

М. Ф. КЛЕЩЕВ, д-р техн. наук, проф. НТУ «ХП»;
Т. Д. КОСТИРКІНА, канд. хім. наук, проф. НТУ «ХП»;
А. В. ГРИШКОВСЬКА, студентка НТУ «ХП»

ДОСЛІДЖЕННЯ УМОВ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТРИПТОФАНУ

Приведено результати дослідження основних спектрофотометричних характеристик триптофану в ультрафіолетовій області та запропоновано умови його визначення: $\lambda = 280$ нм, середовище – 0,01–2 М розчин NaOH, інтервал концентрацій $(0,1-2,0) \cdot 10^{-4}$ М.

Ключові слова: спектрофотометричні характеристики, триптофан, умови визначення.

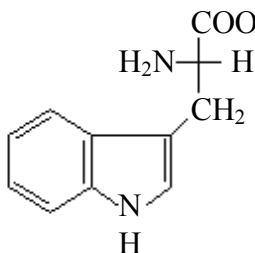
Вступ. Амінокислоти поступають в організм людей та тварин з їжею, головним чином у вигляді харчового білку, займають центральне місце в азотистому обміні і забезпечують синтез в організмі його власних білків і нуклеїнових кислот, ферментів, багатьох коферментів, гормонів та інших біологічно активних речовин. Найпоширенішими є 20 амінокислот (стереоізомери L-ряду), що являються основною структурною частиною молекул білків та можуть існувати у незв'язаному вигляді. До цих найпоширеніших амінокислот відноситься і триптофан.

Триптофан – кристалічний або аморфний порошок: розчинність у 100 г води 1,1 г; малорозчинний у етанолі, розчиняється в розведених розчинах гідроксидів лужних металів і мінеральних кислот. Це неполярна, незамінна, нейтральна амінокислота, що використовується в якості добавки до харчових продуктів та як лікарський засіб: вона сприяє синтезу в головному мозку серотоніну, одного з найважливіших нейромедіаторів, який необхідний тим, хто страждає від безсоння, депресії і для стабілізації доброго настрою [1–4].

В промисловості триптофан виробляють мікробіологічним методом, виділяючи його із культурального середовища визначених штамів бактерій, можна також отримати триптофан із гідролізатів білків або хімічним синтезом.

У всіх цих випадках необхідно мати надійні і прості методи визначення триптофану в сировині, напівпродуктах і готовій продукції та методи аналізу препаратів на основі цієї амінокислоти.

Аналіз останніх досліджень та літератури. Триптофан $C_{11}H_{12}N_2O_2$ (α -аміно-3-індолілпропіонова кислота або β -індоліл- α -аланін) можна визначити хроматографічним, титриметричним чи спектрофотометричним



методами [5–12]. Що стосується спектрофотометричного методу визначення триптофану за його поглинанням в ультрафіолетовій (УФ) області спектру, то найповніші дані є в роботі [8]. Авторами цієї роботи пропонується визначати триптофан при рН 3,0–9,2 в інтервалі концентрацій $(0,4–1,5) \cdot 10^{-4}$ М.

Мета досліджень, постановка проблеми. Метою цієї роботи є розширення діапазону визначуваних концентрацій триптофану (W) за інтенсивністю поглинання в УФ області. Для цього досліджувалися спектрофотометричні аналітичні характеристики триптофану в широкому інтервалі кислотності та концентрації цієї амінокислоти та стабільність аналітичного сигналу при зберіганні розчинів аналіту.

Матеріали досліджень. Враховуючи той факт, що для розчинення амінокислоти використовувалася вода, що є універсальним розчинником при спектрофотометрії амінокислот і має нижню межу пропускання 210 нм [8], нами для роботи була вибрана близька УФ область спектру в інтервалі 220–400 нм. Спектри поглинання розчинів триптофану знімали при температурі в інтервалі 15–25 °С.

Вихідний 0,01 М розчин триптофану готували за точною наважкою амінокислоти, розчини менших концентрацій – розбавленням вихідного розчину. Для отримання розчинів амінокислоти з рН < рІ використовували розчин хлоридної кислоти, з рН > рІ – розчин натрію гідроксиду.

Для роботи використовували спектрофотометр СФ-26 правильність роботи якого перевірялася за стандартними розчинами калію діхромату [10] та рН-метр рН-340, градуйований за стандартними буферними розчинами згідно з інструкцією до роботи приладу та використовували кювети з товщиною поглинаючого шару 1 см.

Оскільки триптофан є цвіттерлітом, що дисоціює як по основному, так і по кислотному механізму і має ізоелектричну точку ($pI = 5,9$), спектрофотометричні характеристики його вивчали в широкому інтервалі рН.

Результати досліджень.

Спектри поглинання триптофану у водному розчині та у розчині хлоридної кислоти представлені на рис. 1.

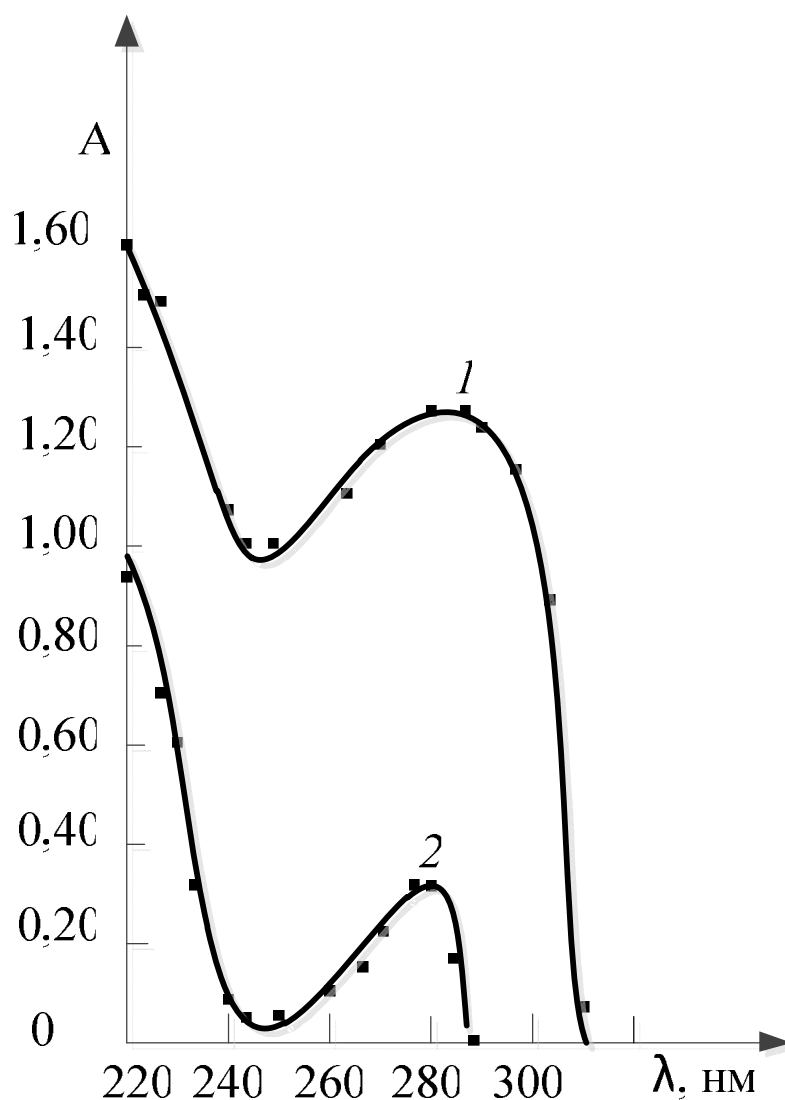


Рис. 1 – Спектри поглинання триптофану: $C = 5 \cdot 10^{-5}$ М, $l = 1$ см.;
1 – розчин триптофану в 0,1 М НСl; 2 – водний розчин триптофану

Як видно із рис. 1, положення максимумів смуг поглинання практично не змінюються із зміною кислотності розчинів і є в області 278–282 нм, що близько до літературних даних [9].

При дослідженні спектрів поглинання розчинів триптофану в лужному середовищі, в інтервалі від 0,1 М до 3 М розчинів NaOH отримано аналогічні результати.

Розраховано молярні коефіцієнти поглинання в кислій, нейтральній і лужній областях, що становлять 5400 ± 180 ; 5600 ± 190 ; 8800 ± 205 відповідно.

При спектрофотометричних дослідженнях одним із основних показників є стійкість аналітичного сигналу в процесі зберігання розчинів (рис. 2).

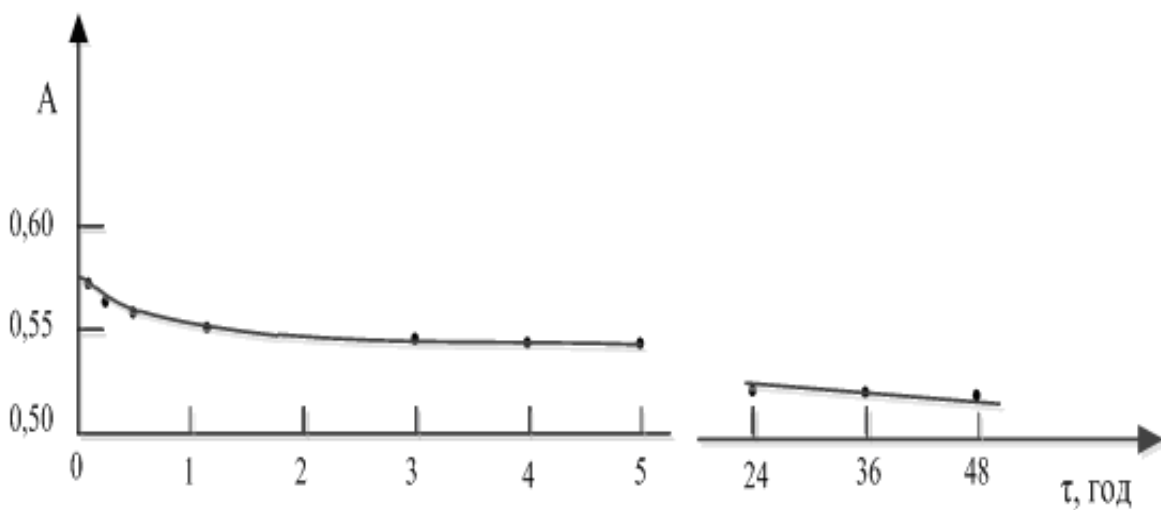


Рис. 2 – Стійкість розчину триптофану при зберіганні $C = 5 \cdot 10^{-5}$ М в 2 М розчині NaOH

Оптична густина розчину триптофану з часом незначно падає: за перші 0,5 год на 0,02, а потім за наступні 4,5 год на 0,01 і через 48 год зменшується на 0,07 одиниць в порівнянні з початковим значенням. Тобто, можна вважати, що через 0,5 год після розбавлення оптична густина розчину триптофану впродовж п'яти годин практично не змінюється.

Залежність світлопоглинання розчинів триптофану від рН в інтервалі довжин хвиль, близькому до максимального поглинання, в областях рН існування триптофану в катіонній, аніонній формі і у вигляді цвіттерліту, знайдено, що в широкому інтервалі рН, від кислого (0,1 М HCl) і до лужного середовища (3 М NaOH), максимум поглинання практично не змінюється і є в області 278–282 нм.

Для визначення оптимальних значень рН визначення триптофану досліджувалася залежність оптичної густини розчинів від рН (див. рис. 3). Як видно із рис. 3, в інтервалах рН 3–9; рН 12–3 М NaOH оптична густина має постійне, хоч і неоднакове, значення. При вищих значеннях рН поглинання дещо вище.

Така залежність вказує на існування переважно однієї із форм цвіт-терліта триптофану (W^{\pm}) при значеннях рН > 12 , а саме аніону (W^{-}), що стосується слабо кислого, нейтрального та слабо лужного середовищ, то форми існування в них триптофану (W^{+} , W^{\pm}) мають однакові спектрофотометричні характеристики.

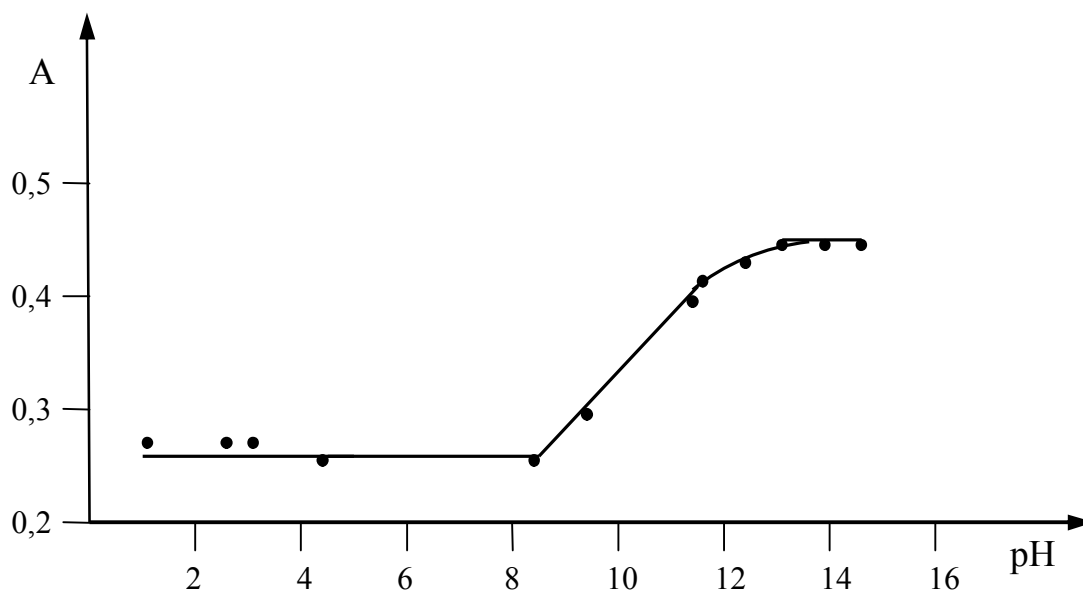


Рис. 3 – Залежність оптичної густини розчинів триптофану від рН:
 $C = 5 \cdot 10^{-5}$ М; $\lambda = 280$ нм; $l = 1$ см

Для побудови градууювального графіка готували серію розчинів триптофану в 2 М розчині NaOH з концентраціями $1 \cdot 10^{-5}$ – $20 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³, використовуючи вихідний розчин триптофану з концентрацією $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ і через 30 хвилин вимірювали їх аналітичний сигнал.

На рис. 4 приведено градууювальник графік для визначення триптофану в лужному середовищі.

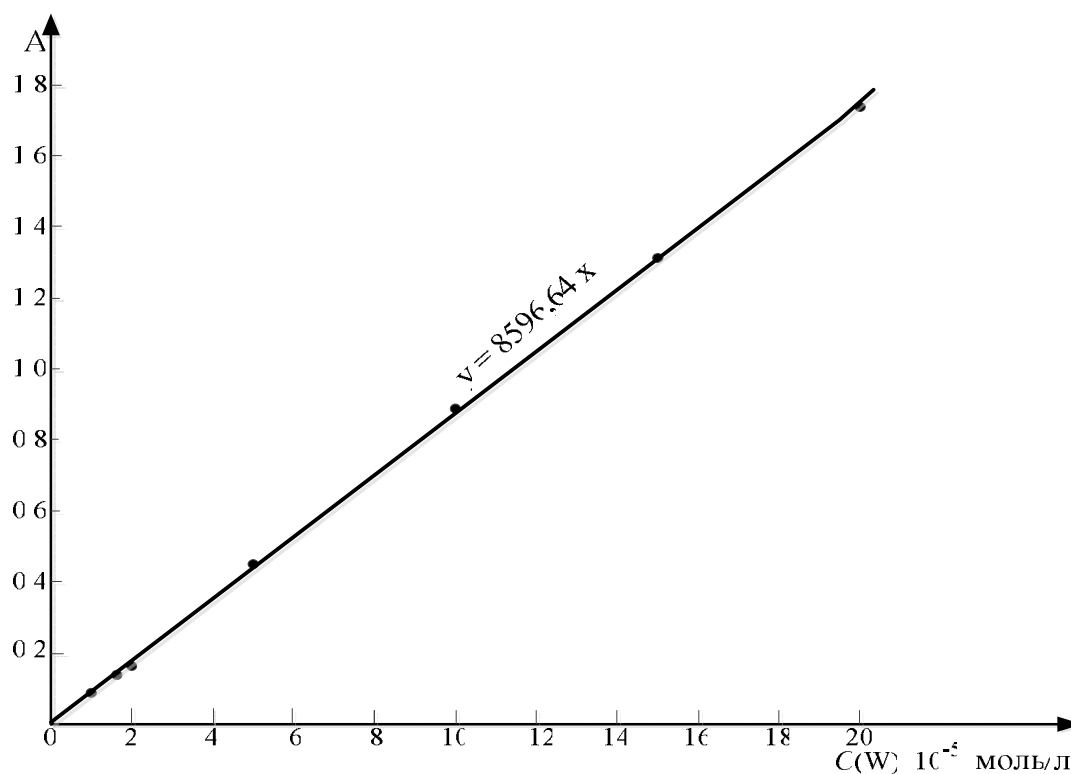


Рис. 4 – Градувальний графік для визначення триптофану при $\lambda = 280$ нм в 2 М розчині NaOH, $l = 1$ см

Градувальна функція для визначення триптофану при тих же умовах, але в середовищі 0,01 М розчину NaOH практично співпадає із наведеною в рис. 4.

Висновки.

На основі результатів дослідження спектрофотометричних характеристики триптофану встановлено оптимальні умови спектрофотометричного визначення триптофану в ультрафіолетовій області спектру:

- 1) $\lambda = 280$ нм; середовище – 0,01–2 М розчин NaOH;
- 2) інтервал концентрацій складає $0,1 \cdot 10^{-4}$ – $2,0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³.

Визначення триптофану в лужному середовищі дає можливість розширити діапазон визначуваних концентрацій триптофану спектрофотометричним методом, при цьому в 4 рази зменшити нижню межу його визначення.

Список літератури: 1. Державна фармакопея України.– Харків: РІРЕГ, 2001.– 531 с. 2. Большая медицинская энциклопедия. – М.: Медицина, 1986. С. 1091-1099. 3. Досон Р. Справочник

биохимика / Р. Досон, Д. Єлліот, У Джонс.– М.: Мир.– 554 с. 4. Анохіна Г. Особливо важливі для життя / Г. Анохіна // Здоров'я і довголіття, 2010, № 30.– С. 4. 5. Филиппович Ю.Б. Практикум по общей биохимии / Ю.Б. Филиппович, Т.А. Егорова, М.И. Севастьянова.– М.: Просвещение, 1982.– 311 с. 6. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков / Пер. с англ. / Под ред. Овчинникова Ю.А.– М.: Мир, 1974.– 461 с. 7. Крешков А.П. Основы аналитической химии. Т. 3. / А.П. Крешков.– М.: Химия.– 472 с. 8. Котова Д.Л. Спектрофотометрическое определение аминокислот в водных растворах / Д.Л. Котова, Т.А. Крысанова, Т.В. Елисеева.– Учебное пособие. Воронеж: Воронежский государственный университет, 2004.– 55 с. 9. Свердлова О.В. Электронные спектры в органической химии / О.В. Свердлова, Э. Штерн, К. Тиммонс.– М.: Мир, 1974.– 296 с. 10. Берштейн И.Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И.Я. Берштейн, Ю.Л. Каминский.– Л.: Химия, 1975.– 232 с. 11. Бабко А.К. Фотометрический анализ. Общие сведения и аппаратура / А.К. Бабко, А.Т. Пилипенко.– М.: Химия, 1968.– 387 с. 12. Ляликов Ю.С. Физико-химические методы анализа / Ю.С. Ляликов.– М.: Химия, 1974.– 536 с. 13. Казичина Л.А. Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектроскопии в органической химии / Л.А. Казичина, Н.Б. Куплетская.– М.: Изд-во МГУ, 1979.– 240 с.

Надійшла до редколегії 24.12.2012

УДК 543.42

Дослідження умов спектрофотометричного визначення триптофану / М. Ф. Клещев, Т. Д. Костиркіна, А. В. Гришковська // Вісник НТУ «ХП». Серія: Інноваційні дослідження у наукових роботах студентів. – Х. : НТУ «ХП». – № 9 (983). – С. 55–61. – Бібліогр.: 13 назв.

Приведены результаты исследования основных спектрофотометрических характеристик триптофана в ультрафиолетовой области и предложены условия его определения: $\lambda = 280$ нм, среда – 0,01–2 М раствор NaOH, интервал концентраций $(0,1–2,0) \cdot 10^{-4}$ М.

Ключевые слова: спектрофотометрические характеристики, триптофан, условия определения.

Are the results of research of basic spectrophotometric descriptions of triptophane resulted in an ultraviolet area and the terms of determination are offered: $\lambda = 280$ nm, an environment is approximately 0,01–2 M solution of NaOH, interval of concentrations $(0,1–2,0) \cdot 10^{-4}$ M. Il.: 4.

Keywords: spectrophotometric descriptions, triptophane, terms of determination.