



## ХИМИЯ

УДК 543. 25

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АРГИНИНА В СМЕШАННЫХ РАСТВОРАХ МОНОАМИНОКАРБОНОВЫХ $\alpha$ -АМИНОКИСЛОТ

О. В. Варыгина, Р. К. Чернова, М. В. Петрович

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского  
E-mail: varigini@mail.ru

Рассмотрено состояние аргинина и моноаминокарбонных  $\alpha$ -аминокислот в водных средах. Построены диаграммы распределения ионизированных форм аргинина и валина при варьировании pH. Показана возможность экспрессного избирательного pH-титриметрического определения аргинина в смешанных растворах моноаминокарбонных  $\alpha$ -аминокислот. Интервал определяемых концентраций 46,3–217,8 мг. Погрешность не превышает 5,5%.

**Ключевые слова:** аргинин, протолитические свойства, моноаминокарбонные  $\alpha$ -аминокислоты, pH-метрическое титрование.

**Definition of Arginine in the Mixed Solutions Monoaminooksidasy  $\alpha$ -aminoacids**

**O. V. Virigina, R. K. Chernova, M. V. Petrovich**

The state of monoaminooksidasy arginine and  $\alpha$ -amino acids in aqueous media. Built chart the distribution of ionized forms of arginine and valine at varying pH. Pakistan the possibility of Express electoral pH titrations of arginine in mixed solutions monoaminooksidasy  $\alpha$ -amino acids. The interval defined concentrations of 46,3–217,8 mg . Error does not exceed 5.5%.

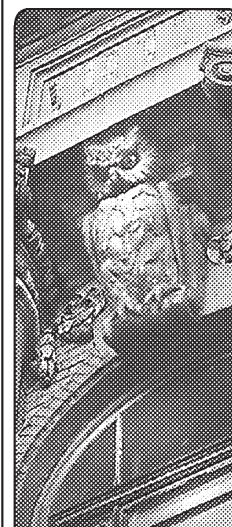
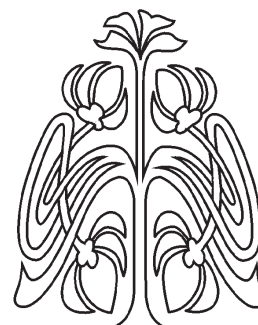
**Key words:** arginine, protolytic properties, monoaminooksidasy  $\alpha$ -amino acids, pH-metric titratio.

DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-125-130

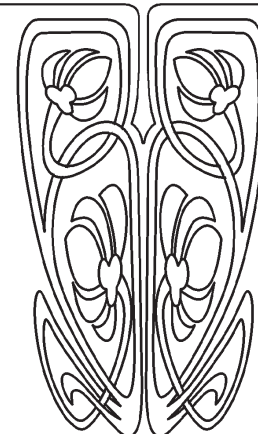
Аргинин (2-амино-5-гуанидинпентановая кислота) – условно-незаменимая  $\alpha$ -аминокислота, является одним из ключевых метаболитов в процессах азотистого обмена (орнитинный цикл млекопитающих и рыб).

L-аргинин входит в состав пептидов и белков, особенно высоко его содержание (до 85%) в основных белках – гистонах и протаминах. Высокая основность аргинина и соответственно способность образовывать ионные связи с фосфатными группами ДНК обуславливают образование нуклеопротеидов-комплексов: гистон – ДНК – хроматина и протамин – ДНК – гетерохроматина сперматозоидов.

Аргинин является составной частью рецептур гепатопротекторов, иммуномодуляторов, кардиологических препаратов, препаратов для лечения ожоговых и ВИЧ-инфицированных больных, входит в рецептуры средств для парэнтерального питания в послеоперационный период. Лекарства с аргинином стали применяться в геронтологии и онкологии.



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ





У взрослого и здорового человека аргинин вырабатывается организмом в достаточном количестве, у детей, пожилых и больных людей уровень синтеза аргинина часто недостаточен, поэтому аргинин массово применяется в различных пищевых добавках. Содержание аргинина в препаратах нормируется.

В связи с этим аргинин (в составе других аминокислот) определяют в основном методами ВЭЖХ, капиллярного электрофореза. Однако эти методы мало пригодны для скринингового обследования лечебных препаратов, экономически и технически не выполнимы в рядовых клинических лабораториях при эпизодическом и единичном определении аргинина в сложных матрицах, в частности, в смесях  $\alpha$ -аминокислот.

В связи с изложенным разработка простых способов идентификации и количественного определения аргинина является актуальной задачей.

В настоящей работе рассмотрена возможность экспрессного избирательного рН-титриметрического определения аргинина в смешанных растворах моноаминокарбоновых  $\alpha$ -аминокислот. Предложенный подход основан на разном состоянии в водных средах аргинина и моноаминокарбоновых  $\alpha$ -аминокислот, что приводит к специфическому изменению рН водных растворов аргинина ( $pH=10,76$ ). Это обусловлено появлением его ионной формы  $R^{++}$ , отсутствующей в водных растворах моноаминокарбоновых  $\alpha$ -аминокислот.

### Реагенты и оборудование

#### *Приготовление растворов аргинина*

*Исходный раствор:* навеску аргинина 0,8710 г растворяли в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 мл.

Для получения 0,0025М раствора навеску аргинина 0,0436 г растворяли в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 мл.

Для титрования аликвоту 5 мл исходного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили до метки дистиллированной водой. Полученный 0,1М раствор аргинина оттитровывали 0,1М раствором HCl.

*Для построения градуировочного графика 1* аликвоты исходного раствора (5 мл; 10 мл; 15 мл; 20 мл; 25 мл) помещали в мерные колбы вместимостью 25 мл, разбавляли дистиллированной водой. Полученные растворы оттитровывали 0,1М раствором HCl.

*Для построения градуировочного графика 2* аликвоты 0,0025 М раствора аргинина (0,25 мл; 0,5 мл; 1 мл) помещали в мерные колбы вместимостью 25 мл, разбавляли дистиллированной водой, оттитровывали 0,002 М раствором HCl.

### *Методики приготовления смесей*

Для приготовления смеси I аминокислот в мерную колбу вместимостью 100 мл вводили навески: 0,4455 г Ala; 0,5858 г Val; 0,3755 г Gly; 0,6558 г Leu (концентрация каждой аминокислоты составляла 0,05М). В эту смесь добавляли 0,8710 г аргинина. Дистиллированной водой доводили объем до 100 мл.

Для приготовления смеси II аминокислот в мерную колбу вместимостью 100 мл вводили навески: 0,6558 г Ile; 0,8260 г Phe (концентрация каждой аминокислоты составляла 0,05М). В эту смесь добавляли 0,8710 г аргинина. Дистиллированной водой доводили объем до 100 мл.

Для приготовления смеси III аминокислот в мерную колбу вместимостью 100 мл вводили навески: 0,4455 г Ala; 0,5858 г Val; 0,3755 г Gly; 0,6558 г Leu; 0,6558 г Ile; 0,8260 г Phe (концентрация каждой аминокислоты составляла 0,05М). В эту смесь добавляли 0,8710 г аргинина. Дистиллированной водой доводили объем до 100 мл.

Для приготовления смеси IV аминокислот в мерную колбу вместимостью 100 мл вводили навески: 0,0446 г Ala; 0,0586 г Val; 0,0376 г Gly; 0,0656 г Leu; 0,0656 г Ile; 0,0826 г Phe (концентрация каждой аминокислоты составляла 0,005М). В эту смесь добавляли 0,8710 г аргинина. Дистиллированной водой доводили объем до 100 мл.

Из каждой полученной смеси аминокислот брали аликвоты по 5 мл, разбавляли дистиллированной водой до 25 мл и оттитровывали 0,1М HCl.

рН-метрическое определение проводили на иономере марки «рх-150МП» с хлоридсеребряным электродом сравнения.

### Экспериментальная часть

Предварительно нами проводились титрования водных растворов аргинина раствором HCl с последующим построением градуировочного графика. На рис. 1 а, б приведены соответственно кривая титрования водного раствора аргинина и градуировочный график.

На кривых четко выражен скачок титрования, который характеризует переход от формы  $R^{+}$  к форме  $R^{++}$  аргинина (рис. 2). При дальнейшем прибавлении кислоты рН соответственно медленно понижается.

На титрование 43,55 мг аргинина в водном растворе расходуется 2,25 мл титранта ( $C_{ARG}=0,01M$ ). Как следует из рис. 1, б, линейная зависимость наблюдается в интервале концентраций 43,6–217,8 мг аргинина. Возможно титрование более низких концентраций аргинина (0,1–0,4 мг) в варианте микротитрования.

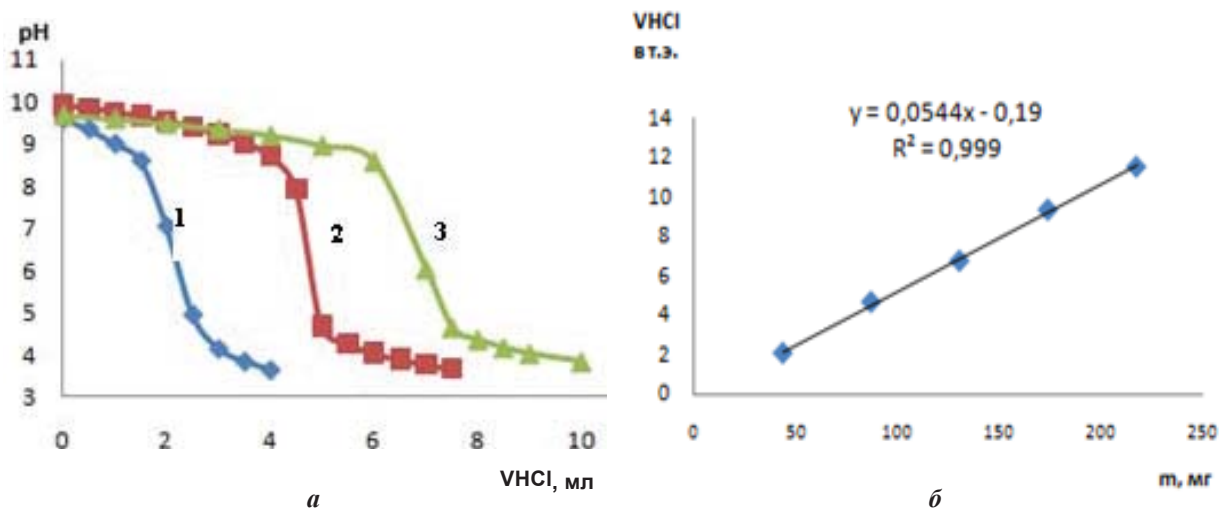


Рис. 1. Кривая pH-метрического титрования (а) 0,01М (1), 0,02М (2), 0,03М (3) растворов аргинина 0,1М раствором HCl; б – градуировочный график для определения аргинина в водном растворе

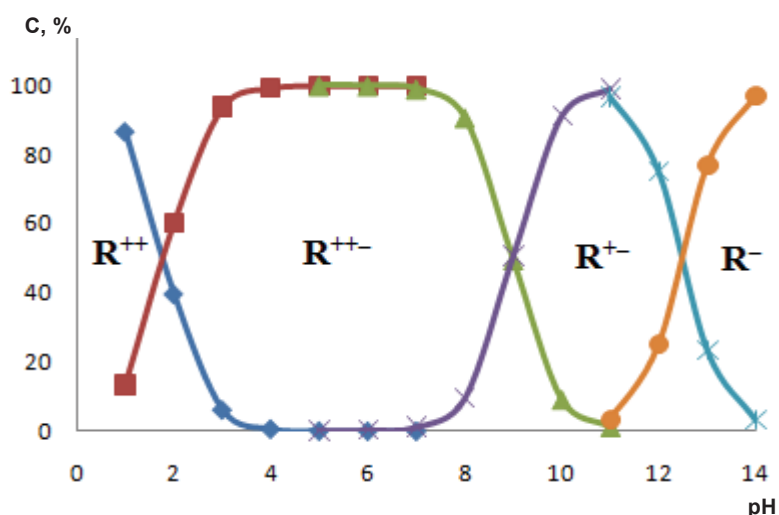


Рис. 2. Диаграмма распределения ионизированных форм аргинина при разных значениях pH

Далее проводились избирательные титриметрические определения аргинина в приготовленных смесях I–IV моноаминокарбоновых α-аминокислот (рис. 3). Как видно из рис. 3, присутствие других аминокислот, а также смеси всех указанных в табл. 1 аминокислот не изменяет объем титранта в точке эквивалентности.

### Результаты и их обсуждение

Известно, что протолитические свойства α-аминокислот определяют их многие физико-химические характеристики. К настоящему времени значения констант ионизации α-аминокислот обобщены и критически оценены в материалах ИЮПАК [1–5]. В табл. 1 обобщены данные о кислотно-основных свойствах аргинина и α-моноаминокарбоновых кислот, их растворимости и величинах pI.

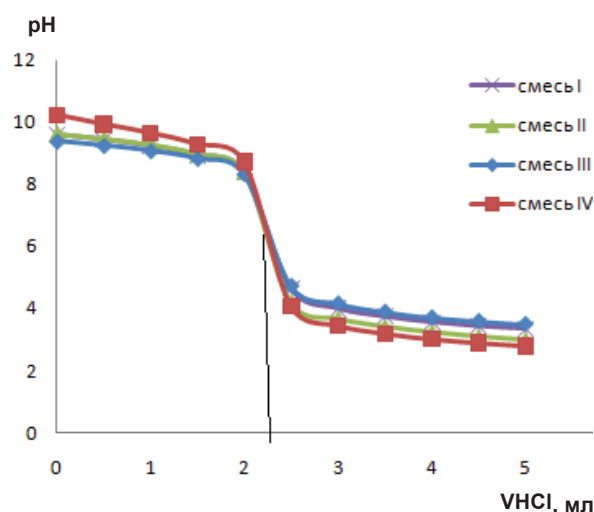


Рис. 3. Кривые pH-метрического титрования 0,05М раствора аргинина в смесях I–IV раствором HCl (0,1М)



Таблица 1

Значения рК ионизации и некоторые характеристики α-аминокислот

№	α-аминокислоты	Обозначение и сокращение	рК						рI	Растворимость в 100 г H <sub>2</sub> O (25°C)		
			α-COOH	β-COOH	γ-COOH	α-NH <sub>2</sub>	>NH <sub>2</sub>	δ-NH <sub>2</sub>			ε-NH <sub>2</sub>	-OH
Аминокислоты												
1	Аргинин H <sub>2</sub> NC(=NH)NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH(NH <sub>2</sub> )COOH	Arg (R)	1,82			8,99			12,48		11,15	15
Моноаминокислоты												
2	Глицин CH <sub>2</sub> (NH <sub>2</sub> )COOH	Gly (G)	2,35				9,78				5,97	25
3	Аланин CH <sub>3</sub> CH(NH <sub>2</sub> )COOH	Ala (A)	2,35				9,78				6,00	16,6
4	Валин (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	Val (V)	2,29				9,74				5,96	8,8
5	Лейцин (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> CH(NH <sub>2</sub> )COOH	Leu (L)	2,33				9,74				5,98	2,2
6	Изолейцин CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH(NH <sub>2</sub> )COOH	Ile (I)	2,32				9,76				5,94	4,1
7	Фенилаланин C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> CH(NH <sub>2</sub> )COOH	Phe (F)	2,20				9,31				5,48	3,0



Для моноаминокарбоновых α-аминокислот первая константа ионизации соответствует диссоциации α-COOH-группы, вторая – депротонированию атома азота α-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-группы.

Типичное распределение ионизированных форм, характерное для моноаминокарбоновых α-аминокислот в зависимости от pH, показано на примере валина (рис. 4).

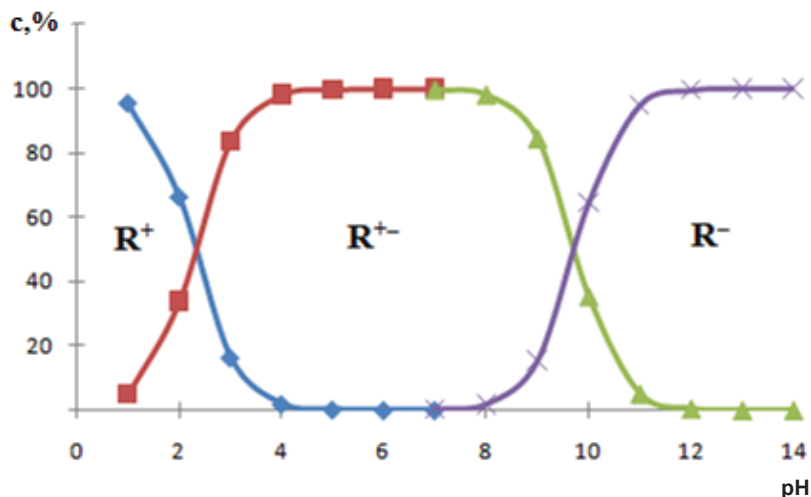
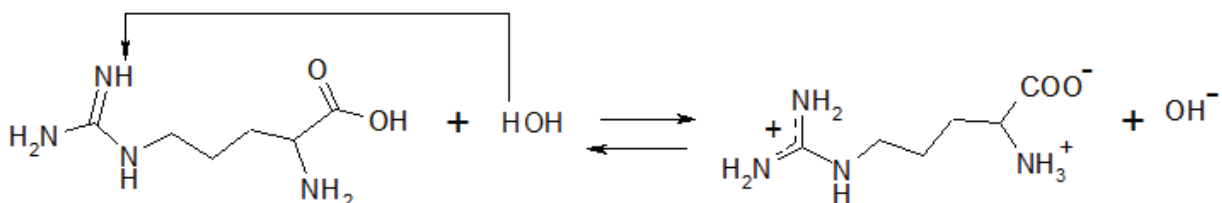


Рис. 4. Диаграмма распределения ионизированных форм валина при разных значениях pH

Аргинин – алифатическая α-аминокислота, несущая два основных центра: аминогруппу в α-положении и гуанидиновую группу в σ-положении.

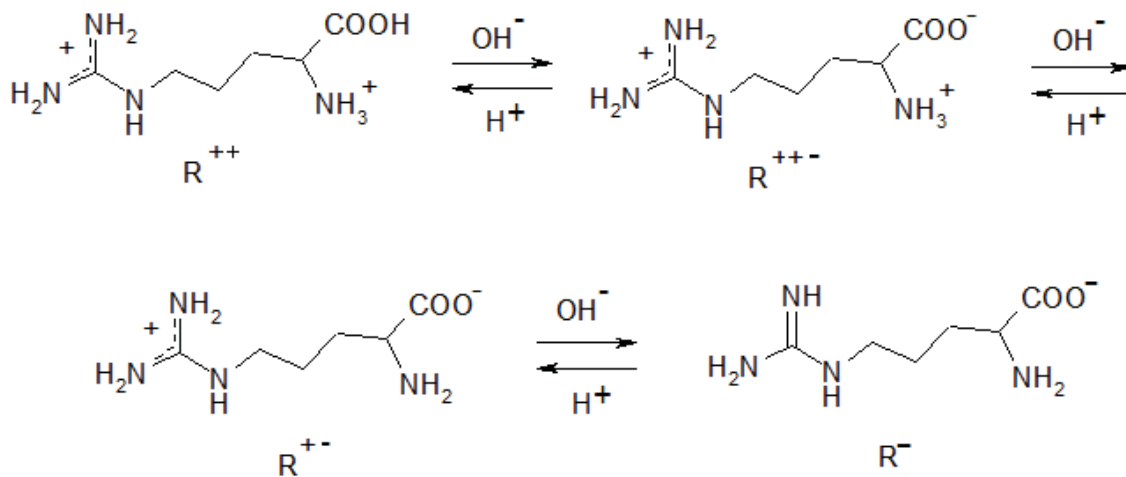
теории Бренстеда – Лоури это свидетельствует о переносе протона от растворителя к протолиту, при этом протонируется гуанидиновая группа, которая благодаря резонансной делокализации заряда при протонировании является сильно основной (pKa = 12,48):

Водные растворы аргинина имеют щелочную реакцию (pH = 10,76). Согласно протолитической



Последовательность образования ионизированных форм аргинина и диаграмма их рас-

пределения в зависимости от pH приведены на рис. 2.





Как следует из вышеприведенных данных, при добавлении аргинина в водные растворы моноаминокарбоновых  $\alpha$ -аминокислот, протонированных только по  $\alpha$ -аминогруппе, имеющих  $pH = 6,64$ , наблюдается увеличение щелочности среды до  $pH=10,76$ . Следовательно, возможно титриметрически, по количеству оттитрованных  $OH^-$  ионов, определить содержание аргинина на фоне моноаминокарбоновых  $\alpha$ -аминокислот. Эта цель и была реализована в данной работе. При этом достигается переход формы  $R^+$  в форму  $R^{++}$  аргинина на фоне не протонируемых в этих условиях форм  $R^+$  моноаминокарбоновых  $\alpha$ -аминокислот (см. рис. 2, 4).

Для оценки правильности определения аргинина в смеси с Ala, Val, Gly, Leu был применен метод «введено–найдено». Для этого в смесь аминокислот вводилось разное количество аргинина (табл. 2). Проведенные pH-потенциометрические определения показали, что в интервале концентраций, указанных на градуировочных графиках, возможно определение аргинина с относительной погрешностью, варьирующей от 3,0 до 5,5%.

Таблица 2

**Пример определения аргинина в смешанном растворе (I) методом «введено–найдено»**

Введено Arg, мг	Найдено Arg, мг	Sr	$\delta, \%$
65,33	61,71 $\pm$ 2,64	0,017	5,5
108,88	103,99 $\pm$ 3,49	0,014	4,5
195,98	190,07 $\pm$ 2,28	0,005	3,0

УДК 543:615.33

## ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ НЕКОТОРЫХ ЦЕФАЛОСПОРИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ В ВОДНЫХ СРЕДАХ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

О. И. Кулапина<sup>1</sup>, В. А. Каренко<sup>2</sup>, Е. Г. Кулапина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского

<sup>2</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет

имени Н. Г. Чернышевского

E-mail: kulapinaeg@mail.ru

Разработаны экспрессные спектрофотометрические методики оценки подлинности некоторых цефалоспориновых антибиотиков II и III поколений. Показана идентичность препаратов цефотаксима (Россия) и клафорана (Франция), цефуроксима (Россия) и цефуросксим аксетила (Англия).

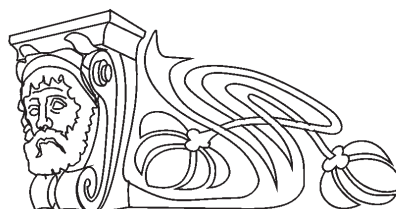
**Ключевые слова:** цефотаксим, клафоран, цефуросксим, цефуросксим аксетил, лекарственные препараты, водная среда.

Проведенные исследования показали, что в интервале концентраций 43,6–217,8 мг возможно прямое избирательное pH-потенциометрическое определение аргинина в различных смешанных растворах моноаминокарбоновых  $\alpha$ -аминокислот с погрешностью, не превышающей 5,5%.

*Работа выполнена в рамках Госзадания Минобрнауки РФ в сфере научной деятельности (базовая часть) по заданию № 2014/203, код проекта 1255, шифр «ПАВ» Метрология создания и анализа новых практически ценных многокомпонентных систем и материалов.*

### Список литературы

1. Kiss T., Sóvágó I., Gergely A. Critical survey of the stability constants of complexes of glycine // Pure and Appl. Chem. 1991. Vol. 63, № 4. P. 597–638.
2. Berthon G. The stability constants of metal complexes of amino acids with polar side chains // Pure and Appl. Chem. 1995. Vol. 67, № 7. P. 1117–1240.
3. Sóvágó J., Kiss T., Gergely A. Critical survey of the stability constants of complexes of aliphatic amino acids // Pure and Appl. Chem. 1993. Vol. 65, № 5. P. 1029–1080.
4. Pettit L. D. Critical survey of formation constants of complexes of histidine, phenylalanine, tyrosine, L-Dopa and tryptophan // Pure and Appl. Chem. 2009. Vol. 56, № 2. P. 247–292.
5. Yamauchi O., Odani A. Stability constants of metal complexes of amino acids with charged side chains-Part I: Positively charged side chains // Pure and Appl. Chem. 1996. Vol. 68, № 2. P. 469–496.
6. Химическая энциклопедия : в 5 т. Т. 1. М. : Сов. энцикл., 1988.



### Research of a State of Some the Cephalosporin Antibiotics in Water Environments by Spectrophotometry

O. I. Kulapina, V. A. Karenko, E. G. Kulapina

An express authenticity estimation of some cephalosporin antibiotics of II and III generations are developed by spectrophotometry. An