



УДК 543.544.943.3-135

Тонкослойная хроматография аминокислот в мицеллярных подвижных фазах на силикагеле

Ворожейкин С.Б., Башко Е.С., Штыков С.Н.

ФГБОУ ВПО Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

Поступила в редакцию 30.07.2011 г.

Аннотация

Методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Сорбфил» с полярной неподвижной фазой изучено влияние природы и концентрации мицелл поверхностно-активных веществ, ионной силы раствора и рН среды на хроматографическое поведение 17 аминокислот. Установлены основные закономерности хроматографического поведения различных групп аминокислот в мицеллярных подвижных фазах (МПФ). Даны примеры применения МПФ для разделения аминокислот в коммерческих препаратах.

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, аминокислоты, разделение, модификация подвижной фазы

The effect of the nature and concentration of surfactant micelles as well as ionic strength and pH on the TLC chromatographic behavior of 17 aminoacids on polar Sorbfil plates was studied. The main regularities of aminoacids chromatographic behavior in micellar mobile phases (MMP) were established. The examples of application of MMP for separation of aminoacids in commercial preparations were given.

Keywords: thin-layer chromatography, silica gel stationary phase, aminoacids, separation, micellar mobile phases

Введение

Аминокислоты, являясь составными частями пептидов, белков, некоторых ферментов и других физиологически-активных соединений, служат основными компонентами живых организмов и играют важнейшую роль в их функционировании. Часть аминокислот живые организмы синтезируют сами, другие (незаменимые) получают с пищей. Аминокислоты, необходимые для животных и человека, получают также промышленным биосинтезом, используя их для производства лекарственных веществ и различных биологически-активных добавок (БАДов) [1-3]. Для анализа объектов, содержащих аминокислоты, чаще всего применяют методы высокоэффективной жидкостной [4], ионообменной [5] хроматографии или капиллярного электрофореза [6], позволяющие совмещать в одном аналитическом цикле разделение и определение составляющих их компонентов.

Необходимость контроля качества большого ассортимента коммерческих препаратов БАДов стимулирует разработку простых и быстрых методов разделения,

идентификации и количественного определения составляющих их аминокислот. Одним из таких методов является тонкослойная хроматография (ТСХ) [7]. Преимуществами ТСХ являются простота, экспрессность, дешевизна и возможность одновременного анализа большого числа проб. Показано, что в более чем 90 процентах работ для разделения аминокислот методом ТСХ используют пластинки с прямой фазой на основе силикагеля [8, 9].

В связи с тем, что аминокислоты в растворах существуют в виде одно- и двухзарядных анионов и катионов, цвиттерионов или незаряженных частиц, содержат гидрофобные и гидрофильные группы, для их разделения применяют большое число разнообразных, часто токсичных или резко пахнущих подвижных фаз (ПФ) [7-9]. Новыми ПФ в этом плане являются мицеллярные подвижные фазы (МПФ) на основе поверхностно-активных веществ (ПАВ), впервые предложенные для аминокислот Армстронгом [10-13]. В некоторых случаях растворы ПАВ используют также для импрегнирования неподвижной фазы [14,15]. Поскольку в мировой литературе по ТСХ аминокислот имеется всего несколько публикаций, посвященных применению мицеллярных ПФ для их разделения, причем в основном на обращенной неподвижной фазе, нами более детально изучено влияние природы и концентрации мицелл ПАВ, а также ионной силы раствора и pH среды на хроматографическое поведение 17 представителей, относящихся к группам гидрофильных, незаряженных и гидрофобных аминокислот.

Эксперимент

Хроматографирование проводили методом восходящей ТСХ в стандартных герметичных камерах производства ЗАО «Сорбполимер», г. Краснодар. Использовали пластинки «Сорбфил» (сорбент силикагель СТХ-1А, зернение 5-17 мкм, толщина слоя 110 мкм, размер пластинки 100x100 мм), ЗАО «Сорбполимер». Детектирование и количественную обработку хроматограмм проводили на видеоденситометре «Сорбфил», ЗАО «Сорбполимер».

Для приготовления подвижных фаз использовали катионные (хлорид цетилпиридиния (ЦП)), анионные (додецилсульфат натрия (ДДС)) и неионные (третон X-100 (ТХ-100)) ПАВ фирмы Merck с содержанием основного вещества более 99%. Использовали следующие аминокислоты: глицин (Gly), аланин (Ala), валин (Val), лейцин (Leu), изолейцин (Ile), фенилаланин (Phe), триптофан (Trp), а также метионин (Met) и пролин (Pro), которые можно отнести к гидрофобным, поскольку углеводородный радикал аминокислоты не содержит ионизируемых групп. Представителями незаряженных при pH 6-7 аминокислот, способных образовывать водородную связь с молекулами воды и спиртами, были серин (Ser), треонин (Thr), тирозин (Tyr), цистеин (Cys), глутамин (Gln), аспарагин (Asn). Гидрофильными двухзарядными анионами являлись аспарагиновая (Asp), глутаминовая (Glu) кислоты, а двухзарядными катионами – лизин (Lys), аргинин (Arg), гистидин (His).

Стандартные растворы 17 аминокислот в водно-этанольной (1:1) среде (1мг/мл) готовили по точной навеске. Растворы аминокислот (1-2 мкл) наносили микрошприцем на стартовую линию хроматографической пластинки, которую после высушивания нанесенного образца помещали в камеру, предварительно насыщенную парами подвижной фазы. После хроматографирования и проявления пластин раствором нингидрина в ацетоне пластинки сушили в течение 10 мин при 90 °С, охлаждали на воздухе, рассчитывали значения R_f аминокислот, а также

параметры эффективности разделения (число теоретических тарелок (N) и эффективную высоту теоретической тарелки, ВЭТТ (H)) и селективность (α). Ионную силу раствора создавали раствором хлорида натрия. Кислотность раствора создавали уксусно-ацетатным буферным раствором, приготовленным из уксусной кислоты (0.1 моль/л) и ацетата натрия (0.1 моль/л) (рН: 2,7; 2,9; 4,8; 5,2), а так же аммиачным буферным раствором, приготовленным из аммиака (0.1 моль/л) и хлорида аммония (0.1 моль/л) (рН: 10,4).

Обсуждение результатов

Влияние природы ПАВ. Известно, что подвижность сорбатов в мицеллярной ТСХ определяется способностью мицелл сольubilизировать и переносить разделяемые соединения [10]. Сольubilизация, в свою очередь, определяется гидрофобными, электростатическими и донорно-акцепторными взаимодействиями мицелл с компонентами разделяемой смеси. Поскольку молекулы аминокислот содержат одновременно положительно и отрицательно заряженные, а также гидрофобные группы, их сольubilизация должна сильно зависеть от природы ПАВ, что и наблюдалось в эксперименте. Установлено, что величина R_f всех нейтральных и гидрофобных аминокислот в присутствии мицелл ДДС близка к единице, т.е. их смеси не разделяются. Гидрофильные аминокислоты, наоборот, имеют различные R_f , особенно хорошо делятся аргинин и лизин, способные взаимодействовать с отрицательно заряженной мицеллой ДДС как за счет электростатических, так и гидрофобных взаимодействий. В ПФ на основе мицелл катионного ЦП, наоборот, не делятся гидрофильные аминокислоты, а нейтральные и гидрофобные имеют различные величины R_f . В мицеллярных ПФ на основе Тритона X-100 удается разделить только гидрофобные аминокислоты, которые, по-видимому, лучше сольubilизируются неионными мицеллами за счет преимущественно гидрофобных взаимодействий. Некоторые хроматографические характеристики аминокислот в мицеллярных ПФ представлены в табл.1.

Влияние концентрации мицелл ПАВ. Влияние концентрации мицелл ПАВ показано на примере ДДС и лизина с аргинином, разделяемых в этой мицеллярной ПФ (рис. 1). Видно, что с увеличением концентрации ДДС подвижность обеих аминокислот растет, причем увеличивается также величина ΔR_f , т.е. улучшаются как эффективность, так и селективность разделения. Наилучшее разделение лизина и аргинина происходит при концентрации ДДС в ПФ в интервале 0.02-0.04 М. Следует отметить, что меньшая подвижность более гидрофобного лизина соответствует общей тенденции мицеллярной ТСХ и объясняется гидрофобизацией силикагеля при адсорбции ДДС на поверхности сорбента [16].

Однако рост подвижности аминокислоты с увеличением концентрации мицелл ПАВ в ПФ не является общей тенденцией. В ряде случаев, когда величина R_f близка к единице, она при любых концентрациях ПАВ изменяется незначительно. Например, R_f глутаминовой кислоты при изменении концентрации ДДС от 0.01 до 0.05 М изменяется в интервале от 0.85 до 0.87.

Таблица 1. Подвижность (R_f), параметры эффективности (N и H) и селективности (α) разделения некоторых аминокислот в мицеллярных подвижных фазах

Аминокислота	R_f	$N \cdot 10^{-2}$	$H \cdot 10^{-2}$, мкм	α
Arg	0.69	1.24	0.94	9.5
Lys	0.41	1.54	10	8.0
Asp	0.91	9.73	3.6	4,5
Glu	0.86	8.61	2.6	3.8
His	0.56	3.69	2.2	-
ЦПХ, 0.060 М				
Gly	0.77	10.1	1.2	-
Ser	0.90	11.3	2.3	8.3
Met	0.80	6.91	1.1	8.5
Val	0.81	6.42	1.3	8.5
Trp	0.84	7.41	0.56	2.8
Phe	0.74	7.88	0.94	9.4
Pro	0.69	5.44	2.2	-
ТХ-100, 0.024 М				
Val	0.81	8.69	0.63	9.4
Trp	0.84	8.82	1.3	6.2
Phe	0.76	8.02	2.8	7.3
Leu	0.77	8.04	0.71	2.6
Ile	0.80	8.59	0.84	8.2
Pro	0.65	6.42	1.2	-

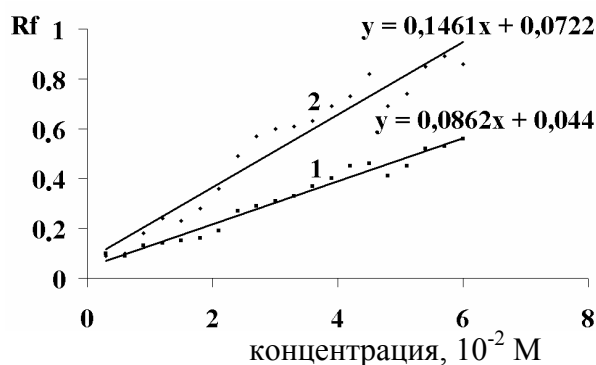


Рис. 1. Влияние концентрации ДДС в подвижной фазе на подвижность аминокислот: 1-лизин, 2-аргинин

Влияние ионной силы раствора. Влияние ионной силы раствора оценивали для мицелл всех типов ПАВ. Увеличение концентрации электролита в растворе «высаливает» аминокислоты из водной среды в менее полярное мицеллярное окружение, т.е. увеличивает их сольubilизацию мицеллами ПАВ. Следствием этого должно быть уменьшение сорбции на неподвижной фазе и увеличение подвижности аминокислот в МПФ, что и наблюдалось в эксперименте (рис.2). Из рис.2 также видно, что увеличение ионной силы раствора вызывает более заметные изменения в величине R_f аминокислот в мицеллах катионного и неионного ПАВ, чем в мицеллах анионного додецилсульфата натрия, что должно быть следствием их более эффективной сольubilизации в мицеллах первых двух типов ПАВ. Вероятно, это также причина более яркой окраски пятен в присутствии солей при действии

нингидрина в присутствии мицелл ЦПХ и Тритона X-100. Увеличение концентрации ПАВ в ПФ при одинаковой ионной силе также приводит к росту R_f аминокислот.

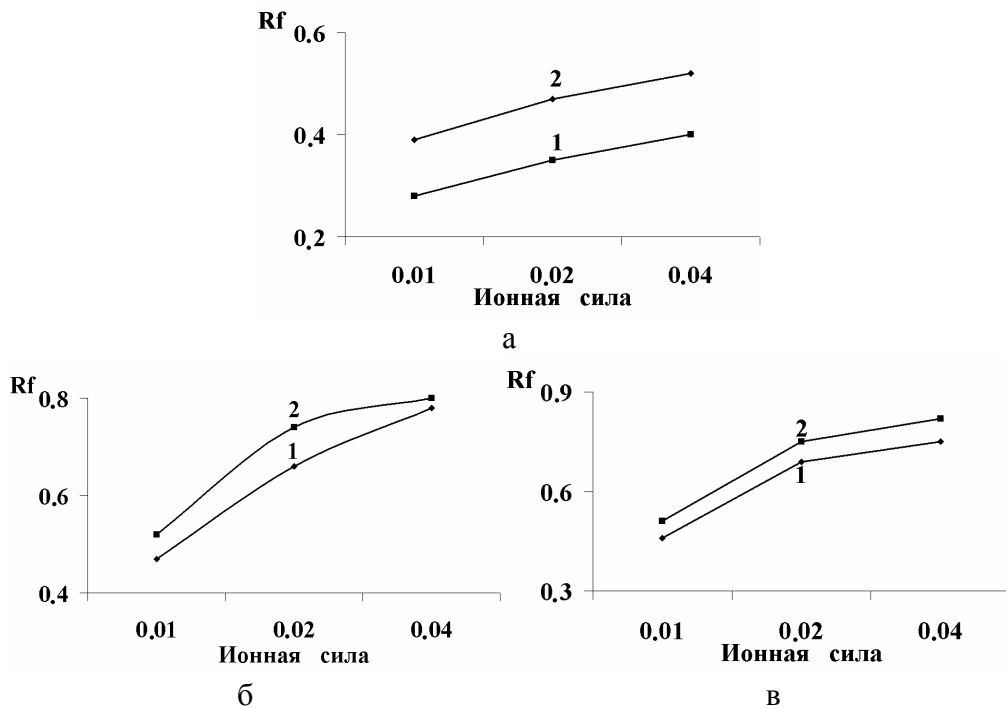


Рис. 2. Влияние ионной силы на подвижность аминокислот в ПФ на основе мицелл ДДС (а); ЦПХ (б); Тритон X-100 (в). $C_{\text{ПАВ}} = 3 \cdot 10^{-2}$ М. 1-лизин, 2-аргинин

Влияние кислотности среды. Влияние кислотности мицеллярной ПФ на подвижность аминокислот показано на рис.3.

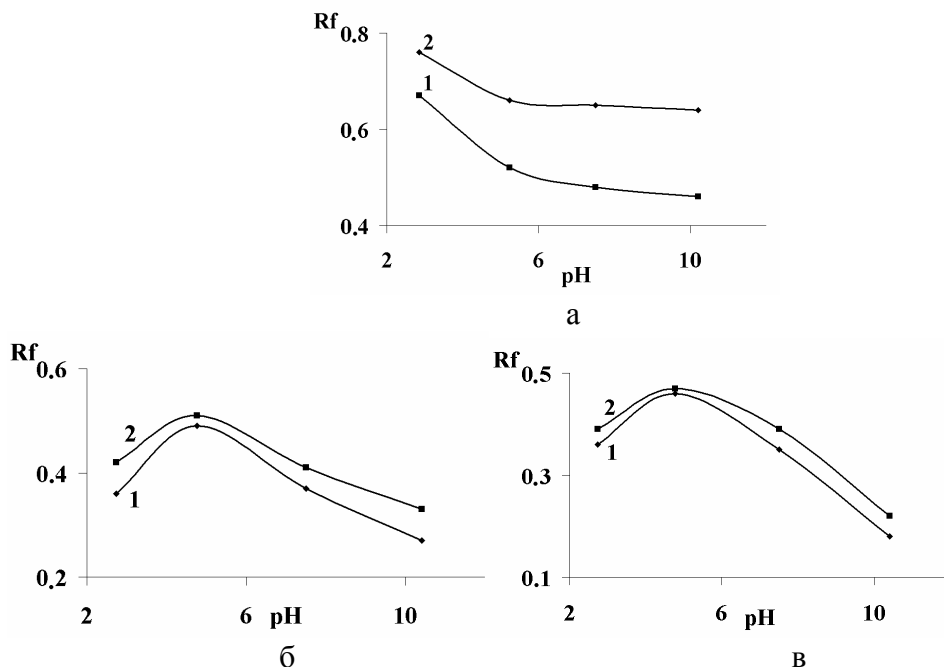


Рис. 3. Влияние кислотности на подвижность аминокислот в подвижных фазах на основе мицелл ДДС (а); ЦПХ (б); Тритон X-100 (в). $C_{\text{ПАВ}} = 3 \cdot 10^{-2}$ М. 1-лизин, 2-аргинин

Видно, что зависимость величины R_f аминокислот в ПФ на основе мицелл катионного и неионного ПАВ проходит через максимум, а в ПФ на основе

анионного ДДС непрерывно уменьшается, причем на зависимости имеется излом и растет величина ΔR_f (эффект дифференцирования). Тем не менее на практике лучше работать в более кислой среде, так как зоны аминокислот в ней более узкие. Следует отметить, что экстремумы на зависимости $R_f - pH$ в ПФ на основе мицелл катионного и неионного ПАВ и излом в мицеллах анионного ДДС приходится на одно и то же значение pH, близкое к 4.5, что, вероятно, связано с изменением химической формы данных аминокислот при диссоциации карбоксильной группы. Нейтральные аминокислоты в ПФ на основе ЦП делятся во всем интервале pH, но лучше в щелочной среде. Разделить нейтральные аминокислоты, варьируя pH среды в мицеллярном растворе TX-100 не удалось, а подвижность гидрофобных аминокислот от кислотности среды практически не зависит.

Практическое применение МПФ. В выбранных оптимальных условиях проведено разделение аминокислот в трех коммерческих объектах: «Фактор роста», «Элтацин» и «ВСАА 1000». Данные препараты повышают толерантность организма к физическим нагрузкам и увеличивают мышечную массу. Пример разделения гидрофильных аминокислот и компонентов БАД «Фактор роста» показан на хроматограмме (рис.4), а количественные данные определения аминокислот в указанных объектах с помощью мицеллярных ПФ на основе различных концентраций ДДС приведены в таблице 2.

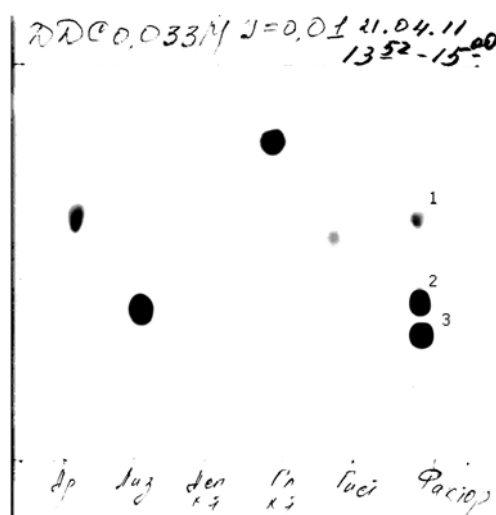


Рис. 4. Пример хроматограммы разделения гидрофильных аминокислот в ПФ на основе 0.03 М ДДС; слева - направо: аргинин, лизин, аспарагиновая, глутаминовая кислоты и гистидин. Цифрами обозначены аминокислоты, разделенные в БАДе "Фактор Роста": 1-аргинин, 2-лизин, 3- орнитин

Для определения аминокислот использовали метод градуировочного графика. Для его построения готовили стандартные растворы аминокислот (1мг/мл). Микрошприцем на стартовую линию пластинки наносили 7 проб объемом от 0.1 до 0.7 мкл. С помощью программы Videodensitometer "Sorbfil", рассчитывали площади пятен. Строили зависимость площади пика от массы пробы, мкг. Как видно из приведенных таблиц, результаты определения в целом соответствуют заявленному содержанию аминокислот в объектах. Таким образом показано, что ПФ на основе мицелл ПАВ позволяют в режиме ТСХ проводить полуколичественную оценку содержания некоторых аминокислот в различных коммерческих БАДах в течение 15-20 минут. Суммарная погрешность, включающая случайную и систематическую составляющую, не превышает 15-20 процентов.

Таблица 2. Содержание аминокислот в 1 грамме объектов, содержащих аминокислоты «Фактор роста» $n = 3$, $P = 0.95$

Аминокислота	R_f	Найдено $m \pm \Delta m$, мг	S_r	Относительная погрешность, %	По паспорту $m_{\text{объект}}$, мг
«Фактор роста», ДДС 0.021 М					
Arg	0.37	83 ± 2	0.06	2.4	100
Lys	0.23	22 ± 1	0.04	4.5	20
«Элтацин», ЦПХ 0.030 М					
Gly	0.91	117 ± 6	0.05	5.1	140
Glu	0.94	128 ± 5	0.06	4.0	140
«ВСАА 1000», ЦПХ 0.045 М					
Val	0.80	177 ± 6	0.05	3.4	192
Leu + Ile	0.74	183 ± 8	0.04	4.4	208

Заключение

Таким образом, проведенное систематическое исследование показало, что варьируя природу и концентрацию мицелл ПАВ в подвижной фазе, ионную силу раствора и pH среды можно проводить разделение аминокислот, относящихся к группам полярных (катионных и анионных), нейтральных или гидрофобных представителей, на пластинках Сорбфил с полярной неподвижной фазой на основе силикагеля. Возможна также быстрая полуколичественная оценка качества коммерческих БАДов, содержащих аминокислоты.

Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2008, Т.1,2. 1206 с.
2. Дебабов В.Г. Биотехнология. М.: Наука, 1994. 425 с.
3. Кленова И.Ф., Яременко Н.А. Ветеринарные препараты в России. М.: Сельхозиздат, 2000. 544 с.
4. Lozanov V., Petrov S., Mitev V. Simultaneous analysis of aminoacid and biogenic polyamines of higher performance liquid chromatography after precolumn derivatization with N-(9-fluorenylenethoxycarbonyloxy) succinide // J. Chromatogr. A, 2004, V. 1025, P. 201–208.
5. Селеменев В.Ф., Хохлов В.Ю., Бобрешова О.В., Аристов И.В., Котова Д.Л. Физико-химические основы сорбционных и мембранных методов выделения и разделения аминокислот. Воронеж, 2001. 300 с.
6. Thongkhao-On K., Kotegoda S., Pulido J.S., Shippy S.A. Determination of amino acids in rat vitreous perfusates by capillary electrophoresis // Electrophoresis, 2004, V.25, P. 2978–2984.
7. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии: в 2 ч. - М.: Мир. 1980. 621 с.
8. Красиков В.Д. Основы планарной хроматографии. – СПб.: Химиздат, 2005. – 232 с.
9. Малахова И.И. Количественная высокоэффективная тонкослойная хроматография аминокислот. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. СПб., 2003. 22 с.

10. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Тюрина Н.В. Поверхностно-активные вещества в тонкослойной хроматографии // Журн. аналит. химии, 2003, Т.58, С.808-818.
11. Armstrong D.W., McNeely M. Use of micelles in the TLC separation of polynuclear aromatic compounds and amino acids // Anal. Lett., 1979, V. 12, P.1285-1291.
12. Sherma J., Sleckman B.P. Chromatography of aminoacids on reversed phase thin layer plates // J. Liq. Chromatogr. 1983, V.6, № 1, P.95-108.
13. Mohammad A. Gupta R. Mobility behavior of amino acids on silica static phase: Micelles activated separations // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, V.65, №.2, P.166-171.
14. Mohammad A. Zehra A. Surfactants modified silica phase for sorption studies of essential amino acids by thin layer chromatography // Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engin. Aspects, 2007, V. 301, № 1-3, P. 404-411.
15. Lepri L., Desideri P.G., Heimler D. Reversed-phase and soap thin-layer chromatography of aminoacids // J. Chromatogr, 1980, V. 195, P. 65-73.
16. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Тюрина Н.В. Тонкослойная хроматография хромофорных индикаторов, хелатообразующих реагентов и хелатов металлов в растворах ПАВ // Сорбционные и хроматографические процессы, 2004, Т.4, Вып. 6. С.750-763.

Штыков Сергей Николаевич – д.х.н., профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского., Саратов

Ворожейкин Сергей Борисович – аспирант кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского, Саратов

Башко Елизавета Сергеевна – студентка 5 курса Института химии Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского, Саратов

Shtykov Sergei N. – Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Division of Analytical Chemistry and Chemical Ecology, Institute of Chemistry, N.G. Chernyshevskii Saratov State University, Saratov
E-mail: shtykovsn@mail.ru

Vorozheikin Sergei B. – post-graduate student, Division of Analytical Chemistry and Chemical Ecology, Institute of Chemistry, N.G. Chernyshevskii Saratov State University, Saratov,
E-mail: deliverer@mail.ru

Bashko Elizaveta S. – student, Institute of Chemistry, N.G. Chernyshevskii Saratov State University, Saratov