



УДК 543.544

Определение важнейших аминокислот в сложных объектах биологического происхождения методом обращённо-фазовой ВЭЖХ с получением фенилтиогидантоинов аминокислот

Руденко А.О., Карцова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный Университет, Санкт-Петербург

Снарский С.И.

Санитарно-ветеринарная лаборатория, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 25.12.2009 г.

Аннотация

Предложена методика определения важнейших аминокислот в сложных матрицах биологического происхождения (солянокислые экстракты предстательной и поджелудочной желёз, комбикорма и образцы мяса) методом обращённо-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием с использованием кислотного гидролиза и модификации аминокислот раствором фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте с получением фенилтиогидантоинов. Установлено влияние pH подвижной фазы на факторы разделения аминокислот. Оптимизированы условия кислотного гидролиза образцов при проведении процедуры пробоподготовки.

Ключевые слова: Высокоэффективная жидкостная хроматография, аминокислоты, экстракт предстательной железы, комбикорм, экстракт поджелудочной железы, мясо, фенилизотиоцианат

The technique of determination of the major amino acids in complex biological matrixes (pancreas and prostata glands, mixed fodders and samples of meat) by reversed-phase HPLC with UV-detection is suggested. The method includes samples hydrolysis with hydrochloric acid and derivatization of amino acids using phenylisothiocyanate solution in isopropanol. Influence of mobile phase pH on resolution of amino acids is established. Conditions of acid hydrolysis at stage of sample preparation are optimised.

Key words: High performance liquid chromatography, amino acids, pancreas and prostata glands, mixed fodder, a pancreas extract, meat, phenylisothiocyanate

Введение

Определение аминокислот является важной аналитической задачей как при определении качества пищевой продукции, так и в клиническом анализе [1].

Усовершенствование техники ВЭЖХ и её широкое практическое применение решает задачи разделения и количественного определения очень малых количеств (10 мг/кг и ниже) определяемых компонентов в сложных

объектах. Отсутствие хромофорных групп в большинстве молекул аминокислот требует стадии дериватизации. Для пред- и постколоночной дериватизации предложены различные реагенты [1, 2, 3, 4, 9].

Так, в [3] на колонке C18 в режиме градиентного элюирования смесью метанол – фосфатный буфер с флуориметрическим детектированием проводили одновременное определение глутатиона, глутамилцистеина и 16 аминокислот с применением *o*-фталевого альдегида в качестве дериватирующего агента. А в [4] при определении десмозина, изодесмозина и 17 других аминокислот использовали нафталиндиальдегид.

Наиболее распространёнными методами определения аминокислот является обращённо-фазовая и катионообменная ВЭЖХ [2], а также электрофоретические методы [9].

Так, в [6] аминокислоты плазмы крови разделили в виде их производных с *o*-фталевым альдегидом менее, чем за 20 мин на колонке C18 с флуориметрическим детектированием с использованием градиентного элюирования смесью вода – фосфатный буфер с добавкой триэтиламина (рН 6.9). В [8] проведено разделение одиннадцати дансильных производных изомеров аминокислот (УФ-детектирование) на β -циклодекстриновой колонке с использованием подвижной фазы метанол – фосфатный буфер (рН 6.5), а в [9] предложен способ определения 16 аминокислот, входящих в состав белков, методом капиллярного электрофореза в режиме мицеллярной электрокинетической хроматографии с использованием фенилизотиоцианатных производных.

Эксперимент

Определение аминокислот проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence, (Япония) с УФ-детектированием (254 нм). Хроматографическая колонка 250x4.6 мм Supelco C18, 5 мкм (США). Хроматографический анализ проводили в градиентном режиме при расходе элюента 1,2 мл/мин (табл. 1) и температуре термостата колонки 40⁰ С. В качестве подвижной фазы использовали смесь 6.0 мМ раствора ацетата натрия с рН 5.5 (компонент А), 1% раствор изопропилового спирта в ацетонитриле (компонент В) и 6.0 мМ раствора ацетата натрия с рН 4.05 (компонент С).

Использовали стандартные образцы следующих аминокислот: аспарагиновая кислота (асп), аспарагин (асн), глутаминовая кислота (глу), глутамин (гли), оксипролин (о-про), серин (сер), глицин (гли), гистидин (гис), аргинин (арг), треонин (тре), аланин (ала), пролин (про), тирозин (тир), валин (вал), лизин (лиз), изолейцин (иле), лейцин (лей), фенилаланин (фен), метионин (мет), цистин (цис) и цистеин (цис-цис), а также дистиллированную воду, ацетонитрил о.с.ч. («Криохром», Россия), изопропиловый спирт о.с.ч. («Вектон», Россия), ацетат натрия о.с.ч., фенилизотиоцианат (ФИТЦ) («Fluka»), соляную кислоту о.с.ч. и гидроксид натрия о.с.ч.

Для построения градуировочной зависимости использовали исходный концентрированный раствор аминокислот в 1 М растворе соляной кислоты. Для этого в пять пробирок помещали соответственно по 150, 100, 50, 25 и 15 мкл исходного раствора и высушивали при 65 °С в токе воздуха, поступающем через капилляр при разряжении, создаваемом водоструйным насосом.

К высушенным аликвотам добавляли 0,10 мл раствора NaOH 0,15 М и тщательно перемешивали. Затем приливали 0,35 мл раствора фенилизотиоцианата в

изопропиловом спирте, перемешивали и добавляли 0,05 мл дистиллированной воды. В случае мутности раствора пробирку прогревали 10-15 с на водяной бане при 60 °С до просветления раствора. Выдерживали 20 мин при комнатной температуре и сразу высушивали на бане при 60 °С в течение 10-15 мин. Сухой остаток растворяли в 1 мл дистиллированной воды и фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. Полученные растворы последовательно вводили в хроматографическую колонку (рис. 1).

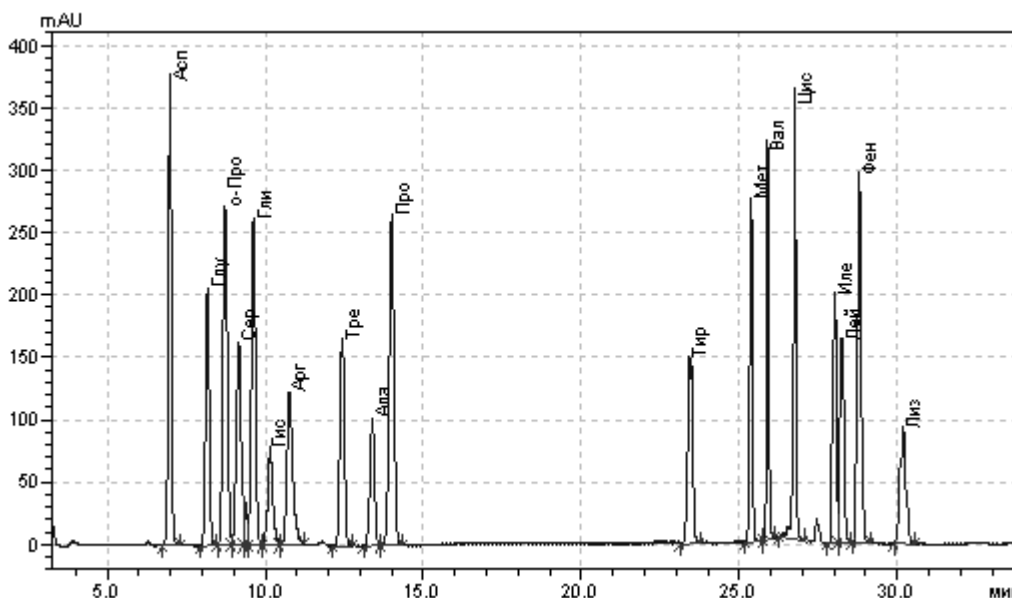


Рис. 1. Хроматограмма стандартной смеси аминокислот после модификации ФИТЦ. Прибор: Shimadzu LC-20 Prominence, детектор диодная матрица. Колонка: Supelco C18 250 x 4,6, 5 мкм. Элюент: ацетатный буфер – ацетонитрил – изопропиловый спирт (см. таблицу 1), λ : 254 нм

Пробоподготовка реальных объектов (мяса, комбикормов, кислотных экстрактов предстательной и поджелудочной желёз) включала кислотный гидролиз проб и модификацию аминокислот раствором фенилизотиоцианата (рис. 2).

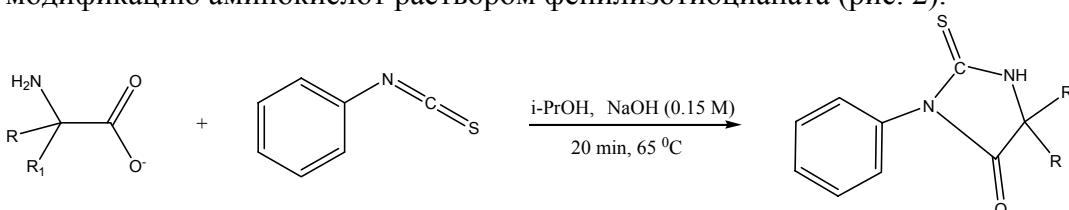


Рис. 2. Получение фенилтиогидантоиновых производных

Для проведения гидролиза в виалы, снабжённые плотно завинчивающимися крышками, помещали 1 мл солянокислого экстракта предстательной (поджелудочной) желёзы или 100 мг гомогенизированного комбикорма (мяса). Далее добавляли 10 мл 6 М раствора соляной кислоты. Смесь тщательно перемешивали и обдували током азота в течение 2 мин. Виалы плотно закрывали крышками и помещали в термостат. Гидролиз проводили при температуре 110° С в течение 17 ч.

После охлаждения гидролизаты фильтровали, перемешивали и отбирали аликвоты 0,5 мл. Аликвоты высушивали при 65 °С в токе воздуха, аналогично описанному выше способу.

К высушенным аликвотам добавляли 0,10 мл раствора NaOH 0,15 М и тщательно перемешивали. Затем приливали 0,35 мл раствора фенилизотионата в изопропиловом спирте, перемешивали и добавляли 0,05 мл дистиллированной воды. Растворы выдерживали 20 мин при комнатной температуре и сразу высушивали на бане при 60 °С в течение 10-15 мин. Сухой остаток растворяли в 1 мл дистиллированной воды и фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Полученные растворы подвергали хроматографическому анализу (рис. 3).

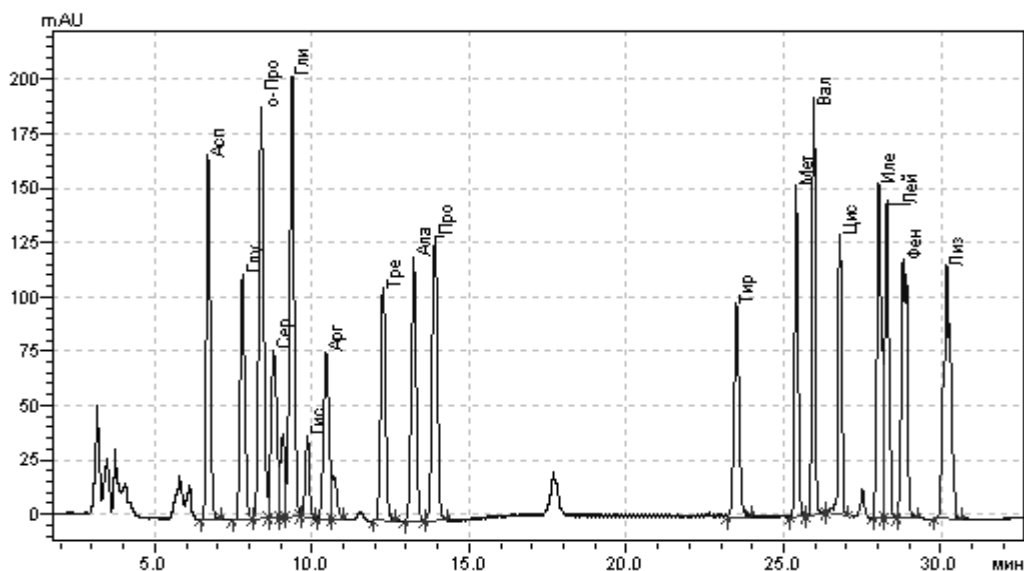


Рис. 3а. Хроматограмма пробы мяса после кислотного гидролиза и модификации ФИТЦ. Прибор: Shimadzu LC-20 Prominence, детектор диодная матрица. Условия: см. Рис. 1.

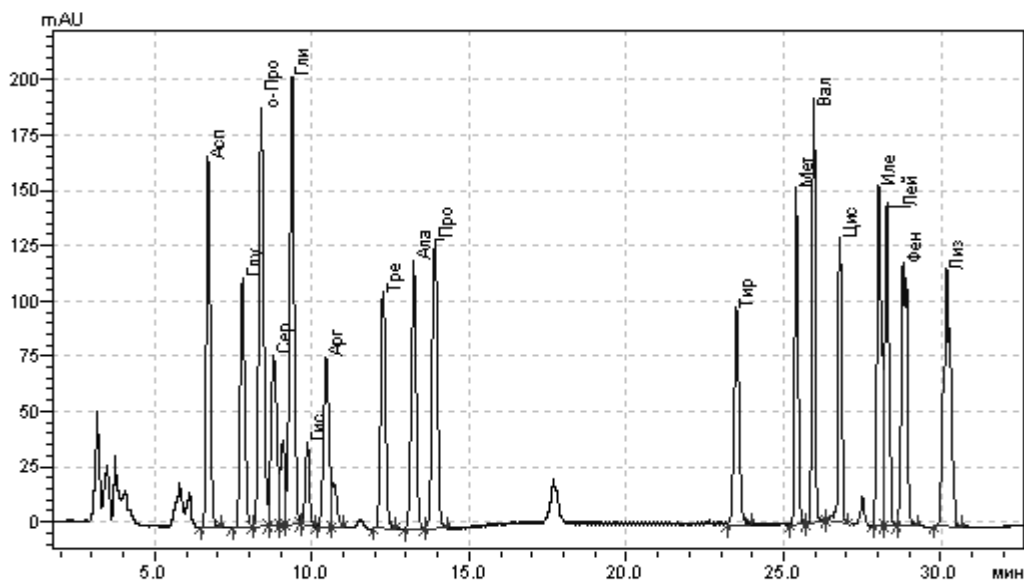


Рис. 3б. Хроматограмма экстракта предстательной железы после кислотного гидролиза и модификации ФИТЦ. Прибор: Shimadzu LC-20 Prominence, детектор диодная матрица. Условия: см. Рис. 1

Результаты и их обсуждение

На стандартных смесях оптимизированы условия хроматографического разделения аминокислот. Установлено, что разделение аминокислот обеспечивается за счёт уменьшения рН подвижной фазы, т.е при переходе от ацетатного буфера с рН 5.5 к буферу с более низким значением рН (4.05) (табл. 1).

Таблица 1. Условия градиентного элюирования

Время, мин	Объемная доля компонента, %		
	А	В	С
0,01	96	4	0
10	37	11	52
13	88,5	11,5	0
21	80	20	0
22	58	22	20
24	0	24	76
32	0	33,5	66,5
32,01	20	80	0
35,3	20	80	0
35,31	97	3	0
41,3	97	3	0

Проблему разделения пиков лейцина и изолейцина, имеющих близкие хроматографические параметры, удалось решить при варьировании состава и рН подвижной фазы на завершающем участке хроматограммы. При этом установлено влияние рН буфера С на разделение этих компонентов (рис. 4).

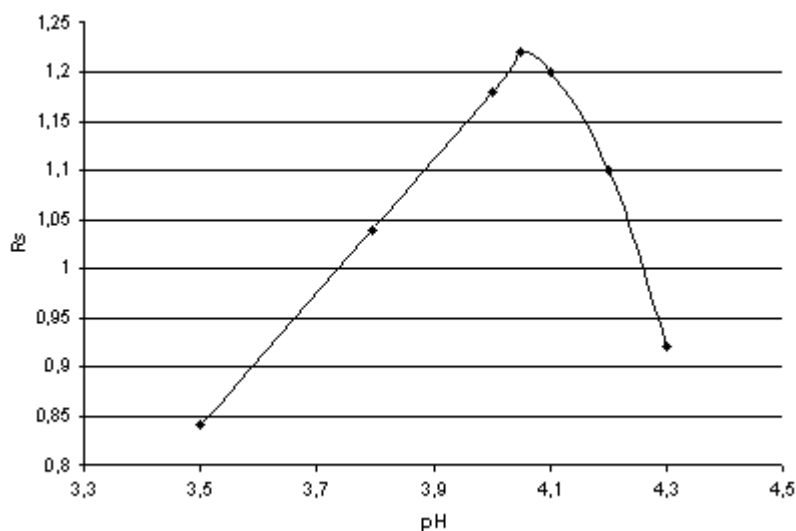


Рис. 4. Влияние рН подвижной фазы (компонента С) на разделение лейцина и изолейцина

При уменьшении содержания компонента С в составе элюента наблюдалось улучшение разделения *ФИТЦ*-производных этих аминокислот.

Одним из определяющих факторов на степень разделения аминокислот явилась температура хроматографической колонки. Особенно важным это оказалось для пар лейцин – изолейцин и аланин – пролин. Даже незначительное изменение

температуры хроматографической колонки приводило к существенному изменению факторов разрешения для этих компонентов. Как видно из рис. 5 оптимальной является значение температуры 40⁰ С.

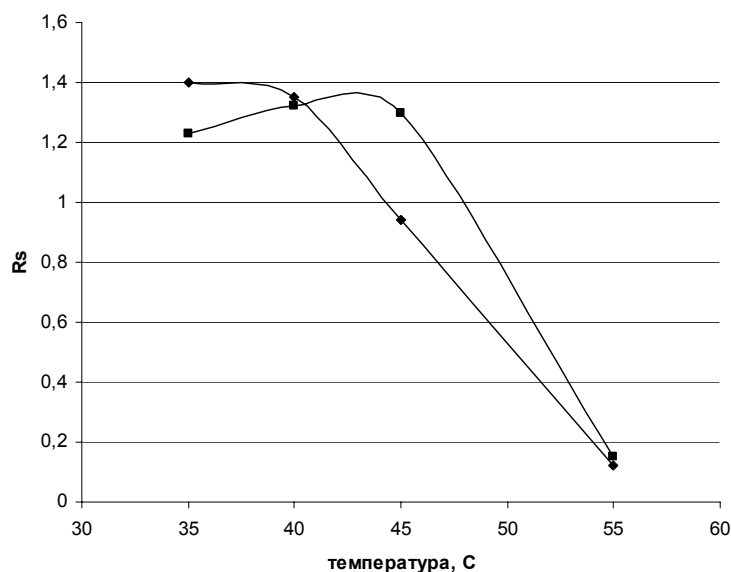


Рис. 5. Зависимость факторов разрешения лейцин-изолейцин и аланин-пролин от температуры хроматографической колонки

Для расщепления пептидных фрагментов и белков, входящих в состав реальных объектов (экстракты предстательной и поджелудочной желёз, комбикорма и образцы мяса) разработана процедура кислотного гидролиза образцов, позволяющая анализировать различные по природе и составу объекты. Таким образом, модификация аминокислот (получение *ФИТЦ*-производных) существенно повысила чувствительность детектирования. Удалось определить полный аминокислотный состав анализируемых объектов (табл. 2).

Таблица 2. Содержание аминокислот в реальных объектах (N = 5, P = 0.95)

Название компонента	Концентрация аминокислот в пробе мяса, г/кг	Концентрация аминокислот в экстракте предстательной железы, мг/мл	Концентрация аминокислот в экстракте поджелудочной железы, мг/мл	Концентрация аминокислот в комбикорме, г/кг
1	2	3	4	5
Аспарагиновая к-та + аспарагин (асп+асн)	9,08±0.31	0,087±0.005	0,085±0.009	1,07±0.23
Глутаминовая к-та + глутамин (глу+глин)	7,53±0.75	0,051±0.006	0,0010±0.0003	0,53±0.05
Оксипролин (о-про)	12,03±0.93	0,017±0.002	0,0041±0.0008	2,03±0.08
Серин (сер)	3,06±0.45	0,020±0.003	0,0022±0.0005	3,11±0.21

Таблица 2. (продолжение)

1	2	3	4	5
Глицин (гли)	13,78±0.81	0,032±0.008	0,0014±0.0002	1,87±0.25
Гистидин (гис)	3,41±0.82	0,400±0.006	0,013±0.003	3,55±0.34
Аргинин (арг)	10,06±0.78	0,069±0.008	0,0040±0.0007	1,42±0.21
Треонин (тре)	6,36±0.99	0,029±0.003	0,0061±0.0005	<0.04
Аланин (ала)	6,21±0.95	0,031±0.005	0,0033±0.0006	<0.04
Пролин (про)	5,03±0.84	0,073±0.009	0,0051±0.0007	0,031±0.008
Метионин (мет)	7,57±0.62	0,574±0.009	0,066±0.004	2,64±0.31
Тирозин (тир)	6,25±1.01	0,041±0.004	0,0058±0.0004	3,15±0.41
Валин (вал)	13,35±0.96	0,052±0.005	0,0021±0.0003	1,21±0.27
Изолейцин (иле)	9,37±0.65	0,068±0.008	0,0026±0.0004	0,39±0.04
Лейцин (лей)	9,21±0.87	0,166±0.011	0,0082±0.0006	1,02±0.11
Фенилаланин (фен)	8,50±0.68	0,148±0.01	0,0111±0.0013	<0.03
Цистеин + цистин (цис+цис-цис)	4,04±0.92	0,037±0.008	<0.0001	1,13±0.12
Лизин (лиз)	19,53±1.23	<0.013	<0.0001	0,57±0.07

Список литературы

1. Садек П. Растворители для ВЭЖХ, М.: «Бином», 2006. 703 с.
2. Introduction to HPLC, Shimadzu, Japan, 2008
3. Noctor G., Foyer C. Simultaneous Measurement of Foliar Glutathione, Glutamylcysteine, and Amino Acids by High-Performance Liquid Chromatography: Comparison with Two Other Assay Methods for Glutathione // J. Anal. Biochem. 1998. V. 264. P. 98.
4. Lunte S. M., Mohabbat T., Wong O.S., Kuwana T. Determination of desmosine, isodesmosine, and other amino acids by liquid chromatography with electrochemical detection following precolumn derivatization with naphthalenedialdehyde/cyanide // J. Anal. Biochem. 1989. V. 202. P. 178.
5. Буланова А.В., Полякова Ю.Л. Хроматография в медицине и биологии, Самара: 2006. 105 с.
6. Teerlink T., van Leeuwen P.A.M., Houdijk A. // J. Clin. Chem. 1994. V. 245. P. 40.
7. Государственная фармакопея СССР, Т. 2. М.: «Медицина», 1990. 397 с.
8. Fujimura K., Suzuki S., Hayashi K., Masuda S. // J. Anal. Chem. 1990. V. 198. P. 62.
9. Poboży E., Czarkowska W., Trojanowicz M. Determination of amino acids in saliva using capillary electrophoresis with fluorimetric detection // J. Biochem. and Biophys. Meth. 2006. V. 67. P. 37-47.

Руденко Андрей Олегович – аспирант кафедры аналитической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, тел. (812) 428-40-44

Карцова Людмила Алексеевна – д.х.н., проф. кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург

Снарский Сергей Иосифович – к.б.н., зав. отделом санитарно-ветеринарной лаборатории Санкт-Петербурга, Санкт-Петербург

Rudenko Andrey O. – the post-graduate student of analytic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, e-mail: andrew_r@inbox.ru

Kartsova Ludmila A. – Dr.Sc.Chem. the professor of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, e-mail: kartsova@gmail.com

Snarskiy Sergey I. – Cand.Sc.Biol. The head of department of veterinary laboratory, St. Petersburg