



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.723:577.112.3

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10892

Исследование сорбции аргинина сульфоэтилированным хитозаном с последующим определением методом капиллярного электрофореза

**Карина Радиковна Нурмухаметова¹✉, Елена Леонидовна Лебедева¹,
Юлия Сергеевна Петрова¹, Людмила Константиновна Неудачина¹**

¹Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия, nkarina99@mail.ru✉

Аннотация. Диагностика различных заболеваний и патологических состояний человека требует разработки экспрессных и чувствительных способов определения аминокислот. Одним из наиболее перспективных в этом отношении методов анализа является капиллярный электрофорез. Он позволяет осуществлять не только определение, но и разделение аминокислот, а также не требует использования токсичных и дорогостоящих реактивов.

Работа посвящена разработке методики электрофоретического определения аминокислот и исследованию сорбции аргинина сорбентом на основе сшитого глутаровым альдегидом N-2-сульфоэтилхитозаном со степенью сульфоэтилирования 1.0 (СЭХ 1.0).

Разработку методики электрофоретического разделения и определения аминокислот (аргинина, аланина, аминокислоты, аспарагина, аспарагиновой кислоты, валина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, лизина, лейцина, изолейцина, серина, орнитина, оксипролина, метионина, треонина, триптофана, фенилаланина, цистеина) проводили с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105М». В результате проведенных исследований оптимизированы следующие условия разделения аминокислот: длина волны детектирования, температура, время гидродинамического ввода пробы, pH и природа фонового электролита, концентрация β -циклодекстрина. Разработанная методика позволяет осуществлять разделение и определение 13 аминокислот при их совместном присутствии в растворе и определение всех 20 исследуемых аминокислот при их индивидуальном присутствии в растворе. Рассчитаны значения пределов определения и пределов обнаружения исследуемых аминокислот методом капиллярного электрофореза в оптимизированных условиях.

Влияние pH аммиачно-ацетатного буферного раствора на сорбцию аргинина СЭХ 1.0 исследовано методом ограниченного объема при исходной концентрации аминокислоты $5 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ (масса сорбента 0.05 г, объем раствора 10.0 см³). Установлено, что извлечение аминокислоты сорбентом является максимальным при pH 6.0 и составляет 44 %. Введение в исследуемый раствор эквимольного по отношению к аминокислоте количества ионов меди (II) не приводит к возрастанию степени извлечения аргинина. Степень извлечения аминокислоты СЭХ 1.0 в медной форме увеличивается с ростом pH и достигает максимального значения равного 85 % при pH 9.0. Равновесие сорбции аргинина сорбентом в медной форме при данном значении pH устанавливается в течение 2 часов контакта фаз.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, аминокислоты, аргинин, сорбция.

Благодарности: исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Программы развития Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина в соответствии с программой стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

Для цитирования: Нурмухаметова К.Р., Лебедева Е.Л., Петрова Ю.С., Неудачина Л.К. Исследование сорбции аргинина сульфоэтилированным хитозаном с последующим определением методом капиллярного электрофореза // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 6. С. 856-868. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10892>



Original article

A study of arginine sorption by sulfoethylated chitosan followed by a capillary electrophoresis

Karina R. Nurmukhametova^{1✉}, Elena L. Lebedeva¹,
Yulia S. Petrova¹, Lyudmila K. Neudachina¹

¹Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russian Federation, nkarina99@mail.ru ✉

Abstract. Diagnostics of various human diseases and pathologies requires developing express and sensitive methods for determining amino acids. In this regard, one of the most promising analysis methods is capillary electrophoresis. It allows both determining and separating amino acids. What is more, it does not require toxic and expensive reagents.

The work is devoted to the development of a method for the electrophoretic determination of amino acids and the study of arginine sorption with a sorbent based on N-(2-sulfoethyl)chitosan cross-linked with glutaric aldehyde with a sulfoethylation degree of 1.0 (SEC 1.0).

The method of electrophoretic separation and amino acids determination (arginine, alanine, aminobutyric acid, asparagine, aspartic acid, valine, histidine, glycine, glutamic acid, lysine, leucine, isoleucine, serine, ornithine, oxyproline, methionine, threonine, tryptophan, phenylalanine, cysteine) was developed using a Kapel-105M capillary electrophoresis system. As a result of the studies, the following conditions for the separation of amino acids were optimised: detection wavelength, temperature, time of hydrodynamic sample injection, pH and the nature of the background electrolyte, and β -cyclodextrin concentration. The developed method allows separating and determining 13 amino acids in their joint presence in the solution and determining all the studied 20 amino acids when present individually in the solution. The values of the determination and detection limits were calculated for the amino acids studied by capillary electrophoresis under optimised conditions.

The effect of the pH of the ammonium-acetate buffer solution on arginine sorption by SEC 1.0 was studied by the method of limited volume at an initial concentration of amino acid of $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ (sorbent mass: 0.05 g, solution volume: 10.0 cm³). It was found that the extraction of the amino acid by the sorbent was maximum at pH 6.0 and was 44%. The introduction of an equimolar (in relation to amino acid) amount of copper (II) ions into the studied solution did not lead to an increase in the degree of arginine extraction. The extraction of the amino acid by SEC 1.0 in its copper form increased with an increase in the pH and reached the maximum value of 85% at pH 9.0. The equilibrium of arginine sorption by a sorbent in a copper form at the given pH value was established within 2 hours of phase contact.

Keywords: capillary electrophoresis, amino acids, arginine, sorption.

Acknowledgments: The study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the Development Programme for the Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin in accordance with the Priority-2030 programme of academic strategic leadership. The research funding from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Ural Federal University Program of Development within the Priority-2030 Program) is gratefully acknowledged.

For citation: Nurmukhametova K.R., Lebedeva E.L., Petrova Yu.S., Neudachina L.K. A study of arginine sorption by sulfoethylated chitosan followed by a capillary electrophoresis. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2022. 22(6): 856-868. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10892>

Введение

Содержание аминокислот в биологических жидкостях человека и тканях организма человека в ряде случаев может являться важным диагностическим показателем [1]. По этой причине разработка простых, доступных и экспрессных методов их определения является важной задачей аналитической химии.

Аргинин – условно заменимая аминокислота, участвующая в синтезе полиаминов и креатина и являющаяся предшественником оксида азота (II) [2]. Для аргинина предложены самые разнообразные методы анализа: электрохимические, оптические и др. [3]. Учитывая то обстоятельство, что аминокислоты часто совместно присутствуют в лекарственных препаратах, продуктах питания, тканях

человека и животных, их биологических жидкостях, наибольшее значение при их определении в составе сложных по составу объектах приобретают методы анализа, позволяющие не только определять, но и разделять рассматриваемые аналиты, прежде всего ВЭЖХ и капиллярный электрофорез (КЭ). При этом последний выгодно отличается отсутствием необходимости использования токсичных органических растворителей и дорогостоящих хроматографических колонок, высокой эффективностью разделения, простотой аппаратного оформления [4]. Возможности данного метода в определенной степени ограничиваются более низкой его селективностью и чувствительностью по сравнению с ВЭЖХ [5]. Существующие методики [6-9] электрофоретического определения аминокислот позволяют осуществлять разделение порядка 11-17 аминокислот, некоторые из них характеризуются высокой длительностью анализа и предполагают использование токсичных органических растворителей [7, 8]. Это определяет необходимость оптимизации условий определения аминокислот методом КЭ, а также исследования возможности сорбционного разделения и концентрирования аминокислот на стадии пробоподготовки.

В качестве сорбентов для концентрирования аминокислот в течение последних 15 лет предложены синтетические органические катиониты [10] и аниониты [11, 12], ионообменные мембраны [13], неорганические материалы [14, 15], гибридные органо-неорганические сорбенты, способные образовывать комплексы по типу «гость – хозяин» [16]. Еще одним видом сорбентов для извлечения аминокислот и других органических соединений являются полиамфолиты. Согласно [17] этот класс материалов является перспективным для сорбции органических ионов из растворов с высокой ионной силой. Помимо этого, энергию их взаимодействия с органическими ионами

можно регулировать путем изменения степени ионизации сорбента.

Ранее [18] нами исследовано извлечение ионов металлов сорбентом на основе сшитого глутаровым альдегидом N-2-сульфоэтилхитозаном со степенью модифицирования сульфоэтильными группами, равной 1.0 (СЭХ 1.0). Данный материал является полиамфолитом: содержит в своем составе слабоосновные аминокислотные группы и сильнокислотные сульфогруппы, депротонированные во всем диапазоне pH. Возможность вступать в катионо- и анионообменные взаимодействия определяет перспективность использования СЭХ 1.0 для концентрирования аминокислот.

Цель работы – исследование сорбции аргинина СЭХ 1.0 с последующим определением аминокислоты методом капиллярного электрофореза. Достижение поставленной цели требовало решения следующих задач: 1) оптимизация условий электрофоретического определения аминокислот; 2) исследование влияния pH на сорбцию аргинина СЭХ 1.0.

Экспериментальная часть

Исходные растворы 20 аминокислот (аргинина, аланина, аминокислоты, аспарагина, аспарагиновой кислоты, валина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, лизина, лейцина, изолейцина, серина, орнитина, оксипролина, метионина, треонина, триптофана, фенилаланина, цистеина) с концентрацией 10^{-2} моль/дм³ готовили из реагентов квалификации не ниже х.ч. Растворы с меньшей концентрацией готовили разбавлением исходных.

Регистрацию электрофореграмм анализируемых растворов проводили на системе капиллярного электрофореза «Капель-105М» (ГК «Люмэкс», Россия), снабженной немодифицированным кварцевым капилляром (внутренний диаметр 75 мкм, эффективная длина 50 см, общая длина 60 см), УФ-детектором и источни-



ком высокого напряжения. Пробу вводили гидродинамически в течение выбранного времени (от 5 до 20 с), при давлении 30 мбар. Анализ проводили при выбранной температуре водного термостатирования капилляра (от 20 до 35°C) и величине рабочего напряжения +25 кВ. Пробу анализировали при длине волны детектирования 190 нм. Между анализами капилляр промывали фоновым электролитом (ФЭ) в течение 3 минут. В качестве ФЭ использовали фосфатный (0.01 моль/дм³ фосфата) или тетраборатный (0.01 моль/дм³ Na₂B₄O₇) буферные растворы, а также тетраборатный ФЭ с добавлением β-циклодекстрина (β-ЦД). Необходимое значение pH ФЭ устанавливали, добавляя разбавленный раствор гидроксида натрия. Значение pH растворов контролировали с помощью лабораторного анализатора жидкости «АНИОН 4100» (ООО НПФ «Инфраспек-Аналит», Россия), снабженного стеклянным комбинированным электродом ЭСК-10601/7.

В качестве сорбента исследован хитозан со степенью сульфэтилирования 1.0, сшитый глутаровым альдегидом (СЭХ 1.0). Синтез и идентификация сорбента описаны в [18].

Сорбцию аргинина СЭХ 1.0 исследовали методом ограниченного объема в диапазоне pH 4.0-9.0, создаваемом аммиачно-ацетатным буферным раствором. Исходная концентрация аминокислоты составляла 5·10⁻⁵ моль/дм³, масса сорбента – 0.05 г, объем раствора – 10.0 см³. Время контакта фаз составляло 1, 3 и 5 ч. Концентрацию аргинина в растворах до и после сорбции определяли методом КЗЭ в оптимизированных условиях. По полученным данным рассчитывали значения степени извлечения аминокислоты (R, %) и сорбции (мкмоль/г). Сорбцию аргинина СЭХ 1.0 в присутствии ионов меди (II) исследовали в аналогичных условиях, концентрация сульфата меди (II) при этом составляла 5·10⁻⁵ моль/дм³.

В таких же условиях исследована сорбция аргинина СЭХ 1.0 в медной

форме. В медную форму СЭХ 1.0 переводили следующим образом: 0.05 г сорбента смешивали с 50.0 см³ 1 моль/дм³ раствора сульфата меди (II), оставляли на сутки при периодическом перемешивании, разделяли фазы фильтрованием, промывали СЭХ 1.0 на фильтре дистиллированной водой, оставляли сушиться на воздухе.

Обсуждение результатов

Первым этапом исследования была оптимизация условий электрофоретического разделения и определения исследуемых аминокислот в водных растворах. Для выбора оптимальной длины волны детектирования с помощью системы капиллярного электрофореза «Капель-105М» получены спектры поглощения водных растворов аминокислот с концентрацией 1·10⁻⁴ моль/дм³.

Для большинства исследуемых растворов аминокислот спектры поглощения имеют схожий вид. На рис. 1 в качестве примера приведены спектры триптофана, тирозина, серина, цистеина.

Спектры поглощения аланина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, аминокислот аргинина, валина, фенилаланина, орнитина, треонина имеют схожий вид со спектром серина, а спектры глутаминовой кислоты, гистидина, лизина, оксипролина, изолейцина, лейцина, глицина имеют схожий вид со спектром цистеина. Большинство исследуемых аминокислот имеют низкие молярные коэффициенты поглощения в УФ-области спектра и лучше всего поглощают в диапазоне длин волн от 190 до 220 нм. Триптофан и тирозин, в свою очередь, способны поглощать вплоть до 275 нм. Также при необходимости селективного определения триптофана и тирозина на фоне всех остальных аминокислот можно выбрать длину волны 275 нм.

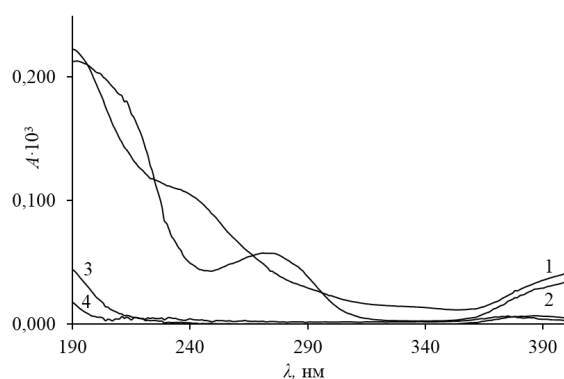


Рис. 1. Спектры поглощения водных растворов триптофана (1); тирозина (2); серина (3); цистеина (4) с концентрацией $1 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³. Фон: дистиллированная вода
 Figure 1. Absorption spectra of aqueous solutions of tryptophan (1); tyrosine (2); serine (3); cysteine (4) with a concentration of $1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³. Background: distilled water

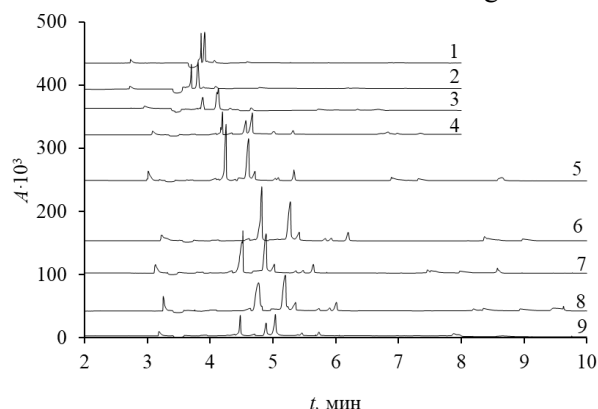


Рис. 2. ЭФГ смеси водных растворов 20 аминокислот ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³). Ввод пробы: 10 с, 30 мбар. $\lambda=190$ нм, $U=+25$ кВ, $T=25^\circ\text{C}$. Фоновый электролит: 0.01 моль/дм³ тетрабората натрия с рН 1) 8.0; 2) 8.5; 3) 9.0; 4) 9.5; 5) 9.6; 6) 9.7; 7) 9.8; 8) 9.9; 9) 10.0

Fig. 2. Electropherogram of a mixture of aqueous solutions of 20 amino acids ($1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³). Sample injection: 10 s, 30 mbar, $\lambda=190$ nm, $U=+25$ kV, $T=25^\circ\text{C}$. Background electrolyte: 0.01 mol/dm³ sodium tetraborate with a pH of 1) 8.0; 2) 8.5; 3) 9.0; 4) 9.5; 5) 9.6; 6) 9.7; 7) 9.8; 8) 9.9; 9) 10.0

Для дальнейших исследований выбрана длина волны 190 нм, соответствующая максимальным значениям светопоглощения всех 20 исследуемых аминокислот.

Для исследования влияния кислотности ФЭ на электрофоретическое поведение аминокислот в диапазоне рН 2.0-7.0 использовался фосфатный ФЭ, в диапазоне рН 8.0-10.0 – боратный ФЭ. В качестве примера на рис. 2 приведены ЭФГ смеси водных растворов аминокислот, полученные с использованием боратного ФЭ.

Установлено, что наилучшее разделение аминокислот достигается при значении рН 9.8-9.9. В этом случае на ЭФГ наблюдаются 10 отдельных пиков, в то время как при других значениях кислотности их число составляет 6-8. Для дальнейших исследований выбрано значение рН 9.8.

Согласно [19] для улучшения электрофоретического разделения аминокислот может использоваться β -ЦД, который способен образовывать с аминокислотами соединения типа «гость-хозяин».

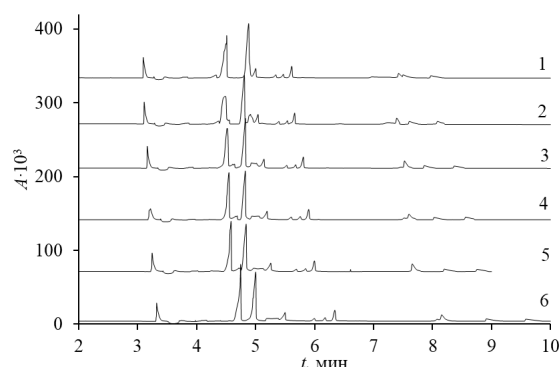


Рис. 3. ЭФГ смеси водных растворов 20 аминокислот ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³). Ввод пробы: 10 с, 30 мбар. $\lambda=190$ нм, $U=+25$ кВ, $T=25^\circ\text{C}$. Фоновый электролит: 0.01 моль/дм³ тетрабората натрия (рН=9.8), содержащий 1) 0; 2) 2; 3) 4; 4) 6; 5) 8; 6) 10 ммоль/дм³ β -ЦД

Fig. 3. Electropherogram of a mixture of aqueous solutions of 20 amino acids ($1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³). Sample introduction: 10 s, 30 mbar, $\lambda=190$ nm, $U=+25$ kV, $T=25^\circ\text{C}$. Background electrolyte: 0.01 mol/dm³ sodium tetraborate (pH = 9.8) containing 1) 0; 2) 2; 3) 4; 4) 6; 5) 8; 6) 10 mmol/dm³ of β -CD

ЭФГ смеси водных растворов аминокислот, полученные с использованием боратного ФЭ, содержащего разные количества β -ЦД, приведены на рис. 3.

Установлено, что с увеличением концентрации β -ЦД в фоновом электролите вид ЭФГ изменяется и времена миграции АК растут. При концентрации 2 ммоль/дм³ появляются новые пики при 4.5 и 5 минутах, а при концентрации 6 ммоль/дм³ удается разделить пики лизина и аргинина. Однако, при концентрациях β -ЦД, равных 8 и 10 ммоль/дм³, пики лизина и аргинина снова появляются в виде одного пика. Поэтому в качестве оптимальной концентрации β -ЦД выбрано значение 6 ммоль/дм³, при котором удается разделить 13 аминокислот (валин, аргинин, аланин, триптофан, фенилаланин, метионин, треонин, серин, аспарагин, цистеин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лизин).

Влияние температуры на электрофоретическое разделение аминокислот в выбранных условиях исследовано в диапазоне 20-35 $^\circ\text{C}$. Установлено, что при повышении температуры от 20 до 30 $^\circ\text{C}$ пики становятся более узкими и высокими, что способствует более высокой чувствительности и селективности разделения аминокислот. При дальнейшем увеличении температуры до 35 $^\circ\text{C}$ пики

лизина, аргинина и глицина сливаются. Для дальнейших исследований выбрана температура 30 $^\circ\text{C}$.

Также исследовано влияние времени гидродинамического ввода пробы при постоянном давлении (30 мбар) на разделение аминокислот. Установлено, что при вводе пробы в течение 5 с наблюдаются настолько низкие пики, что количественное определение становится невозможным. При увеличении времени ввода пробы все пики растут, их разделение улучшается. В качестве оптимального значения времени ввода пробы нами выбрано время, равное 20 с.

Таким образом, в качестве оптимальных условий для разделения исследуемых аминокислот были выбраны следующие условия: тетраборатный фоновый электролит (рН=9.8) с добавлением β -ЦД ($6 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³), температура 30 $^\circ\text{C}$, ввод пробы при давлении 30 мбар в течение 20 с. ЭФГ смеси водных растворов аминокислот, полученная в данных условиях, приведена на рисунке 4.

Таким образом, на ЭФГ при данных условиях наблюдается 13 отдельных пиков аминокислот. Такие аминокислоты как глицин, оксипролин, орнитин, аминокислотная кислота, лейцин, изолейцин, гистидин, разделить не удастся. Для всех исследуемых аминокислот построены

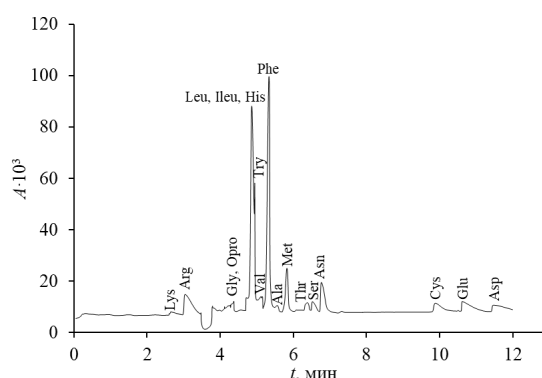


Рис. 4. ЭФГ смеси водных растворов АК ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³). Ввод пробы: 20 с, 30 мбар. $\lambda=190$ нм, $U=+25$ кВ, $T=30$ °С. Фоновый электролит: тетраборатный буферный раствор с концентрацией 0.01 моль/дм³, содержащий $6 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ β -ЦД

Fig. 4. Electropherogram of a mixture of aqueous solutions of AA ($1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³). Sample introduction: 20 s, 30 mbar, $\lambda=190$ nm, $U=+25$ kV, $T=30$ °C. Background electrolyte: tetraborate buffer solution with a concentration of 0.01 mol/dm³, containing $6 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ of β -CD

Таблица 1. Значения диапазонов линейности градуировочных графиков, пределов обнаружения и пределов определения для исследуемых аминокислот

Table 1. Values of the linearity ranges of calibration curves, detection and determination limits for the studied amino acids

Аминокислота	Диапазон линейности, моль/дм ³	Предел обнаружения, моль/дм ³	Предел определения, моль/дм ³
Аланин	$2.5 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$2.9 \cdot 10^{-6}$	$1.7 \cdot 10^{-5}$
Аминомасляная кислота	$1.0 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-6}$	$7.5 \cdot 10^{-6}$
Аргинин	$2.5 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$3.7 \cdot 10^{-6}$	$6.5 \cdot 10^{-6}$
Аспарагин	$2.5 \cdot 10^{-5} - 5.0 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-5}$	$6.0 \cdot 10^{-5}$
Аспарагиновая кислота	$1.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$4.0 \cdot 10^{-6}$	$2.9 \cdot 10^{-5}$
Валин	$1.0 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^{-6}$	$1.5 \cdot 10^{-5}$
Гистидин	$2.5 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$2.5 \cdot 10^{-5}$
Глицин	$5.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.3 \cdot 10^{-5}$	$2.9 \cdot 10^{-5}$
Глутаминовая кислота	$1.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^{-5}$	$2.7 \cdot 10^{-5}$
Изолейцин	$5.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-2}$	$5.5 \cdot 10^{-5}$	$9.9 \cdot 10^{-5}$
Лейцин	$5.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-2}$	$4.8 \cdot 10^{-5}$	$7.1 \cdot 10^{-5}$
Лизин	$1.0 \cdot 10^{-4} - 1.0 \cdot 10^{-2}$	$1.0 \cdot 10^{-4}$	$6.5 \cdot 10^{-4}$
Метионин	$7.0 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$8.5 \cdot 10^{-6}$	$1.6 \cdot 10^{-5}$
Оксипролин	$2.5 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-6}$	$2.8 \cdot 10^{-5}$
Орнитин	$8.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.1 \cdot 10^{-4}$	$2.2 \cdot 10^{-4}$
Серин	$2.5 \cdot 10^{-5} - 5.0 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-5}$	$5.1 \cdot 10^{-5}$
Цистеин	$5.0 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$3.6 \cdot 10^{-6}$	$2.6 \cdot 10^{-5}$
Треонин	$5.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-3}$	$3.5 \cdot 10^{-5}$	$5.3 \cdot 10^{-5}$
Триптофан	$2.5 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$4.0 \cdot 10^{-8}$	$4.7 \cdot 10^{-7}$
Фенилаланин	$2.5 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.4 \cdot 10^{-6}$	$9.1 \cdot 10^{-6}$

градуировочные графики. Полученные при обработке градуировочных графиков значения диапазонов линейности градуировочных графиков, пределов обнаружения и пределов определения для исследуемых аминокислот приведены в табл. 1.

Для всех исследуемых аминокислот ЭФГ характеризуются достаточно хорошей прецизионностью: относительное значение стандартного отклонения для времен миграции аминокислоты не превышает 3%, для высоты (площади) – 5%.

В целом разработанная методика определения аминокислот характеризуется простотой, экспрессностью и низкой стоимостью анализа. Однако она не позволяет осуществлять разделение всех исследуемых аминокислот, что требует проведения их предварительного сорбционного разделения. Кроме этого, определение некоторых аминокислот характеризуется не очень высокой чувствительностью. Использование стадии концентрирования в данном случае может позволить понизить предел их определения.

Следующим этапом работы стало исследование сорбции аргинина сорбентом на основе хитозана – СЭХ 1.0. Выбор данной аминокислоты определялся, во-первых, малым временем ее выхода (экспрессностью определения), во-вторых, низким значением предела определения, позволяющим исследовать сорбцию при относительно невысоких концентрациях аминокислоты в растворе.

С целью выбора оптимальных условий сорбции аргинина исследовали изменение параметров пика аргинина на ЭФГ от возраста раствора аминокислоты. Установлено, что все параметры (высота, площадь, приведенная площадь) остаются стабильными по крайней мере в течение 5 часов.

Результаты исследования сорбции аргинина из аммиачно-ацетатного буферного раствора СЭХ 1.0 представлены на рис. 5. Наименьшие значения степени извлечения аминокислоты СЭХ 1.0 получены для времени контакта фаз, равном 1 ч. Это связано с тем, что для достижения равновесия сорбции требуется больше времени. Установлено, что зависимости степени извлечения аминокислоты, полученные через 3 и 5 часов контакта фаз, имеют схожий вид. А именно: сорбция аргинина СЭХ 1.0 возрастает при $\text{pH} > 4.0$, достигая максимального значения при $\text{pH} 6.0$. При дальнейшем увеличении pH наблюдается уменьшение сорбции аминокислоты.

В условиях эксперимента наиболее вероятным механизмом извлечения аминокислоты является электростатическое взаимодействие заряженных функциональных групп сорбента с заряженными группами аминокислоты. Согласно [20] преобладающей формой аргинина в диапазоне $\text{pH} 3.0-8.0$ является однократно протонированная форма H_2L^+ . Иными словами, аминогруппы в составе аргинина протонированы, а карбоксильная – депротонирована. Максимальные значения сорбции других аминокислот различными полиамфолитами [17, 21] также

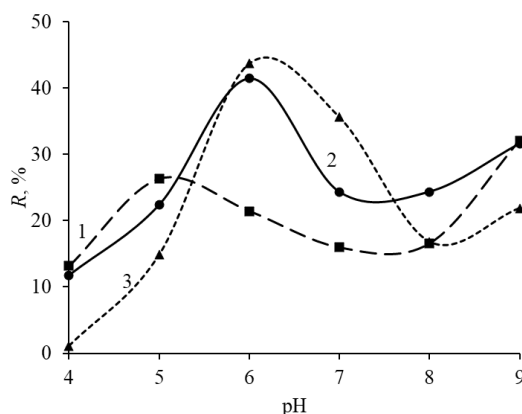


Рис. 5. Зависимость степени извлечения аргинина СЭХ 1.0 от pH аммиачно-ацетатного буферного раствора. Условия анализа: $g(\text{СЭХ } 1.0)=0.0500 \text{ г}$, $V=10 \text{ см}^3$,

$C_{\text{Arg}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/дм}^3$; время контакта фаз 1) 1; 2) 3; 3) 5 ч.

Fig. 5. Dependence of the degree of arginine sorption by SEC 1.0 on the pH of the ammonium-acetate buffer solution. Analysis conditions: $g(\text{SEC } 1.0)=0.0500 \text{ g}$, $V=10 \text{ cm}^3$,

$C_{\text{Arg}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$; phase contact time: 1) 1; 2) 3; 3) 5 h.

наблюдаются при значениях рН, соответствующих нахождению их в растворе в виде биполярных ионов – частиц, несущих одновременно положительный и отрицательный заряд. Это обстоятельство объясняется тем, что сорбированные аминокислоты становятся дополнительными центрами сорбат-сорбатного взаимодействия с образованием ассоциатов между $-\text{COO}^-$ и $-\text{NH}_3^+$ группами.

В целом в условиях эксперимента значения степени извлечения аргинина не превышают 44%. В целях исследования возможности повышения сорбции аминокислоты СЭХ 1.0 изучена ее сорбция в присутствии эквимольного количества сульфата меди (II). Известно, что сорбенты на основе сульфэтилированных аминополимеров, в том числе СЭХ 1.0 [18], в наибольшей степени из растворов сложного состава извлекают ионы серебра (I) и в меньшей – ионы меди (II). Тем не менее, именно медь (II) выбрана для изучения возможности извлечения аргинина за счет смешаннолигандного комплексообразования. Во-первых, по причине более низкой стоимости солей меди (II) по сравнению с солями серебра (I), во-вторых, вследствие большей склонности серебра (I) вступать в окислительно-восстановительные реакции. Помимо этого, в соответствии с рядом Ирвинга – Вильямса [22] медь (II) по сравнению с другими двухзарядными ионами металлов образует наиболее устойчивые комплексы с N,O-содержащими лигандами, к которым относятся аминокислоты.

Установлено, что введение в раствор эквимольного по отношению к аргинину количества меди (II) не приводит к изменению характера зависимости сорбции аминокислоты СЭХ 1.0 и возрастанию степени ее извлечения. Это обстоятельство может быть связано с недостаточной для количественного связывания аминокислоты в устойчивый комплекс концентрацией данного иона и конкурентным комплексообразованием ионов меди (II) с аммиаком, который является

компонентом используемого буферного раствора. Следующим этапом исследования стало изучение сорбции аргинина СЭХ 1.0 в медной форме. Полученная зависимость представлена на рис. 6.

Установлено, что в условиях эксперимента степень извлечения аргинина возрастает с ростом рН аммиачно-ацетатного буферного раствора. Изменение характера зависимости сорбции аминокислоты от рН по сравнению с сорбцией СЭХ в натриевой форме связано с изменением преобладающего механизма процесса. Основным механизмом сорбции аргинина СЭХ 1.0 в медной форме является механизм смешаннолигандного комплексообразования: аминокислота извлекается за счет образования хелатных комплексов с медью (II), которая в свою очередь связана с функциональными амино- и сульфогруппами в составе сорбента. С ростом рН увеличивается степень депротонирования аминогрупп в составе аргинина, увеличивается выход комплекса, образуемого медью (II) в фазе СЭХ 1.0 с аминокислотой, как следствие степень ее извлечения возрастает. Проведение сорбции аргинина СЭХ 1.0 в медной форме приводит к значительному возрастанию степени его извлечения вплоть до 85% при рН 9.0.

Как и при исследовании сорбции аргинина СЭХ 1.0 в натриевой форме, при проведении эксперимента с использованием сорбента в медной форме, зависимости, полученные при времени контакта фаз 3 и 5 часов, имеют схожий вид, степень извлечения аминокислоты при времени контакта фаз 1 час принимает меньшие значения. Для уточнения времени установления равновесия сорбции аминокислоты исследована кинетика ее сорбции СЭХ 1.0 при рН 9.0 в условиях, соответствующих максимальному значению степени извлечения. Полученная кинетическая кривая сорбции аргинина приведена на рис. 7.

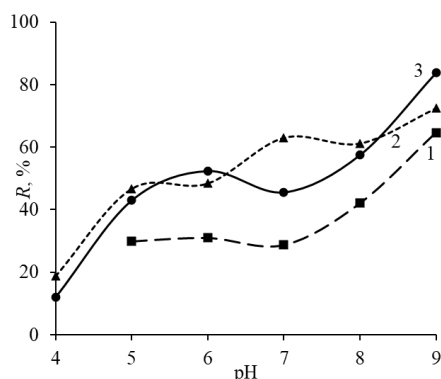


Рис. 6. Зависимость степени извлечения аргинина СЭХ 1.0 в медной форме от pH аммиачно-ацетатного буферного раствора.

Условия анализа: $g(\text{СЭХ 1.0})=0.0500 \text{ г}$, $V=10 \text{ см}^3$, $C_{\text{Arg}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/дм}^3$; время контакта фаз 1) 1; 2) 3; 3) 5 ч.

Fig. 6. Dependence of the degree of extraction of arginine by SEC 1.0 in a copper form on the pH of the ammonium-acetate buffer solution. Analysis conditions:

$g(\text{SEC 1.0})=0.0500 \text{ g}$, $V=10 \text{ cm}^3$, $C_{\text{Arg}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$; phase contact time: 1) 1; 2) 3; 3) 5 h.

Установлено, что равновесие сорбции в условиях эксперимента устанавливается в течение 2 часов контакта фаз. Извлечение аминокислоты является количественным.

Заключение

Разработана простая, экспрессная методика электрофоретического разделения и определения 13 аминокислот, не требующая использования токсичных или дорогостоящих реактивов. Оценены значения пределов обнаружения и пределов определения аминокислот. Получены зависимости, характеризующие влияние pH аммиачно-ацетатного буферного раствора на сорбцию аргинина сорбентом на основе сульфэтилированного хитозана. Установлено, что в условиях эксперимента максимальная степень извлечения

Список литературы

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 2007. 704 с.
2. Palmer R.M.J., Feringe A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological

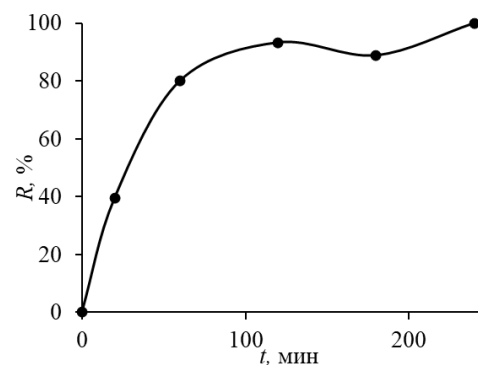


Рис. 7. Кинетическая кривая сорбции аргинина СЭХ 1.0 в медной форме. Условия эксперимента: $g(\text{СЭХ 1.0})=0.0500 \text{ г}$, $V=10.0 \text{ см}^3$, $C_{\text{Arg}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/дм}^3$, pH 9.0, аммиачно-ацетатный буферный раствор.

Fig. 7. Kinetic curve of arginine sorption by SEC 1.0 in a copper form. Conditions of the experiment: $g(\text{SEC 1.0})=0.0500 \text{ g}$, $V=10.0 \text{ cm}^3$, $C_{\text{Arg}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, pH 9.0, ammonium-acetate buffer solution.

аминокислоты сорбентом достигается при pH 6.0 и составляет 44%. Показано, что существенно увеличить степень извлечения аргинина СЭХ 1.0 позволяет использование сорбента в медной форме. При этом сорбция увеличивается с ростом pH и составляет порядка 85% при pH 9.0. Равновесие сорбции аргинина СЭХ 1.0 в медной форме при данном значении pH устанавливается в течение 2 часов контакта фаз.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

activity of endothelium-derived relaxing factor // *Nature*. 1987. Vol. 327. no. 6122. P. 524-526.

3. Gajda G.Z., Stasjuk N.E., Gonchar M.V. The methods of L-arginine analysis // *Biotechnology Acta*. 2014. Vol. 7. no. 1. P. 31-39.



4. Карцова Л.А. Проблемы аналитической химии. Т. 18. Капиллярный электрофорез. М.: Наука, 2014. 444 с.
5. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». Санкт-Петербург: ООО «Веда», 2003. 202 с.
6. Манаенков О.В., Сидоров А.И., Сульман Э.М. Экспресс-определение аминокислот методом капиллярного электрофореза без их предварительной дериватизации // *Журнал аналитической химии*. 2003. Т. 58, № 10. С. 1093-1096.
7. Мельников И.О., Глубоков Ю.М., Мосина А.Г., Назимов И.В. Патент РФ, № 2346931, 2009.
8. Мосина А.Г., Мельников И.О., Назимов И.В., Глубоков Ю.М. Капиллярный электрофорез немодифицированных генетически кодируемых аминокислот // *Журнал аналитической химии*. 2009. Т. 64, № 6. С. 655-659.
9. Chen Z.L., Warren C.R., Adams M.A. Separation of amino acids in plant tissue extracts by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection using aromatic carboxylates as background electrolytes // *Chromatographia*. 2000. Vol. 51. no 1. P. 180-187.
10. Бондарева Л.П., Корниенко Т.С., Овсянникова Д.В., Григорова Е.В. Сорбция ионов аминокислот фосфорнокислыми катионообменниками // *Вестник ВГУИТ*. 2014. № 4. С. 151-156.
11. Хохлова О.Н., Хохлов В.Ю., Лисицына С.А. Сорбция ароматических аминокислот на низкоосновных анионообменниках в непротонированной форме // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 1. С. 34-40.
12. Хохлова О.Н., Трошина П.В., Быковская А.И., Каширцева Е.Р., Хохлов В.Ю. Влияние различных факторов на необменную сорбцию аминокислот анионообменниками // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2021. Т. 21, № 4. С. 486-491.
13. Васильева В.И., Голева Е.А., Селемнев В.Ф. Особенности сорбции фенилаланина профилированными ионообменными мембранами // *Журнал физической химии*. 2016. Т. 90, № 10. С. 1548-1557.
14. Голованова О.А., Головченко К.К. Адсорбция аминокислот на поверхности брусшита и гидроксилпатита // *Журнал физической химии*. 2019. Т. 93, № 11. С. 1714-1723.
15. Котова Д.Л., Крысанова Т.А., Васильева С.Ю., Бекетов Б.Н., Воркушин А.И. Кинетика сорбции алифатических аминокислот из водных растворов на клиноптилолите // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2015. Т. 15, № 3. С. 373-378.
16. Роик Н.В., Белякова Л.А., Дзязько М.А. Сорбция ароматических аминокислот на дисперсном кремнеземе, химически модифицированном β -циклодекстрином // *Хімія, фізика та технологія поверхні*. 2011. Т. 2, № 3. С. 314-324.
17. Бондарева Л.П. Особенности взаимодействия алифатических аминокислот с бифункциональным ионообменником // *Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация*. 2015, № 4. С. 7-13.
18. Petrova Yu.S., Pestov A.V., Usoltseva M.K., Neudachina L.K. Selective adsorption of silver(I) ions over copper(II) ions on a sulfoethyl derivative of chitosan // *J. Hazard. Mater.* 2015. Vol. 299. P. 696-701.
19. ГОСТ Р 52347–2005 Комбикорма, комбикормовое сырье. Определение содержания лизина, метионина, треонина, цистина и триптофана методом капиллярного электрофореза. М.: Стандартинформ, 2005. 16 с.
20. Лыткин А.И., Черников В.В., Крутова О.Н., Скворцов И.А., Корчагина А.С. Термодинамика кислотно-основных взаимодействий L-аргинина в водных растворах при 298.15 К // *Журнал физической химии*. 2018. Т. 92, № 2. С. 257-260.
21. Гапеев А.А., Бондарева Л.П., Астапов А.В., Корниенко Т.С. Гидратация и сорбция аминокислот иминофосфоновым ионообменником // *Физикохимия поверхности и защита материалов*. 2016. Т. 52, № 4. С. 436-441.
22. Irving H., Williams R.J.P. The stability of transition-metal complexes // *J. Chem. Soc.* 1953, pp. 3192-3210.

References

1. Berezov T.T., Korovkin B.F. *Biologicheskaya khimiya*. M., Meditsina Publ., 2007, 704 p. (In Russ.)
2. Palmer R.M.J., Ferringe A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327(6122): 524-526. <https://doi.org/10.1038/327524a0>



3. Gajda G.Z., Stasjuk N.E., Gonchar M.V. The methods of l-arginine analysis, *Biotechnology Acta*. 2014; 7(1); 31-39. <https://doi.org/10.15407/biotech7.01.031>
4. Kartsova L.A. Problemy analiticheskoi khimii. Vol. 18. Kapillyarnyi elektroforez. M., Nauka Publ., 2014, 444 p. (In Russ.)
5. Komarova N.V., Kamentsev Ya.S. Prakticheskoe rukovodstvo po ispol'zovaniyu sistem kapillyarnogo elektroforeza «Kapel'». St.Petersburg, OOO «Veda», 2003. 202 p. (In Russ.)
6. Manaenkov O.V., Sidorov A.I., Sul'man E.M. Ekspress-opredelenie aminokislot metodom kapillyarnogo elektroforeza bez ikh predvaritel'noi derivatizatsii. *J. of Analytical chemistry*. 2003; 58(10): 1093-1096.
7. Mel'nikov I.O., Glubokov Yu.M., Mosina A.G., Nazimov I.V. Patent RF, no 2346931, 2009. (In Russ.)
8. Mosina A.G., Mel'nikov I.O., Nazimov I.V., Glubokov Yu.M. Kapillyarnyi elektroforez nemodifitsirovannykh geneticheski kodiruemyykh aminokislot. *J. of Analytical chemistry*. 2009; 64(6): 655-659.
9. Chen Z. L., Warren C. R., Adams M. A. Separation of amino acids in plant tissue extracts by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection using aromatic carboxylates as background electrolytes. *Chromatographia*. 2000; 51(1): 180-187. <https://doi.org/10.1007/BF02490562>
10. Bondareva L.P., Kornienko T.S., Ovsyanikova D.V., Grigorova E.V. Sorbtsiya ionov aminokislot fosfornokislymi kationoobmennikami. *Vestnik VGUIT*. 2014; 4: 151-156. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2014-4-151-156> (In Russ.)
11. Khokhlova O.N., Khokhlov V.Yu., Lisitsyna S.A. Sorbtsiya aromaticeskikh aminokislot na nizkoosnovnykh anionoobmennikakh v neprotonirovannoi forme. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022; 22(1): 34-40. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9018> (In Russ.)
12. Khokhlova O.N., Troshina P.V., Bykovskaya A.I., Kashirtseva E.R., Khokhlov V.Yu. Vliyanie razlichnykh faktorov na neobmennuyu sorbtsiyu aminokislot anionoobmennikami. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2021; 21(4); 486-491. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2021.21/3632> (In Russ.)
13. Vasil'eva V.I., Goleva E.A., Selemenev V.F. Osobennosti sorbtsii fenilalanina profilirovannymi ionoobmennymi membranami. *J. of Physical Chemistry*. 2016; 90(10): 1548-1557. <https://doi.org/10.7868/S0044453716100277> (In Russ.)
14. Golovanova O.A., Golovchenko K.K. Adsorbtsiya aminokislot na poverkhnosti brushita i gidroksilapatita. *J. of Physical Chemistry*. 2019; 93(11): 1714-1723. <https://doi.org/10.1134/S0044453719110116> (In Russ.)
15. Kotova D.L., Krysanova T.A., Vasil'eva S.Yu., Beketov B.N., Vorkushin A.I. Kinetika sorbtsii alifaticheskikh aminokislot iz vodnykh rastvorov na klinoptilolite. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2015; 15(3): 373-378. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2015.15/284> (In Russ.)
16. Roik N.V., Belyakova L.A., Dzyaz'ko M.A. Sorbtsiya aromaticeskikh aminokislot na dispersnom kremnezeme, khimicheski modifitsirovannom β -tsiklodekstrinom. *Chemistry, Physics and Technology of Surface*. 2011; 2(3): 314-324. (In Russ.)
17. Bondareva L.P. Osobennosti vzaimodeistviya alifaticheskikh aminokislot s bifunktsional'nym ionoobmennikom. *Vestnik VGU, ser.: Chemistry, Biology, Pharmacy*. 2015; 4: 7-13. (In Russ.)
18. GOST R 52347-2005 Kombikorma, kombikormovoe syr'e. Opredelenie soderzhaniya lizina, metionina, treonina, tsistina i triptofana metodom kapillyarnogo elektroforeza. M. Standartinform. 2005, 16 p.
19. Lytkin A.I., Chernikov V.V., Krutova O.N., Skvortsov I.A., Korchagina A.S. Termodinamika kislotno-osnovnykh vzaimodeistvii L-arginina v vodnykh rastvorakh pri 298.15 K. *J. of Physical Chemistry*. 2018; 92(2): 257-260. <https://doi.org/10.7868/S0044453718020164> (In Russ.)
20. Gapeev A.A., Bondareva L.P., Astapov A.V., Kornienko T.S. Gidratatsiya i sorbtsiya aminokislot iminofosfonovym ionoobmennikom. *Physico-chemistry of Surfaces and Materials Protection*. 2016; 52(4): 436-441. <https://doi.org/10.7868/S0044185616040112> (In Russ.)
21. Irving H., Williams R.J.P. The stability of transition-metal complexes. *J. Chem. Soc.* 1953: 3192-3210. <https://doi.org/10.1039/JR9530003192>



Информация об авторах / Information about the authors

К.Р. Нурмухаметова – студент кафедры аналитической химии и химии окружающей среды института естественных наук и математики, Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Е.Л. Лебедева – доцент кафедры аналитической химии и химии окружающей среды института естественных наук и математики, к.х.н., Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Ю.С. Петрова – доцент кафедры аналитической химии и химии окружающей среды института естественных наук и математики, к.х.н., доцент, Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Л.К. Неудачина – заведующий кафедрой аналитической химии и химии окружающей среды института естественных наук и математики, к.х.н., доцент, Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Nurmukhametova Karina R. – student, department of analytical and environmental chemistry of the Institute of natural sciences and mathematics, Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation, e-mail: nkarina99@mail.ru

E.L. Lebedeva – Ph. D. (chemistry), associate prof., department of analytical and environmental chemistry of the Institute of natural sciences and mathematics, Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Yu.S. Petrova – Ph. D. (chemistry), associate prof., department of analytical and environmental chemistry of the Institute of natural sciences and mathematics, Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

L.K. Neudachina – Ph. D. (chemistry), Head of the department of analytical and environmental chemistry of the Institute of natural sciences and mathematics, Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 30.09.2022; одобрена после рецензирования 12.12.2022; принята к публикации 14.12.2022.

The article was submitted 30.09.2022; approved after reviewing 12.12.2022; accepted for publication 14.12.2022.