

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том (4) X

СОЕДИНЕНИЯ

№ 5

1968

УДК 678-13.678.01:54

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЗОТА БЕЛКОВ В ПРИВИТЫХ СОПОЛИМЕРАХ

А. А. Денисова, Л. И. Синякова

В последнее время в литературе появился ряд исследований, связанных с проведением реакции привитой сополимеризации белков с мономерами акрилового ряда [1—4]. Содержание белка в полученных сополимерах устанавливают на основании количества белка, взятого для реакции привитой сополимеризации или расчетным путем, исходя из общего азота, определенного методом Кельдаля. Аналитического метода определения азота белка в сополимерах не имеется.

В данном исследовании делается попытка выяснить возможность применения биуретовой реакции для определения белкового азота в сополимерах, содержащих белок.

Исследование проводили на привитых сополимерах, синтезированных реакцией привитой сополимеризации растворенного или денатурированного коллагена, например желатины с нитрилом акриловой кислоты (АН) в присутствии различных катализаторов — окислительно-восстановительной системы и растворимых в воде перекисей.

Одним из методов количественного определения белка в белковых препаратах является биуретовая реакция. Она основана на том, что при добавлении к сильно щелочному раствору белка насыщенного раствора сернокислой меди возникает окрашивание, оптическую плотность которого измеряют колориметрически.

Предполагают, что в результате этой реакции образуется комплекс, в котором ион меди координирован с пептидной связью, образуя кольцо [5].

С целью применения биуретового метода для определения азота белка в привитых сополимерах, содержащих белок, необходимо было выяснить ряд факторов, влияющих на интенсивность развития окраски, а именно: условия растворения привитых сополимеров, время развития окраски, способ отделения гидрата окиси меди от окрашенных растворов привитых сополимеров и, наконец, оптимальную концентрацию белка в растворах.

Экспериментальная часть

Калибровочную кривую зависимости оптической плотности от концентрации раствора строили по растворам желатины с концентрацией от 50 до 600 мкг / мл (рис. 1). Для этого использовали пищевую желатину первого сорта с содержанием азота 17,73 %. Как видно из рис. 1, оптическая плотность растворов, взятых для построения калибровочной кривой, подчиняется закону Ламберта — Беера.

Условия растворения привитых сополимеров. Сополимеры не растворимы в воде при комнатной и повышенной температурах; растворяются в растворах щелочей при нагревании на кипящей водяной бане при периодическом встряхивании. Чем ниже концентрация щелочи, тем больше время, необходимое для растворения, а именно в 0,9%-ном растворе NaOH — 5 час.; в 1,8%-ном — 2 час.; в 3,7%-ном — 50 мин.

Окрашивание раствора меняется при этом от темно-оранжевого до бесцветного с легким желтоватым оттенком. Известно, что в растворе щелочи при нагревании происходит гидролиз белка и омыление полиакрилнитрила (ПАН), что может повлиять на результаты определения азота белка в привитых сополимерах. Указывается, что в растворе 0,2 н. щелочи происходит омыление ПАН, в результате чего падает количество азота с 25,6 % до 21,7 % [6]. Омыление ПАН в щелочной среде может произойти до полиакриламида или до полиакриловой кислоты, а полиакриловая кислота с медью образует хелатные окрашенные соединения [7]. В связи с этим необходимо выяснить степень гидролиза желатины и образование окрашенного соединения ПАН с медью после их растворения в принятых условиях.

С этой целью навески желатины от 10 до 30 мг и навески ПАН от 5 до 10 мг вносили в 3,7%-ный раствор щелочи и растворяли в течение 50 мин. на кипящей водяной

бане. Затем растворы охлаждали до комнатной температуры и определяли в растворах желатины количество белка по биуретовой реакции, а в растворах ПАН измеряли оптическую плотность.

Навески желатины, взятые для определения, г	10	15	20	25	30
Количество желатины, определенное после растворения в 3,7%-ном растворе щелочи, г	10,0—10,1	14,9—15,0	20,1—20,1	24,9—25,3	30,1—30,2
Относительная ошибка определения, %	0,5	—	0,5	0,4	0,5

Как показывают вышеупомянутые данные, количество желатины, найденное после растворения в щелочном растворе, совпадает в пределах ошибок измерений с количеством, взятым для определения. Гидролиз молекул желатины с привитыми звенями ПАН вследствие стерических факторов более затруднен в сравнении с гидролизом самих молекул желатины. Следовательно, при растворении привитых сополимеров в 3,7%-ном растворе щелочи гидролиза

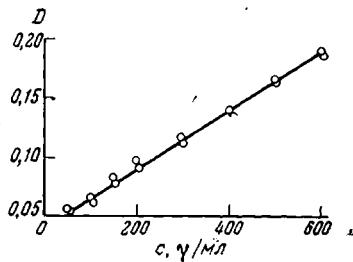


Рис. 1. Калибровочная кривая:
c — концентрация желатины в растворе; D — оптическая плотность

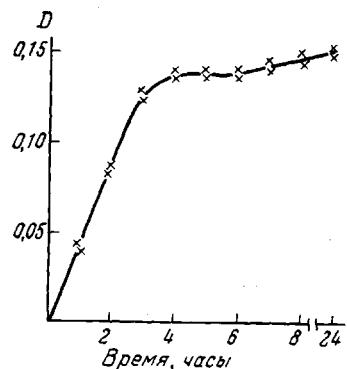


Рис. 2. Изменение плотности окраски D растворов в зависимости от времени

белка не происходит. Окрашивание раствора ПАН с медью не произошло по истечении 4- и 24-часового развития окраски. Значит, в принятых условиях растворения сополимеров омыления ПАН до поликарболовой кислоты не происходит.

Время развития окраски. Для выяснения влияния времени на интенсивность развития окраски оптическую плотность раствора (навеска сополимера 10 мг) измеряли в течение 24 час.— первые 8 час. через каждый час, а затем через 24 часа (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что в первые 3 часа происходит нарастание интенсивности окраски раствора. Интенсивность окраски раствора, измеренная через 4 часа, идентична интенсивности, измеренной через 5 и 6 час.; затем вновь происходит медленное нарастание интенсивности окрашивания растворов. Время развития окраски в интервале 4—6 час. является оптимальным.

Способ отделения гидрата оксида меди от окрашенных растворов сополимеров. Проверяли два метода отделения гидрата оксида меди от растворов сополимеров, а именно фильтрование через бумажный фильтр и центрифugирование при $n = 1500—2000$ об/мин. Первую половину растворов сополимеров с концентрацией от 50 до 300 мкг/мл фильтровали через бумажный фильтр, вторую — центрифугировали. Показатели оптической плотности центрифужированных и фильтрованных растворов приводятся в табл. 1.

Из данных показателей оптической плотности видно, что концентрация белка в растворах, фильтрованных через бумажный фильтр, понижена по сравнению с концентрацией растворов, центрифужированных в пределах 11—44%. В последующих опытах все растворы центрифугировали.

Оптимальная концентрация белка в растворе для определения азота в нем. Навеску сополимера следует подбирать таким образом, чтобы концентрация белка в растворах для определения была в пределах от 50 до 600 мкг/мл.

Для подтверждения достоверности результатов, полученных с применением изложенного выше метода, количество белка находили по содержанию оксипролина* в гидролизатах этих продуктов [8, 9]. Сравнительные данные приведены в табл. 2.

* Авторы благодарны О. И. Пушленко, оказавшей помощь в определении оксипролина в привитых сополимерах.

Таблица 1

Показатели оптической плотности центрифугированных и фильтрованных растворов сополимеров

Содержание белка в сополимерах (на абсолютно сухой вес), г	Показатели оптической плотности растворов		Количество белка, найденное в растворах (на абсолютно сухой вес), г	
	фильтрованные	центрифугированные	фильтрованные	центрифугированные
5	0,039	0,053	3,9	5,0
15	0,062	0,077	8,4	14,7
30	0,107	0,117	26,8	30,2

Из показателей табл. 2 видно, что относительная ошибка определения белка по модифицированному методу с использованием биуретовой реакции находится в тех же пределах, что и по методу определения оксипролина. Однако определение белка в привитых сополимерах по оксипролину связано со следующими особенностями: 1) необходимость предварительного определения количества оксипролина в белке, участвующем в реакции привитой сополимеризации, так как различные белки содержат неодинаковое количество оксипролина; 2) метод трудоемок, ибо требует пред-

Таблица 2

Количество желатины в привитых сополимерах, найденное по биуретовой реакции и по оксипролину

Количество желатины, взятой для реакции сополимеризации (по расчету), % на абсолютно сухой вес	По биуретовой реакции, %		По оксипролину, %	
	на абсолютно сухой вес	относительная ошибка определения *	на абсолютно сухой вес	относительная ошибка определения *
8,0	7,5	±5,1	7,6	±5,0
15,4	16,2	±5,2	14,8	±5,1
30,4	28,9	±4,9	31,8	±4,6
35,0	33,2	±5,0	36,7	±4,8
51,6	54,0	±4,6	54,2	±5,0

* Относительную ошибку рассчитывали по пяти параллельным определениям.

варительного гидролиза сополимера в течение 8—10 час. при ~ 120°; 3) метод по существу является расчетным. Предлагаемый аналитический метод непосредственно определения белка в привитых сополимерах, содержащих белок, прост, не требует больших затрат времени. Относительная ошибка определения находится в пределах 4,6—5,2%.

Методика определения

Навеску привитого сополимера 40—200 мг (с точностью до 0,0001) помещали в колбу на 100 мл, приливали 70 мл дистиллированной воды и 10 мл 30%-ного водного раствора NaOH. Колбу погружали в кипящую водяную баню и кипятили 45—50 мин. до полного растворения привитого сополимера. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры, приливали 1 мл насыщенного раствора CuSO₄ и доводили дистиллированной водой до метки. Через 4 часа измеряли оптическую плотность растворов на фотоэлектроколориметре ФЭК-М (кувета 20 мм, светофильтр — красный, барабан — правый). По калибровочной кривой определяли процентное содержание белка в привитых сополимерах.

Выводы

Метод определения азота белка по биуретовой реакции применен для анализа привитых сополимеров на основе белковых веществ. Точность определения по предлагаемому методу находится в пределах 4,6—5,2%.

Научно-исследовательский институт
кожевенно-обувной промышленности

Поступила в редакцию
9 X 1967

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. А. Курильчиков, М. П. Пенькова, А. Н. Видишева, Хим. волокна, 1959, № 2, 28; 1959, № 4, 16.
2. Л. А. Хисматулина, С. М. Леви, В. А. Кухтин, Высокомолек. соед., 6, 473, 1964.
3. Пат. СССР, 715 194, 1952.
4. Анг. пат. 793 549, 1959.
5. С. А. Павлов, Н. В. Чернов, И. С. Шастакова, А. А. Касьянова, Химия и физика высокомолекулярных соединений в производстве искусственной кожи, кожи и меха, изд-во «Легкая индустрия», 1966, стр. 305.
6. I. R. Cartney, Mod. Plast, 30, 118, 1953.
7. A. M. Kotliar, Z. H. Mordwetz, J. Amer. Chem. Soc., 77, 3692, 1955.
8. R. Neuman, M. Logan, J. Biol. Chem., 184, 299, 1950.
9. А. Л. Зайдес, А. Н. Михайлов, О. И. Пушенко, Биохимия, 29, 5, 1964.

METHOD OF DETERMINATION OF PROTEIN NITROGEN IN COPOLYMERS

A. A. Denisova, L. I. Sinyakova

Summary

Modified method of determination of protein nitrogen in protein containing copolymers using biuret reaction is proposed. Factors governing the intensity of colour developing are studied. The relative error lies within 4,6—5,2%.
