

УДК 543.42.062:547.466

РАЗДЕЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ α -АМИНОКИСЛОТ И ВИТАМИНОВ ПОСЛЕ ЭКСТРАКЦИИ ИЗ ВОДНЫХ СРЕД

Н.Я. Мокшина¹, Я.И. Коренман², О.А. Пахомова², А.В. Зыков²

¹Военный авиационный инженерный университет
394063, Воронеж, ул. Старых большевиков, 54а

²Воронежская государственная технологическая академия
394000, Воронеж, пр. Революции, 19
moksnad@mail.ru

Поступила в редакцию 21 сентября 2009 г.

Разработаны методики экспрессного и селективного определения тирозина, фенилаланина, триптофана, аскорбиновой и никотиновой кислот в различных фазах после экстракции их бинарных и тройных смесей. Ароматические α -аминокислоты и витамины в водной фазе определяли спектрофотометрически с применением градуировочных графиков и расчетного метода Фирордта. Содержание аналитов в органической фазе устанавливали электрохимическими методами (потенциометрическое и кондуктометрическое титрование, капиллярный электрофорез).

Ключевые слова: аминокислоты, витамины, экстракция, спектрофотометрия, гидрофильные растворители, электрохимические методы

Мокшина Надежда Яковлевна – доктор химических наук, доцент кафедры физики и химии Воронежского Военного авиационного инженерного университета.

Область научных интересов – экстракция биологически активных веществ и спектроскопические методы их определения.

Опубликовано около 200 научных работ.

Коренман Яков Израильевич – заслуженный деятель науки и техники РФ, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Воронежской государственной технологической академии.

Область научных интересов – экстракция и сорбция органических соединений, физико-химические методы анализа аналитов и экстрактов.

Опубликовано более 2000 научных работ, в том числе 150 патентов.

Пахомова Оксана Анатольевна – кандидат химических наук, старший преподаватель кафедры общей и неорганической химии Воронежской государственной технологической академии.

Область научных интересов – экстракция биологически активных веществ и электрохимические методы их анализа.

Опубликовано около 50 научных работ.

Зыков Алексей Владимирович – аспирант кафедры аналитической химии Воронежской государственной технологической академии.

Область научных интересов – экстракция витаминов и разработка способов их селективного определения в объектах пищевого и медицинского назначения.

Введение

В последнее время извлечение биологически активных веществ, в том числе аминокислот и витаминов, из водных сред и их селективное определение весьма актуально вследствие бурного развития рынка пищевой и фармацевтической продукции. Несмотря на многочисленные

сведения о хроматографических и электрохимических методах разделения и определения органических веществ, жидкостная экстракция занимает лидирующее положение среди методов разделения и концентрирования [1, 2]. Обзор известных данных об экстракции биологически активных веществ показал, что извлечение и раз-

деление α-аминокислот и витаминов возможно с применением жидкостной экстракции и комплекса физико-химических методов экспрессного и селективного анализа концентратов.

Цель исследования – разработка экспрессных и легко воспроизводимых методик селективного определения фенилаланина, тирозина, триптофана, аскорбиновой и никотиновой кислот при экстракции их бинарных и тройных смесей из водных сред. Для решения поставленной задачи нами применены спектрофотометрический и электрохимические (кондуктометрическое и потенциометрическое титрование) методы определения аналитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

I. Спектрофотометрическое определение методом градуировочного графика α-аминокислот при их совместном присутствии в растворе

Несмотря на существование различных способов определения ароматических аминокислот и витаминов в водных средах, общим способом их определения можно считать спектрофотометрический [3]. Градуировочные графики для определения фенилаланина, тирозина и триптофана строят при длинах волн 257, 275 и 279 нм соответственно; для определения

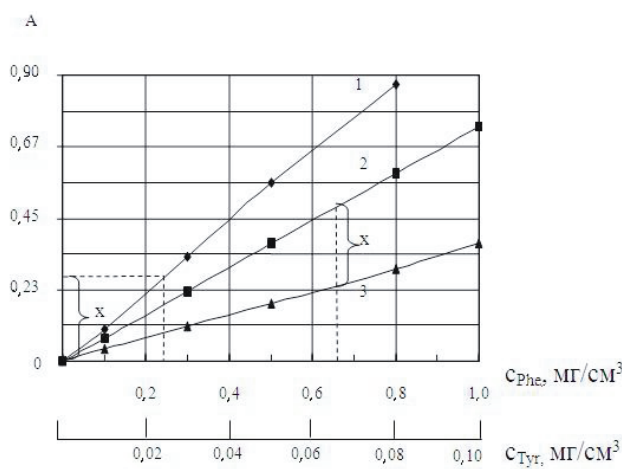


Рис. 1. Градуировочные графики для определения фенилаланина (1, λ = 257 нм) и тирозина (2, λ = 275 нм; 3, λ = 257 нм) при совместном присутствии в водном растворе.

аскорбиновой и никотиновой кислот – при 265 и 262 нм. Водную фазу после экстракции смеси α-аминокислот отделяют и разбавляют водой в известное число раз с тем, чтобы оптическая плотность A находилась в пределах 0,2–0,6, затем при расчетах учитывают кратность разбавления. Содержание α-аминокислот при их совместном присутствии можно определить графически (рис. 1 и 2). По оптической плотности одной из аминокислот находят ее концентрацию, проводят перпендикуляр на градуировочную прямую, соответствующую этой аминокислоте при длине волны второго компонента. Полученный отрезок экстраполируют на ось оптической плотности и находят концентрацию раствора второй аминокислоты [4].

II. Спектрофотометрическое определение аминокислот и витаминов методом Фирордта

Спектры светопоглощения индивидуальных аминокислот и витаминов перекрываются, поэтому их раздельное определение по поглощению в УФ-области с применением градуировочного графика невозможно. При соблюдении основного закона светопоглощения для всех компонентов и принципа аддитивности в отношении их смесей определение индивидуальных веществ возможно методом Фирордта [3-5].

Молярные коэффициенты светопоглощения ε компонентов находили по градуировоч-

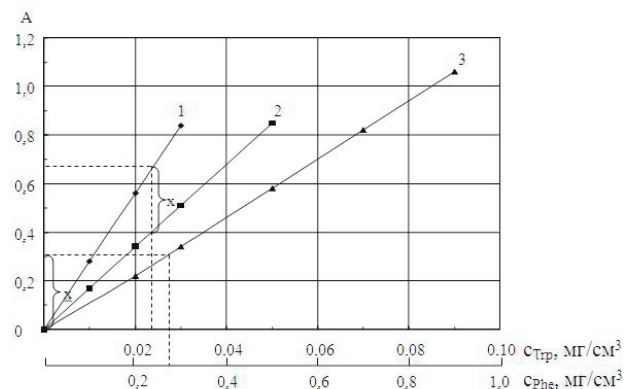


Рис. 2. Градуировочные графики для определения триптофана (1, λ = 279 нм; 2, λ = 257 нм) и фенилаланина (3, λ = 257 нм) при совместном присутствии в водном растворе.

Таблица 1

Уравнения для расчета молярных концентраций c, аминокислот в бинарных смесях

Бинарная смесь аминокислот	Уравнение
Фенилаланин (phe) – тирозин (tyr)	$c_{phe} = 4,750 \cdot 10^{-3} \cdot A^{257} - 1,488 \cdot 10^{-3} \cdot A^{275}$ $c_{tyr} = 6,837 \cdot 10^{-4} \cdot A^{275} - 3,304 \cdot 10^{-5} \cdot A^{257}$
Фенилаланин (phe) – триптофан (trp)	$c_{phe} = 6,126 \cdot 10^{-3} \cdot A^{257} - 4,288 \cdot 10^{-3} \cdot A^{279}$ $c_{trp} = 2,09410 \cdot 10^{-4} \cdot A^{279} - 1,909 \cdot 10^{-5} \cdot A^{257}$

Таблица 2

Уравнения для расчета молярных концентраций витаминов и аминокислот в бинарных смесях (A_1 и A_2 – оптические плотности при характеристических длинах волн первого и второго компонентов смесей соответственно

Бинарная смесь	Уравнение
Аскорбиновая кислота (asc) – триптофан (trp)	$c_{asc} = 1,586 \cdot A_1 - 1,138 \cdot A_2,$ $c_{trp} = 3,714 \cdot A_2 - 2,456 \cdot A_1$
Аскорбиновая кислота (asc) – тирозин (tyr)	$c_{asc} = 1,113 \cdot A_1 - 0,614 \cdot A_2,$ $c_{tyr} = 10,076 \cdot A_2 - 4,590 \cdot A_1$
Аскорбиновая кислота (asc) – фенилаланин (phe)	$c_{asc} = 1,550 \cdot A_1 - 1,042 \cdot A_2,$ $c_{phe} = 197,4 \cdot A_2 - 160,9 \cdot A_1$
Никотиновая кислота (nic) – триптофан (trp)	$c_{nic} = 2,474 \cdot A_1 - 1,891 \cdot A_2,$ $c_{trp} = 2,083 \cdot A_2 - 0,370 \cdot A_1$
Никотиновая кислота (nic) – тирозин (tyr)	$c_{nic} = 2,558 \cdot A_1 - 1,279 \cdot A_2,$ $c_{tyr} = 9,174 \cdot A_2 - 3,018 \cdot A_1$
Никотиновая кислота (nic) – фенилаланин (phe)	$c_{nic} = 8,208 \cdot A_1 - 6,498 \cdot A_2,$ $c_{phe} = 193,7 \cdot A_2 - 180,9 \cdot A_1$

ным графикам, построенным для определения каждой аминокислоты при собственной длине волны и длине волны витамина. Концентрацию индивидуальных компонентов смеси рассчитывали по известным уравнениям [3-5].

Молярные концентрации аминокислот в бинарных смесях вычисляли по уравнениям, представленным в табл. 1. Молярные концентрации витаминов и аминокислот в бинарных смесях находили по уравнениям, приведенным в табл. 2 ($c_i \cdot 10^{-4}$ моль/дм³, $l = 1$ см).

Содержание отдельных компонентов тройных смесей вычисляли по известным уравнениям [6, 7]. Минимальная определяемая концентрация аскорбиновой кислоты составляла $1,14 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³. Погрешность определения α -амино-кислот в смеси с аскорбиновой кислотой не превышает 6 %, аскорбиновой кислоты – 8 %. Погрешность определения никотиновой кислоты не превышает 7,5 %; тирозина, триптофана и фенилаланина в смеси с никотиновой кислотой – 3,5; 6,0 и 5,2 % соответственно.

III. Определение α -аминокислот в экстрактах на основе гидрофильных растворителей электрохимическими методами

Потенциометрическое титрование экстрактов. В среде органических растворителей объекты исследования титруются как кислоты. Поэтому применяли основной титрант – 0,01 моль/дм³ раствор гидроксида калия в этиловом спирте. При такой концентрации титранта содержание воды в его этанольном растворе минимально.

Предварительно полученный экстракт помещали в ячейку для титрования. При раздельном определении α -аминокислот в гидро-

фильных экстрактах титрование проводили в присутствии дифференцирующего растворителя (ди-метилформамид). Дифференцирующий эффект обусловлен специфическим взаимодействием между аминокислотой и экстрагентом, в результате которого образуются анионы и катионы растворителя. ЭДС экстракта измеряли на высокоомном иономере И-130.

Для получения сопоставимых результатов стеклянный электрод в течение 12 ч вымачивали в органическом растворителе, на основе которого приготовлен анализируемый экстракт. После такой обработки в гелеобразном поверхностном слое стеклянного электрода содержится небольшое количество воды, поэтому возможны измерения потенциала органической фазы [8].

В качестве электрода сравнения применяли хлоридсеребряный электрод. После добавления каждой порции титранта (0,02–0,05 см³) отмечали показания прибора и выдерживали некоторое время для стабилизации сигнала. Титровали до установления постоянного потенциала системы.

Кондуктометрическое титрование экстрактов проводили с применением измерительного моста 2ВМ-509 (фирма TESLA) с двумя платиновыми электродами. После каждого титрования электроды ополаскивали растворителем. Постоянная ячейки не зависит от объема анализируемого раствора. После добавления каждой порции титранта (0,02 см³) раствор перемешивали и выдерживали до установления постоянной электропроводности (1–2 мин).

Титрование проводили без термостатирования, поскольку оно увеличивает продолжительность анализа и практически не влияет

Селективное кондуктометрическое определение α -аминокислот в экстракте на основе бутилового спирта, этилацетата и ацетона; $n = 4$, $P = 0,95$

α -Аминокислота	Введено, мг	Найдено, мг
Тирозин	16,50	15,75 \pm 1,21
Фенилаланин	1,50	1,42 \pm 0,05
Тирозин	4,00	4,23 \pm 0,06
Триптофан	2,50	2,38 \pm 0,03

на точность получаемых результатов. При построении графиков и расчете результатов потенциометрического и кондуктометрического титрования учитывали поправки на нейтрализацию примесей в растворителе. Для этого выполняли контрольное титрование экстракта, не содержащего α -аминокислот. Результаты отдельного кондуктометрического определения α -аминокислот после экстракции их смеси бутиловым спиртом приведены в табл. 3.

Анализ экстрактов методом капиллярного электрофореза. Электрофоретическое детектирование экстрактов осуществляли на приборе «Капель-105» с источником высокого напряжения положительной полярности. Содержание α -аминокислот определяли с применением встроенного фотометрического детектора ($\lambda = 254$ нм). Запись и обработку полученных данных осуществляли с применением программного обеспечения «МультиХром». Анализ проводили при напряжении +23 кВ и температуре 30 °С. Для разделения тирозина, триптофана и фенилаланина в капилляре в качестве добавки к фоновому электролиту применяли боратный буферный раствор (рН = 9,18). При таком значении рН аминокислоты находятся в виде анионов и таутомеров с биполярной ионизированной структурой, поэтому возможно получение электрофореграммы с четким разрешением (рис. 3). Электрофореграмма получена при следующих условиях: капилляр кварцевый, детектор встроенный фотометрический, $\lambda = 254$ нм, фоновый электролит – боратный буферный раствор (рН = 9,18), рабочее напряжение +23 кВ, температура 30 °С.

Таким образом, нами разработан алгоритм отдельного определения ароматических α -аминокислот, а также аскорбиновой и никотиновой кислот в водной и органической фазах после экстракции двойных и тройных смесей этих компонентов органическими растворителями. Показана возможность применения различных вариантов спектрофотометрического и электрохимического определения аналитов в водных средах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Золотов Ю.А. Разделение и концентрирование в химическом анализе // Рос. хим. журн. 2005. Т. XLIX, № 2. С. 6–10.
2. Москвин Л.Н., Царицына Л.Г. Методы разделения и концентрирования в аналитической химии. Л.: Химия, 1991. 256 с.
3. Берштейн И.Я., Каминский Ю.Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии. Л.: Химия, 1981. 198 с.
4. Мокшина Н.Я. Экстракция аминокислот и витаминов. Воронеж: Воронеж. гос. технол. акад., 2007. 246 с.
5. Казначеев А.В., Хохлова О.Н., Селеменев В.Ф., Хохлов В.Ю., Мокшина Н.Я. Спектрофотометрическое определение ароматических и гетероциклических аминокислот в их смесях // Ж. аналит. химии. 2000. Т. 55, № 4. С. 375–377.
6. Мокшина Н.Я., Р.В.Савушкин, Селеменев В.Ф., В.Ю.Хохлов. Спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты и аминокислот при совместном присутствии // Аналитика и контроль. 2004. Т. 8, № 4. С. 346–348.
7. Мокшина Н.Я. Раздельное определение никотиновой кислоты и ароматических аминокислот // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2007. Т. 73, № 9. С. 22-24.
8. Пахомова О.А. Новые экстракционные системы для определения α -аминокислот в водных средах: дис...канд.хим.наук. Саратов, 2007. 151 с.

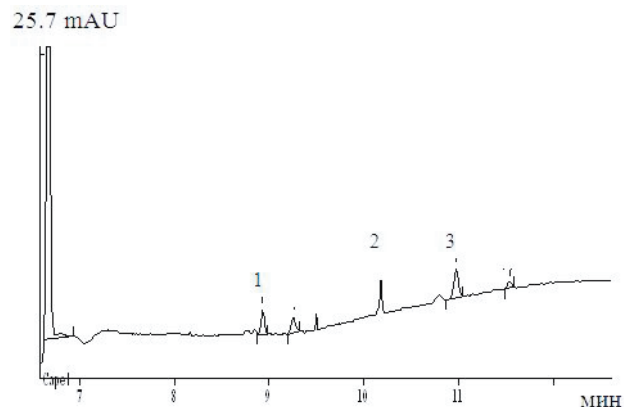


Рис. 3. Электрофореграмма тирозина (1), триптофана (2), фенилаланина (3)

SEPARATE DETERMINATION OF THE AROMATIC α - AMINO ACIDS AND VITAMINS AFTER EXTRACTION FROM WATER ENVIRONMENTS

N.Ya. Mokshina¹, Ya.I. Korenman², O.A. Pakhomova², A.V. Zykov²

*¹Military aviation engineering university
394063, Voronezh, Starykh bolshevikov str., 54a*

*²Voronezh State Technological Academy
394000, Voronezh, Revolutzii Av., 19
moksнад@mail.ru*

The methods of express and selective determination of tirozin, fenilalanin, triptofan, ascorbic and nicotine acids in different phases after extraction of their binary and triple mixtures are developed. Determination of aromatic α -amino acid and vitamins in the water phase was carry out of spectrophotometry with the use of calibrating chart and calculation method of Firordt. The table of contents of analyt in organic phase was set electrochemical methods (potential and conductivity titration, capillary electrophoresis).

Keywords: amino acids, vitamins, spectrophotometry, extraction, hydrophilic solvents, electrochemical methods