

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ

© Э. И. Сулейманова

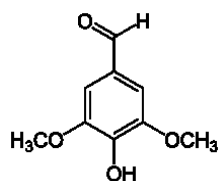
*Азербайджанский государственный университет нефти и промышленности
Азербайджан, AZ 1010 г. Баку, пр. Азадлыг, 20.*

Email: suleymanova1944@mail.ru

Аминокислоты представляют собой органические соединения, в молекуле которых одновременно содержатся карбоксильные и аминные группы. Основные химические элементы аминокислот – это углерод (С), водород (Н), кислород (О) и азот (N), хотя другие элементы также встречаются в радикале определенных аминокислот. Известны около 500 встречающихся в природе аминокислот (хотя только 20 используются в генетическом коде). Последние двадцать аминокислот называют незаменимыми. Незаменимые аминокислоты – это необходимые аминокислоты, которые не могут быть синтезированы в том или ином организме. Для разных видов организмов список незаменимых аминокислот различен. Все белки, синтезируемые организмом, собираются в клетках из 20 базовых аминокислот, только часть из которых может синтезироваться организмом. Невозможность сборки определенного белка организмом приводит к нарушению его нормальной работы, поэтому необходимо поступление незаменимых аминокислот в организм с пищей. В связи с этим перед химиками-аналитиками стоит первоочередная задача разработки эффективных методов качественного и количественного определения аминокислот. В представленной работе показаны результаты по применению метода спектрофотометрии для определения аминокислот.

Ключевые слова: аминокислоты, спектрофотометрия, количественный анализ, незаменимые аминокислоты, предел обнаружения.

Аминокислоты представляют собой класс органических соединений, в молекулах которых одновременно содержатся две функциональные группы: карбоксильная COOH и аминная NH_2 . Одним из эффективных методов определения аминокислот является метод спектрофотометрии. В этой работе нами представлен анализ результатов научных исследований в области определения аминокислот методом спектрофотометрии. Так, в работе [1] описан спектрофотометрический метод определения аминокислот, основанный на реакции между аминокислотами и сиринальдегидом при pH 9.0, в результате которой в водном метиловом спирте возникает цвет с максимальным поглощением при 420 нм.

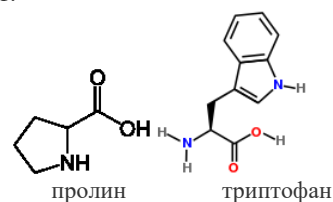


сирингальдегид

Поглощение продукта подчиняется закону Бера в диапазоне концентраций 0.025–0.5 мМ исходной аминокислоты. Кинетика реакции следует общей кинетике второго порядка, первого порядка по каждому из реагентов. Скорости реакции исследовали в зависимости от pH реакционной среды и строения аминсоединений. Показано, что логарифмы констант скорости второго порядка увеличивались с увеличением концентрации аниона аминокислоты по мере увеличения pH. Авторами обсуждаются механизмы реакции.

Следует отметить, что исследования по определению аминокислот методом спектрофотометрии берут свое начало со второй половины прошлого столетия, и в одной из работ [2] была показана возможность определения аминокислот спектрофотометрическим методом с помощью их медных солей, а в другой работе [3] для этой цели была использована нингидринная реакция.

В патентном методе [4] в пробу добавляют избыток раствора 7-хлор-4,6-динитробензофуросана в органическом растворителе. Приготовленный таким образом раствор нейтрализуют, регистрируют его оптическую плотность при длине волны 500–550 нм. Предлагаемый метод позволяет селективно определять пролин или триптофан в присутствии других аминокислот.



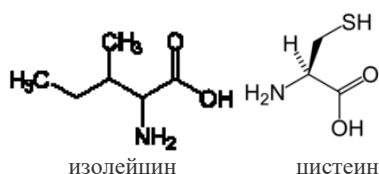
пролин

триптофан

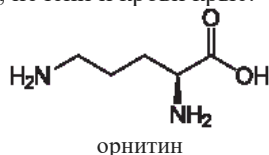
Разработан новый спектрофотометрический метод определения содержания триптофана в белковых гидролизатах [5]. В качестве реагента используется сульфат дифениламина, который окисляется до дифенилбензидинсульфокислоты после реакции с нитритом натрия в среде серной кислоты. Нестабильный продукт окисления быстро реагирует с нитритом натрия с образованием диазотированного промежуточного продукта. Когда диазотированный промежуточный продукт сочетается с триптофаном,

образуется продукт розового цвета, который стабилен в течение не менее 1 ч при температуре окружающей среды. Этот окрашенный продукт имеет максимум поглощения при 522 нм и молярную абсорбционную способность $0.89 \cdot 10^4$ л/(моль·см). Закон Бера соблюдается в диапазоне 0.30–12 мг/мл. Метод применен для анализа содержания триптофана в белковых гидролизатах белого амура. Более того, его сравнивают с анализом высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой. Достоверной ($p < 0.05$) разницы между двумя результатами нет. Метод прост, быстр и точен по сравнению с предыдущими.

Предложен спектрофотометрический метод определения содержания белка в образце после полного кислотного гидролиза [6]. В этой методике свободные аминокислоты реагируют с *o*-фталевым альдегидом и *N*-ацетил-L-цистеином при pH 9.5 с использованием изолейцина в качестве эталонного соединения. Поправочные коэффициенты используются для учета различий между молярной абсорбционной способностью изоиндолов аминокислот и восстановлением аминокислот после обработки гидролизом. Предел обнаружения находился в диапазоне 40–50 мкг белка. Также определяли содержание свободных аминокислот в частично гидролизованном белке.



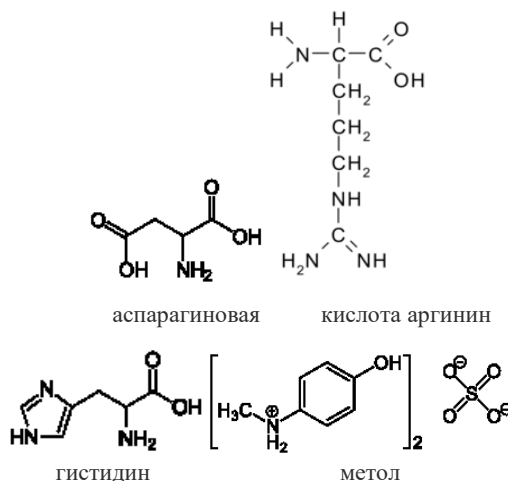
В работе [7] было обнаружено, что кислый нингидриновый реагент специфически реагирует с образованием продукта розового цвета ($E_{\text{макс.}} 560$ мкм) с цистеином. Метод оказался высокочувствительным для определения цистеина (при концентрации 28.0×10^3). Гомоцистеин, глутатион, пролин, орнитин и другие протестированные природные аминокислоты не давали подобной реакции. Продукт реакции был стабилен не менее 3–4 ч при комнатной температуре, и экстинкция была пропорциональна концентрации цистеина в диапазоне 0.05–0.5 мкмоль. Кислотный нингидриновый реагент также давал желтые продукты ($E_{\text{макс.}} 370$ – 404 мкм) с триптофаном, 5-гидрокситриптофаном, 5-гидрокситриптамимином и индол-3-илуксусной кислотой. Метод применен для определения цистеина в хлорнокислых экстрактах мозга, печени и крови крыс.



Показано [8], что между скоростями реакции восьми незаменимых аминокислот с нингидрином и между спектрами поглощения продуктов их реакции

практически нет различий (дифференциально-скоростной кинетический метод). В данной работе заново оптимизированы условия проведения хромогенных реакций лейцина, изолейцина, триптофана, лизина, треонина, валина, фенилаланина и метионина с нингидрином, затем применен метод частичных наименьших квадратов (ЧНК) для одновременного определения двух смесей, каждая из которых содержит пять различных аминокислот среди выше восьми незаменимых аминокислот (обработка данных с помощью микрокомпьютера). Метод прост, быстр, точен, и результаты согласуются как с настоящими значениями, так и с данными, полученными с помощью автоанализатора аминокислот. Кроме того, наши эксперименты показывают, что этот метод лучше, чем метод фильтра Калмана.

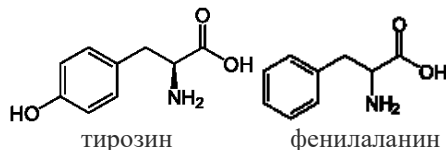
В работе [9] описаны простые и чувствительные спектрофотометрические методы определения пролина, гидроксипролина, аспарагиновой кислоты, аргинина и гистидина, основанные на образовании окрашенных частиц с метолом и гипохлоритом натрия или хлорамином-Т. Изучены влияние других аминокислот и наилучшие условия образования окрашенных комплексов. Методы применимы для определения вышеупомянутых аминокислот в чистых образцах и в белковых гидролизатах.



Разработан новый простой метод обнаружения свободных аминокислот (TFAA) в *Sipunculus nudus* с помощью УФ-спектрофотометрии [10]. Были оптимизированы условия предварительной обработки подхода, такие как температура и время хромогенной реакции, время измерения после хромогенной реакции, экстрагирующий агент и его концентрация, время экстракции. Установленный метод показал хорошую линейность в диапазоне TFAA 0.0 ~ 40.0 мкг/мл ($R^2 = 0.9958$) с пределом обнаружения (LOD) 1.96 мкг/мл и точностью 6.14% (относительное стандартное отклонение, RSD). Стандартные извлечения при добавлении составили 95.1% ~ 108.6%. Наконец, метод был успешно применен для обнаружения TFAA в *Sipunculus nudus* и других вод-

ных продуктах. Результаты показали, что содержание TFAA в *Sipunculus nudus* было выше, чем в других водных продуктах, собранных в этой работе.

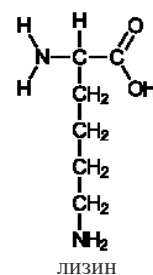
Для одновременного количественного определения трех ароматических аминокислот триптофана, полярных тирозина и фенилаланина TRP, TYR и PHE применяли простой УФ-спектрофотометрический дифференциальный метод дериватизации [11]. Отсутствие затрат времени и реагентов на этапы подготовки пробы или отделения анализа от основной массы помех сделало этот подход экологически безопасным, устойчивым и экологичным. Линейные калибровочные кривые дифференциальной второй производной строили при оптимальной длине волны для каждого анализа (218.9, 236.1 и 222.5 нм) для PHE, TRP и TYR соответственно. Количественное определение для каждого анализа проводилось в диапазоне концентраций (1.0–45, 0.1–20.0 и 1.0–50.0 мкг/мл) в повторах (n=3) с приемлемым значением линейности R^2 (0.9983, 0.9970 и 0.9990) для PHE, TRP и TYR соответственно. Хорошая воспроизводимость подхода выражалась в низких значениях относительных стандартных отклонений, которые составляли менее 1.03%. Для подтверждения точности метода было проведено исследование восстановления, которое составило (97.35–99.65, 99.90–96.10 и 98.30–99.03) для PHE, TRP и TYR соответственно. Предложенный подход может быть удовлетворительно применен к анализу указанных аминокислот в фармацевтических препаратах.



В работе [12] для определения аминокислот предложен спектрофотометрический проточно-инжекционный метод, основанный на иммобилизации 1,2-нафтохинон-4-сульфонатного реагента в анионообменном насадочном реакторе Amberlite IRA 904. Реагент был прикреплен к этому твердому слою за счет электростатического связывания между сульфонатными и четвертичными группами аммония. Этот твердофазный реактор использовали в качестве источника реагента, поскольку его можно было десорбировать с помощью раствора соляной кислоты. Реагент, высвобождаемый в проточной системе, реагирует с аминокислотами в термостатируемом реакционном змеевике с образованием соответствующих производных. Спектрофотометрическое детектирование проводили при 480 нм. Для глицина отклик был линейным до 1.5×10^{-3} М, предел обнаружения 5.3×10^{-4} М, повторяемость 0.4% и воспроизводимость 5.4%. Метод применялся для анализа некоторых аминокислот в нескольких фармацевтических образцах. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами стандартного метода анализа аминокислот.

Разработан и валидирован новый простой и чувствительный спектрофотометрический метод определения L-тирозина в фармацевтических препаратах [13]. Спектрофотометрический метод основан на реакции L-тирозина с 4-хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом (НБД-Cl) в щелочной среде (pH 10.0) с образованием оранжевого продукта-поглопителя при 388 нм. Переменные, влияющие на реакцию L-тирозина с NBD-Cl, были тщательно изучены и оптимизированы. В оптимальных условиях реакции были обнаружены хорошие линейные зависимости между показаниями и концентрациями L-тирозина в диапазоне 10–50 мкг/мл. Предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ) составили 2.85 мкг/мл и 8.6 мкг/мл соответственно. Метод был успешно применен для определения L-тирозина в его фармацевтических препаратах.

Серийные определения лизина проводили спектрофотометрическим методом, основанным на специфической реакции Шторхера [14]. Сравнения были сделаны с помощью анализатора аминокислот, и стандартные различия были устранены с помощью математических расчетов. Этот метод подходит для скрининга злаков на повышенное содержание лизина или в сочетании с любым анализом белка на повышенное соотношение лизин/белок.



Представлен спектрофотометрический метод определения лизина гидрохлорида и глютаминовой (глутаминовой) кислоты, основанный на их реакции с ацетилацетонформальдегидным реагентом [15]. Полученные окрашенные хромогенные частицы в растворе измеряют непосредственно при их длине волны максимальной оптической плотности 415 нм. Закон Бера соблюдается в диапазоне концентраций 10–60 мкг/мл гидрохлорида лизина и 20–160 мкг/мл глютаминовой кислоты. Предлагаемый метод применяется для анализа их фармацевтических составов. Результаты выгодно отличаются от полученных официальным методом.



Исследования в области разработки новых методик спектрофотометрического определения аминокислот также рассматривались в работах [16–23].

Таким образом, приведенный обзор результатов исследований в области изучения и определения

аминокислотных фрагментов в молекулах органических соединений показывает, что эти работы продолжают интенсивно развиваться и появляются весьма благоприятные перспективы для проведения этих исследований на современном этапе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Medien H. A. Spectrophotometric method for determination and kinetics of amino acids through their reaction with syringaldehyde // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 1998. Vol. 54. N 2. P. 359–365.
2. Spies J., Chambers D. Spectrophotometric analysis of aminoacids and peptides with their copper salts // *Journal of Biological Chemistry*. 1951. Vol. 191. N 2. P. 787–797.
3. Fitzpatrick W. H. Spectrophotometric Determination of Amino Acids by the Ninhydrin Reaction // *Science*. 1949. Vol. 109. N 6. P. 469–472.
4. Patent RU. 2012869C1. 1991. Method of spectrophotometric determination of aminoacids / М. И. Евгеньев, Н. Г. Николаева, Ф. С. Левинсон, Д. Г. Победимский, И. И. Евгеньева.
5. Jiaovan R., Mouming Z., Jinshui W. Spectrophotometric Method for Determination of Tryptophan in Protein Hydrolysates // *Food Technology and Biotechnology*. 2007. Vol. 45. N 4. P. 360–366.
6. Medina Hernandez M. J., Camanas R. V., Cuenca E., Alvarez-Coque M. C. Determination of the protein and free amino acid content in a sample using o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine // *Analyst*. 1990. Vol. 115. N 8. P. 1125–1128.
7. Gaitonde M. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids // *Biochem J*. 1967. Vol. 104. N 2. P. 627–633.
8. Guozhen F., Nie L. Determination of eight essential amino acids in mixtures by chemometrics–spectrophotometry without separation // *Analytica Chimica Acta*. 2001. Vol. 445. N 2. P. 245–253.
9. Tummuru M. K., Ekambareswara K., Sastry C. S. Spectrophotometric determination of amino acids using metol and sodium hypochlorite or chloramine-T // *Microchimica Acta*. 1984. Vol. 84. P. 199–208.
10. Hongli Y., Yongiong C., Zhang L., Wei X. Determination of total free amino acids in *Sipunculus nudus* by UV spectrophotometry // *E3S Web of Conferences*. 2020. Vol. 189. P. 2013–2015.
11. Al-Janabi K. W., Al-Jumaily A. K., Luaibi H. Quantitative analysis of some aromatic amino acids by Spectrophotometric mathematical derivatization // *Biochemical and Cellular Archives*. 2020. Vol. 20. N 2. P. 6435–6439.
12. Vela M., Saurina J., Hernandez-Cassou S. Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Amino Acids by Using 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate Immobilized on an Ion Exchange Resin // *Analytical Letters*. 1998. Vol. 31. N 2. P. 313–331.
13. Bsheir B. E., Elbashir A. Spectrophotometric methods for the determination of L-tyrosine in pharmaceutical formulations // *Chem Xpress*. 2015. Vol. 8. N 2. P. 95–101.
14. Maraz L., Votisky E. Application of a spectrophotometric method for lysine determination in cereal seeds // *Cereal Research Communications*. 1981. Vol. 9. N 2–3. P. 193–197.
15. Shah S. A., Devani M. B., Shishoo C. J., Soni K. P. Spectrophotometric determination of amino acids and their dosage forms // *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020. Vol. 120. P. 338–344.
16. Borchers R. Spectrophotometric Determination of Amino Acids. Alkaline Copper Salt Method Using Cuprizone, Biscyclohexanoneoxalyldihydrazone // *Anal. Chem*. 1959. Vol. 31. N 7. P. 1179–1180.
17. Demeester J., Bracke M., Vochten R., Lauwers A. Differential Spectrophotometric Determination of Tyrosine and Tryptophan in Pharmaceutical Amino Acid Solutions // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1978. Vol. 67. N 5. P. 729–730.
18. Gorumutsu G. P., Ratnakaram V. N., Malladi S. Ninhydrin based visible spectrophotometric determination of gemigliptin // *Orient J. Chem*. 2019. Vol. 35. N 1. P. 112–119.
19. Nnamonu L., Nkpa N. Use of Buffers in Spectrophotometric Determination of N- Phosphonomethylglycine by the Ninhydrin Colour Reaction // *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*. 2012. Vol. 1. N 1. P. 6–10.
20. Sriastava A. Micro-level Estimation of Methionine Using Inhibitory Kinetic Spectrophotometric Method // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2012. Vol. 11. N 3. P. 10654–10663.
21. Waddell W. J. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein // *J. Lab. Clin. Med*. 1956. Vol. 48. N 2. P. 311–314.
22. Vandana B. P., Kalpesh N., Mukund M., Bapna M. Spectrophotometric determination of histidine hydrochloride monohydrate in pharmaceutical formulations // *International Journal of Pharm Tech Research*. 2009. Vol. 1. N 3. P. 852–856.
23. Sinhababu A., Basu S., Haradhan D. Modified ninhydrin reagents to detect amino acids on TLC plates // *Research on Chemical Intermediates*. 2015. Vol. 41. P. 2785–2792.

*Поступила в редакцию 09.01.2023 г.
После доработки – 21.02.2023 г.*

DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2023.1.15

**APPLICATION OF SPECTROPHOTOMETRY
FOR THE DETERMINATION OF AMINO ACIDS**

© E. I. Suleymanova

*Azerbaijan State University of Oil and Industry
20 Azadlig Avenue, AZ 1010 Baku, Republic of Azerbaijan.**Email: suleymanova1944@mail.ru*

Amino acids are organic compounds that contain carboxyl and amine groups at the same time. The basic chemical elements of amino acids are carbon (C), hydrogen (H), oxygen (O), and nitrogen (N), although other elements also occur in the radical of certain amino acids. About 500 naturally occurring amino acids are known (although only 20 are used in the genetic code). The last twenty amino acids are called essential. Essential amino acids are essential amino acids that cannot be synthesized by any organism. For different types of organisms, the list of essential amino acids is different. All proteins synthesized by the body are assembled in cells from 20 basic amino acids, only a fraction of which can be synthesized by the body. The impossibility of assembling a certain protein by the body leads to disruption of its normal functioning; therefore, the intake of essential amino acids into the body with food is necessary. In this regard, analytical chemists face the primary task of developing effective methods for the qualitative and quantitative determination of amino acids. There are various physicochemical methods for the qualitative and quantitative determination of amino acid molecules in organic samples and pharmaceuticals. For this purpose, methods of infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance, ultraviolet spectroscopy and a number of other modern techniques can be used. The most effective and frequently used method for determining amino acids in analytics is spectrophotometry. In the presented work, we show the results of the application of the spectrophotometry method for the determination of amino acids in different samples.

Keywords: amino acids, spectrophotometry, quantitative analysis, essential amino acids, limit of detection.

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at bulletin_bsu@mail.ru if you need translation of the article.

1. Medien H. A. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 1998. Vol. 54. N 2. Pp. 359–365.
2. Spies J., Chambers D. *Journal of Biological Chemistry*. 1951. Vol. 191. N 2. Pp. 787–797.
3. Fitzpatrick W. H. *Science*. 1949. Vol. 109. N 6. Pp. 469–472.
4. Patent RU. 2012869C1. 1991. Method of spectrophotometric determination of aminoacids / M. I. Evgen'ev, N. G. Nikolaeva, F. S. Levinson, D. G. Pobedimskii, I. I. Evgen'eva.
5. Jiaovan R., Mouming Z., Jinshui W. *Food Technology and Biotechnology*. 2007. Vol. 45. N 4. Pp. 360–366.
6. Medina Hernandez M. J., Camanas R. V., Cuenca E., Alvarez-Coque M. C. *Analyst*. 1990. Vol. 115. N 8. Pp. 1125–1128.
7. Gaitonde M. *Biochem J*. 1967. Vol. 104. N 2. Pp. 627–633.
8. Guozhen F., Nie L. *Analytica Chimica Acta*. 2001. Vol. 445. N 2. Pp. 245–253.
9. Tummuru M. K., Ekambareswara K., Sastry C. S. *Microchimica Acta*. 1984. Vol. 84. Pp. 199–208.
10. Hongli Y., Yongiong C., Zhang L., Wei X. *E3S Web of Conferences*. 2020. Vol. 189. Pp. 2013–2015.
11. Al-Janabi K. W., Al-Jumaily A. K., Luaibi H. *Biochemical and Cellular Archives*. 2020. Vol. 20. N 2. Pp. 6435–6439.
12. Vela M., Saurina J. *Analytical Letters*. 1998. Vol. 31. N 2. Pp. 313–331.
13. Bsheir B. E., Elbashir A. *Chem Xpress*. 2015. Vol. 8. N 2. Pp. 95–101.
14. Maraz L., Votisky E. *Cereal Research Communications*. 1981. Vol. 9. N 2–3. Pp. 193–197.
15. Shah S. A., Devani M. B., Shishoo C. J., Soni K. P. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020. Vol. 120. Pp. 338–344.
16. Borchers R. *Anal. Chem*. 1959. Vol. 31. N 7. Pp. 1179–1180.
17. Demeester J., Bracke M., Vochten R., Lauwers A. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1978. Vol. 67. N 5. Pp. 729–730.
18. Gorumutsu G. P., Ratnakaram V. N., Malladi S. *Orient J. Chem*. 2019. Vol. 35. N 1. Pp. 112–119.
19. Nnamonu L., Nkpa N. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*. 2012. Vol. 1. N 1. Pp. 6–10.
20. Sriastava A. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2012. Vol. 11. N 3. Pp. 10654–10663.
21. Waddell W. J. *J. Lab. Clin. Med*. 1956. Vol. 48. N 2. Pp. 311–314.
22. Vandana B. P., Kalpesh N., Mukund M., Bapna M. *International Journal of Pharm Tech Research*. 2009. Vol. 1. N 3. Pp. 852–856.
23. Sinhababu A., Basu S., Haradhan D. *Research on Chemical Intermediates*. 2015. Vol. 41. Pp. 2785–2792.

*Received 09.01.2023.**Revised 21.02.2023.*