

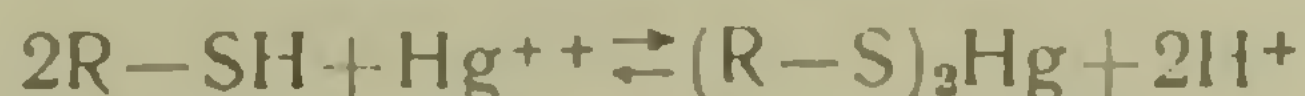
БИОХИМИЯ

С. С. Оганесян и В. Г. Джанибекова

Амперометрическое определение
небелковых тиоловых соединений в мышцах ртутью

(Представлено Г. Х. Бунятяном 11.VII.1958)

Метод амперометрического титрования меркаптанов, предложенный Кольтгофф и Гаррис (¹), нашел широкое применение в исследованиях химической структуры белков и аминокислот, благодаря модификации Р. Бенеш и Р. Е. Бенеш (²) для количественного определения —SH групп в биологических средах. Несмотря на существование других методов (полярографический, колориметрический и гистохимический) определение тиолов амперометрическим титрованием азотнокислым серебром довольно интенсивно используется в многочисленных исследованиях (²⁻⁸). Однако, как выяснилось впоследствии, в этом методе имеется ряд источников ошибок, в частности применение аммиачного буфера ($\text{NH}_4\text{OH}-\text{NH}_4\text{NO}_3$), как комплекс образующего с AgNO_3 соединения, ведет к денатурации белковой молекулы и ускоряет окисление тиоловых групп (⁹). Значительным влиянием на белки обладает также алкоголь, который добавляется на титруемую смесь. Азотнокислое серебро легко разлагается на свету. Вышеизложенное послужило причиной для ряда попыток модификации амперометрического титрования —SH групп AgNO_3 , а также поисков новых агентов, реагирующих с —SH группами. Кольтгофф, Штрикс и Танака (¹⁰) предложили для полярографического определения тиоловых групп применить уксусно-кислую или двуххлористую ртуть (сулема). Согласно Кольтгофф, Штрикс и Моррен (¹¹), основная реакция между ртутью и цистеином заключается в образовании соединения типа $\text{Hg}(\text{RS})_2$. Сесил (¹²) указывает, что двуххлористая ртуть реагирует с цистеином согласно уравнению

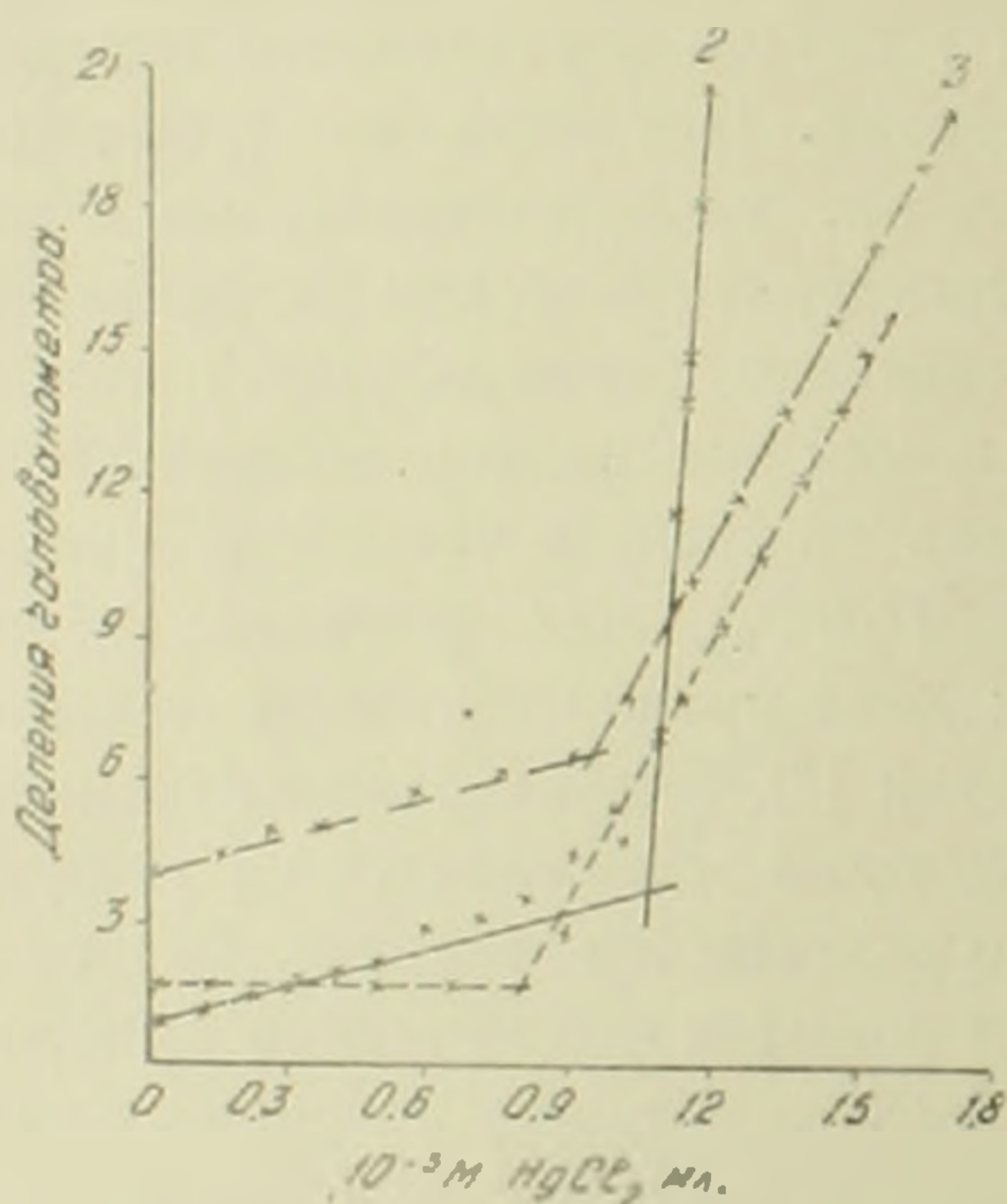


При излишке ионов ртути могут образоваться также соединения типа $(\text{R}-\text{S})_2\text{Hg}_2$ и $(\text{R}-\text{S})_2\text{Hg}_3$; однако исследование этого автора показало, что при амперометрическом титровании сулемой имеет место образование, главным образом $(\text{R}-\text{S})_2\text{Hg}$, соединения, где один атом ртути реагирует с двумя —SH группами.

К сожалению, все работы, проведенные с помощью HgCl_2 , в основном велись на растворах серосодержащих аминокислот (^{10, 11, 12}) или на сыворотке крови (¹¹). Что касается выделения из тканей животного небелковых — SH соединений и их количественного определения амперометрическим титрованием ртутью, то работ, посвященных этому вопросу, в литературе не удалось найти. Все исследования в этом отношении проведены с использованием азотнокислого серебра, со всеми вытекающими отсюда последствиями.

Подобное состояние методических приемов определения — SH групп толкает на новые поиски и усовершенствования (^{14, 15}). Настоящая статья посвящена изучению количества небелковых — SH соединений в мышцах, с применением амперометрического титрования ртутью.

Техника опытов. Регистрация результатов титрования производилась согласно схеме, предложенной Р. Бенеш и Р.Е.Бенеш (²). Прибором измерения служил микрогальванометр М 91/А с $T_0 = 1,5$ секунды, внутренним сопротивлением 3500 ом и внешним — 64000 ом, чувствительность прибора $1,5 \times 10^{-8}$ А. Electroдами служили: платиновый провод, соединенный с гальванометром через ось электро-мотора „Пионер“, вращающийся при 750—800 об/мин, и электрод сравнения, составленный из металлической ртути и раствора $\text{Kj} + \text{Hg}_2\text{I}_2$; он одним концом сообщался с титруемой смесью через агаровый мостик (на насыщенном хлористом калии), а другим концом через металлическую ртуть-платину с гальванометром. Поддерживающим электрод раствором служил 0,14 н NaCl , рекомендуемый для его восстановления (¹⁴).



Кривая амперометрического титрования 2 мл цистеина (10^{-3} М) двуххлористой ртутью (10^{-3} М).

- 1—сульфосалициловый раствор цистеина + 1N NaOH (pH 6,0);
- 2—сульфосалициловый раствор цистеина + бура (pH 9,0);
- 3—то же + карбонатный буфер + 0,5 М KCl (pH 1,2)

Интервал в 1—2 минуты, для установления колебаний гальванометра.

Ввиду того, что сульфосалициловая кислота является стабилизатором сульфгидрильных групп (²), она применялась для осаждения белков. Для нейтрализации кислого безбелкового фильтрата мышцы

применялись: а) 1н NaOH, б) карбонатный буфер (0,06 М Na_2CO_3 , 0,04 М NaHCO_3 , 0,5 М KCl), с) боратный буфер (бура 0,05 М).

Опыты с цистеином. С целью проверки влияния различных методических приемов на результаты титрования, была проведена серия контрольных опытов с цистеином. Свободный цистеин (1,2 мг) растворялся в 10 мл дистиллированной воды или 2,5% раствора сульфосалициловой кислоты. Перед каждым титрованием приготавлилась смесь из 2 мл раствора цистеина (1×10^{-3} М) и исследуемого буфера, применявшегося для нейтрализации сульфосалициловой кислоты.

Результаты предварительной титрации буферных смесей (без цистеина) показали, что все используемые буферы связывают незначительное количество двуххлористой ртути. В табл. 1 приведены некоторые цифры, соответствующие боратному и карбонатному (с 0,5 М KCl) буферам.

При изучении значения pH титруемой смеси (сульфосалициловая кислота + цистеин + буфер) выяснилось, что наилучшей является щелочная среда. Как видно из табл. 1, при pH ниже 8 трудно получать воспроизводимые результаты, а в кислой среде титруется лишь 70—80% истинного количества —SH групп. В боратном буфере (при pH 9,0) были получены наиболее четкие данные.

Полученные данные, подтверждая прежние факты о стабилизации —SH групп в сульфосалициловой кислоте, приводят к заключению, что необходимым условием при амперометрическом титровании ртутью является нейтрализация сульфосалициловокислого раствора цистеина и создание щелочной среды. Таким образом, нельзя согласиться с Сесил (¹²) о возможности титрации —SH групп в кислой среде, где, вероятно, происходит разложение комплекса $(\text{R—S})_2\text{Hg}$, что нарушает ход титрования.

Опыты на мышцах. Безбелковый фильтрат мышечной ткани был получен после добавления к гомогенату 2,5% сульфосалициловой кислоты и перемешивания в течение 15—20 минут. Сульфосалициловая кислота добавлялась 1:10 к весу свежей ткани. Все процедуры производились на холоду. Полученный после фильтрации безбелковый фильтрат имел кислую реакцию (pH 3). Для нейтрализации фильтрат, объем которого составлял около 6 мл, разбавлялся в первой группе опытов дважды дистиллированной водой (нейтрализация 1н NaOH), во второй группе — карбонатным буфером без или с 1 н NaOH (pH 6,8—9,0) и в последней группе — боратным буфером (бура 0,05 М pH 9,24). К титрационной смеси в некоторых случаях добавлялся также хлористый натрий (0,9%—раствор).

Результаты наших опытов показали, что воспроизводимые данные могут быть получены при титрации безбелкового фильтрата в щелочной среде. Как видно из табл. 2, нейтрализация кислого безбелкового фильтрата 1 н NaOH с одной стороны, и карбонатным, боратным буферами, с другой, — не равнозначны. В первом случае обычно

Таблица 1

Количество HgCl_2 в мл (1×10^{-3} М), ушедшее на титрацию
2 мл цистеина (1×10^{-3} М), растворенного в сульфосалици-
ловой кислоте

Разбавляющая среда	Время с момента приготовления раствора цистеина в минутах	
	2—5	15—20
Бура (0,05 М) без добавления цистеина рН 9,24	0,07	—
То же	0,04	—
То же + сульфосалициловая к-та рН 8,5	0,04	—
То же	0,03	—
Карбонатный буфер, 0,5 М КСl без цистеина рН 7,2	0,04	—
То же	0,05	—
Нейтрализация 1 NaOH рН 4,0	0,76	—
То же рН 5,0	0,75	—
То же рН 6,0	0,85	0,50
То же рН 8,0	1,00	—
Карбонатный буфер + 0,5 М КСl рН 7,2	0,70	—
То же рН 7,2	1,10	—
То же + 1 N NaOH рН 8,0	1,00	—
То же рН 9,0	1,10	—
То же рН 9,0	1,05	—
То же рН 9,0	1,05	—
То же рН 9,0	1,14	0,87
То же рН 9,0	1,10	0,85
То же рН 9,0	—	0,85
То же рН 8,0	—	0,80
Боратный буфер (0,05 М) рН 9,0	1,00	0,98
То же рН 9,0	1,05	1,03
То же рН 9,0	1,02	1,00
То же рН 9,0	1,00	0,97
То же рН 9,0	1,08	1,16
То же рН 9,0	1,10	1,08

имелся низкий титр — SH групп, даже при рН титруемой смеси равной 9. При нейтрализации фильтрата карбонатным буфером с 0,5 М КСl (раствор Эдсалля) также были получены данные, ниже, чем в боратном буфере. Добавление на разбавленный раствором Эдсалля безбелковый фильтрат 0,9% — NaCl еще больше снижало титруемое количество — SH групп. При расчете оказалось, что количество хлоридов в этом случае соответствовало примерно 0,7 М, что уже отражалось на результатах титрования, тогда как, согласно Сесил (¹²), при титрации растворов чистого цистеина допустимое количество хлоридов при рН 6,7 составляет 2 М.

Таблица 2

Количество —SH групп в безбелковом фильтрате икроножной мышцы лягушки, определяемое HgCl_2 ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) при разбавлении сульфосалициловокислого фильтрата различными буферами (500 мг ткани)

С р е д а	Количество HgCl_2 , ушедшее на титрацию	Количество —SH в мг цистеина на 100 г ткани
Без разбавления pH 2,0	0,05	2,40
Нейтрализация 1н NaOH pH 8,0	0,08	3,80
То же pH 9,0	0,14	6,70
Карбонатный буфер, 0,5 M KCl pH 7,2	0,04	1,90
То же + 1н NaOH pH 8,5	0,18	8,60
То же pH 9,0	0,21	10,08
То же pH 9,0	0,18	8,60
То же + 0,9% NaCl pH 9,0	0,14	6,70
Боратный буфер (бура 0,05 M) pH 9,0	0,35	16,81
То же pH 9,0	0,29	13,90
То же pH 10,0	0,25	12,00
То же pH 9,0	0,23	11,40
То же pH 9,0	0,25	12,00
То же pH 9,0	0,25	12,00
То же pH 9,0	0,34	16,28
То же pH 9,0	0,26	12,50

Отсюда необходимо заключить, что экстракция тканей физиологическим раствором (0,9% NaCl) и раствором Эдселля может отражаться на результатах титрования этих экстрактов ртутью. Можно допустить, что в безбелковом фильтрате тканей присутствие хлоридов значительно сильнее сказывается на ходе титрования —SH групп, чем в растворах цистеина.

При титрации смесей безбелкового фильтрата с боратным буфером (pH 9,0) оттитрованное количество —SH групп составляло в среднем 16 мг цистеина на 100 г мышечной ткани, когда при применении 1н NaOH (pH среды 9,0) оттитровалась половина этого количества.

На основании вышеизложенного можно предложить следующую схему амперометрической титрации небелковых —SH соединений в мышце ртутью.

Гомогенат готовится добавлением на размельченную ножницами навеску ткани (500 мг) 0,5—1,0 мл дважды дистиллированной воды и кварцевого песка. Ткань растирается на холоду в течение 5—10 минут, после чего добавляется 2,5% раствор сульфосалициловой кислоты. Смесь энергично перемешивается и оставляется на холоду 10—15 минут. Фильтрация производится через бумажный фильтр и

осадок на фильтре промывается небольшим количеством боратного буфера (рН 9,24), и впоследствии объем безбелкового фильтрата доводится этим же буфером до 35 мл, при этом рН смеси достигает 8,7—9,0. Перемешивание смесей вращающимся платиновым электродом перед титрацией не должно продолжаться больше 2—3 минут, ибо происходит уменьшение титруемых —SH групп, возможно в свя-

зи с нейтрализацией стабилизирующего влияния сульфосалициловой кислоты в щелочной среде.

Располагая количеством —SH групп в безбелковом фильтрате и в гомогенате ткани, можно рассчитать количество белковых —SH групп по формуле:

Колич. —SH в гомогенате —
— колич. —SH в б/б фильтрате = колич. —SH в белковых фракциях.

Таблица 3
Количество небелковых —SH групп в икроножной мышце лягушки (буфер Бура 0,05 М рН 9,0)

Среднее из 18 опытов	Количество в мг цистеина на 100 г ткани
Левая мышца	13,1
Правая мышца	14,00
Среднее	15 ± 3,0

Определяя количество —SH групп титрацией ртутью вышеописанным способом, нами установлено, что в безбелковом фильтрате поперечно-полосатой мышцы содержится 1/6—1/8 часть общего количества —SH групп.

Предложенный нами модифицированный метод амперометрического титрования ртутью для количественного определения —SH групп в безбелковом фильтрате легко осуществим, достаточно точен и лишен недостатков, связанных с применением AgNO₃.

Полученные данные указывают на то обстоятельство, что приготовление гомогената мышечной ткани на физиологическом растворе (0,9% NaCl) с последующим разделением безбелкового фильтрата может повлиять на ход титрации. Это необходимо учесть при широком применении растворов, содержащих хлориды. Необходимым условием является также проведение титрации ртутью в щелочной среде (выше рН 8).

Институт физиологии
Академии наук Армянской ССР

Ս. Ս. ՇՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ ԵՎ Վ. Գ. ԶԱՆԻԲԵԿՈՎԱ

Այս ապիտային —SH խմբերի քանակական որոշումը
մկանցներում սնդիկի միջոցով

Թիոլների՝ այսինքն —SH խմբերի ամպերոմետրիկ որոշման նշանակը մեծ չափերով օգտագործվում է նրանց քանակական ասումնասիրությանը թյունների ընթացքում, քանի որ նրանք տալիս են տեղեկություններ սպիտակուցային մոլեկուլի և ամինոթթուների քիմիական կառուցվածքի մասին: Որինչ այժմ ոչ սպիտային զանազան —SH միացությունների քանակը որոշվում էր AgNO₃ միջոցով, սակայն ազատաթթվային աբաթի

«դառապործումն ունի բացասական կողմեր: Տվյալ աշխատանքում հիմնվելով մի շարք հետազոտությունների վրա առաջարկվել է ձևափոխել կենդանական հյուսվածքներում ոչ պիտային — SH խմբերի քանակական որոշման ամպերոմետրիկ եղանակը, օգտագործելով սուլեմա (HgCl_2), որը բացառորեն միացություն է տալիս — SH խմբերի հետ:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ И. М. Кольтгофф и В. Е. Гаррис, *Ind. Eng. chem. Anal.* 18, 161 (1946). ² Р. Бенеш и Р. Е. Бенеш, *Arch. Biochem.* 19, 1 (1948). ³ Р. Бенеш и Р. Е. Бенеш, *Arch. Biochem.* 28, 1 (1950). ⁴ Е. Шюенбах и Е. Армстид, *Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med.* 73, 44 (1950). ⁵ Н. Вейсман, Е. Шюенбах и Е. Армстид, *Journ. Biol. chem.* 187, 1 (1950). ⁶ С. Гольдцнер, В. Раулс и А. Гольдцнер, *Journ. Biol. chem.* 203, 1 (1953). ⁷ В. Штайб и Ф. Турба, *Biochem. Ztschr.* 327, 473 (1956). ⁸ А. В. Азявгик, *Биохимия*, 23, 244 (1958). ⁹ Р. Бенеш, Х. Лэрди и Р. Е. Бенеш, *Journ. Biol. chem.* 216, 663 (1955). ¹⁰ В. Штрикс, И. М. Кольтгофф и Танака, *Anal. chem.* 26, 209 (1954). ¹¹ И. М. Кольтгофф, В. Штрикс и Л. Моррен, *Anal. chem.* 26, 366 (1954). ¹² Р. Сесил, *Biochem. et Biophys. acta.* 18, 154 (1955). ¹³ Л. Бек, В. Линкенгейм и А. Маррагини, *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.* 4, 823 (1954). ¹⁴ E. Chinard and L. Hellerman, *Methods of Biochemical Analysis*. Intersci Publ., N. 4. 1954 vol. 1. ¹⁵ Б. Поглазов, В. Билуши и А. А. Баев, *Биохимия*, 23, 209 (1958).