

Коренман Я.И., Горохов А.А.\*, Нифталиев С.И., Пахомова О.А.  
Воронежская государственная технологическая академия,  
\*Оренбургский государственный университет

## ЭКСТРАКЦИЯ НЕЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ В АНАЛИЗЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

Аминокислотный дисбаланс является одной из причин возникновения патологических процессов и дисфункций различных органов [1]. Дефицит аминокислот могут вызвать многие факторы: нерациональное питание, заболевания желудочно-кишечного тракта, инфекции, стресс. Незаменимые аминокислоты не синтезируются в организме человека и поэтому должны поступать с пищей или в составе сбалансированных терапевтических средств (биологически активные добавки, витаминные комплексы, белковые смеси). В связи с возросшими объемами фальсификации лекарственных средств актуальность приобретает разработка способов определения аминокислот в составе фармацевтических комплексов. Эта задача относится к одной из приоритетных в аналитической химии, ее решение возможно с применением жидкостной экстракции гидрофильными растворителями и последующего анализа концентрата инструментальными и хроматографическими методами.

Для экстракции из водных сред традиционно применяются гидрофобные растворители, например, алифатические спирты  $C_6 - C_{10}$ , алкилацетаты  $C_4 - C_6$  [2]. Однако в отношении аминокислот они характеризуются невысокой эффективностью, степень извлечения из водных сред такими растворителями не превышает 15%.

В последнее время для экстракции органических соединений разных классов применяются частично или полностью растворимые в воде экстрагенты, например, низшие гомологи спиртов и эфиров, а также их смеси [3,4]. Применение гидрофильных экстрагентов расширяет возможности титриметрического анализа. Это связано с тем, что в среде органических растворителей сила слабых аминокислот возрастает и становится возможным их селективное определение без предварительного разделения.

Обязательным условием применения гидрофильных растворителей как экстрагентов из водных растворов является насыщение водной фазы электролитом, снижающим растворимость распределяемого соединения в воде. Известно, что сульфат лития один из эффективных высаливателей органических соединений разных классов [5], практически нерастворим в применяемых экстрагентах и легко растворим в воде (34,7% мас. при 20 °С).

Для разработки способа определения незаменимых аминокислот в препарате «Альвезин» (ООО «Алтайвитамины») изучена экстракция этих аминокислот из водных растворов трехкомпонентной смесью гидрофильных растворителей (бутиловый спирт – этилацетат – ацетон).

Водный раствор смеси аминокислот (лизин, тирозин, аланин, глицин) готовили из навески препарата «Альвезин», отфильтрованный раствор подкисляли  $HNO_3$  (рН = 5,5 – 6,0) и насыщали сульфатом лития до концентрации 20 мас.%. К водно-солевому раствору аминокислот добавляли смесь гидрофильных растворителей (бутиловый спирт – этилацетат – ацетон) и экстрагировали на вибросмесителе. Время установления межфазного равновесия зависит от соотношения объемов водного раствора и экстрагента ( $r$ ). Увеличение  $r$  снижает скорость перераспределения вещества в водном растворе и, следовательно, замедляет установление межфазного равновесия. При  $r = 10$  оно достигается в течение 5–10 – минутной экстракции.

Полученный концентрат анализировали методами потенциметрического и кондуктометрического титрования, а также капиллярного электрофореза.

Потенциметрическое титрование экстрактов осуществляли на высокоомном потенциометре по кислотно-основному механизму с применением цепи с переносом заряда:

СЭ / H<sup>+</sup> АК / AgCl / KCl, где СЭ – стеклянный электрод; АК – аминокислота, AgCl / KCl – хлоридсеребряный электрод, заполненный насыщенным раствором KCl в этиловом спирте.

Кондуктометрические измерения проводили в стандартной ячейке с платиновыми электродами. Постоянную ячейки находили с применением раствора хлорида калия по известной методике [6].

В среде органических растворителей объекты исследования титруются как кислоты. Поэтому применяли основной титрант – 0,01 моль/дм<sup>3</sup> раствор гидроксида калия в этиловом спирте. При такой концентрации содержание воды в этанольном растворе титранта минимально

Титровали без термостатирования, поскольку оно практически не влияет на точность получаемых результатов и вместе с тем увеличивает продолжительность анализа. 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 аминокислот.

Электрофоретическое детектирование экстракта проводили на приборе «Капель-105» с источником высокого напряжения положительной полярности. Содержание

аминокислот определяли с помощью встроенного фотометрического детектора ( $\lambda = 254$  нм). Для записи и обработки полученных данных применяли программное обеспечение «МультиХром». Анализ выполняли при напряжении +23 кВ и температуре 30° С. Для разделения лизина, тирозина, аланина и глицина 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 электрофореграмм с четким разрешением (рис. 1).

Коэффициенты распределения и степень извлечения аминокислот вычисляли по известным уравнениям [5].

Один из факторов, влияющих на коэффициенты распределения аминокислот (D), рН водного раствора. Экстрагировали из подкисленных водно-солевых растворов (рН ~ 5,5 – 6,0), в этих условиях аминокислоты практически полностью находятся в экстрагируемом (неионизированном) состоянии (рис. 2).

Аминокислоты экстрагируются по гидрато-сольватному механизму за счет образования межмолекулярных водородных связей, причем сольватация amino- и карбоксигрупп может происходить с протонным переносом и в его отсутствие [7, 8]. Анионы аминокислот

практически негидратированы, поэтому молекулы воды в экстракте образуют координационные связи с протонами кислот. При сольватации формируется сольватная оболочка между растворителем и ионами аминокислоты. Механизм экстракции аминокислот, содержащих протонодонорные и протоноакцепторные функциональные группы, обусловлен их природой и взаимным расположением заместителей. Добавление к ацетону апротонного растворителя (этилацетат) усиливает сольватацию аминокислот

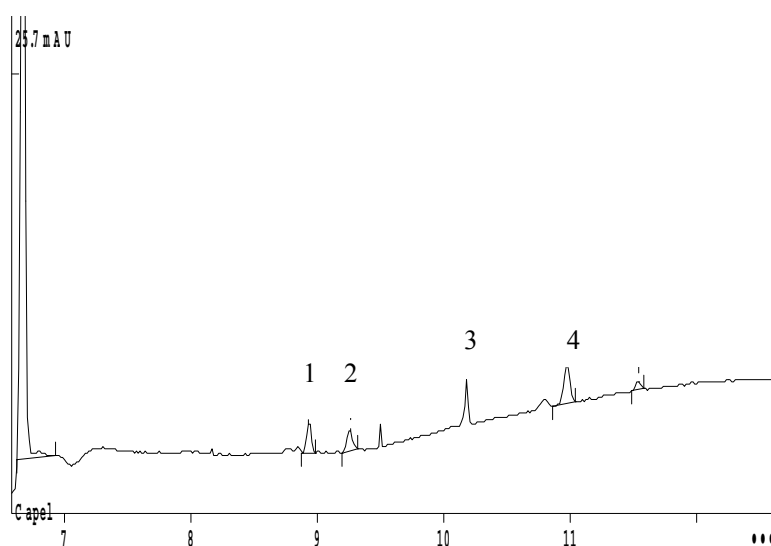


Рисунок 1. Электрофореграмма лизина (1), тирозина (2), аланина (3) и глицина (4)

бутиловым спиртом, способствует повышению коэффициентов распределения и практически полному (~97%-ому) извлечению аминокислот из анализируемого водного раствора.

Установлено, что коэффициенты распределения аминокислот зависят от соотношения компонентов в составе смеси растворителей. Для применения смеси растворителей в качестве экстрагента необходимо оптимизировать соотношение отдельных компонентов. Решение задачи связано с получением большого массива экспериментальных данных. Ранее нами оптимизирован состав трехкомпонентной смеси гидрофильных растворителей методом симплекс-решетчатого планирования эксперимента и разработаны системы, в которых достигаются максимальные коэффициенты распределения аминокислот [9, 10]. На основании этих данных разработан состав смеси, при котором происходит 97%-ое и более полное извлечение лизина, тирозина, аланина и глицина из водных растворов [11]. Максимальные коэффициенты распределения достигаются при соотношении компонентов в смеси бутиловый спирт – этилацетат – ацетон, равном 6: 1: 3.

Результаты потенциометрического, кондуктометрического и электрофоретического определения аминокислот приведены в таблице.

Таблица. Определение лизина, тирозина, аланина и глицина в экстракте

Аминокислота	Найдено кислоты в концентрате, мкг		
	потенциометрическое титрование	кондуктометрическое титрование	капиллярный электрофорез
Лизин	5,47 ± 1,21, S <sub>r</sub> = 0,13	5,16 ± 1,34 S <sub>r</sub> = 0,15	5,53
Тирозин	5,32 ± 1,18, S <sub>r</sub> = 0,18	5,41 ± 2,11, S <sub>r</sub> = 0,16	5,45
Аланин	5,43 ± 2,01, S <sub>r</sub> = 0,08	5,47 ± 1,35, S <sub>r</sub> = 0,10	5,50
Глицин	5,38 ± 1,65, S <sub>r</sub> = 1,47	5,40 ± 1,21, S <sub>r</sub> = 1,33	5,58

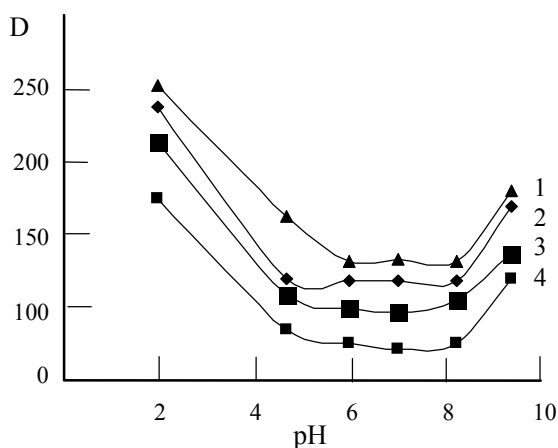


Рисунок 2. Зависимость коэффициентов распределения лизина (1), тирозина (2), аланина (3) и глицина (4) от pH водного раствора

При однократной экстракции в оптимизированных условиях степень извлечения лизина, тирозина, аланина и глицина из анализируемых водных растворов достигает 97 – 98%.

#### Список использованной литературы:

1. Garrett R.H., Grisham C.M. Molecular aspects of Cell Biology. // Fort Worth, Philadelphia et al. – Saunders College Publ., 1995. – V. 21, №4. – P. 1227-1243.
2. Коренман Я.И. Коэффициенты распределения органических соединений. Справочник. – Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 1992. – 336 с.
3. Коренман Я. И., Нифталиев С. И. Экстракция хлорфенолов гидрофильными растворителями // Журн. прикл. химии. 1993. Т. 66. №8. С. 1763 – 1766.
4. Нифталиев С.И. Экстракция ароматических кислот гидрофильными растворителями – моделирование, закономерности, межфазного распределения, прогнозирование и применение в анализе: Автореф. дис. ...докт. хим. наук. – Краснодар: Кубан. гос. ун-т., 2004. – 48 с.
5. Коренман Я.И. Экстракция фенолов. – Горький: Волго-Вятск. изд-во, 1973. – 216 с.
6. Кери Ф. Углубленный курс органической химии. Кн.1. Структура и механизмы. М.: Химия, 1981. – 520 с.
7. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки. М.: Мир, 1985.
8. Мокшина Н.Я., Нифталиев С.И., Пахомова О.А. Распределение тирозина и триптофана в системе вода – бутиловый спирт – ацетон – этилацетат – сульфат лития // Сорбц. и хроматогр. процессы, 2006. – Т. 6, №4. – С. 642–646.
9. Мокшина Н.Я., Нифталиев С.И., Пахомова О.А. Экстракция тирозина и фенилаланина смесью гидрофильных растворителей из водно-солевого раствора. // Изв. вузов. Химия и хим. технология, 2005. – Т.48, №1. – С. 109–112.
10. Мокшина Н.Я., Нифталиев С.И., Пахомова О.А. Экстракция некоторых алифатических аминокислот из водных растворов с применением смеси гидрофильных растворителей // Хим. технология, 2005. – №5. – С. 44–46.
11. Способ определения глицина в водном растворе: пат. 2277085 РФ: МПК<sup>С1</sup> С 07 С 227/38 // Мокшина Н.Я. Нифталиев С.И., Пахомова О.А.; заявитель и патентообладатель Воронеж. гос. университет и Воронеж. гос. технол. акад. – №2005107249/04; заявл. 15.03.2005; опубл. 27.05.2006, Бюл. №15 (ч. II). – С. 478–479.