

(α -нафтиламин). Содержание нитритов в большинстве исследуемых образцов продуктов растениеводства оказалось ниже предела определения методики. Найдены нитриты в свёкле – (94 ± 5) мкг/кг и редисе – (55 ± 3) мкг/кг.

Выводы. Проведено сравнительное исследование методик количественного определения нитратов с помощью дифениламина, салицилата натрия, ионоселективного электрода и нитритов по реакции с реактивом Грисса в растительных продуктах. Отмечены их основные метрологические характеристики, преимущества и недостатки. Методики апробированы на образцах продуктов растениеводства.

Литература

1. Methods of analysis of food components and additives / Ed. by S. Ötles. – Taylor&Francis. – 2005. – 451 p.
2. Moorcroft, M.J. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review / M.J. Moorcroft, J. Davis, R.G. Compton // Talanta. – 2001. – Vol. 54, N 5. – p. 785–803.
3. Nitrates and nitrites in food and water / ed. by M. Hill. – Woodhead Publishing, 1996. – 196 p.
4. Вольнец, В.Ф. Аналитическая химия азота / В.Ф. Вольнец, М.П. Вольнец. – М.: Наука, 1977. – 307 с.
5. Скурихина, И.М. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов / И.М. Скурихина, В.А. Тутельян. – М.: Брандес, 1998. – 340 с.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Б.Н. Кочергин

В молекулярной биологии, биохимии и других смежных с ними дисциплинах большое значение имеют физико-химические методы определения нуклеиновых кислот. Изменения в их составе позволяет получить ценную информацию о функциональной активности органов и тканей и характере обменных процессов в организме.

В настоящее время в биохимической практике существует много различных способов определения количественного содержания ДНК и РНК в биологических системах. В основе этих способов лежат специфические реакции на их составные части: углеводный компонент (рибоза или дезоксирибоза), фосфорную кислоту или на измерении поглощения нуклеиновых кислот в ультрафиолетовом свете за счет азотистых оснований. Свойства азотистых оснований поглощать ультрафиолетовые лучи в зоне максимума (260 нм) используется для количественного определения ДНК и РНК спектрофотометрическим методом. Существует много модификаций этого метода. Среди них метод двухволновой спектрофотометрии, разработанный Цаневым и Марковым [1, 151-154]. В этом методе подбираются такие две длины волн, при которых оптическое поглощение примесей, в основном, ароматических аминокислот одинаково, а величина разности при этих длинах волн, при которых белковые примеси имеют одинаковое оптическое поглощение.

Недостатком метода Цанева-Маркова является гидролиз ткани 1 н щелочью, что приводит к появлению значительных белковых примесей и к дезаменированию цитидиловой кислоты. Другим недостатком является применение ТХУ для удаления кислоторастворимых продуктов. С учетом этих недостатков и некоторых других процедур, связанных с подготовкой образцов тканей для анализа нами внесены изменения в метод Цанева-Маркова. Ниже дается описание спектрофотометрического метода раздельного определения ДНК и РНК в одной навеске. Метод позволяет вести определение в свежем или фиксированном биологическом материале. Свежую или фиксированную в этаноле (1:15) ткань массой 500 мг. тщательно измельчали, затем обрабатывали 50% раствором этанола, содержащим 2% ацетат калия, а затем 5 мл. 96% этанола при $0-4^{\circ}\text{C}$, в течении 15 минут, отделяя его каждый раз центрифугированием. После этого из образцов ткани экстрагировали липиды, в начале 10 мл. смесью ацетона и хлороформа (5:1), трижды на холоду, затем 10мл. кипящей смесью хлороформа с этанолом 15 минут, тоже три раза. После этого осадок обрабатывали диэтиловым эфиром по 10 мл. 3 раза, дополнительную обработку осадка проводили пентаном 2 раза по 5 мл. Высушенную ткань и измельченную до порошкообразного состояния, использовали для последующей экстракции кислоторастворимых продуктов. Навеску сухого порошка весом 20мг. трижды обрабатывали 10-кратным объемом холодной $0,2\text{ н HClO}_4$ с последующим центрифугированием на холоду. Образовавшийся осадок, содержащий нуклеиновые кислоты инкубировали в $0,5\text{ н KOH}$ при температуре 37°C в течение 18 часов. На каждые 5 мг. сухой ткани брали 1 мл. KOH . В начале, пока не прогреются образцы (1 час), закрывать пробкой не следует. Содержимое пробирок периодически перемешивали стеклянной палочкой. К охлажденному гидролизату прибавляли холодную концентрированную HClO_4 до pH 1 (0,1 мл. HClO_4 на каждый мл. KOH).

Образовавшийся осадок, KClO_4 , белок и ДНК, отделяли центрифугированием (для полноты осаждения раствор выдерживали 10 минут при температуре 0°C в водяной бане со льдом). Центрифугат представляет собой раствор, содержащий РНК. Осадок два раза промывали 0,2 н HClO_4 с последующим центрифугированием. Центрифугаты объединяли, доводили до общего объема 15 мл. 0,5 н HClO_4 и использовали для определения РНК. Измеряли оптическую плотность при длинах волн 260 нм, 286 нм. Контролем при спектрофотометрировании РНК служил 0,5 н КОН, обработанный аналогичным образом, что и опытные пробы.

Из осадка дважды экстрагировали ДНК горячей 0,5 н HClO_4 при температуре 96°C в больших пробирках с обратным холодильником, первый раз 45 минут, второй – 20 минут. Общий объем доводили до 10 мл. 0,5 н HClO_4 и спектрофотометрировали против контроля 0,5 н HClO_4 при длинах волн 268 нм, 284 нм.

Расчеты проводили по формулам (1), (2). Количество нуклеиновых кислот выражали в мг/г сухой обезжиренной ткани.

$$РНК = \frac{561 \cdot (A_{260} - A_{286}) \cdot V}{W \cdot l \cdot 100} \cdot 10,5 \quad (1)$$

$$РНК = \frac{800 \cdot (A_{265} - A_{284}) \cdot V}{W \cdot l \cdot 100} \cdot 10,1 \quad (2)$$

где: W – навеска сухой ткани (мг);

l – толщина кюветки (1 см);

V – объем экстракта (мл);

10,5 – соответствующий коэффициент для пересчета фосфора РНК в весовое количество РНК;

10,1 – соответствующий коэффициент для пересчета фосфора ДНК в весовое количество ДНК;

Модифицированный нами метод использовали при изучении нуклеиновых кислот в органах и тканях некоторых моллюсков (таб.1).

Таблица 1

Содержание нуклеиновых кислот в организме
Anodonta cygnea (мг/г сухой ткани)

Источник	ДНК	РНК	ДНК/ РНК
	M ±m	M ±m	
Мышцы	0,49 ±0,22	1,99 ±0,11	0,25
Печень	3,64 ±0,47	19,65 ± 0,99	0,18
Жабры	1,10 ±0,34	3,83 ± 0,30	0,28

Таким образом, предложенная нами модификация метода позволяет определять нуклеиновые кислоты в органах тканей беспозвоночных животных.

Литература

1. Цанев, Р. Спектрофотометрический метод определения нуклеиновых кислот / Р.Г. Цанев, Г.Г. Марков // ж. Биохимия. – 1961. – т.25. С. 151-154.

ХАРАКТЕРИСТИКА ФЛАВОНОИДОВ РАСТЕНИЙ С ПЕРЕХОДНОЙ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ СТРАТЕГИЕЙ ЖИЗНИ (CSR)

Г.П. Кудрявцев

Флавоноиды растений представлены разными по восстановленности дифенилпропаноидного скелета низкомолекулярными фенольными соединениями. Среди разнообразных химических свойств, характерных для этих природных веществ, весьма привлекательным является склонность их, как и некоторых синтетических фенолов к фенол-диеновой таутомерии. Данный вид таутомерии исследован на примере 8-С- глюкозилапигенина (витексина), выделенного из листьев *Beta vulgaris L.* В процессе ее протекания у витексина возникает из фенольной (наиболее устойчивой)