Проведение анализа.

1 мл свежеприготовленного гидролизата вводят на аналитическую колонку аминокислотного анализатора. Разделение аминокислот проводят в системе трех натрий цитратных буферных растворов: рН 3,5; рН 4,25; и рН 9,45. Данные буферные растворы подают в колонку по стандартной программе со скоростью 10–12 мл/ч при давлении 25–30 см. рт. ст.

На выходе из аналитической колонки разделенные аминокислоты смешиваются с нингидриновым реактивом в смесительном блоке в соотношении 0,5 мл нингидринового реактива на 1 мл элюата. Реакция аминокислот с нингидрином проводят на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Затем в охлажденные до 20 °С пробирки добавляют по 5 мл 60 % этанола, тщательно перемешивают и после этого полученные образцы фотометрируют непрерывно и одновременно при двух длинах волн в проточной кювете фотометра. α -Аминокислоты, имеющие первичную аминогруппу образуют пурпурную окраску, интенсивность светопоглощения которой измеряют при длине волны 570 нм, а пролин образует соединения желтой окраски, измеряемой при длине волны 440 нм [27, 30].

Проведением анализа калибровочной смеси α -аминокислот известного состава и известной концентрации при постоянных элютивных условиях определяют время задерживания ее отдельных компонентов и площадь их пиков. Под временем задерживания подразумевают, интервал времени от внесения образца до момента прохождения максимума данного компонента через детектор.

Качественный аминокислотный состав кислотного гидролизата определяют сравнением времени задерживания его отдельных пиков со временем задерживания компонентов калибровочной смеси α -аминокислот [29].

Количественную оценку хроматограмм проводят с помощью электронного интегратора [29].

При калибровочных анализах интегратор, кроме времени задерживания, определяет площадь пика каждой α -аминокислоты (в микровольтсекундах) при

их известных концентрациях. Из калибровочных анализов для отдельных α -аминокислот рассчитывают среднюю площадь их пиков, приходящуюся на 1 нМ по формуле:

$$K = \frac{(X_1 + X_2 + \dots + X_n) / n}{\text{Кол-во (нМ)}}$$

где: K – константа отдельной α -аминокислоты калибровочной смеси, т.е. средняя площадь пика соответствующая 1 наномолю этой кислоты,

X_1, X_2, X_n – площадь пика соответствующей α -аминокислоты, определенная при 1-м, 2-м, n -м анализах калибровочной смеси,

n – количество калибровочных анализов,

Кол-во (нМ) – количество в наномолях указанной α -аминокислоты, дозированной при калибровочных анализах.

Количество отдельных α -аминокислот в образце (нМ) рассчитывают по формуле:

$$(\text{нМ}) = \frac{P}{K}$$

где: P – площадь пика отдельной α -аминокислоты в образце, определенная интегратором, K – константа данной α -аминокислоты калибровочной смеси.

Продолжительность аминокислотного анализа приготовленного гидролизата составила 90 мин, воспроизводимость анализа $\pm 3 \%$ [29].

Установлено, что шрот яблок после кислотного гидролиза достаточно богат по аминокислотному составу, особенно в отношении кислот аспарагиновой, глутаминовой и аргинина, а суммарное содержание α -аминокислот в сырье составляет 5,77 % (табл. 14).

Таблица 14.

Аминокислотный состав шрота яблок после кислотного гидролиза.

| α -Аминокислоты | Содержание, мг % | α -Аминокислоты | Содержание, мг % |
|-------------------------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|
| Аспарагиновая кислота | 954 | Метионин | 156 |
| Треонин | 432 | Изолейцин | 234 |
| Серин | 278 | Лейцин | 336 |
| Глутаминовая кислота | 1160 | Тирозин | 216 |
| Пролин | 361 | Фенилаланин | 229 |
| Глицин | 236 | Гистидин | 194 |
| Аланин | 230 | Лизин | 245 |
| Валин | 98 | Аргинин | 410 |
| Суммарное содержание α -аминокислот в сырье, % | | | 5,77 |

Следует отметить, что несмотря на высокий выход α -аминокислот, проведение кислотного гидролиза в данных условиях связано с воздействием повышенного давления на сырье, сложным аппаратурным оформлением процесса, а также со значительными временными затратами при подготовке гидролизата (более 20 ч), что ограничивает использование данной технологии в условиях промышленного производства. На этом основании, нами была поставлена цель: оптимизировать условия кислотного гидролиза для повышения выхода аминокислот из сырья и разработать доступную методику его проведения. Оценку полноты гидролиза мы проводили путем количественного определения суммы аминокислот в пересчете на пролин с помощью нингидриновой реакции.

Нами изучено влияние концентрации раствора кислоты хлороводородной на выход суммы аминокислот. К 5 г высушенного шрота яблок добавляют 35 мл воды и оставляют на 30 мин для набухания. Далее к сырью добавляют 65 мл

раствора кислоты хлороводородной в концентрации от 0,45 М до 5,5 М и проводят гидролиз при температуре 80–90 °С в течение 2 ч. Затем гидролизат отделяют фильтрованием, а сырье, для его более полного истощения, трехкратно экстрагируют водой (в соотношении 1:6) по 30 мин в аналогичном температурном режиме. Полученные извлечения фильтруют и объединяют с гидролизатом

К объединенному гидролизату добавляют натрия гидрокарбонат до нейтральной реакции, переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят водой до метки. В результате кислотного гидролиза образуется комплекс балластных веществ (в т.ч. и продукты частичного гидролиза ВМС), снижающих качество готового продукта. Для очистки от данных веществ, к 20 мл гидролизата добавляют трехкратный объем 96 % этанола и отстаивают в течение 10–12 ч при температуре 3–4 °С. Образующийся осадок отделяют центрифугированием, после чего извлечение сгущают до полного удаления этанола, переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят водой до метки.

Далее нами проведена нингидриновая реакция, как описано выше (при количественном анализе свободных α -аминокислот шрота яблок) и установлено, что гидролиз шрота яблок 0,9 М раствором кислоты хлороводородной обеспечивает наиболее высокий выход суммы аминокислот – до 0,85 % в пересчете на пролин.

В следующей серии экспериментов нами изучено влияние продолжительности гидролиза на выход суммы аминокислот. Кислотный гидролиз проводили 0,9 М раствором кислоты хлороводородной в интервале времени от 1 ч до 12 ч. Установлено, что наибольший выход суммы аминокислот из шрота яблок (1,71 % в пересчете на пролин) наблюдается при продолжительности гидролиза в течение 10 ч. На нейтрализацию полученного извлечения израсходовано 5 г натрия гидрокарбоната.

Данные по оптимизации условий проведения кислотного гидролиза шрота яблок приведены в табл. 15.

Таблица 15.

*Влияние регулируемых факторов кислотного гидролиза
на выход суммы α- аминокислот шрота яблок*

| № п/п | Концентрация раствора кислоты хлороводородной, М | Продолжительность гидролиза, ч | Выход суммы аминокислот, % |
|-----------|--------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| 1 | 5,5 | 2 | 0,17 |
| 2 | 4,6 | 2 | 0,31 |
| 3 | 3,6 | 2 | 0,52 |
| 4 | 1,8 | 2 | 0,64 |
| 5 | 0,9 | 2 | 0,85 |
| 6 | 0,45 | 2 | 0,66 |
| 7 | 0,9 | 1 | 0,59 |
| 8 | 0,9 | 3 | 0,96 |
| 9 | 0,9 | 4 | 1,08 |
| 10 | 0,9 | 5 | 1,19 |
| 11 | 0,9 | 6 | 1,30 |
| 12 | 0,9 | 7 | 1,42 |
| 13 | 0,9 | 8 | 1,51 |
| 14 | 0,9 | 9 | 1,58 |
| 15 | 0,9 | 10 | 1,71 |
| 16 | 0,9 | 11 | 1,56 |

Таким образом, нами оптимизированы условия кислотного гидролиза: к 5 г шрота яблок (точная навеска), высушенного до воздушно-сухого состояния, добавляют 35 мл воды очищенной и оставляют на 30 мин для набухания. Затем к набухшему сырью добавляют 65 мл 0,9 М раствора кислоты хлороводородной и проводят гидролиз при температуре 80–90 °С в течение 10 ч. Полученный гидролизат отделяют фильтрованием, а сырье трехкратно экстрагируют во-

дой в аналогичном температурном режиме. Полученные извлечения фильтруют, объединяют с гидролизатом и проводят нейтрализацию добавлением 5 г натрия гидрокарбоната. Затем гидролизат переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят водой до метки. Далее проводят очистку гидролизата от балластных ВМС добавлением 96 % этанола, как описано выше. Следует отметить, что разработанный метод кислотного гидролиза не связан с использованием дорогого оборудования, характеризуется простотой исполнения и относительно небольшой продолжительностью во времени.

С целью изучения влияния балластных веществ на содержание суммы α -аминокислот в шроте яблок после гидролиза (в оптимизированных условиях), мы приготовили кислотный гидролизат без очистки от балластных веществ (образец 3) и гидролизат, очищенный от балластных веществ (образец 4) и затем провели нингидриновую реакцию (как описано выше). 2 мл каждого продукта разбавляли водой: до 10 мл (образец 3) и до 5 мл (образец 4).

Результаты количественного содержания суммы α -аминокислот в шроте яблок после кислотного гидролиза и аналогичный показатель для образца, очищенного от балластных веществ приведены в табл. 16 и 17.

Таблица 16.

*Результаты количественного определения
суммы α -аминокислот в шроте яблок после кислотного гидролиза.*

| № п/п | Навеска сырья, г | Навеска пролина, г | D, при $\lambda=400$ нм | | Содержание суммы аминокис- лот относительно пролина, % |
|----------|---------------------|--------------------------|-------------------------|---------|-----------------------------------------------------------------|
| | | | Водного извлечения | Пролина | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | 0,029982 | 0,000249 | 0,40423 | 0,52285 | 1,509 |
| 2 | 0,029915 | 0,000244 | 0,41568 | 0,52285 | 1,532 |

Продолжение табл. 16.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|----------|----------|---------|---------|-------|
| 3 | 0,02993 | 0,000244 | 0,41676 | 0,51884 | 1,539 |
| 4 | 0,029965 | 0,000244 | 0,41873 | 0,51732 | 1,549 |
| 5 | 0,030015 | 0,000249 | 0,41204 | 0,51762 | 1,552 |
| 6 | 0,030028 | 0,000254 | 0,40520 | 0,51802 | 1,555 |

Таблица 17.

Результаты количественного определения суммы α -аминокислот в шроте яблок, очищенном от балластных ВМС, после гидролиза

| № п/п | Навеска сырья, г | Навеска пролина, г | D, при $\lambda=400$ нм | | Содержание суммы аминокислот относительно пролина, % |
|-------|------------------|--------------------|-------------------------|---------|------------------------------------------------------|
| | | | Водного извлечения | Пролина | |
| 1 | 0,023978 | 0,000244 | 0,73493 | 0,52279 | 1,681 |
| 2 | 0,023902 | 0,000249 | 0,72279 | 0,51925 | 1,704 |
| 3 | 0,023895 | 0,000249 | 0,72718 | 0,52012 | 1,712 |
| 4 | 0,023885 | 0,000249 | 0,72709 | 0,51815 | 1,719 |
| 5 | 0,023444 | 0,000244 | 0,73021 | 0,51800 | 1,724 |
| 6 | 0,023815 | 0,000249 | 0,73017 | 0,51946 | 1,727 |

Анализ данных табл. 10, 11 и 16, 17 показал, что содержание суммы α -аминокислот в пересчете на пролин в исходном сырье составило 1,532 %, в сырье, очищенном от балластных ВМС, – 1,112 %. Аналогичный показатель для шрота яблок, подвергнутого кислотному гидролизу составил 1,539 % и 1,711 %, соответственно.

Статистическая обработка результатов анализа представлена в таблице 18, где номер каждого образца соответствует нумерации образцов при их подготовке к количественному определению суммы α -аминокислот.

Таблица 18.

Статистическая обработка метода количественного определения суммы α -аминокислот в шроте яблок относительно пролина

| № образца | f | $\langle x \rangle$, % | s^2 | s | P, % | Δx | ε , % |
|-----------|---|-------------------------|----------------------|----------------------|------|------------|-------------------|
| 1 | 5 | 1,532 | $2,85 \cdot 10^{-4}$ | $1,69 \cdot 10^{-2}$ | 95 | 0,0434 | 2,83 |
| 2 | 5 | 1,112 | $1,03 \cdot 10^{-4}$ | $1,01 \cdot 10^{-2}$ | 95 | 0,026 | 2,34 |
| 3 | 5 | 1,539 | $2,95 \cdot 10^{-4}$ | $1,72 \cdot 10^{-2}$ | 95 | 0,0442 | 2,87 |
| 4 | 5 | 1,711 | $2,89 \cdot 10^{-4}$ | $1,7 \cdot 10^{-2}$ | 95 | 0,0437 | 2,55 |

Как видно из данных таблицы 18, разработанный метод характеризуется достаточно высокой точностью определения и воспроизводимостью. Относительная ошибка результата отдельного определения для всех образцов не превышает ± 3 %. Кроме того, метод прост и доступен в исполнении, не требует дорогостоящего аппаратного оборудования и может быть использован для количественного определения суммы аминокислот в растительном сырье.

Однако, исходное извлечение шрота яблок (образец 1) и гидролизат (образец 3) содержат вещества, реагирующие с нингидрином (пептиды и белки), влияющие на изменения значений оптической плотности. Это приводит к ошибкам результатов количественного содержания α -аминокислот в сырье. Поэтому, для получения достоверных результатов, отражающих количественное содержание суммы α -аминокислот в растительном сырье, необходимо проводить его очистку от сопутствующих ВМС, например, с помощью осаждения этанолом, как описано выше.

Таким образом, проведение кислотного гидролиза способствует увеличению содержания суммы α -аминокислот в шроте яблок до 1,711 % в пересчете на

пролин, что значительно превышает аналогичный показатель для исходного сырья – 1,112 %. Это позволит в дальнейшем разработать на основе кислотного гидролизата малотоксичные препараты широкого спектра фармакологической активности, обогащенные α -аминокислотами.

Количественное определение суммы α -аминокислот в промышленных отходах бобов какао

Поиск и создание новых эффективных гепатопротекторных средств, благоприятно влияющих на функционирование системы желудочно-кишечного тракта, является одной из актуальных проблем современной медицины.

Какаовелла – отход кондитерской промышленности, применяющийся в качестве заменителя порошка какао, для получения алкалоида теобромина. В настоящее время предложена паста из какаовеллы в качестве пищевой добавки в кондитерские изделия [3].

Приказом МЗ РФ № 335 (14.11.97.) разрешено к медицинскому применению лекарственное средство кавехол (регистр. № 97/335/10) в виде гранул, получаемое из какаовеллы, содержащее в своем составе аминокислоты, в том числе и все незаменимые, углеводы (2–2,5 %), белки (8–9 %), алкалоиды (0,5–1 %), полифенольные соединения, в том числе катехины и эпикатехины, фенолокислоты, в том числе производные коричной кислоты, микроэлементы, обладающее антиоксидантным, желчегонным, гепатопротекторным, радиопротекторным и энтеросорбционным действием [38].

Нами изучен аминокислотный состав какаовеллы после кислотного гидролиза (табл. 19) с использованием аминокислотного анализатора (по методике, описанной на с. 76–78) [29, 34].

Таблица 19.

*Аминокислотный состав какаоветлы
после проведения кислотного гидролиза.*

| α-Аминокислоты | α-Аминокислоты какаоветлы после гидролиза, мг % |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Аспарагиновая | 2179 |
| Треонин | 703 |
| Серин | 671 |
| Глутаминовая | 2834 |
| Пролин | 954 |
| Глицин | 494 |
| Аланин | 529 |
| Валин | 522 |
| Метионин | 196 |
| Изолейцин | 591 |
| Лейцин | 932 |
| Тирозин | 571 |
| Фенилаланин | 616 |
| Гистидин | 480 |
| Лизин | 882 |
| Аргинин | 1076 |
| Суммарное содержание α-аминокислот в сырье, % | 14,23 |

Анализ данных табл. 19 показывает, что после кислотного гидролиза суммарное содержание α-аминокислот в какаоветле составляет 14,23 %, что значительно превышает аналогичный показатель для шрота яблок (5,77 %). Полученные данные говорят о том, что какаоветла является перспективным источ-

ником получения лекарственных средств широкого спектра фармакологической активности, обогащенных α -аминокислотами.

С этих позиций представляет интерес разработать на основании нингидриновой реакции доступную точную методику количественного определения суммы α -аминокислот какаоеллы, а также оптимизировать условия повышения их выхода.

Ранее нами установлено, что пролин в условиях проведения нингидриновой реакции дает наиболее стабильные результаты светопоглощения. Поэтому, как и в случае шрота яблок, содержание суммы α -аминокислот в какаоелле определено в пересчете на РСО пролина.

На первом этапе исследований нами проведена количественная оценка содержания свободных α -аминокислот в сырье.

С целью изучения влияния балластных веществ на количественное содержание α -аминокислот в какаоелле, нами приготовлены водное извлечение нативное (образец 1) и подверженное очистке (образец 2).

Приготовление образца 1. К 10,0 г сырья какаоеллы (точная навеска), высушенного до воздушно-сухого состояния (остаточная влажность – 9,24 %) добавляют 70 мл воды очищенной и оставляют на 30 мин для набухания. Затем к набухшему сырью добавляют еще 100 мл воды и проводят экстрагирование при температуре 80–90 °С в течение 1 ч. Данную операцию повторяют четыре раза. Полученные извлечения фильтруют, объединяют, переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводят водой до метки.

Приготовление образца 2 проводят, как описано выше (с. 71).

Далее нами проведена количественная оценка содержания свободных α -аминокислот, основанная на спектрофотометрическом анализе продуктов нингидриновой реакции, в пересчете на пролин (по методике, оптимизированной для шрота яблок, с. 73). При этом 4 мл каждого из продуктов исследуемых образцов разбавляли водой до 5 мл.

Установлено, что нативная какаоелла и сырье, очищенное от балластных веществ содержат незначительные суммарные количества α -аминокислот – 0,432 % и 0,44 % в пересчете на пролин соответственно (табл. 20–21).

Таблица 20.

Результаты количественного определения суммы свободных α -аминокислот в какаоелле.

| № п/п | Навеска сырья, г | Навеска пролина, г | D, при $\lambda=400$ нм | | Содержание суммы аминокислот относительно пролина, % |
|-------|------------------|--------------------|-------------------------|---------|------------------------------------------------------|
| | | | Водного извлечения | Пролина | |
| 1 | 0,0302 | 0,000239 | 0,50601 | 0,52031 | 0,424 |
| 2 | 0,02979 | 0,000237 | 0,51027 | 0,52007 | 0,430 |
| 3 | 0,03031 | 0,000241 | 0,51149 | 0,51989 | 0,431 |
| 4 | 0,03077 | 0,000244 | 0,51387 | 0,51845 | 0,433 |
| 5 | 0,03024 | 0,000241 | 0,51248 | 0,51722 | 0,435 |
| 6 | 0,03038 | 0,000244 | 0,51090 | 0,51844 | 0,436 |

Таблица 21.

Результаты количественного определения суммы свободных α -аминокислот в какаоелле, очищенной от балластных ВМС.

| № п/п | Навеска сырья г | Навеска пролина, г | D, при $\lambda=400$ нм | | Содержание суммы аминокислот относительно пролина, % |
|-------|-----------------|--------------------|-------------------------|---------|------------------------------------------------------|
| | | | Водного извлечения | Пролина | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | 0,02402 | 0,000249 | 0,39594 | 0,52101 | 0,434 |
| 2 | 0,02389 | 0,000249 | 0,39728 | 0,51845 | 0,440 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---------|----------|---------|---------|-------|
| 3 | 0,02396 | 0,000249 | 0,39925 | 0,51831 | 0,441 |
| 4 | 0,02405 | 0,000244 | 0,41092 | 0,51962 | 0,442 |
| 5 | 0,02378 | 0,000244 | 0,40737 | 0,51866 | 0,444 |
| 6 | 0,02381 | 0,000244 | 0,40856 | 0,51732 | 0,446 |

С целью повышения выхода суммы α -аминокислот из какаоеллы нами оптимизированы условия проведения кислотного гидролиза (табл. 22). Методика оптимизации гидролиза какаоеллы совпадает с таковой для шрота яблок (с. 81–84). После отделения гидролизата фильтрованием, сырье, для более полного истощения, 3-кратно экстрагируют водой при температуре 80–90 °С. Полученные извлечения фильтруют, объединяют с гидролизатом, добавляют натрия гидрокарбонат до нейтральной реакции и доводят водой до 500 мл.

Для удаления из гидролизата балластных веществ проведена очистка с помощью осаждения этанолом (с. 82).

Содержание суммы α -аминокислот в какаоелле определяли спектрофотометрическим анализом продуктов нингидриновой реакции, в пересчете на пролин, так же как и в шроте яблок. Установлено, что наибольший выход очищенной суммы α -аминокислот из какаоеллы наблюдается при проведении гидролиза 0,9 М раствором кислоты хлороводородной в течение 10 ч (табл. 22). При этом оптимальные параметры кислотного гидролиза какаоеллы и шрота яблок полностью совпадают (табл. 15 и 22, с. 83–84).

*Влияние регулируемых факторов кислотного гидролиза
на выход суммы α -аминокислот какаоветлы*

| № п/п | Концентрация раствора кислоты хлороводородной, М | Продолжительность гидролиза, ч | Выход суммы аминокислот, % |
|-----------|--------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| 1 | 5,5 | 2 | 0,87 |
| 2 | 4,6 | 2 | 1,09 |
| 3 | 3,6 | 2 | 1,21 |
| 4 | 1,8 | 2 | 1,42 |
| 5 | 0,9 | 2 | 1,63 |
| 6 | 0,45 | 2 | 1,38 |
| 7 | 0,9 | 1 | 1,44 |
| 8 | 0,9 | 3 | 1,79 |
| 9 | 0,9 | 4 | 1,96 |
| 10 | 0,9 | 5 | 2,11 |
| 11 | 0,9 | 6 | 2,25 |
| 12 | 0,9 | 7 | 2,39 |
| 13 | 0,9 | 8 | 2,54 |
| 14 | 0,9 | 9 | 2,62 |
| 15 | 0,9 | 10 | 2,83 |
| 16 | 0,9 | 11 | 2,56 |

С целью изучения влияния балластных веществ на суммарное количественное содержание α -аминокислот в какаоветле после гидролиза в оптимизированных условиях, мы приготовили кислотные гидролизаты без очистки (образец 3) и очищенный от сопутствующих ВМС (образец 4) и затем провели

нингидриновую реакцию (как описано выше). 2 мл каждого продукта разбавляли водой: до 10 мл. Результаты анализа приведены в табл. 23 и 24.

Установлено, что сырье после кислотного гидролиза содержит 3,11 % суммы α -аминокислот в пересчете на пролин. Аналогичный показатель для какаоеллы, подверженной кислотному гидролизу с последующей очисткой от балластных ВМС, составил 2,823 %.

Таблица 23.

Результаты количественного определения

суммы α -аминокислот в какаоелле после кислотного гидролиза.

| № п/п | Навеска сырья, г | Навеска пролина, г | D, при $\lambda=400$ нм | | Содержание суммы аминокислот относительно пролина, % |
|-------|------------------|--------------------|-------------------------|---------|------------------------------------------------------|
| | | | Водного извлечения | Пролина | |
| 1 | 0,01485 | 0,000249 | 0,43051 | 0,52137 | 3,051 |
| 2 | 0,01479 | 0,000249 | 0,43355 | 0,51986 | 3,094 |
| 3 | 0,01475 | 0,000244 | 0,44180 | 0,51701 | 3,115 |
| 4 | 0,01477 | 0,000244 | 0,44350 | 0,51714 | 3,122 |
| 5 | 0,01499 | 0,000249 | 0,44313 | 0,51823 | 3,13 |
| 6 | 0,01482 | 0,000249 | 0,43982 | 0,51909 | 3,137 |

Таблица 24.

Результаты количественного определения суммы α -аминокислот в какаоелле, очищенной от ВМС, после кислотного гидролиза

| № п/п | Навеска сырья, г | Навеска пролина, г | D, при $\lambda=400$ нм | | Содержание суммы аминокислот относительно пролина, % |
|-------|------------------|--------------------|-------------------------|---------|------------------------------------------------------|
| | | | Водного извлечения | Пролина | |
| 1 | 0,012 | 0,000244 | 0,32303 | 0,52009 | 2,783 |
| 2 | 0,01187 | 0,000244 | 0,32373 | 0,51946 | 2,823 |
| 3 | 0,01189 | 0,000249 | 0,31916 | 0,52007 | 2,832 |
| 4 | 0,01193 | 0,000249 | 0,32118 | 0,51923 | 2,845 |
| 5 | 0,01199 | 0,000244 | 0,32991 | 0,51856 | 2,853 |
| 6 | 0,01204 | 0,000249 | 0,32661 | 0,51989 | 2,863 |

В табл. 25 приведена статистическая обработка результатов количественного определения суммы α -аминокислот в какаоелле относительно пролина, где номер каждого образца соответствует нумерации образцов при их подготовке к анализу. Методика характеризуется достаточно высокой точностью определения и воспроизводимостью, ошибка отдельного определения для каждого образца не превышает 3 %. Водное извлечение и гидролизат какаоеллы с нингидрином образуют стабильные продукты (за период 1–1,5 ч после начала реакции интенсивность светопоглощения снижается на 1–1,4 %).

Таблица 25.

*Статистическая обработка метода количественного определения
суммы α -аминокислот в какао-велле относительно пролина*

| № образца | f | $\langle x \rangle$, % | s^2 | s | P, % | Δx | ε , % |
|-----------|---|-------------------------|----------------------|----------------------|------|------------|-------------------|
| 1 | 5 | 0,432 | $1,87 \cdot 10^{-5}$ | $4,32 \cdot 10^{-3}$ | 95 | 0,0111 | 2,57 |
| 2 | 5 | 0,441 | $1,7 \cdot 10^{-5}$ | $4,12 \cdot 10^{-3}$ | 95 | 0,0106 | 2,4 |
| 3 | 5 | 3,11 | $1,0 \cdot 10^{-3}$ | $3,17 \cdot 10^{-2}$ | 95 | 0,0815 | 2,62 |
| 4 | 5 | 2,833 | $8,09 \cdot 10^{-4}$ | $2,84 \cdot 10^{-2}$ | 95 | 0,0731 | 2,58 |

Следует отметить, что как и в случае анализа шрота яблок, для получения достоверных результатов количественного содержания α -аминокислот в какао-велле, необходимо подвергать образцы очистке от балластных ВМС, как описано выше.

Анализ данных табл. 25 показывает, что в кислотный гидролиз способствует значительному повышению содержания очищенной фракции α -аминокислот с 0,441 % до 2,832 %, что обуславливает перспективность какао-веллы, как ценного источника получения суммарных лекарственных средств, обогащенных α -аминокислотами, для профилактики и лечения заболеваний гепатобиллиарной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании исследования спектральных характеристик продуктов реакции α -аминокислот с нингидрином в различных растворителях установлены единые максимумы поглощения для большинства α -аминокислот: в УФ- (в диапазоне длин волн 220–260 нм) и видимой областях спектра (при длине волны 400 ± 2 нм, а также в диапазоне длин волн 560–570 нм).

Оптимизация условий проведения нингидриновой реакции показала, что продукты реакции α -аминокислот с водным раствором нингидрина характеризуются наибольшей стабильностью во времени и имеют единый максимум поглощения при длине волны 400 ± 2 нм. Поэтому, наиболее целесообразно проводить нингидриновую реакцию с водным раствором нингидрина, с последующим спектрофотометрическим определением продуктов при длине волны 400 нм.

На этом основании разработаны методы количественного определения α -аминокислот в лекарственных препаратах и растительном сырье, основанные на реакции с 0,2 % водным раствором нингидрина. Разработанные методы отличаются достаточной точностью (относительная ошибка результата отдельного определения для всех образцов не превышает ± 3 %) и доступностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аминокислотный и минеральный состав надземной части *Atragene Speciosa* / И.В. Шилова, Е.А. Краснов, Н.В. Барановская и др. // Хим.-фарм. журн. – 2002. – Т. 36, № 11. – С. 36–38.
2. Аникина Н.В. Спектрофотометрическое определение цистина / Н.В. Аникина, М.Е. Пудель // Хим.-фарм. журн. – 1983. – Т. 17, № 2. – С. 244–245.
3. Балаховский И.С. Определение суммарного количества аминокислот в крови и других биологических жидкостях / И.С. Балаховский, В.А. Варфоломеев // Лаб. дело. – 1977. – № 4. – С. 213–216.
4. Бестужева С.В. Разделение и количественное определение свободных аминокислот в сыворотке крови на пластинах Фиксион 50 x 8 / С.В. Бестужева // Лаб. дело. – 1977. – № 3. – С. 133–136.
5. Бондаренко Б.Н. Количественное определение аминокислот при хроматографии в тонком слое / Б.Н. Бондаренко // Лаб. дело. – 1984. – № 2. – С. 118–120.
6. Бородина В.Л. Экспресс-метод количественного определения аминокислот с помощью газожидкостной хроматографии / В.Л. Бородина, А.И. Крылов, В.А. Рогозкин // Лаб. дело. – 1984. – № 7. – С. 395–397.
7. Бубенчикова В.Н. Лабазник шестилепестный: аминокислотный и минеральный состав / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Сухомлинова // Фармация – 2005. – Т. 54, № 3. – С. 9–11.
8. Великанова О.Ф. Спектрофотометрический метод определения суммарного количества аминокислот в сыворотке крови / О.Ф. Великанова, Ю.В. Галаев // Лаб. дело. – 1981. – № 11. – С. 701–702.
9. Глицин таблетки сублингвальные 0,1 г.: ФСП 42-0025265-02-99. – 07.06.2002.
10. Государственная фармакопея СССР. – XI – изд. – М.: Медицина, 1989. – Вып 2. – 400 с.

11. Граник В.Г. Метаболизм L-аргинина (обзор) / В.Г. Граник // Хим.-фарм. журн. – 2003. – Т. 37, № 3. – С. 3–20.
12. Грин Н. Биология: В 3-х Т. / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор: Пер. с англ. Е.Р. Наумовой, М.С. Морозовой, О.В. Протасовой. – М.: Мир, 1996. – Т. 1. – 368 с.
13. Даниляк И.Г. Аевит и глутаминовая кислота в лечении больных бронхиальной астмой / И.Г. Даниляк, А.Х. Коган, С.В. Болевич // Клинич. медицина. – 1995. – № 5. – С. 50–53.
14. Доссон Р. Справочник биохимика / Р. Доссон, Д. Эллиот – М.: Мир, 1991. – 544 с.
15. Защищенная (трансбуккальная) фармацевтическая композиция, включающая аминокислотную кислоту: Пат. 2253442 РФ, МКИ А61 К31/198. – № 2003133180/15 / ЗАО «Канонфарма продакшн»; Заявлено 14.11.2003 // Изобретения полезные модели. – 2005. – № 16. – С. 1085.
16. Зенкова Е.А. 1,2,3,4-тетрагидро-1,4-диоксо-2,2,3,3-тетрагидроксиафталин как реагент для обнаружения биогенных аминов методом ТСХ и источник получения нингидринового реактива / Е.А. Зенкова, Е.В. Дегтярев // Хим.-фарм. журн. – 2000. – Т. 34, № 2. – С. 46–48.
17. Зенкова Е.А. Оптимизация получения нингидринового реактива из 1,2,3,4-тетрагидро-1,4-диоксо-2,2,3,3-тетрагидроксиафталина (оксолина) и возможности его применения / Е.А. Зенкова, Е.В. Дегтярев // Хим.-фарм. журн. – 2000. – Т. 34, № 3. – С. 31–33.
18. Ивановская А.М. Полярографическое определение метионина при анодной поляризации // А.М. Ивановская, Ю.Е. Орлов, В.А. Агилов // Фармация – 1992. Т. 41, № 1. – С. 72–73.
19. Изучение аминокислотной фракции экстракта мумие сухого / Т.Л. Киселева, Л.Н. Фролова, Л.А. Баратова и др. // Хим.-фарм. журн. – 1998. – Т. 32, № 2. – С. 47–51.

20. Изучение компонентного состава аминокислот в гомеопатических матричных настойках арники горной / Е.В. Яковлева, З.П. Костенникова, Л.А. Баратова и др. // Фармация – 2002. – Т. 51, № 5. – С. 11–14.
21. Качественное и количественное определение аминокислот в зерновых культурах методом капиллярного электрофореза / В.Ф. Семенов, Н.Ю. Страшила, А.В. Калач и др. // Сорбц. и хроматограф. процессы. – 2004. – Т. 4, № 2. – С. 159–169.
22. Кислота глутаминовая: ВФС 42-2722-96. – 25.04.96.
23. Количественное определение аминокислот в пыльце (обножке) / И.В. Духанина, А.Ю. Айрапетова, Г.Д. Лазарян. и др. // Хим.-фарм. журн. – 2006. – Т. 40, № 2. – С. 22–23.
24. Количественное определение L-лизина, L-гомосерина и α -треонина в культуральных жидкостях методом хроматоденситометрии на отечественных пластинках «Сорбфил» / Е.В. Дегтярев, В.Ф. Панфилов, А.П. Тарасов и др. // Хим.-фарм. журн. – 1992. – Т. 26, № 9–10. – С. 121–123.
25. Количественное определение L-триптофана методом хроматоденситометрии пластинок / Е.В. Дегтярев, В.Г. Дегтярь, А.Ф. Вайсбург и др. // Хим.-фарм. журн. – 1994. – Т. 28, № 4. – С. 52–55.
26. Колориметрические методы анализа азотистых соединений: Метод. реком. / Волгогр. сельхоз. ин-т, кафедра химии; Сост. В.А. Храмов. – Волгоград, 1979. – 15 с.
27. Копытко Я.Ф. Аминокислоты и жирные кислоты настоек Парнасия (Белозора болотного) гомеопатических матричных / Я.Ф. Копытко // Хим.-фарм. журн. – 2003. – Т. 37, № 7. – С. 12–14.
28. Коробейникова Э.Н. Определение содержания свободных аминокислот в сыворотке и моче здоровых детей / Э.Н. Коробейникова, Г.В. Мещеринова // Лаб. дело. – 1980. – № 5. – С. 221–223.

29. Крищенко В.П. Комплексная методика определения аминокислот в различных фракциях азотного комплекса растений / В.П. Крищенко // Изв. АН СССР. Сер. Биология. – 1978. – № 3. – С. 327–331.
30. Лазарян Д.С. Сравнительное изучение аминокислотного состава расплода пчел / Д.С. Лазарян // Хим.-фарм. журн. – 2002. – Т. 36, № 12. – С. 42–44.
31. Лукманова К.А. Аминокислотный и минеральный состав фитопрепарата люцерон / К.А. Лукманова, В.А. Рябчук, Н.Х. Салихова // Фармация – 2000. Т. 49, № 2. – С. 25–26.
32. Мансурова И.Д. Определение количества оксипролина и лизина в сыворотке крови / И.Д. Мансурова, Е.Н. Набиджанова // Лаб. дело. – 1982. – № 8. – С. 459–461.
33. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: В 2-х Т. – 14-е изд. перераб. и доп. – М.: Новая волна, 2000. – Т. 1–2.
34. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермаковой. – Л.: Химия, 1977. – 540 с.
35. Непрямое полярографическое определение триптофана, триптамина и серотонина в водно-органических растворах формальдегида / И.И. Левина, Г.В. Чечекин, А.П. Арзамасцев и др. // Хим.-фарм. журн. – 1997. – Т. 31, № 10. – С. 50–51.
36. Одновременное определение аминокислот в пищевых продуктах методом капиллярного электрофореза при косвенном детектировании в УФ-лучах / Chen Bing, Li Xiaoge, He Ping et al // РЖ 19. Химия. Сводн. т. / ВИНТИ. – 2004. – № 22. – Р.1.19.
37. Определение аминокислот и глюкозы в аминокислотных инъекционных растворах методом анионообменной хроматографии с интегрированным импульсным амперометрическим детектированием / Yu Hong, Ding Yong Sheng et al // РЖ 19. Химия. Сводн. т. / ВИНТИ.– 2003. – № 4. – Г.294.

38. Определение следовых количеств аминокислот нейротрансмиттеров в плазме крови крыс методом капиллярного электрофореза в сочетании с детектированием флуоресценции, индуцированной диодным лазером / Fu Min, Zhang Dongming, Ma Wanyan et al // РЖ 19. Химия. Сводн. т. / ВИНТИ.– 2003. – № 20. – Г.322.
39. Островский С.Ю. Изучение роли гистидина в неферментативной инактивации ацетальдегида / С.Ю. Островский, В.И. Кондаков // Хим.-фарм. журн. – 1987. – Т. 21, № 9. – С. 1034–1037.
40. Половодова Н.В. Разработка спектрофотометрической методики определения кислоты аспарагиновой на основе реакции с нингидрином / Н.В. Половодова // Молодежная наука Прикамье – 2002: Тез. докл. Обл. науч. конф. молодых ученых, студентов и аспирантов, Пермь, 6–9 декабря 2002 г. – Пермь, 2002. – С. 162.
41. Производные природных аминокислот в роли радиопротекторов / С.А. Казарян, К.П. Григорян, С.Н. Айрапетян и др. // Хим.-фарм. журн. – 1995. – Т. 29, № 7. – С. 11–15.
42. Раевский К.С. Медиаторные аминокислоты / К.С. Раевский, В.П. Георгиев – М.: Медицина, 1986. – 240 с.
43. Разводовский Ю.В. Влияние L-триптофана на содержание свободных аминокислот и биогенных аминов в головном мозге крыс при субхронической интоксикации фенобарбиталом / Ю.В. Разводовский, Е.М. Дорошенко // Хим.-фарм. журн. – 2003. – Т. 37, № 1. – С. 6–7.
44. Разделение аминокислот методом капиллярного электрофореза с использованием 9-(2-карбазол)-этилхлорформиата (СЕОС) в качестве дериватизирующего агента / Ming Yong-fei, Sun Yu-xi, Shi Yun wei et al // РЖ 19. Химия. Сводн. т. / ВИНТИ.– 2006. – № 8. – Б2.542.
45. Россихина А.В. Разработка способа определения калия аспарагината в препарате «Аспаркам» / А.В. Россихина // Молодежная наука Прикамье – 2002:

- Тез. докл. Обл. науч. конф. молодых ученых, студентов и аспирантов, Пермь, 6–9 декабря 2002 г. – Пермь, 2002. – С. 163.
46. Способ количественного определения алифатических аминокислот: Пат. 2167410 РФ МКИ G 01 N 21/78. – № 99116880/28 / Т.И. Ярыгина, А.В. Захаров, В.А. Дубовик; Заявлено 03.08.1999 // Изобретения полезные модели. – 2001. – № 14. – С.478.
 47. Способ получения пищевой добавки из какаоветлы для кондитерских производств: А.С. 1679679 СССР МКИ А 23 G 1/00. / Э.Т. Оганесян, А.В. Симонян и др.; Заявлено 15.08.88. Зарегистрировано 22.05.91.
 48. Способ получения средства, обладающего гепатозащитным, желчегонным и антиоксидантным действием: Пат. 2033176 РФ МКИ А 61 К 35/78. – № 4934925/14 / Э.Т. Оганесян, А.В. Симонян и др.; Заявлено 07.05.91 // Изобретения (заявки и патенты) – 1995. – № 11. – С.113.
 49. Стандартизация лекарственных форм фенибута / Т.И. Ярыгина, Л.А. Черышкина, Г.Г. Перевозчикова и др. // Фармация – 2004. – Т. 53, № 5. – С. 14–15.
 50. Стандартизация рогов и пантов северного оленя. 1. Количественное определение нингидринактивных веществ в порошке рогов северного оленя / В.П. Пахомов, Т.В. Максимова, И.Н. Никулина и др. // Хим.-фарм. журн. – 1997. – Т. 31, № 4. – С. 53–54.
 51. Тихонов Б.Б. Применение метода капиллярного электрофореза для исследования аминокислотного состава белков амаранта / Б.Б. Тихонов // Вестн. Тверск. гос. техн. ун-та. – 2002. – № 2. – С. 128–130.
 52. УФ-спектрофотометрическое определение ароматических аминокислот / Е.Р. Рошаль, В.Н. Сенаторова, А.Ф. Шолин и др. // Хим.-фарм. журн. – 1991. – Т. 25, № 4. – С. 80–83.
 53. Химия биологически активных и природных соединений / Под ред. Н.А. Преображенского, Р.П. Евстигнеевой. – М.: Химия, 1970. – 512 с.

54. Цистеин: ВФС 42-2633-96. – 20.02.96.
55. Чернобровкин М.Г. Определение аминокислот в препарате «Элтацин» / М.Г. Чернобровкин, Н.В. Кольцова, Б.Н. Шепелев // Фармация – 2004. Т. 53, № 5. – С. 18–20.
56. Чистякова А.М. Влияние некоторых аминокислот на показатели липидного обмена в эксперименте / А.М. Чистякова, В.Н. Мирошкина // Вопросы питания. – 1990. – № 1. – С. 40–41.
57. Шайдарова Л.Г. Концентрирование и электрокаталитическое определение некоторых серусодержащих аминокислот на электродах, модифицированных металлофталоцианинами / Л.Г. Шайдарова, С.А. Зиганишина, Г.К. Будников // Разделение и концентрирование в аналитической химии: Материалы международного симпозиума, посвященного юбилею академика Ю.А. Золотова, Краснодар, 6–11 октября 2002 г. – Краснодар, 2002. – С. 122–123.
58. Шпак А.В. Электрофоретические методы определения аминокислот / А.В. Шпак, А.В. Пирогов, О.А. Шпигун // Международный форум «Аналитика и аналитики»: Каталог рефератов и статей. Т. 1. Воронеж, 2–6 июля 2003 г. – Воронеж, 2003. – С. 192.
59. Яханбахшт Гасеми. Одновременное спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты и L-цистеина в фармацевтических препаратах с использованием метода двух скоростей реакций и дифференциально-кинетического метода / Яханбахшт Гасеми, Шахзад Наеби // Хим.-фарм. журн. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 41–48.
60. Abbaspour A. Determination of L-histidine by modified carbon paste electrode using tetra-3,4-pyridinoporphirazinatocopper (II) / A. Abbaspour, A. Ghaffarinejad, E. Safaei // Talanta. – 2004. – VOL. 64, № 4. – P. 1036–1040.

61. A MRI contrast medium composition: Пат. 1350524 ЕПВ, МКИ А61 К 49/06 / Henrik Thomsen // РЖ 19. ХИМИЯ. Сводн. т. / ВИНТИ. – 2005. – № 4. – О.283П.
62. Compositions and methods for lowering plasma lipoprotein A and risk factors of cardiovascular diseases: Пат. 6693129 США, МКИ А61 К 31/34 / Matthias Rath, Rath Matthias // РЖ ХИМИЯ: Сводн. т. / ВИНТИ – 2005. – № 2. – О.265П.
63. Dimova N. RP-HPLC analysis of amino acids with UV-detection / N. Dimova // Докл. Болг. АН. – 2003. – Т. 56, № 12. – С. 75–78.
64. Enteric formulation: Пат. 6864242 США, МПК⁷ А61 К 31/70 / Ernest Stephen // РЖ 19. ХИМИЯ. Сводн. т. / ВИНТИ. – 2005. – № 21. – О.188П.
65. Garcia-Willar N. Liquid chromatographic determination of lysine by potentiometric detection with biosensor / N. Garcia-Willar, Hernandez-Cassou // Anal. Lett. – 2002. – № 8. – P. 1313–1323.
66. Gatte R. Phanquene: a useful fluorescent pre-chromatographic derivatization reagent for liquid chromatographic analyses of amino acid dosage form / R. Gatte, M.G. Gioia, A.M. Di Pieta // Anal. chem. acta. – 2002. – № 1–2. – P. 11–20.
67. Infant formula with free amino acids and nucleotides: Пат. 6511696 США, МПК⁷ А23 L 1/305 / Gohman Sharon, Lowry Carol J.O. // РЖ 19. ХИМИЯ. Сводн. т. / ВИНТИ. – 2003. – № 16. – P.133П.
68. Khan A.A. Studies of the kinetics and mechanism of interaction of α -amino acids with ninhydrin // J. Indian Chem. Soc. – 1989. – VOL. 66, № 7. – P. 454–456.
69. Kuryt T. Quantitative analysis of amino acids in biological fluids by gas chromatography with flame ionization detection / T. Kuryt, D. Sawnor–Corszynska // Acta chromatogr. – 2000. – № 10. – P. 97–103.

70. Natural composition for the treatment of circularly conditions: Пат. 6340480 США, МПК⁷ А61 К 35/78 / Duckett Melvin J., Moore Kyle // РЖ 19. Химия. Сводн. т. / ВИНТИ. – 2003. – № 1. – О.273П.
71. Novatchev N. Evaluation of the impurity profile of amino acids by means of CE. / N. Novatchev, U. Holzgrabe // J. Pharm. and biomed. Anal. – 2001. – VOL. 26, № 5–6. – P. 779–789.
72. Sequential injection analysis system for on-line monitoring of l-cysteine concentration in biological processes / Lee Seung-Hyun, Sohn Ok-Jae, Yim Yong-Sik et al // Talanta. – 2005. – VOL. 65, № 2. – P. 187–192.
73. Therapeutic agent for primary biliary cirrhosis: Пат. 6339104 США, МПК⁷ А61 К 31/195 / Nishiguchi Shuhei, Sounaka Ichirou // РЖ 19. Химия. Сводн. т. / ВИНТИ. – 2003. – № 1. – О.250П.