

БИОХИМИЯ

Г. В. Барсегян

Количественное определение свободного этаноламина в животных тканях пара-бензохиноном

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР С. А. Мирзяном 4/III 1965)

Исходя из важного биологического значения этаноламина его количественное определение в животных тканях представляет большой интерес.

Триер в 1911 г. предложил метод определения этаноламина путем образования им комплексного соединения с золотом (1). Чаргафф применял динодсалициловую экстракцию этаноламина из продуктов гидролиза фосфатидов (2). В последующие годы количественное определение этаноламина производилось периодатным методом, который впервые был предложен Николэ и Шинном (3). Периодатный метод, сущность которого заключается в определении количества образовавшегося аммиака из этаноламина в присутствии периодата ( $H_2O_8$ ), был применен Рамси и Стюартом (4), Бурмастером (5), Флэри и Гитаром (6), Артомом (7), Фишманом и Артомом (8), Камаляном (9). Недостаток периодатного метода заключается в его неспецифичности, так как вместе с этаноламином в реакцию вовлекается и серин.

Открытие и совершенствование хроматографии создало ряд новых методов для количественного определения этаноламина. Как ниингидрин — положительное вещество, этаноламин был идентифицирован обычным методом определения аминокислот. Меджи и др. обнаружили этаноламин в гидролизатах фосфатидов методом хроматографии на бумаге при использовании в качестве растворителя смеси метил-этил-кетона, метил-целлосольва и уксусной кислоты в определенных соотношениях (10). Для лучшего разделения этаноламина часто применяется двухмерная хроматография, так как его  $R_f$  близок к таковым других аминокислот.

Некоторыми авторами этаноламин определялся методом хроматографии на колонках с использованием различных ионообменных смол Дауэкс-50, Зео-Карб и др. (11-13). Несмотря на чувствительность хроматографического метода, его сложность, продолжительность и необходимость для этих редких реактивов лишает исследователей воз-

возможности широко применять его для этой цели. Исходя из этого, мы поставили перед собой задачу разработать более простой, но чувствительный метод количественного определения этаноламина в животных тканях. При разработке нашего метода мы исходили из того, что этаноламин вступает в специфическую реакцию с пара-бензохиноном с образованием оранжево-красного окрашивания. Как показали наши исследования, другие аминоспирты, аминокислоты, адреналин, серотонин и даже производные этаноламина, как фосфоэтиламин, не дают этой специфической реакции. Для проверки специфичности предложенного нами метода мы провели также исследования с экстрактами печени с предварительным разделением этаноламина методом хроматографии на бумаге. Результаты этих опытов показали, что, кроме этаноламина, другие метаболиты не реагируют с пара-бензохиноном.

Сущность метода заключается в экстрагировании этаноламина из животных тканей с последующей цветной реакцией с пара-бензохиноном. Для экстракции мы использовали этиловый или бутиловый спирты, в которых этаноламин хорошо растворяется. Цветная реакция с пара-бензохиноном развивается не сразу. При хранении реакционной смеси в темном месте при  $37^{\circ}\text{C}$  через 1,5 часа образуется стойкое оранжево-красное окрашивание.

Навеска исследуемой ткани (например, 1 г печени) переносится в ступку, растирается и высушивается в вакуумном эксикаторе над  $\text{CaCl}_2$ . Процесс высушивания можно проводить также продуванием холодного воздуха. Необходимо избегать притока теплого воздуха, с целью предотвращения испарения этаноламина. Даже при применении холодного воздуха процесс высушивания надо заканчивать в эксикаторе.

После высушивания ткань растирают в порошок и количественно переносят в колбочку, куда наливают 5 мл этилового или бутилового спирта, колбу прикрывают и оставляют стоять на ночь (12—16 часов) для полного экстрагирования этаноламина. Затем содержимое колбочек переносят в центрифужные пробирки, а колбочки дважды прополаскивают 1 мл спирта, который переливают в пробирки. Центрифугирование в течение 15 мин. производится при 2000  $\text{xg}$ . Надосадочную жидкость наливают в 10-миллилитровую градуированную пробирку, а к осадку приливают 1 мл спирта, содержимое пробирки тщательно перемешивают, вновь центрифугируют и надосадочную жидкость приливают к основному экстракту. Промывание осадка повторяют трижды. К экстракту этаноламина добавляют точно 0,2 мл раствора пара-бензохинона, объем раствора доводят до 10 мл спиртом, перемешивают и оставляют в затемненном термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 1,5 часа. В указанное время образуется оранжево-красное окрашивание. Одновременно ставится контрольный опыт, состоящий из 9,8 мл этилового или бутилового спирта и 0,2 мл раствора пара-бензохинона; фотометрирование опытной пробы производят в фотоэлектроколориметре против слепой пробы (фильтр синий, кювета 1 см). Количественный расчет этаноламина производится по заранее составленной калибровочной кривой с использованием точных растворов этаноламина.

Пара-бензохинон представляет собой желтые игольчатые кристаллы. Его можно выкристаллизовать из бензола и желательнее хранить в темной склянке. Растворы пара-бензохинона готовятся непосредственно перед употреблением следующим образом: 100 мг пара-бензохинона растворяют в 10 мл смеси, состоящей из 8 мл N-бутилового спирта и 2 мл пиридина.

Количество свободного этаноламина, определенного нашим методом в тканях белых крыс, соответствует литературным данным. Для проверки предлагаемого метода мы поставили опыты по воспроизводству этаноламина. С этой целью к печеночным гомогенатам белых крыс добавляли разные количества этаноламина, который определялся с удовлетворительной точностью. В табл. I приводятся эти данные.

Как видно из данных табл. I, количество добавленного этаноламина почти полностью воспроизводится этим методом.

Высокая чувствительность нашего метода выражается в порядке 0,5—1 мкг.

Таблица I  
Воспроизводимость этаноламина при его добавлении к печени белых крыс

| Количество добавленного этаноламина в мкг | Количество найденного этаноламина в мкг | Воспроизведенный этаноламин |                     |
|---|---|-----------------------------|---------------------|
|   |   | в мкг                       | в % от добавленного |
| 0   | 27,5                                    | —                           | —                   |
| 20  | 46,2                                    | 19,7                        | 98,7                |
| 40  | 67,5                                    | 40                          | 100                 |
| 60  | 85,0                                    | 57,5                        | 95,8                |
| 80  | 102,5                                   | 75,0                        | 93,7                |
| 100                                       | 126,2                                   | 98,7                        | 98,7                |

Таким образом, предложенным нами несложным методом можно с большой точностью определить количество свободного этаноламина в животных тканях. Этим же методом можно пользоваться для определения этаноламина в гидролизатах фосфатидов.

Ереванский зоотехническо-ветеринарный институт

#### Գ Վ. ՔԱՐԱՆՂՅԱՆ

### Կենդանական հյուսվածքներում ազատ էթանոլամինի որոշումը պարու-բենզոլիդով

էթանոլամինը լայնորեն տարածված է կենդանական աշխարհում: Նա օրգանիզմում գտնվում է ինչպես ազատ, այնպես էլ կապված վիճակում, հատկապես ֆոսֆատիդների կազմում: Բազմաթիվ հետազոտություններով ցույց է տրվել էթանոլամինի կարևոր փոլոգիական դերը: Արա ջանակալան որոշումը կենդանական օրգանիզմի հյուսվածքներում ունի որոշակի նշանակություն: Էթանոլամինի քանակական որոշման միջև հիմա գոյություն ունեցող եղանակներն իրենց անհարմարության կամ ժանրակազմության պատճառով չեն կարողացել լայն կիրառում գտնել գիտա-հե-

տազատակա՞ն շրջաններում, այդ իսկ պատճառով մեր առաջ խնդիր դրեցինք մշակել կենդանու-  
կան հյուսվածքներում ազատ էթանոլամիների որոշման մատչելի և նշգրիտ եղանակ:

Մեր կողմից առաջարկված էթանոլամիների որոշման եղանակի սկզբունքը այն է, որ էթանո-  
լամիներ տալիս է յուրահատուկ գունավորման ունակցիտ պարա-բենզոթիոնների հետ: Ընդհանուր  
սովեցին մեր հետազոտությունները, բացի էթանոլամիներից, օրգանիզմում գտնվող մյուս միացու-  
թյունները չեն տալիս այդ բնորոշ ունակցիան:

էթանոլամիների որոշման համար հետազոտվող հյուսվածքը տրորում են, չորացնում, այնու-  
հետև հյուսվածքի փոշու վրա ավելացնում են էթիլ կամ բուտիլ սպիրտ (էթանոլամիներ էքստրակ-  
ցիայի ենթարկելու համար) և թողնում են 12—16 ժամ, որից հետո ցենտրաֆուգում են և վերել  
հեղուկի վրա ավելացնում են պարա-բենզոթիոնների լուծույթ: Ստացված խառնուրդը 1.5 ժամվա  
ընթացքում պահում են մթացրած թերմոստատի մեջ 37°-ում, որի հետևանքով առաջանում է  
կարմրա-նարնջագույն գունավորում: Գունավոր լուծույթը ֆստոմետրում են և էթանոլամիների հալու-  
նի քանակներով նախօրոք կազմած կորագծի օղակաթյամբ որոշում են հետազոտվող հյուսվածքում  
ազատ էթանոլամիների քանակը:

#### Л И Т Е Р А Т У Р А — Կ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- <sup>1</sup> *Триер, Z. Physiol. Chem.* 76, 496, 1911—12. <sup>2</sup> *Чаргафф, ЗиФФ, Риттенберг, J. Biol. Chem.* 138, 439, 1941. <sup>3</sup> *Николэ, Шинн, J. Biol. Chem.*, 139, 687, 1941. <sup>4</sup> *Рамси, Стюарт, Biochem. J.* 35, 39, 1941. <sup>5</sup> *Бурмастер, J. Biol. Chem.*, 165, 1—6, 1946. <sup>6</sup> *Флэри, Гитар, Bull. Soc. Chem. Biol.*, 28, 651, 1946. <sup>7</sup> *Артом, J. Biol. Chem.* 157, 585, 1945. <sup>8</sup> *Фишман, Артом, Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 60, 288, 1945. <sup>9</sup> *Г. В. Камалян, Диссертация, 1952, Ереван.* <sup>10</sup> *Мэджи, Бейкер, Томпсон, Biochem. Biophys. Acta*, 40, 118, 1960. <sup>11</sup> *Стейн, J. Biol. Chem.* 201, 45, 1953. <sup>12</sup> *Декст, Фойлер, Вэлыш, Biochem. J.* 48, 13, 1951. <sup>13</sup> *Лак, Вилькоккс, J. Biol. Chem.* 205, 859, 1953. <sup>14</sup> *Блау, Biochem. J.* 80, 193, 1961.