

4. Proceedings of the fifteenth international workshop [Rare-Earth Magnets and their Applications], (Dresden, Germany. 30 august – 3 september), 1998. – P.111-117.
5. Спеддинг Ф. Редкоземельные металлы / Ф.Спеддинг, А.Дааян. – М.: Metallurgia, 1965. – 49с.

Надійшла до редколегії 30.11.2016

УДК547.757.547.466.757.158.344:31/611.81

ГУЛЯЄВ В.М., д.т.н., професор
КОРНІЄНКО І.М., к.т.н., доцент
ЧЕТВЕРИКОВА К.С., бакалавр
ТРІШИНА В.Ю., бакалавр
ГОЛОВЕЙ О.П., к.т.н., доцент

Дніпродзержинський державний технічний університет

АДАПТАЦІЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНОГО СПРОЩЕНОГО МЕТОДУ ВИДІЛЕННЯ АМІНОКИСЛОТИ ТРИПТОФАНУ ДО УЧБОВОГО ПРОЦЕСУ

Вступ. Триптофан – незамінна амінокислота. В невеликих кількостях міститься у багатьох природних білках. Приймає участь в утворенні ніотинової кислоти і серотоніну (у ссавців, в тому числі людини), пігментів очей оммахромів (у комах), гетероауксинів, індиго, ряду алкалоїдів (у рослин). Порушення обміну триптофану призводять до недоумства, а також можуть слугувати показниками таких захворювань, як туберкульоз, рак, діабет. Недолік триптофану в кормах та їжі може бути причиною функціональних і органічних розладів у тварин та людини [1].

Маючи на увазі все це, можна стверджувати, що споживання триптофану з їжею є досить актуальним питанням. Тому є необхідним здійснювати якісний та кількісний контроль за його вмістом у білковій їжі.

Запропонована в даній роботі методика кількісного визначення триптофану з успіхом може бути використана для такого роду контролю.

Авторами [2] показано, що вміст триптофану у білку казеїні складає від 1 до 1,7%. Нами було досліджено, що вміст триптофану складає 1,4%. Для отримання більш точних результатів казеїн брали свіжий, який самостійно готували.

Постановка задачі. Розробити покращену методику визначення амінокислоти триптофану, яка могла б бути використана для лабораторних досліджень у навчальних закладах.

Результати роботи. 1. *Наукове обґрунтування.* Триптофан – α -аміно- β -індолілпропіонова кислота, яка має структурну формулу, зображену на рис.1 [2].

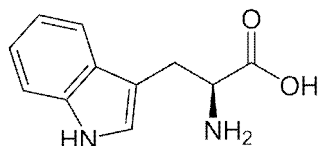


Рисунок 1 – Структурна формула триптофану

Триптофан належить до азотвмісних гетероциклічних ароматичних сполук.

Реакції на визначення триптофану обумовлені наявністю в його структурі індольного ядра. Переважна більшість таких реакцій являє собою взаємодію триптофану (фрагменту індолу) з різноманітними альдегідами (карбонільною компонентою) у кислому середовищі, причому реакція заміщення в індольному ядрі йде у положенні 2.

Продукт такої взаємодії представляє собою конденсовану сполуку двох молекул триптофану і молекули альдегіду [2] (рис.2).

Саме такого роду реакція використовувалася для дослідження методики визначення триптофану у даній науковій роботі.

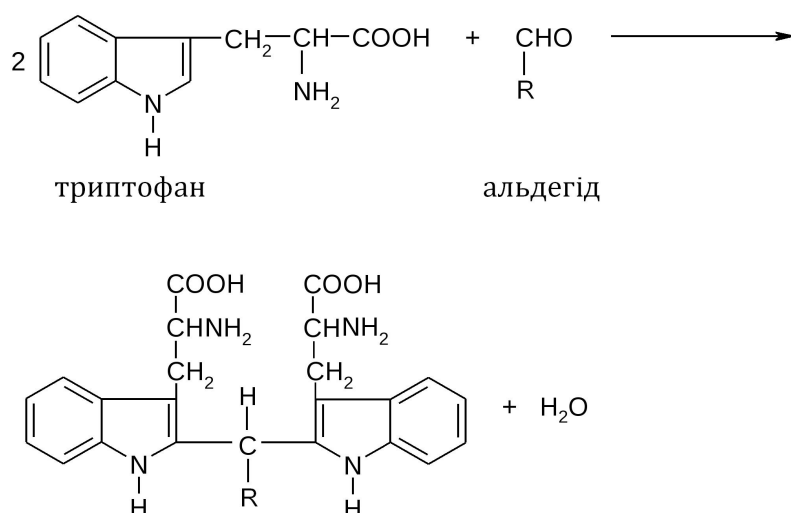


Рисунок 2 – Реакція триптофану з альдегідом

У якості альдегіду, на відміну від оригінальної методики, замість реактиву Ерліха (п-N,N-диметиламінобензальдегіда) використали ванілін, який являє собою 4-гідрокси-3-метоксибензальдегід. Замість соляної кислоти використали ортофосфорну кислоту з добавкою хлористого натрію. Така заміна є рівноцінною, оскільки під час нагрівання розчину фосфорної кислоти з хлористим натрієм виділяється хлористий водень.

Запропоновано проводити покращену методику визначення триптофану наступним чином:

1) приготування розчину гідролізату. Гідролізат готують з 1,35 г $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 2 г NaF, 400 мг казеїну, 100 мг панкреатину шляхом розведення у дистильованій воді і доведенням об'єму розчину до 100 мл. Розчин залишають на 7 діб у термостаті при 37°C . Далі його нагрівають до кипіння, охолоджують, додають 1,6 мл льодяної оцтової кислоти до слабкокислої реакції, знову нагрівають до кипіння, центрифугують 1 год. та декантують з осаду;

2) приготування розчину триптофану. У мірну колбу на 100 мл помістити 2 г NaF і 0,1 г L-триптофану і додати води, заповнивши колбу наполовину. Колбу закрити гумовою пробкою та інтенсивно струсити. Коли весь триптофан змочиться і частина його перейде у розчин, об'єм розчину довести до 100 мл і залишити до повного розчинення. 3 мл розчину триптофану помістити у мірну колбу на 100 мл і довести об'єм до 100 мл;

3) приготування 2%-го розчину ваніліну у 40%-й фосфорній кислоті. 2,7 мл 85%-ї ортофосфорної кислоти додати до 5,3 мл дистильованої води і у отриманому розчині розчинити 0,205 г ваніліну;

4) приготування досліджуваного розчину. До 10 мл розчину гідролізату додати 2 мл 2%-го розчину ваніліну у 40%-й ортофосфорній кислоті і довести об'єм розчину до 20 мл 85%-ю фосфорною кислотою;

5) приготування порівняльного розчину. Порівняльний розчин готується аналогічним чином, але замість гідролізату додають розчин триптофану у кількості 10 мл.

До досліджуваного і порівняльного розчинів додати по 1 г NaCl. Далі ці розчини нагрівати на слабо киплячій водяній бані, при цьому розчиняється увесь хлористий натрій.

Після 30 хв. нагрівання (від самого початку) розчини забрати з нагріву. Після охолодження розчини колориметрувати. Результати колориметрування наведено у табл. 1.

3. Математичне обґрунтування результатів дослідження. Спочатку визначили молярні концентрації триптофану у порівняльному розчині на всіх етапах розведення, потім за законом Бугера-Ламберта-Бера та методом молярного коефіцієнта світлопоглинання знайшли молярні концентрації триптофану у досліджуваному розчині на всіх етапах розведення. Результати наведено в табл. 2.

Оскільки продукт реакції має забарвлення, яке залежить від певного альдегіду, це дає можливість застосовувати колориметричні методи для кількісного визначення триптофану.

2. Методика експерименту. Прототипом для дослідження нової методики послужила методика Вуазене-Рода, видозмінена Томасом [2]. Це найбільш проста у здійсненні методика, тому її і взяли за основу.

Таблиця 1 – Оптична щільність розчинів триптофану в залежності від розведення

Розчин	Розведення							
	-	4:1	4:2	4:3	4:4	4:5	4:6	4:7
	Оптична щільність, нм							
Порівняльний	0,530	0,385	0,320	0,280	0,237	0,208	0,187	0,173
Досліджуваний	0,500	0,380	0,320	0,265	0,227	0,200	0,184	0,117

Таблиця 2 – Молярні концентрації триптофану у розчинах

Розчин	Розведення							
	-	4:1	4:2	4:3	4:4	4:5	4:6	4:7
	Концентрація, ммоль/л							
Порівняльний	0,073	0,059	0,049	0,042	0,037	0,033	0,029	0,027
Досліджуваний	0,069	0,058	0,049	0,040	0,035	0,031	0,029	0,026

Далі знайшли масові концентрації казеїну у досліджуваному розчині на всіх етапах розведення, припускаючи, якщо б не було гідролізу. Розрахували масові концентрації триптофану у цих розчинах та його масові частки у казеїні. Результати наведено у табл.3.

Таблиця 3 – Масова частка триптофану у казеїні та їх концентрація

Речовина	Розведення							
	-	4:1	4:2	4:3	4:4	4:5	4:6	4:7
	Масова концентрація, г/л							
Триптофан	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,006	0,006	0,005
Казеїн	1,000	0,800	0,667	0,571	0,500	0,444	0,400	0,364
	Масова частка, %							
Триптофан	1,400	1,500	1,499	1,401	1,400	1,351	1,500	1,374

Розрахунок середнього значення масової частки триптофану дав 1,428%.

Висновки. В ході дослідження було встановлено, що дана методика має ряд переваг у порівнянні з оригінальною. Окрім того, що в даній методиці не використовується прекурсор (соляна кислота), а також менш доступний і більш дорогий реактив Ерліха, слід відзначити, що інтенсивність забарвлення розчинів була більшою у порівнянні з оригінальною методикою. Також на проведення досліду не потрібно витратити 48 год. часу на настоювання розчину, а потрібно лише затратити 30 хв. на нагрівання, що є досить актуальним при проведенні досліду на уроці під час лабораторної роботи.

Запропоновано застосовувати дану методику для аналізу триптофану у білковій їжі. Також було встановлено, що дана методика може бути використана під час проведення лабораторних занять у навчально-освітніх закладах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Биологический энциклопедический словарь / под ред. Гилярова М.С. – 2-е изд., исправл. – М.: Сов. Энциклопедия, 1986. – 831с.: ил., 29 л. ил.
2. Блок Р. Аминокислотный состав белков и пищевых продуктов / под ред. проф. Гаврилова Н.И., Боллинг Д. – М: ИИЛ, 1949. – 472с.

Надійшла до редколегії 28.12.06.2016.