

УДК 547.541.2

DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2023.2.11

## ПРИМЕНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛАНИНА

© Э. И. Сулейманова

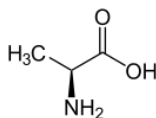
*Азербайджанский государственный университет нефти и промышленности  
Азербайджан, AZ1010 г. Баку, пр. Азадлыг, 20.*

*Email: suleymanova1944@mail.ru*

*Аланин представляет собой одну из двадцати протеиногенных (входящих в состав белков всех живых организмов) аминокислот. Биологическое значение имеет оптический изомер (энантиомер) L-аланин. Аланин входит также в состав ряда биологически активных соединений. Является заменимой аминокислотой (человеческий организм способен ее синтезировать). В лаборатории его синтезируют из пропионовой кислоты через  $\alpha$ -хлорпропионовую кислоту. Температура плавления аланина составляет 295–316 °С. Аланин (2-аминопропановая кислота) синтезируется в мышцах из молочной кислоты, а также поступает из продуктов питания. В печени аминокислота превращается в глюкозу, является важным компонентом процесса ее производства и преобразования в энергию, регулирует уровень сахара в крови. В медицине часто используется в качестве средства предотвращения гипогликемии. В человеческом организме существуют две форма аланина: альфа-аланин и бета-аланин. Из альфа-формы строятся протеины, а бета-форма входит в состав пантотеновой кислоты и различных биологически активных соединений. Организмом аланин также используется как строительный материал для карнозина. Карнозин поддерживает кислотно-щелочной баланс, предотвращает быстрое старение и повышает выносливость.*

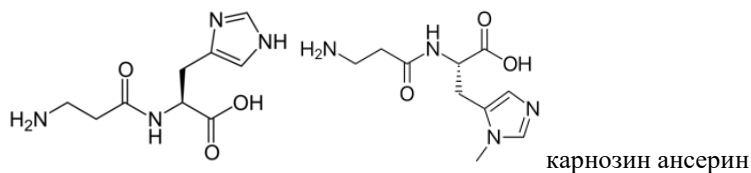
**Ключевые слова:** аминокислоты, аланин,  $\beta$ -аланин, хиральный аланин, спектрофотометрия, инфракрасная спектроскопия, длина волны.

Аланин представляет собой 2-аминопропановую кислоту и относится к ряду алифатических аминокислот.

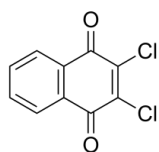


$\alpha$ -Аланин входит в состав многих белков,  $\beta$ -аланин – в состав ряда биологически активных соединений. Аланин легко превращается в печени в глюкозу. Этот процесс носит название глюкозо-аланинового цикла и является одним из основных путей глюконеогенеза в печени.

$\beta$ -Аланин (3-аминопропионовая кислота) является природной бета аминокислотой, в которой аминогруппа находится в  $\beta$ -положении. В отличие от своего стерического аналога –  $\alpha$ -аланина,  $\beta$ -аланин не имеет хирального центра.  $\beta$ -аланин не включается в синтез крупных белков и ферментов. В организме он образуется в результате деградации дигидроурацила и карнозина. Входит в состав естественных белков карнозина и ансерина, а также является частью пантотеновой кислоты (витамин В5), которая входит в состав кофермента А.



Учитывая высокую биологическую роль аланина, очень важно применение эффективных аналитических методов определения аланина. В продолжение исследований в области определения белковых молекул [1–3], в этой работе нами рассмотрены основные методы определения аланина, используемые в аналитической химии в настоящее время. Так, в работе [4] разработан простой и чувствительный колориметрический метод для определения аминокислот глицина, аланина и изолейцина. Аминокислоты дериватизировали дихлоном в присутствии бикарбоната натрия. Аминокислоты показали максимальное поглощение при 470 нм. Метод был валидирован с точки зрения линейности (5–25 мкг/мл для глицина, аланина и изолейцина), прецизионности (колебания в течение дня 0.13–0.78, 0.22–1.29, 0.58–2.52% и колебания между днями 0.52–2.49. 0.43–3.12, 0.58–4.48% для глицина, аланина и изолейцина соответственно), точности (91.43–98.86, 96.26–105.99 и 95.73–104.82 для глицина, аланина и изолейцина соответственно), предела обнаружения (0.6, 1 и 1 мкг/мл для глицина, аланина и изолейцина соответственно) и предела количественного определения (5 мкг/мл для глицина, аланина и изолейцина). Метод оказался простым и чувствительным.



дихлон – аналитический реагент

Сообщается [5], что ближний инфракрасный диапазон – это область комбинированных полос и обертонов, обусловленных межатомными силами взаимодействия. Атомы водорода, будучи самыми легкими, колеблются в ближней ИК-области из-за групп NH, O-H и CH. Это обычные группы атомы, присутствующие в большинстве пищевых продуктов. Поскольку длины волн ближнего ИК-диапазона специфичны, можно идентифицировать отдельные компоненты, чтобы их можно было использовать для количественного анализа фосфатов, силикатов и аминокислот в тростниковом соке. Аланин и глицин обычно встречаются в сахарном тростнике. В настоящем исследовании проводится онлайн-оценка аланина и глицина в тростниковом соке с использованием спектроскопии ближнего ИК-диапазона. Спектрофотометр ближнего ИК-диапазона Elico (Индия) с диапазоном (600–2 500 нм) использовался в режиме пропускания в сочетании с двумя многомерными процедурами калибровки, т.е. анализом частичной регрессии методом наименьших квадратов (PLSR) и пошаговым многомерным линейным регрессионным анализом (SMLR) для определения аланина и глицина в тростниковом соке.

Авторы работы [6] применили комбинацию методов тонкослойной хроматографии и ИК-спектроскопии (ТСХ/FTIR) в сочетании с методом картирования для анализа смеси аланин/аргинин. Для разделения аланина и аргинина использовали пластины узкополосной ТСХ, приготовленные с использованием AgI в качестве стационарной фазы. Распределение аланиновых и аргининовых пятен проявлялось на 3D хроматограмме. Аланин и аргинин могут быть успешно разделены на пластине узкополосной ТСХ. Кроме того, спектры FTIR разделенных пятен аланина и аргинина на пластинке узкополосной ТСХ примерно такие же, как соответствующие эталонные ИК-спектры.

Разработан новый спектрофотометрический метод количественного определения  $\beta$ -аланина в фармацевтических препаратах [7]. Этот метод основан на измерении поглощения водных растворов  $\beta$ -аланина при 470 нм. Аналитический метод был оптимизирован и проверен путем установления линейности (коэффициент корреляции  $r = 1,000$ ), прецизионности ( $RSD\% = 0,806$ ,  $n = 9$ ) и точности (100.8%). По экспериментальным данным методика корректно воспроизводится и пригодна для использования в лабораториях госинспекции контроля качества лекарственных средств и ОТК химико-фармацевтических предприятий.

Сообщается о разработке нового количественного метода определения аминокислот с использованием рамановской спектроскопии [8]. Были измерены спектры комбинационного рассеяния глицина, аланина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, фенилаланина и триптофана. Соотношение полос между интенсивностью комбинационного рассеяния аминокислоты и ацетонитрила в качестве внешнего стандарта рассчитывали, чтобы исключить влияние таких факторов, как интенсивность лазерной мощности и инструментальные эффекты. Калибровочные кривые были получены путем построения соотношений полос в зависимости от концентраций аминокислот. Кривые были линейными с коэффициентами корреляции более 0.99 для всех аминокислот. Для подтверждения воспроизводимости этого метода были измерены спектры комбинационного рассеяния образцов с известной концентрацией. Относительные ошибки были небольшими, что указывало на то, что концентрации аминокислот можно определить с помощью рамановской спектроскопии.

УФ-видимая-коротковолновая ближняя ИК-спектроскопия диффузного отражения (UV-vis-SWNIR DRS) в сочетании с хемометрикой впервые исследуется для различения энантиомеров и их рацемических соединений с использованием D-, L- и DL-аланина в качестве модельных соединений. После оптимизации условий измерения размеров частиц порошка и расстояния между волоконным зондом и образцом были построены дискриминантные модели методом наименьших квадратов (PLS-DA) с помощью UV-vis-SWNIR DRS для проведения качественного анализа хиральности аланина. В результате при оптимизированных условиях размера частиц, просеянных через 100 сит и расстояние 5.3 мм, была получена отличная дискриминация хиральности с точностью 100%, что лучше, чем у производителей с точностью 86.67%. Результаты этого исследования показывают, что метод UV-vis-SWNIR DRS в сочетании с хемометрикой может быть быстрым, простым и неинвазивным методом хирального анализа [9].

Разработан новый метод получения комплексов конденсации аминокислот (аланина и фенилаланина) с 8-гидроксихинальдином в различных экспериментальных условиях [10]. Полученные таким образом продукты исследуются для идентификации и количественного анализа с использованием различных спектроскопических методов, включая флуоресцентную активность синтезированных продуктов. В современных исследованиях идентификация аминокислот в наномольных количествах стала возможной по флуорометрической активности комплекса аминокислот-хинальдин с использованием различных длин волн возбуждения и испускания. При этом флуорометрическая активность комплексов в 10–100 раз более чувствительна, чем метод анализа с участием нингидрина. 2-Метил-8-гидроксихинолин (8-гидроксихинальдин) при конденсации с аланином и фенилаланином образовывал флуоресцентные комплексы. Комплексы отдельно были исследованы для идентификации и количественной оценки аминокислот. Использование 8-гидроксихинальдина для различных целей и его сравнение с

8-гидроксихинолином аналогичного назначения свидетельствуют об уменьшении флуоресцентного сигнала комплексов 8-гидроксихинальдин-аминокислота.

Спектры поглощения поликристаллов L-, D- и DL-аланина были измерены с помощью терагерцевой спектроскопии во временной области (THz-TDS) в диапазоне частот 10–90 см<sup>-1</sup> при комнатной температуре [11]. Авторы работы наблюдали несколько полос поглощения, которые имеют большую разницу между энантиомерами L- и D-аланина) и рацемическим соединением (DL-аланин) по их пиковым частотам. Это очевидное различие показывает, что полосы поглощения ТГц поразительно чувствительны к кристаллическим структурам. Этот результат указывает на то, что THz-TDS можно использовать для различения энантиомеров и рацемического соединения.

Колебательный спектр аминокислоты аланина определен расчетным путем в инфракрасном диапазоне 1 000–2 000 см<sup>-1</sup> в различных средах, охватывающих газовую, гидратированную и кристаллическую фазы, с помощью траекторий классической молекулярной динамики, выполненных с поляризуемым силовым полем оптимизированной энергетики атомных мультиполей для биомолекулярного моделирования [12]. Был проведен анализ эффективных мод, при котором спектры оптимально разлагаются на различные полосы поглощения, возникающие из-за четко определенных внутренних мод. В газовой фазе такой анализ позволяет выявить существенные различия между спектрами, полученными для нейтральной и цвиттер-ионной форм аланина. В конденсированных фазах метод дает бесценную информацию о молекулярном происхождении колебательных полос и дополнительно показывает, что пики с похожими положениями могут быть отнесены к довольно разным молекулярным движениям.

Отмечается [13], что энантиомерные аминокислоты выполняют определенные физиологические функции в сложных биологических системах. Однако систематические исследования, посвященные свойствам d-аминокислот в твердом состоянии, все еще ограничены. Чтобы пролить свет на эту область, были проведены структурные и спектроскопические исследования d-аланина с использованием дифракции нейтронов на порошке, поляризованного комбинационного рассеяния и неэмпирических расчетов частот гармонических колебаний. Наблюдаются четкие изменения числа колебательных мод в зависимости от температуры, что может быть напрямую связано с вариациями длин связей атомов. Эти результаты показывают различия в структурных свойствах d-аланина по сравнению с l-аланином.

Аминокислота β-метиламиноаланин (ВММА) вырабатывается цианобактериями и связана с развитием нейродегенеративных заболеваний [14]. Авторами разработан метод количественного анализа ВММА в биологических образцах и растительных экстрактах. Метод использует 50 мкл образца и имеет предел количественного определения 300 нг/мл, погрешность внутри цикла менее 1%. Используя этот метод, авторы проанализировали образцы сыворотки человека, образцы спинномозговой жидкости человека и экстракт семян саговника. В образцах крови человека ВММА обнаружить не удалось. Содержание ВМАА в семенах составило 50 мг/кг.

Инфракрасные спектры высокого разрешения β-аланина и его водных кластеров были изучены с использованием матричной ИК-Фурье-спектроскопии твердого пара Н<sub>2</sub>. Известно, что цвиттерионные формы аминокислот более устойчивы, чем нейтральные формы в водных растворах и биологических средах, однако до сих пор ведутся споры о том, стабильны ли цвиттер-ионы в небольших кластерах аланин-вода [15]. Авторы исследовали стабилизирующий эффект молекул воды на цвиттер-ионную форму β-аланина путем совместного осаждения Н<sub>2</sub>О и β-аланина в твердом паре Н<sub>2</sub>. Путем сравнения с теоретическими расчетами, а также со спектрами FT-IR кристаллического β-аланина была определена характерная частота деформационных колебаний NH<sub>3</sub>NH для цвиттер-ионной формы. Анализ временного поведения спектрального пика показывает, что другие предполагаемые пики цвиттерионов ведут себя аналогично характерному спектральному пику NH<sub>3</sub>. Было показано, что вода может стабилизировать цвиттер-ионную форму аминокислот газовой фазы, заставляя цвиттер-ион образовываться предпочтительно по сравнению с нейтральной формой при определенных условиях. Скорость образования цвиттер-иона β-аланина может быть связана с агрегацией небольших кластеров воды в твердой матрице пара-Н<sub>2</sub>. Эти данные дают представление о поведении образования цвиттер-ионов аминокислот.

Приведены результаты ИК- и рентгеноструктурного исследования динамики молекулярных групп и структурных изменений L-аланина и DL-аланина (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-CH(CH<sub>3</sub>)-COO<sup>-</sup>) при изменении температуры. Анализ изменений в диапазоне частот 4 000–600 см<sup>-1</sup> ИК-спектров при изменении температуры показывает наличие аномалии для полосы ~974 см<sup>-1</sup> в DL-аланине, аналогичной аномалии для полосы 955 см<sup>-1</sup>, ранее описанной для L-аланина. Данные рентгеноструктурного анализа для L- и DL-аланина показывают, что при изменении температуры не происходит резких изменений параметров элементарной ячейки, конформаций самих молекул аминокислот и длин водородных связей, которые свидетельствовали бы о структурном фазовом переходе [16].

Сообщается [17] о совместном экспериментальном и теоретическом исследовании N-(аланин)-n-стиролсульфонамида (АСС). Новое соединение было впервые синтезировано реакцией n-стиролсульфонилхлорида и (S)-аланина в мягких условиях. Структура аддукта был подтверждена с использованием спектров FT-IR и <sup>1</sup>H-NMR. Методом DFT исследованы спектры ИК и ЯМР <sup>1</sup>H, МЭП и ВЗМО–НСМО анализа. Значения химического сдвига Н-ЯМР сравнивали с экспериментальными данными. Распределение потенциальной энергии (PED) нормальных

мод по соответствующим внутренним координатам рассчитано для АСЭ с помощью программы BALGA и сопоставлено с теоретическими и экспериментальными значениями. АСС исследуют в отношении золотистого стафилококка и кишечной палочки. Также сообщалось об исследовании молекулярного докинга.

Таким образом, из приведенного анализа результатов исследований методов определения аланина следует, что для решения задачи качественного и количественного нахождения аланина и его производных в составе различных молекул могут быть использованы самые различные физико-химические методы анализа, среди которых наиболее перспективным и часто используемым является метод ИК-спектроскопии и ее различных модификационных вариантов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Сулейманова Э. И. Применение метода спектрофотометрии для определения аминокислот // Вестник Башкирского университета. 2023. №1. С. 100–105.
2. Сулейманова Э. И. Применение потенциометрического метода в биомедицине // Вестник Башкирского гос. пед. университета. 2022. №1. С. 166–174.
3. Сулейманова Э. И. Определение органических соединений в лекарственных препаратах методом экстрактивной спектрофотометрии // Вестник Башкирского гос. пед. университета. 2022. №2. С. 237–243.
4. Qadri S., Rathod I., Kanakia D. Colorimetry method for estimation of glycine, alanine and isoleucine // Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2007. Vol. 69. N 3. Pp. 345–366.
5. Roy A. Estimation of Alanine and Glycine in Cane Juice Using Near Infrared Spectroscopy // International Journal of Food Engineering. 2007. Vol. 3. №1. Pp. 26–31.
6. Lin J., Feng Z., Ran G., Jiang Y. Analysis of an alanine/arginine mixture by using TLC/FTIR technique // Journal of Spectroscopy. 2014. Vol. 9. №1. Pp. 1–4.
7. Portna K. P., Vasiuk S.  $\beta$ -alanine spectrophotometric determination in reaction with sodium salt of 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid // Zaporozhye Medical Journal. 2015. №1. С. 95–98.
8. Numata Y., Otsuka M., Yamagishi K., Tanaka H. Quantitative Determination of Glycine, Alanine, Aspartic Acid, Glutamic Acid, Phenylalanine, and Tryptophan by Raman Spectroscopy // Analytical Letters. 2017. Vol. 50. №4. Pp. 651–662.
9. Xianqing L., Kailin X., Hul L., Shun Y. Qualitative analysis of chiral alanine by UV-visible-shortwave near infrared diffuse reflectance spectroscopy combined with chemometrics // RSC Advances. 2016. Vol. 6. №10. Pp. 3395–3405.
10. Jakhriani M. A., Kazi G. H., Wattoo M. H. Analytical Investigation of Fluorescent Complexes of Alanine and Phenylalanine with 8-hydroxyquinoline and 8-hydroxy quinoline in Aqueous Phase // Pakistan Journal of Biological Sciences. 2000. Vol. 3. №8. Pp. 1345–1348.
11. Yamaguchi M., Miyamaru F., Yamamoto K., Tani M. Terahertz absorption spectra of L-, D-, and DL-alanine and their application to determination of enantiometric composition // Applied Physics Letters. 2005. Vol. 86. №5. Pp. 31–38.
12. Bowles J., Jahnigen S., Vuilleumiet R., Calvo H. Influence of the environment on the infrared spectrum of alanine: An effective mode analysis // J. Chem. Phys. 2023. Vol. 158. №9. Pp. 94025–94031.
13. Belo E., Pereira J., Freire P., Argynov D. N. Hydrogen bonds in crystalline d-alanine: diffraction and spectroscopic evidence for differences between enantiomers // Inter. U. Cr. Journal. 2018. Vol. 5. №1. Pp. 6–12.
14. Kushnit M., Berquist J. Beta-methylamino-L-alanine analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry with iTRAQ as the derivative // Eur. J. Mass Spectrom. 2009. Vol. 15. №3. Pp. 439–443.
15. Moore B., Takamasa B., Djuricanin P., Wong J. Infrared spectroscopy of alanine and its water cluster isolated in solid parahydrogen // 73-rd International Symposium on Molecular Spectroscopy. 2018. 32 p.
16. Minkov V. S., Chesalov Y. A., Boldyreva Y. E. A study of the temperature effect on the IR spectra of crystalline amino acids, dipeptides, and polyamino acids. VI. L-alanine and DL-alanine // Journal of Structural Chemistry. 2010. Vol. 51. №6. Pp. 1052–1063.
17. Shafieyoon P., Mahdipour E., Michalski J. Synthesis, Characterization, and Biological Investigation of Alanine-Based Sulfonamide Derivative: FT-IR,  $^1\text{H}$  NMR Spectra: MEP, HOMO–LUMO Analysis, and Molecular Docking // Russian Journal of Physical Chemistry. 2019. Vol. 93. Pp. 1285–1296.

*Поступила в редакцию 22.05.2023 г.*

DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2023.2.11

**APPLICATION OF PHYSICO-CHEMICAL METHODS OF ANALYSIS  
FOR THE DETERMINATION OF ALANINE**

© E. I. Suleymanova

*Azerbaijan State University of Oil and Industry  
20 Azadlig Avenue, AZ 1010 Baku, Republic of Azerbaijan.**Email: suleymanova1944@mail.ru*

Alanine is one of the twenty proteinogenic (part of the proteins of all living organisms) amino acids. The optical isomer (enantiomer) L-alanine is of biological importance. Alanine is also part of a number of biologically active compounds. It is a non-essential amino acid (the human body is able to synthesize it). In the laboratory, it is synthesized from propionic acid via  $\alpha$ -chloropropionic acid. The melting point of alanine is 295–316 °C. Alanine (2-aminopropanoic acid) is synthesized in muscles from lactic acid and also comes from food. In the liver, the amino acid is converted into glucose, which is an important component of the process of its production and conversion into energy, it regulates blood sugar levels. In medicine, it is often used as a means of preventing hypoglycemia. There are two forms of alanine in the human body: alpha-alanine and beta-alanine. Proteins are built from the alpha form, and the beta form is a part of pantothenic acid and of various biologically active compounds. The body also uses alanine as a building block for carnosine. Carnosine maintains the acid-base balance, prevents rapid aging and increases endurance. Alanine and carnosine were discovered in 1888 by the Australian scientist T. Weil. The presented work shows the results of studies in the field of determination of alanine and its derivatives by various physicochemical methods of analysis.

**Keywords:** amino acids, alanine,  $\beta$ -alanine, chiral alanine, spectrophotometry, infrared spectroscopy, wavelength.

*Received 22.05.2023.*