

УДК 543.545

## ПОЛУЧЕНИЕ ФЕНИЛТИОГИДАНТОИНОВ АМИНОКИСЛОТ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

К.В. Степанов, А.В. Пирогов, М.А. Дикунец, О.А. Шпигун

*(кафедра аналитической химии)*

Предложена методика получения фенилтиогидантоинов 16 аминокислот для анализа методом капиллярного электрофореза в режиме мицеллярной электрокинетической хроматографии. Способ получения производных включает в себя реакцию гидролизата белка с фенилизотиоцианатом с последующей циклизацией фенилтиокарбаматных производных в трифторуксусной кислоте. Содержание побочных продуктов после дериватизации и очистки было определено методом ВЭЖХ. Предложены дополнительные процедуры очистки фенилтиокарбаматов и фенилтиогидантоинов аминокислот от побочных продуктов и ионогенных примесей. Методика опробована при анализе гидролизатов протеина и рыбной муки.

Анализ аминокислотного состава пищи (определение общего количества аминокислот в образце) – важная аналитическая задача. Как правило, объектом анализа являются образцы с высоким содержанием липидов и углеводов, а также неорганических солей. Наиболее распространенные методы анализа аминокислотного состава – ионная хроматография с пост-колоночной дериватизацией, а также обращеннофазовая ВЭЖХ с фотометрическим детектированием. Эти методы обеспечивают довольно быстрое и точное определение аминокислотного состава, однако для их применения требуется сложная аппаратура [1, 2]. Существующие методы дериватизации аминокислот фенилизотиоцианатом [3] обладают рядом недостатков, затрудняющих их использование для мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ). Сдерживающим фактором является отсутствие адсорбционного удерживания стационарной фазой в методе капиллярного электрофореза, что приводит к появлению пиков примесей и затрудняет идентификацию ФТГ-аминокислот. Таким образом, МЭКХ в отличие от ВЭЖХ требует дополнительной очистки продуктов дериватизации аминокислот от побочных продуктов и ионогенных соединений. Для преодоления проблем с идентификацией пиков предложена двухстадийная процедура дериватизации аминокислот фенилизотиоцианатом с получением фенилтиогидантоинов аминокислот в качестве конечного продукта дериватизации. В ходе дериватизации образуются такие побочные продукты, как диметилфенилтио-

мочевина, дифенилтиомочевина и алкилтиомочевины [3, 4]. В настоящей работе сравниваются различные процедуры дериватизации и очистки смеси производных для получения минимальных количеств побочных продуктов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали бидистиллированную воду, этанол “ч.д.а”, триэтиламин (“Acros Organics”, США), трифторуксусную кислоту (“Sigma”, США), фенилизотиоцианат (“Acros Organics”, США), а также набор аминокислот (“ICN”, США) и стандартную смесь 18 аминокислот. Определение аминокислот проводили на системе капиллярного электрофореза “Капель-105” (“Люмэкс”, Россия) с программой обработки данных “Мультихром” (“Амперсенд”, Россия). Рабочая длина волны детектора 270 нм или 195 нм для более чувствительного детектирования. Эффективная длина капилляра 35 см до детектора, напряженность электрического поля 580 В/см. Анализируемую смесь вводили избыточным давлением 20 мБарр в течение 10 с. Буферный раствор, содержащий 25 мМ додецилсульфата натрия, 1,8 мМ тетрабората натрия и 10,7 мМ дигидрофосфата натрия, использовали для всех электрофоретических разделений.

### Условия разделения аминокислот

Для разделения ФТГ – производных аминокислот – использовали капилляр с эффективной длиной 40 см и диаметром 50 мкм. При проведении анализов напря-

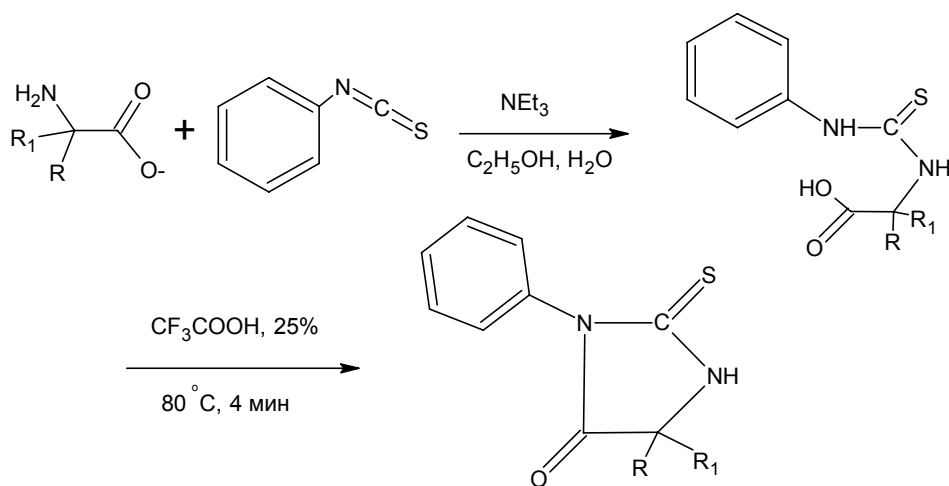


Рис. 1. Схема реакций получения ФТГ-производных аминокислот

жение составляло 25 КВ. Пробу вводили избыточным давлением 20 мБарр в течение 10 с. Для приготовления рабочего буферного раствора и растворов аминокислот использовали бидистиллированную воду.

### Результаты и обсуждение

#### Гидролиз образцов белка

В ампулу объемом 2 мл вносили навеску 20 мг рыбной муки или 15 мг молочного протеина, далее в ампулу добавляли 1 мл раствора, содержащего 6 М соляной кислоты и 0,1% фенола. Перед запайкой ампулу продували аргоном. Гидролиз проводили в течение 20 ч при температуре 110°C в сушильном шкафу. По окончании гидролиза пробы оставляли охлаждаться до комнатной температуры и фильтровали, используя целлюлозоацетатный фильтр с размером пор 0,22 мкм (*“Владипор”*, Россия). Фильтр промывали 1 мл воды, после чего фильтраты объединяли. Полученный раствор использовали в тот же день.

#### Получение ФТГ-производных аминокислот

Аликвоту 50 мкл смеси аминокислот или 100 мкл гидролизата белка вносили в сухую пробирку и упаривали досуха в вакууме при нагревании до 40°C. Далее к сухому остатку добавляли либо 50 мкл смеси этанол:триэтиламин в соотношении 2:1, либо 100 мкл раствора триптофана 1 мг/мл в смеси этанол:триэтиламин (2:1), и упаривали досуха. К полученным таким образом основным формам аминокислот добавляли 50 мкл дериватирующей смеси, содержащей этанол:триэтиламин:воду:фенилизотиоцианат в объемных

соотношениях 7:1:1:1 и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. Растворители и избыток фенилизотиоцианата отгоняли в вакууме при комнатной температуре до образования вязкого остатка. К остатку, содержащему фенилизотиоцианат и ФТГ-аминокислоты, добавляли 100 мкл воды и перемешивали. Далее проводили очистку ФТГ-производных от фенилизотиоцианата экстракцией. Для этого к пробе добавляли 100 мкл смеси гексан:этилацетат (7:1) и встряхивали в течение 30 с, после этого верхний слой отбрасывали, операцию повторяли 3 раза до получения гомогенного раствора.

#### Циклизация ФТГ-производных аминокислот

К 100 мкл раствора ФТГ-производных аминокислот добавляли 100 мкл 50%-й трифторуксусной кислоты в 2 М HCl. Полученную смесь переносили в водяную баню и нагревали в течение 4 мин. Затем смесь охлаждали и проводили экстракцию ФТГ-производных этилацетатом. Для этого в пробирку, содержащую 200 мкл смеси, вносили 400 мкл этилацетата и встряхивали в течение 1 мин. После расслаивания смеси собирали раствор производных аминокислот в этилацетате (верхний слой). Последующие два цикла экстракции проводили, используя порции по 200 мкл этилацетата. Экстракты объединяли и упаривали в вакууме досуха при нагревании (30–40°C) на водяной бане. Полученный сухой остаток растворяли в электрофоретическом буферном электролите или в ацетонитриле. Схема реакции представлена на рис. 1.

Определение количества тиомочевины в реакционной смеси на различных стадиях дериватизации прово-

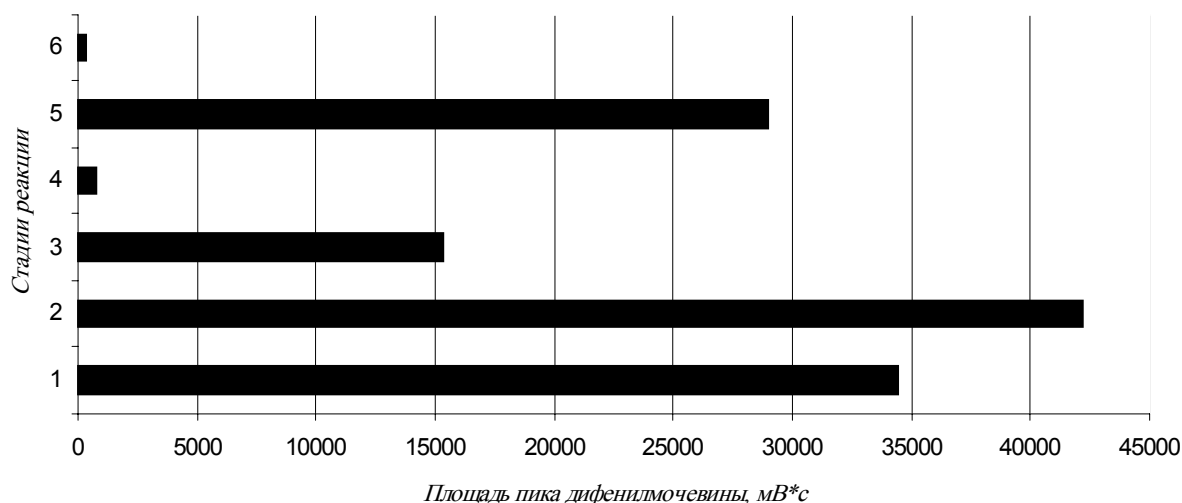


Рис. 2. Содержание дифенилмочевины на различных стадиях пробоподготовки: 1 – получение ФТК-аминокислот при 20°C; 2 – получение ФТК-аминокислот при 55°C; 3 – после обработки реакционной смеси, полученной при 20°C смесью гексан:этилацетат (7:1); 4 – смесь, полученная при 20°C после циклизации при 80°C; 5 – смесь, полученная при 20°C после циклизации при 55°C; 6 – смесь ФТГ-аминокислот, приготовленная по предлагаемой методике, включающей образование ФТК-производных, очистку продукта, циклизацию при 80°C с последующей экстракцией ФТГ-аминокислот этилацетатом. Объемы всех исследуемых смесей были доведены до 2 г по массе дистиллированной водой

дили методом ВЭЖХ. Для этого продукты реакции, полученные в разных условиях, растворяли в ацетонитриле и разделяли на жидкостном хроматографе с фотометрическим детектором с рабочей длиной волны 240 нм.

Процесс дериватизации аминокислот характеризуется соотношением полученных производных и образованием побочных продуктов в результате реакции. Основными побочными продуктами являются различные производные тиомочевины, которые затрудняют разделение и идентификацию производных аминокислот [4].

Сравнение выходов дифенилтиомочевины в ходе реакции образования ФТК-аминокислот в различных условиях показано на рис. 2. Видно, что при повышении температуры на первой стадии реакции дериватизации количество дифенилтиомочевины значительно возрастает. Таким образом, оптимальными условиями дериватизации можно считать температуру 25°C и время реакции 20 мин. Из данных, представленных на рис. 2, следует, что процедура экстракции фенилизотиоцианата позволяет наряду с избытком фенилизотиоцианата удалить значительную часть дифенилтиомочевины. Упаривание в вакууме также позволяет удалить фенилизотиоцианат, однако требует

нагрева и значительных затрат времени, при этом выход продуктов побочных реакций, по-видимому, увеличивается.

Таким образом, наиболее оптимальной, на наш взгляд, является процедура упаривания растворителей с последующей экстракционной очисткой. Типовые электрофореграммы смеси ФТГ-аминокислот представлены на рис. 3, 4.

Стадия циклизации аминокислот может быть охарактеризована выходом производных аминокислот и одновременным разложением производных тиомочевины. Показано, что при температуре 80°C достигается наиболее полное разложение дифенилтиомочевины, а также сокращается время проведения реакции без значимого изменения выхода производных аминокислот. Количество аминокислот определяли методом капиллярного электрофореза. Было показано, что различия в температуре и времени реакции слабо влияют на количественные оценки, сделанные по методу внутреннего стандарта с использованием триптофана. Наибольшее влияние температуры протекания реакции на количественную оценку было отмечено для ФТГ-треонина. Проведение реакции при 80°C и использование триптофана в качестве внутреннего стандарта обусловило среднеквадратичное отклонение 18%.

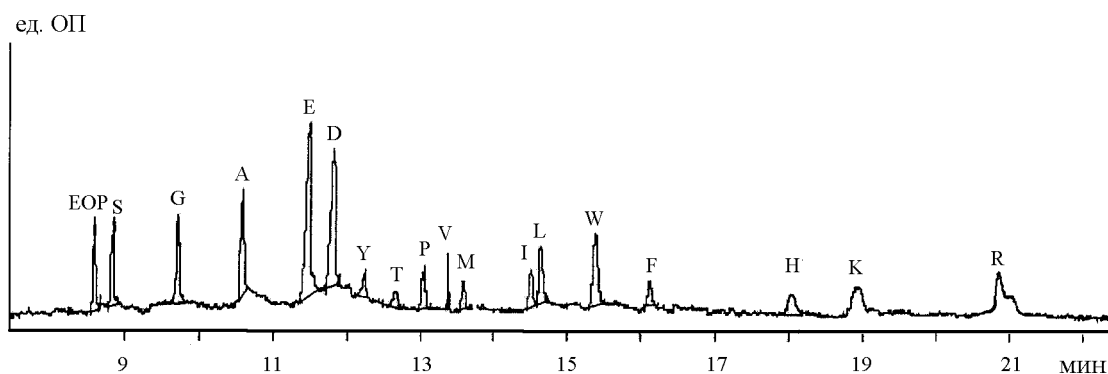


Рис. 3. Электрофореграмма гидролизата рыбной муки со стандартной добавкой 0,1 мг триптофана на капилляре 40 см×50 мкм, длина волны детектора 195 нм, 25 КВ. Буферный раствор – 25 мМ додецилсульфата натрия, 1,8 мМ тетрабората натрия и 10,7 мМ дигидрофосфата натрия

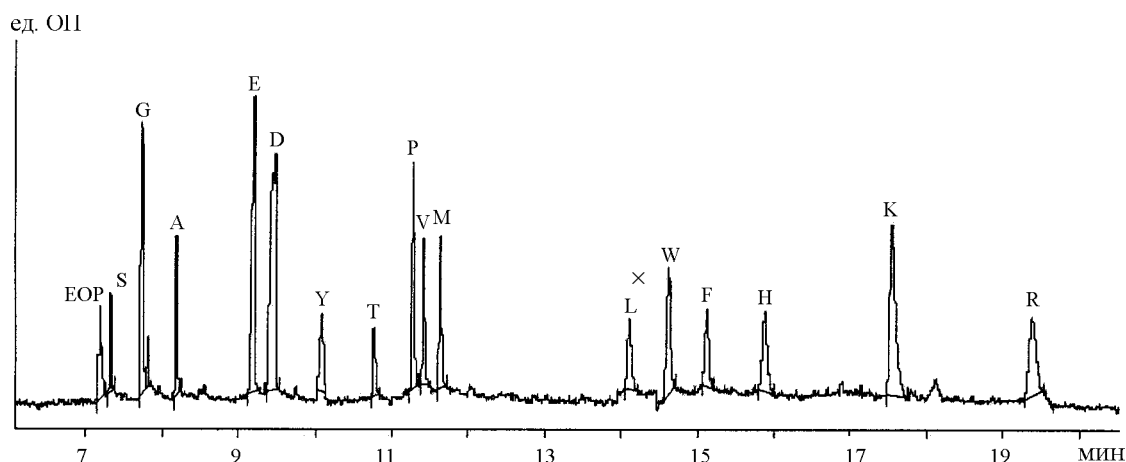


Рис. 4. Электрофореграмма гидролизата молочного протеина со стандартной добавкой 0,1 мг триптофана (30% углеводов, 70% протеина, жиров менее 1%) на капилляре 40 см×50 мкм, длина волны детектора 195 нм, 25 КВ. Буферный раствор – 25 мМ додецилсульфата натрия, 1,8 мМ тетрабората натрия и 10,7 мМ дигидрофосфата натрия

Таким образом, установлено, что оптимальными условиями являются температура 80°C и время дериватизации 4 мин. Предложена методика дериватизации, включающая получение ФТК-производных при 20°C и времени реакции 20 мин, процедуру экстракции избытка фенилизотиоцианата смесью гексан:этилацетат (7:1) и процедуру циклизации ФТК-производных аминокислот при 80°C в течение 4 мин. Данный вариант дериватизации был взят за основу для последующих экспериментов.

В качестве заключительной стадии подготовки образца к электрофоретическому анализу была использована экстракция. Экстракция производных этилацета-

том ведет к незначительной потере производных, однако позволяет удалить ионогенные примеси матрицы и дает практически чистые производные, что необходимо для воспроизводимого разделения аминокислот методом капиллярного электрофореза. Потери производных аминокислот при экстракции оценивали методом капиллярного электрофореза. Для этого ФТГ-производные аминокислот извлекали из раствора трифторуксусной кислоты смесью гексан:этилацетат (7:1).

Полученный раствор трифторуксусной кислоты упаривали в вакууме при нагревании до 40°C досуха. Далее в пробирку добавляли 0,5 мл электрофоретического буфера и оставляли стоять 30 мин, периодически

ополаскивая стенки пробирки буферным раствором. Анализ полученной смеси показал наличие пиков аминокислот на пределе обнаружения прибора.

Производные таких аминокислот, как глицин и серин, по-видимому, экстрагируются без значительных потерь, так как сравнение значений концентрации аминокислот, полученных без экстракции, со значениями концентрации аминокислот, полученных по методике с применением экстракции, не подтвердило потерь производных. Однако следует отметить, что для глицина и серина наблюдаемая относительная погрешность количественного определения может достигать 38 и 41% соответственно в случае

реального объекта, вследствие неполного разрешения пиков, а также возможных потерь серина при гидролизе [1].

Таким образом, был предложен новый вариант проведения реакции дериватизации, позволяющий анализировать реальные объекты методом капиллярного электрофореза. Показано, что использование данного метода позволяет получать производные аминокислот, свободные от соединений, мешающих электрофоретическому разделению без значительных потерь аминокислот. Предлагаемая схема проведения дериватизации успешно опробована при анализе реальных объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fountoulakis M., Lahm H.-W.* // J. Chromatogr. A 1998. **826**. P. 109.
2. *Campanella L., Crescentini G., Avino P.* // J. Chromatogr. A 1999. **833**. P. 137.
3. *Okiyama N., Santa T., Toriba A., Imai K.* // Anal. Chim. Acta. 2001. **429**. P. 293.
4. *Bjergegaard C., Möller P., Sørensen H., Sørensen J., Sørensen S.* // J. Chromatogr. A 1999. **836**. P. 115.

Поступила в редакцию 13.08.04

## A TECHNIQUE OF SYNTHESIS OF AMINO ACID PHENYLTHIOHYDANTOINES FOR THE QUANTITATIVE PROTEIN COMPOSITIONAL ANALYSIS USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS

K.V. Stepanov, A.V. Pirogov, M. A. Dikunetz, O.A. Shpigun

A technique for the derivatization of amino-acids with phenylisothiocyanate has been developed for the capillary electrophoretic applications. The derivatization technique based on the reaction between of dried amino-acid's hydrolysate and phenylisothiocyanate with the following cyclization of phenylthiocarbamates in an aqueous solution of a trifluoroacetic acid (a scheme is presented). An additional procedure of the sample and the derivatives purification for capillary electrophoresis is described. The by-products of the derivatization and purification procedures were separated, determined and compared by HPLC. The technique has been tested on samples of a protein hydrolyzate and a fish flour.