ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ
ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՖԻԶԻԿԱՔԻՄԻԱԿԱՆ, ՕՊՏԻԿԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԵՎ ՍՏԱՑՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿՆԵՐԸ

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՖԻԶԻԿԱՔԻՄԻԱԿԱՆ, ՕՊՏԻԿԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԵՎ ՍՏԱՑՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿՆԵՐԸ

Լաբորատոր աշխատանքների ձեռնարկ
«Կենսօրգանական քիմիա»
առարկայից

ԵՐԵՎԱՆ
ԵՊՀ ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
2018

ՀՏԴ 547.466
ԳՄԴ 24.239
Ա 520

Հրատարակության է երաշխավորել
ԵՊՀ ֆարմացիայի ինստիտուտի
գիտական խորհուրդը

Կազմեցին՝
քիմ. գիտ. թեկնածու **Հ. Մ. Սիմոնյան**
քիմ. գիտ. թեկնածու **Ա. Ֆ. Մկրտչյան**

Ա 520 Ամինաթթուների ֆիզիկաքիմիական և օպտիկական հատկությունները, ստացման եղանակները: Լաբորատոր աշխատանքների ձեռնարկ «Կենսօրգանական քիմիա» առարկայից/ կազմողներ՝ Հ. Մ. Սիմոնյան, Ա. Ֆ. Մկրտչյան: -Եր., ԵՊՀ հրատ., 2018, 40 էջ:

Ձեռնարկում ներկայացված են ամինաթթուների ֆիզիկաքիմիական և օպտիկական հատկությունները, ինչպես նաև սինթեզի որոշ մեթոդներ: Աշխատանքը կազմված է տեսական և փորձնական մասերից: Յուրաքանչյուր բաժնում տեսական ակնարկից հետո բերված են որոշ փորձեր, որոնք նախատեսված են ուսանողների լաբորատոր աշխատանքների համար: Ձեռնարկը նախատեսված է «Դեղագիտություն» և «Քիմիա» մասնագիտությամբ ուսանողների համար:

ՀՏԴ 547.466
ԳՄԴ 24.239

ISBN 978-5-8084-2292-6

© ԵՊՀ հրատ., 2018
© Կազմողի համար, 2018

1. Ամինաթթուների անալիզի մեթոդները

Ամինաթթուները երկֆունկցիոնալ միացություններ են, որոնց ֆիզիկաքիմիական հատկությունները և բազմազան ռեակցիաների մասնակցությունը պայմանավորված են մոլեկուլում առկա թթվային բնույթի կարբոքսիլային և հիմնային բնույթի ամինային խմբերով:

Այսօր հայտնի են 1000-ից ավելի ամինաթթուներ, որոնցից շատերը α-ամինաթթուներ են: Դրանք այն ամինաթթուներն են, որոնց կառուցվածքում COOH և NH_2 խմբերը միացած են միևնույն ածխածնի ատոմին:

Ամինաթթուները, ինչպես ազատ ձևով, այնպես էլ կապված վիճակում մասնակցում են բակտերիաների, սնկերի, ջրիմուռների, բուսական և կենդանական բջիջների գոյացման և զարգացման գործընթացներում: Քսան ամինաթթուներ (ըստ էության տասնինը ամինաթթու և մեկ իմինաթթու) հանդիսանում են պեպտիդների ու սպիտակուցների կառուցվածքային տարրերը: Սպիտակուցային հիդրոլիզատներում այդ քսան ամինաթթուների հայտնաբերման համար հաջողությամբ կիրառվում է քրոմատոգրաֆիական անալիզի եղանակը:

Ամինաթթուների անալիզի մեթոդները հիմնականում հիմնված են նինհիդրինի հետ նրանց փոխազդեցության ռեակցիայի վրա, որը առաջարկել է Ռուէմանը 1911 թ.: Նինհիդրինը կամ տրիկետոհիդրինդենհիդրատը (I) փոխազդելով ամինաթթվի հետ, վերականգնվում է մինչև դիկետոքսիհիդրինդենի (II), իսկ ամինաթթուն դեզամինացման արդյունքում միջանկյալ իմինաթթվի առաջացմամբ վեր է ածվում α-կետոթթվի և ամոնիակի: Կետոթթուն իր հերթին դեկարբոքսիլացվում է, առաջացնելով ալդեհիդ՝ ելային ամինաթթվի համեմատությամբ մեկ ածխածնի ատոմի պակաս պարունակությամբ: Առաջացած դիկետոքսիհիդրինդենը փոխազդում է անջատված ամոնիակի և նինհիդրինի 2-րդ մոլեկուլի հետ, առաջացնելով միացություն (III), որի ենթլային ձևի ամոնիումային աղին (IV) բնորոշ է մանուշակագույն գունավորումը, որն այլ կերպ կոչվում է «Ռուէմանի մանուշակագույն» (Սխեմա 1): Հետազոտու-

թյունները ցույց են տվել, որ կախված լուծիչի բնույթից, առաջացած արգասիքի լուծույթը կարող է ունենալ ինչպես մանուշակագույն, այնպես էլ երկնագույն գունավորում:

Սխեմա 1

Փորձ № 1

Առանձին ամինաթթուների որակական անալիզը նրբաշերտային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով

Ամինաթթուների խառնուրդում առանձին ամինաթթուների անալիզի ամենապարզ և մատչելի մեթոդը համարվում է նրբաշերտային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդը (ՆՇՔ): Այն հիմնված է SiO_2-ի կամ ցելյուլոզի շերտով պատված ալյումինե կամ ապակյա թիթեղների միջոցով ամինաթթուների բաժանման սկզբունքի վրա: Դրա համար ամինաթթվային խառնուրդի ջրային լուծույթից միկրոնեռարկիչների միջոցով ~1-10 մկլ կաթեցվում է թիթեղի ստորին մասից 1սմ բարձրության վրա (start), որից հետո թիթեղը տեղադրվում է

հերմետիկ փակվող խցիկում՝ լցված բաժանող բուֆերային լուծույթով (էլյուենտ): Էլյուենտը մազանոթային ուժերի հաշվին թիթեղի մակերևույթով շարժվելով դեպի վեր, տեղափոխում է ամինաթթվային խառնուրդին, որն անցնելով SiO_2-ի կամ ցելյուլոզի շերտով, բաժանվում է առանձին ամինաթթուների: Երբ լուծույթը հասնում է թիթեղի վերին մասից 1սմ ցածր դիրքի (front), թիթեղը հանվում է, չորացվում, ներկվում նինհիդրինի լուծույթով և տաքացվում 5 րոպե մոտ 80°C ջերմաստիճանի տակ (նկար 1):

Նկ. 1. Ներբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի հիմնական փուլերը

Այդ ընթացքում առանձին ամինաթթուները, փոխազդելով նինհիդրինի հետ, առաջացնում են մանուշակագույն գույնով ներկված կետեր: Որպես արդյունավետ էլյուենտ, որի ներկայությամբ բաժանվում են գրեթե բոլոր սպիտակուցային ամինաթթուները, համարվում է էթանոլ:բութանոլ:ացետոն:ամոնիակ:ջուր (2:2:4:3:1) խառնուրդը, իսկ որպես նինհիդրինի լուծույթ օգտագործվում է ացետոն (95 մլ), քացախաթթու (1 մլ) և ջուր (4 մլ) խառնուրդում 0,5 գ նինհիդրինի լուծույթը:

Ներբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով ամինաթթուների անալիզը բնորոշող որակական ցուցանիշը համարվում է R_f-ի արժեքը, որը բնութագրում է սորբենտի շերտում ամինաթթվի շարժունակությունը (նկար 2): Յուրաքանչյուր ամինաթթվին բնորոշ է R_f-ի որոշակի արժեք, որը կարող է փոփոխվել կախված բուֆերի, սորբենտի և քրոմատոգրաֆիական թիթեղի տեսակից, սորբենտի շերտի հաստությունից, ինչպես նաև անալիզի իրականացման պայմաններից:

Նկ. 2. Առանձին ամինաթթվի ՆՇՔ

Խառնուրդում առանձին ամինաթթուների որակական անալիզի համար պատրաստում են տարբեր ամինաթթուների ստանդարտ լուծույթներ, ՆՇՔ թիթեղի start-ի կենտրոնական մասում տեղադրվում է հետազոտվող նմուշը, իսկ նրա աջ և ձախ կողմերում՝ ստանդարտ լուծույթները: Թիթեղը վերը նշված ձևով մշակումից հետո ըստ R_f-ի արժեքի որոշվում է խառնուրդում պարունակվող առանձին ամինաթթուների իսկությունը: Նկար 3-ում բերված է ամինաթթվային խառնուրդի ՆՇՔ-ն:

Նկ. 3. Ամինաթթվային խառնուրդի ՆՇՔ-ն
4-ը՝ խառնուրդի նմուշ,
1-ը՝ լեյցին, 2-ը՝ վալինի,
3-ը՝ լիզինի, 5-ը՝ պրոլինի,
6-ը՝ ալանինի և 7-ը՝ լիզինի
ստանդարտ նմուշները

Չնայած սխալի բարձր տոկոսին (մինչև 5%) մեթոդի պարզության շնորհիվ ՆՇՔ-ն հաճախ օգտագործվում է նաև ամինաթթուների քանակական անալիզի համար: Դրա համար նախ որոշվում է խառնուրդի ամինաթթվային կազմը (որակական անալիզ), որից հետո առանձին ամինաթթուների կոնցենտրացիան (քանակական անալիզ):

Փորձ № 2
Թղթային քրոմատոգրաֆիայի եղանակով հետազոտվող խառնուրդի նմուշում հայտնի ամինաթթվի քանակական անալիզը

Ամինաթթուների որակական և քանակական անալիզի համար արդյունավետորեն օգտագործվում է նաև թղթային քրոմատոգրաֆիայի եղանակը: Ամինաթթուների անալիզի այս մեթոդը էությամբ նման է նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիական անալիզի մեթոդին, այն տարբերությամբ, որ SiO_2 կամ ցելյուլոզ կրող թիթեղների փոխարեն օգտագործվում է քրոմատոգրաֆիական թուղթ:

Ավելի հաճախ թղթային քրոմատոգրաֆիայի ժամանակ որպես բուֆերային լուծույթ օգտագործվում է ջուր-բութանոլ-քացախաթթու լուծիչների խառնուրդը: Բուֆերային լուծույթի պատրաստման համար 4 մլ բութանոլին ավելացվում է 1 մլ քացախաթթու և 5 մլ թորած ջուր:

Որպես քրոմատոգրաֆիական խցիկ օգտագործվում են հերմետիկ փակվող ապակե տարաներ (նկար 4):

Նկ. 4. Թղթային գրոմատոգրաֆիա

Ապակե խցիկում կաթոցիկի օգնությամբ լցվում է բութանոլային բուֆերային լուծույթը 7-10 մմ բարձրությամբ: Անհրաժեշտ է ուշադրություն դարձնել, որ բուֆերային լուծույթի ավելացման ժամանակ տարայի պատերը չթրջվեն:

Հետազոտվող նմուշում ամինաթթվի քանակությունը որոշելու համար, այն համեմատվում է նույն ամինաթթվի մի շարք հայտնի կոնցենտրացիաներով ստանդարտ լուծույթների հետ: Քրոմատոգրաֆիական թղթի ստորին մասից 2.5 սմ բարձրության վրա անցկացվում է մեկնարկային գիծը (start), որի վրա կաթեցվում են հետազոտվող խառնուրդը և ալանինի ստանդարտ լուծույթները (0.5, 1, 1.5 և 2 գ/լ): Թղթե ժապավենին կաթեցված կետերի տրամագիծը չպետք է գերազանցի 5 մմ-ը: Թիթեղը չորացվում է օդում կամ չորացուցիչում և համոզվելով, որ կետերը չորացել են այն իջեցվում է քրոմատոգրաֆիական խցիկի մեջ այնպես, որ այն հատվածը, որտեղ կաթեցված են նմուշները չմտնեն բուֆերային լուծույթի մեջ: Այնուհետև, երբ բուֆերային լուծույթը բարձրանում է 13-15 սմ, թղթե ժապավենը հանվում է խցիկից, մատիտով նշվում է բուֆերային լուծույթի սահմանը (front) և ժապավենը չորացվում օդում կամ չորացուցիչում:

Ամինաթթուների հետքերի հայտնաբերման համար չորացած քրոմատոգրաֆիկական ժապավենը հավասարաչափ ցողվում է նինհիդրինի լուծույթով (նինհիդրինի լուծույթի պատրաստումը նկարագրված է փորձ 1-ում) և տաքացվում 70-90^{0}C-ում: Տաքացման ընթացքում քրոմատոգրաֆիկական թղթի վրա հայտնվում են գունավոր կետեր:

Այնուհետև համեմատվում են թիթեղի վրա ստացված գունավոր կետերն ըստ մեծության և գույնի ինտենսիվության ինչպես տեսողական (նկար 5), այնպես էլ սպեկտրալուսաչափական եղանակով: Վերջինիս դեպքում թիթեղից կտրելով առանձնացվում է ամինաթթվի գունավորված հետքը և էլյուատային լուծույթով (52 մլ էթանոլ, 48 մլ ջուր ու գույնի կայունացման համար լուծույթին ավելացվում է 0.364 գ $CdCl_2$) էլյուցիայի ենթարկելուց հետո չափվում է ստացված գունավորված լուծույթի ծավալը, որից հետո սպեկտրալուսաչափական եղանակով որոշվում է ամինաթթվի կլանման գործակիցը ալիքի երկարության տեսանելի մարզում:

Նկ. 5. ՆՇՔ մեթոդով խառնուրդում ալանինի քանակության որոշումը. 4-ը՝ խառնուրդի նմուշ ալանինի ստանդարտ նմուշներ՝ 2-ը՝ 1գ/լ, 2-ը՝ 0,75 գ/լ, 3-ը՝ 2 գ/լ, 5-ը՝ 0,5 գ/լ, 6-ը՝ 1,5 գ/լ, 7-ը՝ 0,2 գ/լ . (ինչպես երևում է նկարից, խառնուրդում C_{Ala} = 2գ/լ)

Համեմատելով հետազոտվող խառնուրդի նմուշից առանձնացված ամինաթթվի լուծույթի կլանման արժեքը նույն ամինաթթվի հայտնի կոնցենտրացիաներով ստանդարտ նմուշների կլանման արժեքների հետ, աստիճանավորման կորերի միջոցով որոշվում են առանձին ամինաթթուների քանակությունները: Դրա համար նախօրոք պետք է առանձին ամինաթթուների համար հայտնի ստանդարտ կոնցենտրացիաներով լուծույթների օգտագործմամբ ստանալ աստիճանավորման կորեր՝ նույն պայմաններում, միևնույն քրոմատոգրաֆիական թղթերի և խցիկների, ամինաթթվային բուֆերի և նինհիդրինի լուծույթի կիրառմամբ:

Փորձ № 3
Ավտոմատ ամինաթթվային անալիզի մեթոդով արգինինի քանակական որոշումը և նույնականացումը

Ամինաթթուների անալիզի գործընթացներում լայն տարածում են գտել ամինաթթվային անալիզատորները:

Նախքան հետազոտության իրականացումը «Shimadzu Nexeria X2» ամինաթթվային անալիզատորը բերվում է աշխատանքային վիճակի համապատասխան շահագործման տեխնիկական պահանջների, որից հետո պատրաստում են էլյուցիոն համակարգը՝ ացետոնիտրիլ : մեթանոլ : ջուր= 45:40:15 (ըստ ծավալի), և ֆոսֆատային բուֆերը pH 7.2 (կշռում ենք 1.77 գ կալիումի դիֆոսֆատ և 1.306 գ կալիումի մոնոֆոսֆատ և լուծում 1000 մլ դեիոնիզացված ջրում):

Արգինինի քանակական որոշման համար վերցնում են ամինաթթվի 0.45 մգ կշռագանգված և լուծում 1 մլ 0.01 Ն-ոց աղաթթվի լուծույթում: Քանակական որոշման համար անհրաժեշտ է կառուցել աստիճանավորման կոր, որի համար վերցնում են ամինաթթվի լուծույթից և նոսրացնում 0.01 Ն-ոց աղաթթվով 1000, 2000, 3000 և 4000 անգամ՝ աստիճանավորման կորի վրա առնվազն չորս կետ ստանալու համար: Նոսրացված լուծույթները ֆիլտրում են 0.2 մկմ անց-

քերի մեծություն ունեցող թաղանթային ֆիլտրերով, տեղափոխում հետազոտվող նմուշների համար նախատեսված տարաների մեջ և տեղադրում ավտոմատ ներարկման համակարգի մեջ՝ նմուշների համար նախատեսված հարթակի վրա:

Ամինաթթուների նույնականացման հիմքում ընկած է դերիվատիզացման (ածանցյալի ստացման) եղանակով ամինաթթուների որոշումը օրտոֆտալալդեհիդի (I) հետ միացման ռեակցիայով՝ նուկլեոֆիլ ագենտի (2-մերկապտոէթանոլի) միջավայրում, որը հանգեցնում է ֆլյուրեսցենցվող միացության ստացմանը (III) (Սխեմա 2):

Սխեմա 2

Դերիվատիզացնող ռեագենտը (օրտոֆտալալդեհիդ (OPA), 2-մերկապտոէթանոլ) 100 մկլ ծավալով ևս տեղադրվում է ավտոմատ ներարկման համակարգի մեջ՝ դերիվատիզացնող ռեագենտի համար նախատեսված հարթակի վրա: Ամինաթթվի ածանցյալի ստացումն իրականացվում է ավտոմատ կերպով «LabSolution» ծրագրային ապահովման ամինաթթուների քանակական և որակական նույնականացման համար նախատեսված մեթոդին համապատասխան:

Արգինինի մոդելային լուծույթների չորս տարբեր կոնցենտրացիաների հետազոտությունից հետո կառուցվում է աստիճանավորման կոր՝ նվազագույնը երեք կետով, որտեղ կորելիացիայի գործակիցը մոտ է մեկի, որից հետո հետազոտվում է անհայտ կոնցենտրացիայիով ամինաթթվի լուծույթը:

Ամինաթթուների քանակական որոշման և նույնականացման մեթոդի պայմանները ներկայացված են աղյուսակ 1-ում:

Աղյուսակ 1

Ամինաթթուների որոշման
մեթոդի քրոմատոգրման պայմանները

Քրոմատոգրաֆիական աշտարակ	Waters, Novo-Pak C 18, 4 μm, 3,9 x 150 mm (Waters, USA)
Դետեկտորի ալիքի երկարություն	ex350-em450 նմ
Հոսքի արագություն	1 մլ/ր
Ներարկման ծավալ	10 մկլ
Աշտարակի ջերմաստիճան	30 °C
Պոմպի աշխատանքային ռեժիմ	Գրադիենտային
Շարժուն ֆազ	Ա՝ ացետոնիտրիլ:մեթանոլ:ջուր= 45:40:15 (ըստ ծավալի) Բ՝ ֆոսֆատային բուֆեր pH 7.2

2. Ամինաթթուների ֆիզիկաքիմիական հատկությունները

Ամինաթթուները ամֆոտեր միացություններ են, քանի որ դրանց մոլեկուլի կառուցվածքում պարունակվում են ինչպես հիմնային (NH_2), այնպես էլ թթվային (COOH) խմբեր: Ուժեղ թթվային միջավայրում կարբոքսիլային խումբը դիսոցված չէ, իսկ ամինո խումբը գտնվում է ամբողջովին պրոտոնացված վիճակում: Ուժեղ հիմնային միջավայրում հակառակն է՝ ամինո խումբը գտնվում է ազատ հիմքի տեսքով, իսկ կարբոքսիլային խումբը՝ կարբոքսիլատ անիոնի տեսքով: Բյուրեղական վիճակում ամինաթթուները գտնվում են երկբևեռ ցվիտերիոնների տեսքով, որոնց բյուրեղական ցանցը կայունանում է իոնական փոխազդեցությունների հաշվին: Դրանով են բացատրվում ամինաթթուների հալման բարձր ջերմաստիճանները և ցածր լուծելիությունը ոչ բևեռային լուծիչներում:

Ամինաթթվի ջրային լուծույթով էլեկտրական հոսանք անցկացնելիս, կախված pH-ի արժեքից ամինաթթվի մոլեկուլը տեղաշարժվում է կամ դեպի անոդ, կամ դեպի կատոդ: Եթե pH-ի արժեքը այն-

պիսին է, որ ամինաթթվի մոլեկուլը բացառապես գտնվում է ցվիտերիոնի տեսքով և նրա պրոտոնացված ու դեպրոտոնացված ձևերի հարաբերությունը հավասար է 1-ի, ապա ամինաթթվի մասնիկը չի տեղաշարժվի դեպի անոդ կամ կատոդ: Լուծույթի այն pH-ի արժեքը, որի դեպքում ամինաթթվի մասնիկը գտնվում է չեզոք (բիպոլյար) ցվիտերիոնային վիճակում, կոչվում է իզոէլեկտրիկ կետ (pI) և այն համարվում է ամինաթթուների ֆիզիկաքիմիական հատկությունները բնութագրող ցուցանիշը:

Հետևաբար մոնոամինոկարբոնաթթուները չեզոք ջրային լուծույթներից բյուրեղանում են ոչ թե չդիսոցված մասնիկների ձևով, այլ դիպոլյար իոնների կամ ցվիտերիոնների տեսքով:

Չդիսոցված մասնիկ Ցվիտերիոնային մասնիկ

Ամինաթթուների երկբևեռ կամ ցվիտերիոնային կառուցվածքի մասին են վկայում նաև դրանց մոլեկուլների դիէլեկտրիկ թափանցելիության հաստատունների բարձր արժեքները, որոնք վկայում են այն մասին, որ երկբևեռ մոլեկուլի ներսում դրական և բացասական լիցքերը ամբողջությամբ բաժանված են:

Ամինաթթուների թթվահիմնային հատկությունները կարելի է մեկնաբանել Բրենստեդ-Լոուրի տեսության համաձայն: Պարզագույն մոնոամինոմոնոկարբոնաթթուները լրիվ պրոտոնացված վիճակում համարվում են երկհիմն թթուներ և հիմքով տիտրման ժամանակ կարող են դիսոցվել երկու աստիճանով (Սխեմա 3):

Սխեմա 3

Նկար 6-ում ներկայացված է ալանինի երկփուլանի տիտրման կորը: Ինչպես երևում է կորից դիսոցման երկու փուլերի pK-ների արժեքները բավականին տարբերվում են իրարից և դիսոցման կորը կազմված է իրարից լավ բաժանված երկու թևերից: Ամեն մի թևում առկա է միջինացված կետ, որում OH^- իոնների ավելացման դեպքում pH-ի փոփոխությունը նվազագույն է: Այդ կետերը համապատասխանում են կարբոքսիլային խմբի (pK_1(α-COOH) 2.34) և ամինային խմբի (pK_2 (α-NH_2) 9.69) դիսոցման հաստատունի արժեքներին: pH 2.34 արժեքի դեպքում, որը համապատասխանում է ալանինի տիտրման առաջին փուլի միջինացված արժեքին, առկա են էկվիմոլային քանակությամբ երկու տեսակի իոններ՝ պրոտոնի դոնոր կատիոն ($^+H_3NCHRCOOH$) և պրոտոնի ակցեպտոր ցվիտերիոն ($^+H_3NCHRCOO^-$): pH 9.69 արժեքի դեպքում, որը համապատասխանում է տիտրման երկրորդ փուլի միջին արժեքին, էկվիմոլային քանակությամբ պարունակվում են պրոտոնի դոնոր ցվիտերիոն ($^+H_3NCHRCOO^-$) և պրոտոնի ակցեպտոր անիոն ($H_2NCHRCOO^-$) մասնիկները:

համարժեք OH^-

Նկ. 6. Ալանինի (R=CH_3) տիտրման կորը

Տիտրման կորի երկու թևերի միջև անցման կետը համապատասխանում է pH 6.02 արժեքին, որի դեպքում մոլեկուլը չի կրում գումարային էլեկտրական լիցք և չի տեղափոխվում էլեկտրական դաշտում: Լուծույթի pH-ի այդ արժեքը համապատասխանում է ամինաթթվի իզոէլեկտրիկ կետին և այն համարժեք է α-COOH իոնի դիսոցման հաստատունի (pK_1(α-COOH) և α-NH_2 իոնի դիսոցման հաստատունի (pK_2(α-NH_2) արժեքների միջին թվաբանականին:

$$pI = 1/2\ (pK_1(\alpha\text{-COOH}) + pK_2(\alpha\text{-NH}_2))$$

Բոլոր մոնոամինամոնոկարբոնաթթուները ենթարկվում են այդ օրինաչափությանը: Մոնոամինոմոնոկարբոնաթթուների մոտ կարբոքսիլային խումբը օժտված է ավելի ուժեղ արտահայտված թթվայնությամբ, քան սովորական կարբոնաթթուների, օրինակ, քացախաթթվի (pK_1(α-COOH) 4.76) կամ կաթնաթթվի (pK_2(α-NH_2) 3.86) դեպքում: Հավանաբար դա պայմանավորված է α-COOH խմբի հարևանությամբ գտնվող դրական լիցքավորված NH_3^+ խմբի պրոտոն վանելու հատկությամբ, ինչը նպաստում է կարբոքսիլային խմբի դիսոցմանը: Բացի դրանից, մոնոամինոմոնոկարբոնաթթուների դեպքում α-NH_2 խումբը օժտված է ավելի թույլ արտահայտված

հիմնայնությամբ (կամ ուժեղ արտահայտված թթվայնությամբ), քան համապատասխան ալիֆատիկ ամինների NH_2 խումբը: Այդ պատճառով էլ բոլոր մոնոամինոմոնոկարբոնաթթուները, որոնք չեն պարունակում լիցքավորված խմբեր կողքային ռադիկալում, pK_1(α-COOH) և pK_2(α-NH_2) արժեքներով իրար բավականին մոտ են:

Լիցքավորված R խմբերով ամինաթթուների տիտրման կորերն ունեն ավելի բարդ տեսք, քանի որ նրանք պայմանավորված են ինչ-պես α-COOH և α-NH_2, այնպես էլ ռադիկալի ֆունկցիոնալ խմբերի դիսոցման ռեակցիաներով: Օրինակ հիմքով ասպարգինաթթվի տիտրման գործընթացները ընթանում են 3 փուլով (Սխեմա 4):

Սխեմա 4

Նմանատիպ տեսք ունեն նաև գլուտամինաթթվի տիտրման հավասարումները: Թթվային ամինաթթուների համար իզոէլեկտրա-կան կետը որոշվում է երկու կարբոքսիլային իոնների դիսոցման հաստատունների միջին թվաբանականով.

$$pI = 1/2(pK_1 + pK_3)$$

Հավասարումից հետևում է, որ ասպարգինաթթվի և գլուտամի-նաթթվի իզոէլեկտրական կետերը համարժեք են pH-ի թթվային

մարզին, ինչի շնորհիվ նշված ամինաթթուները բյուրեղանում են թթվային միջավայրից:

Հիմնային ամինաթթուների տիտրման ռեակցիաները նույնպես ընթանում են երեք փուլով: Առաջին փուլով տիտրվում է α-COOH խումբը, այնուհետև՝ α-NH_2 խումբը, իսկ վերջում՝ ռադիկալի հիմնային խումբը: Օրինակ, հիմքով լիզինի տիտրման գործընթացները ընթանում են սխեմա 5-ում ներկայացված փուլերով:

Սխեմա 5

Հիմնային ամինաթթուների իզոէլեկտրիկ կետի արժեքը որոշվում է դրանց երկու հիմնային խմբերի տիտրման հաստատունների միջին թվաբանականով:

$$pI = 1/2(pK_2 + pK_3)$$

Նշված ամինաթթուները բյուրեղանում են հիմնային միջավայրերից, քանի որ նրանց իզոէլեկտրական կետի արժեքները համապատասխանում են pH-ի հիմնային մարզին, որտեղ նրանց լուծելիությունը նվազագույն է:

Նկար 7-ում բերված են գլուտամինաթթվի և լիզինի տիտրման կորերը:

ա համարժեք OH^-

բ համարժեք OH^-

Նկ. 7. Գլուտամինաթթվի (ա) և լիզինի (բ) տիտրման կորերը

Ամինաթթուների ֆիզիկաքիմիական հատկությունները որոշիչ դեր են խաղում դրանց բյուրեղացման, բաժանման, անալիզի մեթոդների մշակման, սինթեզի և քիմիական հատկությունների արտահայտման գործընթացներում: Սովորաբար ամինաթթուները բյուրեղացվում են ջրից կամ ջուր-էթանոլ համակարգից իզոէլեկտրական կետին համարժեք pH արժեքի տակ, քանի որ հենց այդ կետում է դրանց լուծելիությունը հասնում նվազագույնի:

Փորձ № 4
Ալանինի իզոէլեկտրիկ կետի որոշում

Ալանինի իզոէլեկտրիկ կետը որոշելու համար 100 մլ 0.01 Մ լրիվ պրոտոնացված (լուծույթին ավելացնում են մի քանի կաթիլ աղաթթու՝ մինչև pH~1-1,5) ալանինի լուծույթը տիտրվում է 1 Ն NaOH-ի լուծույթով: pH-ի փոփոխությունը չափվում է pH-մետրի օգնությամբ: Նախ գրանցվում է pH-ի սկզբնական արժեքը (մինչև NaOH ավելացնելը), այնուհետև NaOH-ի ավելացված յուրաքանչյուր ծավալաբաժնի դեպքում չափվում է ամինաթթվի լուծույթի pH-ը: Տիտրումը ավարտելուց հետո (երբ pH-ի արժեքը հասցվում է 12) արձանագրված տվյալների հիման վրա կառուցվում է տիտրման

կորը: Ժամանակակից ավտոմատացված pH-մետրերը անմիջապես գծում են կորերը:

Տիտրման կորերից որոշվում է pK_1(α-COOH)-ի և pK_2(α-NH_2)-ի արժեքները և ալանինի նմուշի իզոէլեկտրիկ կետը (pI):

3. Ամինաթթուների քիմիական հատկությունները

Ամինաթթուների քիմիական հատկություններն առաջին հերթին բնորոշվում են միևնույն ածխածնի ատոմի մոտ գտնվող հիմնային (NH_2) և թթվային (COOH) խմբերի հատկություններով: Կողքային ռադիկալի խմբերը (ալիֆատիկ, արոմատիկ և հետերոցիկլիկ օղակները, SH, OH, լրացուցիչ NH_2 և COOH և այլն) որոշում են ամինաթթուների հատկությունների տարբերությունը և առանձին ամինաթթուներին յուրահատուկ ռեակցիաների իրականացման հնարավորությունը:

NH_2 և COOH խմբերին բնորոշ ռեակցիաները բազմաթիվ են, որոնք ուսանողներին հայտնի են «Օրգանական քիմիա» դասընթացից, ուստի այս բաժնում կներկայացվեն միայն որոշ ռեակցիաներ:

3.1. Տիտրում ըստ կարբոքսիլային խմբի (ֆորմոլային տիտրում)

Ամինաթթուների ֆորմոլային տիտրումը ջրում համարվում է մեծ ճշտության մեթոդ: Դրա համար ամինաթթուն հիմնային միջավայրում նախօրոք մշակում են ֆորմալինով: Արդյունքում առաջանում է ածանցյալ, որի NH_2 խմբի հիմնայնությունը թուլացված է (Սխեմա 6), ինչը հնարավորություն է տալիս կարբոքսիլային խումբը տիտրել հիմքով պոտենցոմետրիկ եղանակով կամ pH 9 արժեքին մոտ գույնի փոփոխման մարզով ինդիկատորի ներկայությամբ (Սխեմա 6):

Սխեմա 6

Ֆորմոլային տիտրումը կիրառվում է ազատ ամինաթթուների հայտնաբերման, դրանց խառնուրդների հետազոտման, ինչպես նաև սպիտակուցային հիդրոլիզատներից ամինաթթուների անջատման գործընթացներին հետևելու համար:

Փորձ № 5

Փորձանոթի մեջ լցնում են 10 կաթիլ գլիցինի 1 %-ոց ջրային լուծույթ և ավելացնում մի քանի կաթիլ մեթիլեն կարմիր ինդիկատոր: Լուծույթը ստանում է դեղին գունավորում: Ավելացնում են 5 կաթիլ ֆորմալդեհիդի 36 %-ոց լուծույթ և թափահարում: Ֆորմալդեհիդը կապվում է ամինային խմբերի հետ և լուծույթը ստանում է կարմիր գունավորում, որը խոսում է լուծույթի թթվային բնույթի մասին: Այնուհետև կաթիլներով ավելացնում են 0.4%-ոց NaOH լուծույթ, այնքան ժամանակ մինչև կարբոքսիլային խմբերը ամբողջովին կապվեն և լուծույթը կրկին ստանա դեղին գունավորում:

3.2. Ազոտային թթվի հետ ռեակցիան

Առաջնային ամինային խումբ պարունակող ամինաթթուները, փոխազդելով ազոտային թթվի հետ, վեր են ածվում համապատասխան օքսիթթուների (Սխեմա 7): Ազոտային թթվի փոխարեն սովորաբար ավելացնում են $NaNO_2$ աղաթթվի միջավայրում:

Սխեմա 7

Ամինաթթուների դեզամինացման ռեակցիան կիրառություն է գտել մանրէաբանական սինթեզի արդյունքում առաջացած ամինաթթվային խառնուրդներից L-պրոլինի անջատման տեխնոլոգիայում:

Փորձ № 6

Փորձանոթի մեջ լցնում են 5 կաթիլ գլիցինի 1 %-ոց ջրային լուծույթ, ավելացնում են նատրիումի նիտրիտի լուծույթ, ավելացնում են 2 կաթիլ խիտ աղաթթու և զգույշ թափահարում: Նկատվում է գազային ազոտի պղպջակների անջատում:

3.3. Մետաղակոմպլեքսների առաջացում

Գրեթե բոլոր ամինաթթուները երկվալենտ մետաղների իոնների հետ առաջացնում են կոմպլեքսային միացություններ (Սխեմա 8): Կոմպլեքսների կայունությունը աճում է մետաղի իոնների հետևյալ շարքով.

$$Mg^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Cd^{2+} < Co^{2+} < Zn^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+}$$

Այդ կոմպլեքսների ջրային լուծույթները՝ ի տարբերություն մետաղների այլ աղերի ջրային լուծույթների, օժտված են ցածր էլեկտրահաղորդականությամբ:

Սխեմա 8

Պղնձի ամինաթթվային կոմպլեքսներն օգտագործում են անալիտիկական նպատակներով: Դրա համար ամինաթթուն և պղնձի աղը լուծում են թույլ հիմնային լուծույթներում և յոդոմետրիկ կամ կալորիոմետրիկ եղանակով որոշում են պղնձի իոնը:

Փորձ № 7

Փորձանոթի մեջ լցնում են 20 կաթիլ գլիցինի 1 %-ոց լուծույթ, ավելացնում են 0.1 գ պղնձի (II) կարբոնատ և տաքացնում: Լուծույթը ստանում է կապույտ գունավորում: Ավելացնում են 2 կաթիլ NaOH: Նստվածք չի առաջանում, որը խոսում է խելատային կոմպլեքսի առաջացման մասին, որտեղ պղնձի ատոմը միացած է ոչ միայն թթվածնի ատոմի հետ, այլ նաև ամինո խմբի ազոտի հետ:

4. Ամինաթթուների օպտիկական հատկությունները

Ամինաթթուները հիմնականում հանդիսանում են քիրալային միացություններ՝ շնորհիվ դրանց կառուցվածքում ասիմետրիկ ածխածնի ատոմի առկայության: Սակայն քիրալությունը ոչ բոլոր դեպքերում է պայմանավորված մոլեկուլում ասիմետրիկ ատոմի առկայությամբ: Ընդհանուր առմամբ քիրալային են կոչվում այն միացությունները, որոնք չունեն սիմետրիայի հարթություն, և հետևաբար, անհամադրելի են իրենց հայելային արտապատկերման հետ: «Քիրալություն» ասելով հասկացվում են երկու առարկաներ, որոնցից մեկը մյուսի նկատմամբ գտնվում են այնպես, ինչպես օրինակ՝ ձախ և աջ ձեռքերը:

Ամինաթթուների կոնֆիգուրացիան որոշվում է մոլեկուլում քիրալային ածխածնի ատոմի շուրջը տեղակալիչների տարածական բաշխմամբ և արտահայտվում է L,D կամ (*S,R*) սիմվոլներով:

(*S*)-Ալանին

L -Ալանին

(*R*)-Ալանին

D -Ալանին

Օպտիկական ստերեոիզոմերների թիվը որոշվում է 2^n բանաձևով, որտեղ n-ը տվյալ մոլեկուլում քիրալային ածխածնի ատոմների թիվն է: Կախված n-ի արժեքից, ամինաթթվի օպտիկական իզոմերները կարող են լինել էնանտիոմերներ (n=1) կամ դիաստերեոմերներ (n=2):

Բնական սպիտակուցների հիդրոլիզատից անջատված բոլոր ամինաթթուները պատկանում են L շարքին:

Որոշ սպիտակուցային ամինաթթուներ (թրեոնին, իզոլեյցին), ինչպես նաև բազմաթիվ ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ (հիդրոքսիլեյցին, իզովալին, դիամինոգլուտարաթթու և այլն) իրենց կառուցվածքում պարունակում են երկու և ավելի քիրալային ածխածնի ատոմներ: Երկու ասիմետրիկ ածխածնի ատոմ պարունակող ամինաթթուները կոչվում են դիաստերեոտոպ ամինաթթուներ:

Քիրալային միացության լուծույթով բևեռացված լույսի ճառագայթները անցկացնելիս՝ կախված մոլեկուլի տարածական կառուցվածքից, լույսի բևեռացման հարթությունը շեղվում է իր ելային դիրքից աջ (ժամացույցի սլաքի ուղղությամբ) կամ ձախ (հակառակ ուղղությամբ): Այստեղից եզրակացություն է արվել, որ քիրալային մոլեկուլները գտնվում են օպտիկապես ակտիվ իզոմերների ձևով:

4.1. Գրականության մեջ հայտնի նմուշների բացարձակ կոնֆիգուրացիայի և օպտիկական մաքրության որոշում

Հայտնի կոնֆիգուրացիայով ամինաթթուների սինթեզված նմուշների բացարձակ կոնֆիգուրացիան և օպտիկական մաքրության աստիճանը կարելի է որոշել պոլյարիմետրիկ չափումների միջոցով:

Տեսակարար պտույտի արժեքը որոշվում է հետևյալ բանաձևով.

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\alpha_{\text{չափված}} \cdot 100\%}{c \cdot l},$$

որտեղ՝

$[\alpha]_D^{25}$՝ տեսակարար օպտիկական պտույտի արժեքը,

$\alpha_{\text{չափված}}$՝ պոլյարիմետր սարքի միջոցով չափված պտույտի արժեքը,

c՝ լուծույթի կոնցենտրացիան, գ/100 մլ լուծիչում,

l՝ սարքի կյուվետի հաստությունը, դմ:

Գրականության մեջ հայտնի նյութի նմուշի տեսակարար պտույտի արժեքը որոշելուց հետո, այն համեմատվում է գրականական տվյալների հետ: Ընդ որում չափման պայմանները՝ կոնցենտրացիան, լուծիչը և ջերմաստիճանը պետք է համապատասխանեն գրականական տվյալներում բերված չափման պայմանների հետ: Հակառակ դեպքում չափման արդյունքում արձանագրված տվյալ-

ները չեն արտացոլի հետազոտվող նյութի օպտիկական պտույտի իրական արժեքը, քանի որ չափման պայմանները որոշիչ ազդեցություն են գործում պտույտի արժեքի վրա:

Չափումը կատարելուց առաջ նախ անհրաժեշտ է օգտագործվող մաքուր լուծիչի միջոցով սարքի օպտիկական պտույտի արժեքը բերել զրոյական դիրքի, իսկ այնուհետև չափել հետազոտվող լուծույթի նմուշի պտտման արժեքը 589 նմ ալիքի երկարության տակ: Չափման ժամանակ կյուվետում լցված լուծույթը չպետք է պարունակի օդի պղպջակներ: Պտույտի արժեքը չափելուց հետո ($\alpha_{\text{չափված}}$) վերը նշված բանաձևով որոշվում է տեսակարար օպտիկական պտույտի արժեքը:

Փորձ № 8
Պրոլինի բացարձակ կոնֆիգուրացիայի և օպտիկական մաքրության որոշում

L-պրոլինի տեսակարար օպտիկական պտույտի գրականական արժեքն է $[\alpha]_D^{20}$= -84^{0}C (C=4, H_2O), իսկ D-պրոլինի դեպքում՝ $[\alpha]_D^{20}$= +85^{0}C (C=4, H_2O):

Վերցվում է 1գ L-պրոլին (կամ D-պրոլին), լուծվում 25 մլ ջրում, այնուհետև կատարվում են L-պրոլինի և D-պրոլինի նմուշների պոլյարիմետրիկ չափումներ: Փորձը կրկնվում է 3 անգամ, հաշվվում է $\alpha_{\text{չափվածի}}$-ի միջին արժեքը, այնուհետև տեղադրելով բանաձևի մեջ՝ ստացվում են տեսակարար օպտիկական պտույտի արժեքները և համեմատվում գրականական տվյալների հետ: Որպեսզի համոզվեն, որ ամինաթթվի ռացեմատ խառնուրդի տեսակարար օպտիկական պտույտի արժեքը զրո է, կատարվում է նաև L,D-պրոլինի տեսակարար օպտիկական պտույտի արժեքի չափում:

5. Ամինաթթուների սինթեզի մեթոդներ

Ամինաթթուներ կարելի է ստանալ սպիտակուցային հիդրոլիզատներից անջատման ճանապարհով, մանրէաբանական, կենսատրանսֆորմացիոն կամ քիմիական սինթեզի եղանակով: Առաջին երեք եղանակով կարելի է ստանալ սպիտակուցային L-ամինաթթուներ, իսկ քիմիական ճանապարհով ստացվում են ամինաթթուների ոչ ակտիվ ռացեմատ խառնուրդներ, որոնց բաժանումը օպտիկական ակտիվ անտիպոդների բավականին աշխատատար, իսկ որոշ դեպքերում՝ անհնարին գործընթաց է: Օպտիկապես մաքուր ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների սինթեզի համար այսօր աշխարհում հաջողությամբ կիրառվում է ասիմետրիկ սինթեզի ուղղությունը, իսկ սպիտակուցային ամինաթթուների համար՝ մանրէաբանական սինթեզի ուղղությունը:

Սպիտակուցային ծագման որոշ ամինաթթուների դեպքում, որոնց համար ստացված չեն ակտիվ շտամ-արտադրիչներ, հաջողությամբ կիրառվում է խառը քիմիաէնզիմատիկ եղանակը:

5.1. Խառը քիմիաէնզիմատիկ սինթեզ

Այս մեթոդը արտադրական կիրառություն է ստացել L-մեթիոնին և L-ֆենիլալանին ամինաթթուների համար:

Մեթոդի հիմքում ընկած է սովորական քիմիական սինթեզի եղանակով ամինաթթվի ռացեմատ խառնուրդի ստացումը և էնզիմատիկ եղանակով դրանց հետագա բաժանումը առանձին էնանտիոմերների: Որպես լավագույն ֆերմենտ, այդ նպատակի համար օգտագործվում են ամինոացիլազներ, որոնք անջատվում են կենդանիների օրգաններից, օրինակ՝ խոզի երիկամներից, կամ էլ ստացվում են կենսասինթետիկ եղանակով: Առաջին դեպքում օգտագործվում է անջատված ֆերմենտ իմոբիլիզացված վիճակում, իսկ երկրորդ դեպքում՝ E.coli գենինժեներային շտամ-արտադրիչի կուլտիվացման արդյունքում առաջացած կենսազանգված: Տեխնոլոգի-

ական առումով ավելի նպատակահարմար է երկրորդ մոտեցումը, որը ապահովում է վերջնական արգասիքի ավելի ցածր ինքնարժեքը:

Քիմիական սինթեզի եղանակով ստացված D,L-մեթիոնինը առաջին հերթին ացիլացվում է քացախաթթվի անհիդրիդով: Արդյունքում առաջացած N-ացետիլ-D, L-մեթիոնինը մշակվում է ամինոացիլազ ֆերմենտով՝ 37°C ջերմաստիճանում: Այդ ընթացքում N-ացետիլ-L-մեթիոնինը ենթարկվում է $NH–COCH_3$ կապի հիդրոլիզի՝ L-մեթիոնինի առաջացմամբ: N-ացետիլ-D-մեթիոնինը չի հիդրոլիզվում, քանի որ այն ֆերմենտի սուբստրատ չէ և հետևաբար՝ չի կարող ենթարկվել ֆերմենտի ազդեցությանը: Առաջացած L-մեթիոնինը առանձնացվում է չռեակցված N-ացետիլ-D-մեթիոնինից, գունազրկվում, աղազրկվում և բյուրեղացվում (Սխեմա 9):

Սխեմա 9

Ky-2x8 H^+ -ը կատիոնափոխանակային խեժն է:

Չհիդրոլիզված N-ացետիլ-D-մեթիոնինից L-մեթիոնինի առանձնացումը կարելի է իրականացնել ինչպես իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով (սորբցիայի և դեսորբցիայի),

այնպես էլ ջուր-օրգանական լուծիչ համակարգերից լուծահանմամբ կամ բյուրեղացմամբ:

Մեթոդի առավելությունը կայանում է նաև նրանում, որ այն միաժամանակ ապահովում է ինչպես L-, այնպես էլ D-մեթիոնինի ստացումը: Դրա համար չհիդրոլիզված N-ացետիլ-D-մեթիոնինն առանձնացվելուց հետո ենթարկվում է թթվային հիդրոլիզի՝ առաջացնելով D-մեթիոնին:

Փորձ № 9
L-մեթիոնինի և D-մեթիոնինի ստացումը խառը քիմիաէնզիմատիկ եղանակով

N-ացետիլ-D, L-մեթիոնինի սինթեզը

Սառնարանով և մեխանիկական խառնիչով մատակարարված եռանցքանի կլորահատակ կոլբայում տեղավորվում է 5 գ (0.032 մոլ) D, L-մեթիոնին, ավելացվում է 8.5 մլ թորած ջուր և խառնվում՝ խառնուրդի ջերմաստիճանը պահպանելով 50^0C: Ստացված կախույթին ավելացվում է 6 մլ (0.0625 մոլ) քացախաթթվի անհիդրիդ: Խառնումը շարունակվում է 2 ժամ՝ ռեակցիոն խառնուրդի ջերմաստիճանը պահպանելով 70^0C:

Ռեակցիայի ընթացքին հետևում են նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով՝ ն-բութանոլ-քացախաթթու-ջուր (3:1:1) համակարգում:

Ռեակցիայի ավարտից հետո (ՆՇՔ թիթեղի վրա մեթիոնինի հետքերի անհետացում) մնացորդային քացախանհիդրիդի և առաջացած քացախաթթվի հեռացման նպատակով ստացված լուծույթը վակուում թորման է ենթարկվում 60^0C ջերմաստիճանում: Ստացված յուղանման խառնուրդին ավելացվում է ռեակցիոն խառնուրդի ծավալից երկու անգամ շատ ջուր և վակուում թորվում մինչև չոր զանգվածի առաջացում:

D, L-մեթիոնինի մնացորդային քանակների հեռացման համար ստացված խառնուրդը լուծվում է թորած ջրում և անցկացվում

КУ-2x8 H^+ ձևի իոնափոխանակային խեժով: N-ացետիլ-D, L-մեթիոնինի լուծույթը օգտագործվում է ֆերմենտային հիդրոլիզի համար:

Ռացեմատ N-ացետիլ մեթիոնինի ֆերմենտային հիդրոլիզը

Ֆերմենտային հիդրոլիզի իրականացման համար 0.3Մ N-ացետիլ-D, L-մեթիոնինին ավելացվում է $CoCl_2$ 0.2 մՄ լուծույթ, չեզոքացվում է 10 Մ NaOH-ի լուծույթով մինչև pH = 6.6-6.8: Այնուհետև ավելացվում են թորած ջուր և ացիլազի կոշտ ֆերմենտային էքստրակտ: Ռեակցիան տարվում է 37^0C ջերմաստիճանում: Ռեակցիայի ընթացքում պարբերաբար ստուգվում է առաջացած L-մեթիոնինի կոնցենտրացիան: Այս պայմաններում ֆերմենտային դեացետիլացման ռեակցիան գործնականում կանգնում է, երբ N-ացետիլ-L-մեթիոնինի հիդրոլիզը հասնում է 98%-ի: Այնուհետև ռեակցիոն միջավայրի pH-ը 2.9-3.0 փոքրացնելու համար ավելացվում է խիտ HCl և L-մեթիոնինի սորբցիայի համար խառնուրդը անցկացվում է H^+ ձևի ԿՈՒ-2x8 իոնափոխանակային խեժով: Ացետիլ-L- և ացետիլ-D- մեթիոնին պարունակող լուծույթը ենթարկվում է կրկնակի ֆերմենտային հիդրոլիզի: Ստացված լուծույթը կրկին անցկացվում է ֆերմենտային հիդրոլիզի առաջին փուլում L-մեթիոնինի սորբցիայի համար օգտագործված իոնափոխանակային աշտարակով: L-մեթիոնինից ազատ N-ացետիլ-D-մեթիոնինի լուծույթը ենթարկվում է քիմիական հիդրոլիզի:

N-ացետիլ-D-մեթիոնինի քիմիական հիդրոլիզը

N-ացետիլ-D-մեթիոնինի հիդրոլիզը իրականացնում են 6 Մ HCl-ում եռացմամբ 1-2 ժամվա ընթացքում: Աղաթթվի հեռացման համար հիդրոլիզից հետո խառնուրդը թորում են, ստացված զանգվածին երեք անգամ ավելացնում են 20-30 մլ թորած ջուր և վակուում թորում 60^0C ջերմաստիճանում:

5.2. Ամինաթթուների ասիմետրիկ սինթեզ

Ասիմետրիկ է կոչվում այն սինթեզը, որի ընթացքում էնանտիոմերներից կամ դիաստերեոմերներից որևէ մեկն առաջանում է ավելցուկով: Ասիմետրիկ սինթեզը կարող է լինել էնզիմատիկ կամ քիմի-

ական: Իզոմերներից որևէ մեկի նույնիսկ 1% ավելցուկի դեպքում սինթեզը համարվում է ասիմետրիկ, օրինակ, L/D=51/49 (%):

Ասիմետրիկ սինթեզը բնութագրվում է ասիմետրիկ ելքով, որն այլ կերպ կոչվում է հիմնական ստերեոիզոմերի էնանտիոմերային (ee) կամ դիաստերեոմերային (de) ավելցուկ: Օրինակ, L-էնանտիոմերի ասիմետրիկ սինթեզի ժամանակ ասիմետրիկ ելքը որոշվում է հետևյալ բանաձևով՝

$$ee\ (\%) = \frac{[L] - [D]}{[L] + [D]} \times 100,$$

որտեղ

[L]-ը՝ L-էնանտիոմերի կոնցենտրացիան է

[D]-ն՝ D-էնանտիոմերի կոնցենտրացիան

Կախված օգտագործվող քիրալային ինդուկտորի քանակությունից, ասիմետրիկ սինթեզը կարող է լինել ստեխիոմետրիկ կամ կատալիտիկ: Ստեխիոմետրիկ ասիմետրիկ սինթեզի ռեակցիաներում քիրալային ագենտը օգտագործվում է սուբստրատին ստեխիոմետրիկ (1:1) քանակությամբ, իսկ կատալիտիկ ասիմետրիկ սինթեզի պրոցեսներում՝ կատալիտիկ քանակությամբ (սուբստրատի մոլային քանակության 1/100-1000 քանակով): Չնայած այն հանգամանքին, որ տնտեսավարության տեսակետից առավել հեռանկարային է համարվում կատալիտիկ ասիմետրիկ սինթեզի ուղղությունը, այսօր ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների փոքրածավալ պրեպարատիվ արտադրության պրակտիկայում կիրառություն են գտել ստեխիոմետրիկ ասիմետրիկ սինթեզի մեթոդները՝ ռեգեներացվող քիրալային օժանդակ ռեագենտների կիրառմամբ:

Ստեխիոմետրիկ ասիմետրիկ սինթեզի հետաքրքիր տարբերակ է համարվում կենսամիմետիկ ասիմետրիկ սինթեզի ուղղությունը, ինչը նախատեսում է պիրիդոքսալֆոսֆատ (ՊՖ) կախյալ ֆերմենտների պարզ մոդելային համակարգերի ստեղծումը և դրանց միջոցով ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների ասիմետրիկ սինթեզի իրականացումը:

Օրգանիզմում ֆերմենտների ազդեցությամբ տեղի է ունենում L-ամինաթթուների ասիմետրիկ սինթեզ 100% ասիմետրիկ ելքով:

Դեռևս 20-րդ դարի 80-ական թվականներին Բելոկոնի և աշխատակիցների կողմից սինթեզվել է (*S*)-2-N-(N'-բենզիլպրոլիլ) ամինոբենզոֆենոն (*S*)-BPB քիրալային օժանդակ ռեագենտը և նրա ու ամինաթթուների Շիֆի հիմքերի հետ Ni^{II} իոնի առաջացրած հարթ քառակուսային կոմպլեքսները՝ Ni^{II}-(S)- BPB-(*S*)-AA (նկար 8):

Ni^{II}-(*S*)-BPB-(*S*)-AA

Նկ. 8. BPB քիրալային օժանդակ ռեագենտի ամինաթթվային կոմպլեքսի կառուցվածքը

Այս կոմպլեքսները գործում են ՊՖ ֆերմենտների ազդեցության սկզբունքներով և ապահովում են 90%-ից բարձր ասիմետրիկ ելք: Կոմպլեքսներն ունեն կարմիր գույն, որը հնարավորություն է տալիս ռեակցիայի ընթացքին հետևել ՆՇՔ մեթոդով՝ առանց լրացուցիչ երևակման: Կոմպլեքսները ջրում անլուծելի են, բայց լավ լուծվում են օրգանական լուծիչներում, ինչի շնորհիվ էլ հեշտությամբ անջատվում են ռեակցիոն միջավայրից: Այս կոմպլեքսների կարևոր առանձնահատկություններից մեկն էլ այն է, որ ռեակցիայի վերջնական փուլում քիրալային օժանդակ ռեագենտը քանակապես վերականգնվում է, ինչը հնարավորություն է տալիս այն օգտագործել բազմակի անգամ՝ առանց լրացուցիչ մաքրման:

Փորձ № 10
Ni^{II}-(*S*)-BPB-Gly և Ni^{II}-(*S*)-BPB-(*S*)-Ala կոմպլեքսների սինթեզը

Սառնարանով և մեխանիկական խառնիչով մատակարարված եռանցքանի կլորահատակ կոլբայում տեղավորվում է 1 գ (0.0026 մոլ) (*S*)-2-N-(N′-բենզիլպրոլիլ)-ամինաբենզոֆենոնի, 1.51 գ (0.0052 մոլ) $Ni(NO_3)_2$ x $6H_2O$ և 0.98գ (0.013 մոլ) գլիցինի [կամ 1.16 գ (0.013 մոլ) ալանինի] խառնուրդը լուծված 9.5 մլ մեթանոլում:

Ռեակցիոն խառնուրդը խառնվում է 50^0C-ում մինչև այն դառնա վառ կանաչ գույնի: Խառնման պայմաններում ավելացվում է KOH-ի մեթանոլային լուծույթ (1.31 գ KOH լուծված 4 մլ մեթանոլում) և խառնումը շարունակվում է ևս 2 ժամ (3 ժամ ալանինի դեպքում) 60-65^0C-ում (Սխեմա 10):

Ռեակցիայի ավարտից հետո ռեակցիոն խառնուրդին սենյակային ջերմաստիճանում ավելացվում է 1.3 մլ քացախաթթու մինչև չեզոք ռեակցիա:

Այնուհետև ռեակցիոն խառնուրդը խառնման պայմաններում լցվում է 32 մլ սառը ջրի մեջ և շարունակվում խառնել ևս 1 ժամ: Հաջորդ օրը առաջացած բյուրեղները ենթարկվում են վակուում ֆիլտրման և չորացվում:

Սխեմա 10

Փորձ № 11
(*S*)-ալիլգլիցինի ասիմետրիկ սինթեզը

Ni^{II}-(S)-BPB-Gly կոմպլեքսի ալկիլումը ալիլբրոմիդով

5-10^{0}C սառեցման պայմաններում եռանցքանի կլորահատակ կոլբայում 10 մլ դիմեթիլֆորմամիդում լուծված 10 գ (0.02մոլ) Ni^{II}-(*S*)-BPB-Gly կոմպլեքսին ավելացվում է 1.74 մլ ալիլբրոմիդ, այնուհետև ավելացվում է լավ մանրացված 2.8 գ (0.07 մոլ) NaOH: Ռեակցիոն խառնուրդը խառնվում է 30 րոպե 10-15^{0}C ջերմաստիճանում (Սխեմա 11):

Ռեակցիայի ընթացքին հետևում են նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով՝ քլորոֆորմ:էթիլացետատ (1:3) համակարգում:

Ռեակցիայի ավարտից հետո ռեակցիոն խառնուրդին ավելացվում է 5 մլ քացախաթթու մինչև չեզոք ռեակցիա: Այնուհետև ավելացվում է մեթանոլ-ջուր 1:1 հարաբերությամբ խառնուրդ և խառնվում ևս 5-10 րոպե: Առաջացած բյուրեղները ենթարկվում են վակուում ֆիլտրման և չորացվում:

Սխեմա 11

Ni^{II}-(S)-BPB-(S)-allylGly կոմպլեքսի քայքայումը և (S)-ալիլգլիցինի ստացումը

Ni^{II}-(*S*)-BPB-(*S*)-allylGly կոմպլեքսի քայքայման ու (*S*)-ալիլգլիցինի ստացման համար կոմպլեքսի չոր մնացորդը լուծվում է

CH_3OH-ում և խառնման պայմաններում դանդաղ ավելացվում մինչև 50°C տաքացված 2N HCl-ի ջրային լուծույթին: Կոմպլեքսին բնորոշ կարմիր գույնի անհետացումից հետո լուծույթը ենթարկվում է վակուում գոլորշիացման: Չոր մնացորդին ավելացվում է թորած ջուր և ֆիլտրվում ելային քիրալային ռեագենտը ((*S*)-2-N-(N′-բենզիլպրոլիլ)-ամինաբենզոֆենոնը): Քիրալային ռեագենտի հետքերի լրիվ հեռացման համար, ջրային ֆիլտրատը լրացուցիչ ենթարկվում է քլորոֆորմով էքստրակցման: Ստացված ջրային լուծույթից (*S*)-ալիլգլիցինը անջատվում է այն անցկացնելով H^+ ձևի Ky-2x8 կատիոնափոխանակային խեժով լցված աշտարակով, որպես էլյուենտ օգտագործելով 5% NH_4OH լուծույթը: Այնուհետև ամոնիակային էլյուատը վակուում գոլորշիացվում է մինչև չոր զանգված և վերաբյուրեղացվում C_2H_5OH/H_2O=1/1 լուծիչների համակարգից (Սխեմա 12):

Սխեմա 12

Օգտագործված գրականության ցանկ

1. Ա. Ս. Սաղյան, «Ամինաթթուների, պեպտիդների և սպիտակուցների քիմիա», ԵՊՀ հրատարակչություն, 2010, Երևան:
2. G. C. Barrett, «Chemistry and biochemistry of amino acids», Chapman and Hall, 1984, London.
3. Х. Д. Якубке, «Аминокислоты, пептиды, белки», 1985, Москва.
4. В. В. Племенков, «Введение в химию природных соединений», 2001, Казань.
5. Е. П. Артемьева, «Аминокислоты и белки», 2006, Екатеринбург.
6. В. А. Смирнов, Ю. Н. Климочкин, «Аминокислоты и полипептиды», часть 1, 2014, Самара.
7. Н. Н. Иванова, Ю. Н. Фирсова, Г. М. Селедцова, «Малый лабораторный практикум по органической химии», часть II, 2010, Москва.
8. Н. А. Преображенский, Р. П. Естигнеев, «Химия биологических активных природных соединений», 1984, Москва.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

1. Ամինաթթուների անալիզի մեթոդները 3
2. Ամինաթթուների ֆիզիկաքիմիական հատկությունները 12
3. Ամինաթթուների քիմիական հատկությունները 19
3.1. Տիտրում ըստ կարբոքսիլային խմբի (ֆորմոլային տիտրում) 19
3.2. Ազոտային թթվի հետ ռեակցիան 20
3.3. Մետաղակոմպլեքսների առաջացում 21
4. Ամինաթթուների օպտիկական հատկությունները 22
4.1. Գրականության մեջ հայտնի նմուշների բացարձակ կոնֆիգուրացիայի և օպտիկական մաքրության որոշում 24
5. Ամինաթթուների սինթեզի մեթոդներ 26
5.1. Խառը քիմիաէնզիմատիկ սինթեզ 26
5.2. Ամինաթթուների ասիմետրիկ սինթեզ 29
Օգտագործված գրականության ցանկ 35

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՖԻԶԻԿԱՔԻՄԻԱԿԱՆ ԵՎ ՕՊՏԻԿԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ, ՍՏԱՑՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿՆԵՐԸ

Լաբորատոր աշխատանքների ձեռնարկ
«Կենսօրգանական քիմիա»
առարկայից

Համակարգչային ձևավորումը՝ Կ. Չալաբյանի
Կազմի ձևավորումը՝ Ա. Պատվականյանի
Հրատ. սրբագրումը՝ Վ. Դերձյանի

Տպագրված է Time to Print օպերատիվ տպագրությունների սրահում:
ք. Երևան, Խանջյան 15/55

Ստորագրված է տպագրության՝ 27.06.2018:
Չափսը՝ 60x84 $^{1}/_{16}$: Տպ. մամուլը՝ 2.5:
Տպաքանակը՝ 100:

ԵՊՀ հրատարակչություն
ք. Երևան, 0025, Ալեք Մանուկյան 1
www.publishing.am

ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆ 2018
publishing.ysu.am