

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА НЕКОТОРЫХ
РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ АРМЕНИИ,
МЕТОДОМ ПОЛУЧЕНИЯ ИХ ОРТО-ФТАЛАЛЬДЕГИДНЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ**

А. О. ЦАТУРЯН^{а,б}, Э. В. МИНАСЯН^а, А. С. ДАДАЯН^{а,б} и Л. А. СТЕПАНЯН^а

^а Научно-производственный центр “Армбиотехнология”
НАН Республики Армения

Армения, 0056, Ереван, ул. Гюрджяна, 14
Факс: (374-10)654180, E-mail: avetis-tsaturyan@yandex.ru

^б Ереванский государственный университет
Институт фармации

Армения, 0025, Ереван, ул. А. Манукяна, 1

Поступило 26 VII 2018

Исследован аминокислотный состав образцов трилистника, расторопши, грушанки и ягоды годжи методом получения их орто-фталальдегидных производных. Исследования проведены на аминокислотном анализаторе “Shimadzu Nexera X2” (Japan) с флуоресцентным детектором при длине волн ex350-em450 нм. В качестве неподвижной фазы была использована хроматографическая колонка “Novo-Pak C 18, 4 μ m, 3.9×150 mm”, а элюирование анализов проводили в градиентном режиме.

Рис. 7, библиограф. ссылок 11.

Аминокислоты считаются весьма сложным объектом для химического анализа. Это обусловлено, во-первых, наличием в молекулах гидрофобных (неполярные углеводородные фрагменты) и гидрофильных (карбоксо-, amino-, гидроксо- и меркапто-) группировок. Во-вторых, амфотерный характер аминокислот, за счет наличия в структуре основных и кислотных функций, приводит к возникновению в нейтральных растворах аминокислоты цвиттер-иона [1]. Поэтому при анализе аминокислот необходимо учитывать величину изоэлектрической точки (рН растворов).

Аминокислотный анализ является хорошо изученным и в то же время развивающимся разделом современной аналитической химии.

Определение аминокислот в продуктах питания, напитках и лекарственных препаратах имеет большое значение для контроля технологии производства, оценки качества сырья и готовой продукции, выявления фальсификатов.

К сожалению, несмотря на наличие большого числа методов анализа, как правило, их применение для анализа аминокислот бывает неприемлемо.

Спектральные методы (УФ-, ИК-, ЯМР-) не могут быть использованы для анализа многокомпонентных смесей. По той же причине не информативны спектрофотометрия и фотоэлектроколориметрия. Большинство хроматографических методов (БХ, ТСХ, ГХ, ионообменная хроматография), как правило, не позволяют эффективно разделить аминокислотные смеси, а следовательно, и достичь целей анализа. Масс-спектрометрия в силу высокой стоимости оборудования и себестоимости одного анализа пока не доступна для широкого применения [2-4].

В настоящее время наиболее перспективным и результативным в анализе многокомпонентных аминокислотных смесей является метод ВЭЖХ, позволяющий не только за один аналитический процесс разделить и провести качественный и количественный анализ большинства эссенциальных аминокислот, но и определить оптические изомеры, что является одной из главных задач фармацевтического анализа [5-11].

Следует отметить, что в настоящее время единые подходы к определению аминокислот в различных объектах отсутствуют. На основании вышеизложенного актуальной задачей является разработка доступных и удобных методов анализа аминокислот в различных объектах.

Экспериментальная часть

Разделение аминокислот осуществлялось на аминокислотном анализаторе "Shimadzu Nexera X2" (Japan) с флуоресцентным детектором RF-20A "Shimadzu". Для разделения аминокислот использовали хроматографическую колонку "Novo-Pak C 18, 4 μ m, 3.9×150 mm". Разделения аминокислот осуществлялись в градиентном режиме элюирования, в качестве подвижной фазы были использованы: А) ацетонитрил:метанол:вода = 45:40:15 (об/об); Б) фосфатный буфер pH=7, скорость потока составляла 0.5 мл/мин, детектирование проводилось при длине волны ex350-em450 нм, температура колонки – 30°C, объем инъекции – 10 μ l. Использовались химические реактивы и элюенты (MeCN, MeOH, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, HCl, орто-фталдальдегид реагент CAS: 643-79-8) фирмы Sigma-Aldrich со степенью чистоты > 99.9 %.

Все изученные образцы были представлены лабораторией галеновых новогаленовых препаратов НПЦ "Армбиотехнология" НАН РА.

Описание методики. Определение аминокислот основано на получении их орто-фталальдегидных производных (рис. 1).

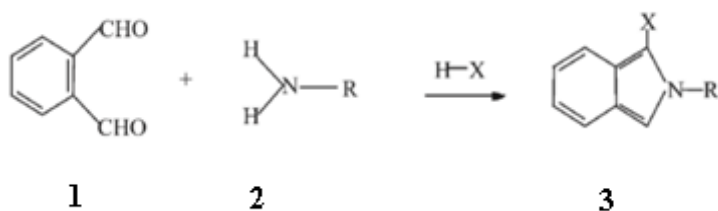


Рис. 1. Схема образования флуоресцирующих (3) продуктов реакции аминокислот (2) с орто-фталевым альдегидом (1) в присутствии нуклеофильных реагентов. 3 – (1-Х-замещенный)-2-*R*-изоиндол, где *R* – остаток аминокислоты; *X* – нуклеофильный агент (HSC₂H₂OH – 2-меркаптоэтанол), стандартно используемый для флуориметрического определения аминокислот.

Модельный раствор аминокислотной смеси с концентрацией 2.5 М/мл разбавляли 0.01 Н соляной кислотой, и с целью освобождения от механических и нерастворившихся мелких частиц раствор фильтровали с помощью фильтра с размером пор 0.2 микромметр, затем раствор образца вставляли в автосамплер.

Приготовленные образцы и дериватирующий реагент помещались в автосамплер, где при температуре 5°C автоматически происходил процесс получения ортофталевых производных аминокислот, без вмешательства хроматографиста. Результаты анализа отображались на экране компьютера в виде хроматограммы, а программное обеспечение "LabSolution" позволяло автоматически интегрировать полученные пики.

Результаты и их обсуждение

Для проверки воспроизводимости метода была построена калибровочная кривая для четырех разных концентраций аминокислотной модельной смеси (рис. 2).

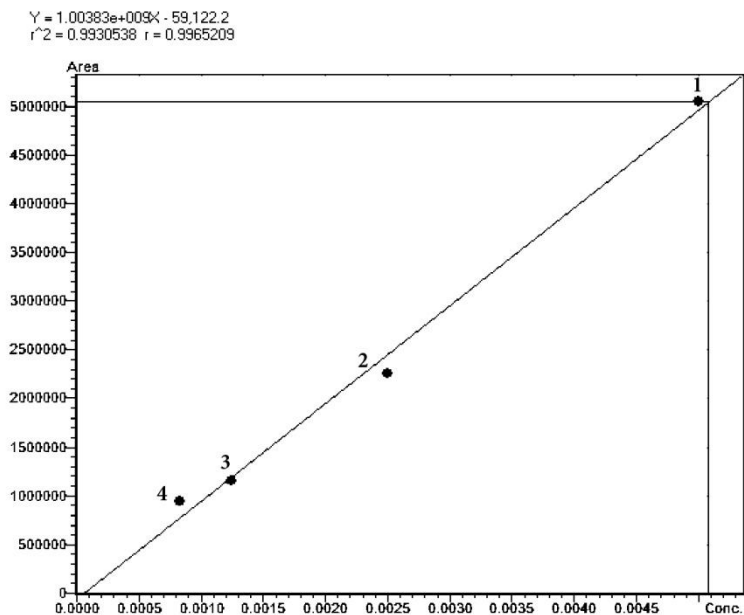


Рис.2. Калибровочная кривая модельной смеси аминокислот.

№	Образец	Концентрация, $\mu M/ml$	Площадь пика, %	Высота пика, AU
1	модельный раствор аминокислотной смеси №1	0.0005	5043.958	1025.329
2	модельный раствор аминокислотной смеси №2	0.0025	2252.252	448.852
3	модельный раствор аминокислотной смеси №3	0.00125	1149.157	229.518
4	модельный раствор аминокислотной смеси №4	0.00083	938.145	188.115

Данная калибровочная кривая используется для качественного и количественного определения аминокислот в исследуемых образцах.

<Chromatogram>

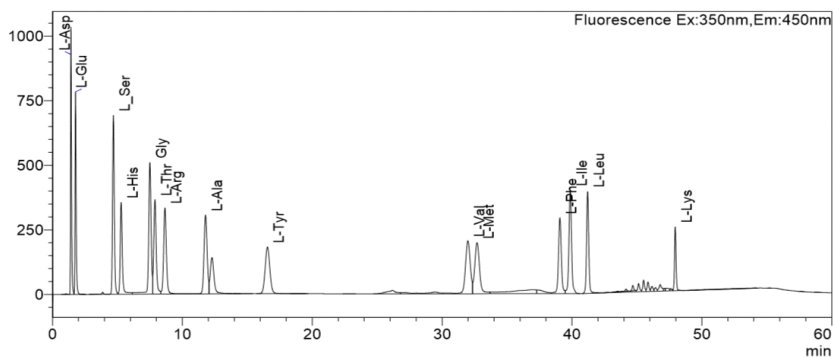
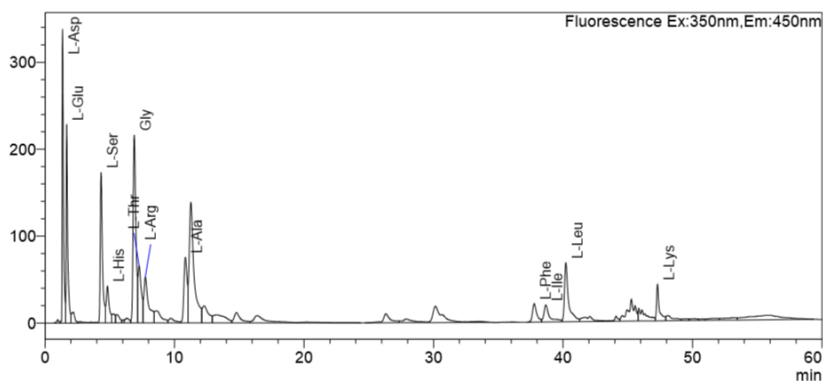


Рис. 3. Хроматограмма модельного раствора аминокислотной смеси.

<Chromatogram>

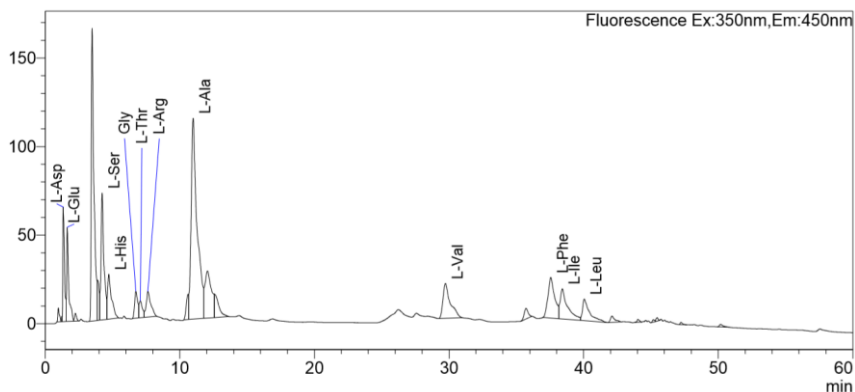


ID #	Название	Время удержания	Площадь	Высота	Концентрация, мг/мл
1	L-Asp	1.356	2196182	330643	0.093
2	L-Glu	1.672	1864268	223842	0.09
3	L-Ser	4.324	2054415	172554	0.053
4	L-His	4.819	679539	42349	0.045
5	Gly	6.886	3162664	215442	0.053
6	L-Thr	7.267	1186235	65590	0.045
7	L-Arg	7.751	1345732	52738	0.076
8	L-Ala	10.839	1284062	75340	0.034
10	L-Phe	37.780	496431	20881	0.036
11	L-Ile	38.673	602222	18912	0.023
12	L-Leu	40.227	1489335	66184	0.061
13	L-Lys	47.305	633722	40291	0.056

Рис. 4. Хроматограмма и количественные данные аминокислотного анализа образца трилистника.

На рис. 5 и 6 соответственно приведены данные об аминокислотном составе спиртового экстракта образцов расторопши и грушанки.

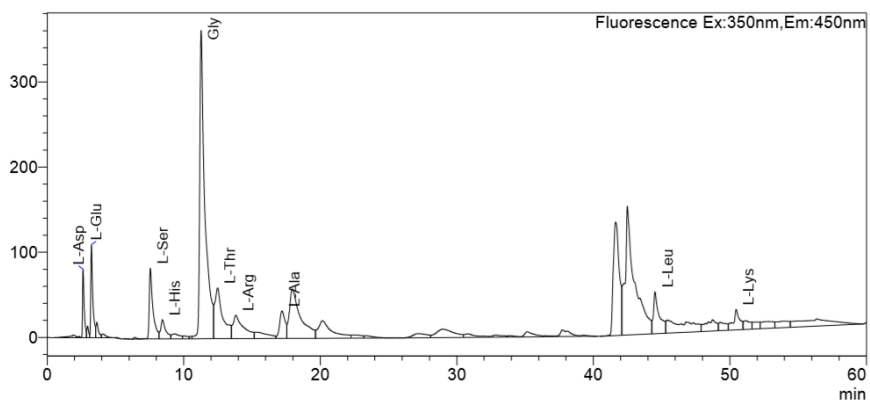
<Chromatogram>



ID #	Название	Время удержания	Площадь	Высота	Концентрация, мг/мл
1	L-Asp	1.345	528929	64595	0.009
2	L-Glu	1.639	557629	53244	0.049
3	L-Ser	4.226	1091599	71751	0.049
4	L-His	4.725	521100	25342	0.061
5	Gly	6.740	232075	15123	0.009
6	L-Thr	7.065	162544	9458	0.012
7	L-Arg	7.635	349004	14441	0.046
8	L-Ala	10.986	3468011	113473	0.151
9	L-Val	29.738	735942	19690	0.035
10	L-Phe	37.560	804866	22966	0.087
11	L-Ile	38.419	651454	16974	0.042
12	L-Leu	40.050	437543	12197	0.027

Рис. 5. Хроматограмма и количественные данные аминокислотного состава образца расторопши.

<Chromatogram>

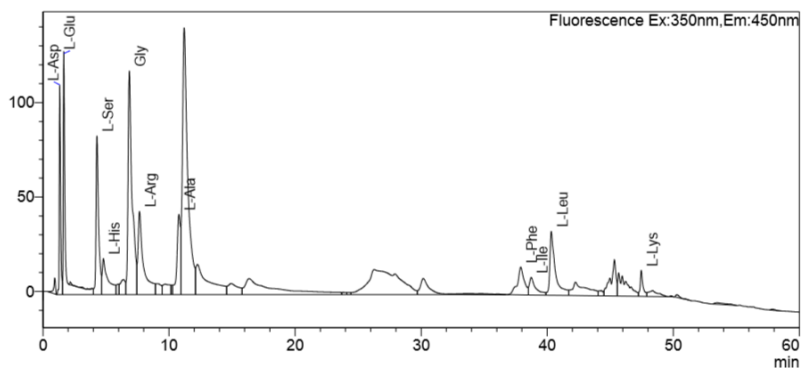


ID #	Название	Время удержания	Площадь	Высота	Концентрация, мг/мл
1	L-Asp	2.633	673747	797228	0.15
2	L-Glu	3.239	1142567	109508	0.16
3	L-Ser	7.555	1554625	82882	0.08
4	L-His	8.443	583303	22202	0.06
5	Gly	11.277	9647100	360566	0.084
6	L-Thr	12.481	2440429	59541	0.07
7	L-Arg	13.816	1486059	27392	0.1
8	L-Ala	17.198	904220	32106	0.0987
9	L-Leu	44.530	1443552	48200	0.1
10	L-Lys	50.474	768966	23553	0.1

Рис. 6. Хроматограмма и количественные данные аминокислотного состава образца грушанки.

Данный метод был применен также для изучения аминокислотного состава ягоды годжи, произрастающей на территории Арцаха.

<Chromatogram>



ID #	Название	Время удержания	Площадь	Высота	Концентрация, мг/мл
1	L-Asp	1.333	765283	110313	0.038
2	L-Glu	1.652	1522410	127346	0.074
3	L-Ser	4.279	1207452	84044	0.032
4	L-His	4.796	610233	19048	0.041
5	Gly	6.849	2602134	118399	0.044
6	L-Arg	7.660	1347104	44063	0.076
7	L-Ala	10.789	813202	42304	0.022
8	L-Phe	37.902	556308	14330	0.039
9	L-Ile	38.737	325901	9136	0.014
10	L-Leu	40.337	1025339	33277	0.041
11	L-Lys	47.473	212971	13257	0.013

Рис. 7. Хроматограмма и количественные данные аминокислотного состава образца ягоды годжи.

Таким образом, примененный метод определения аминокислот, основанный на получении их ортофталевых производных, обеспечивает интенсивное разделение модельной смеси аминокислот на хроматографической колонке “Novo-Pak C 18, 4 μ m, 3.9×150 mm” и пригоден для изучения аминокислотного состава образцов растительных экстрактов, обеспечивая высокую точность полученных качественных и количественных данных (рис. 1 и 2).

ՆԱՅԱՍԱԿՆՈՒՄ ԱՃՈՂ ՈՐՈՇ ԲՈՒՅՍԵՐԻ ԱՄԻՆԱԹՎԱՅԻՆ ԿԱԶՄԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԴՐԱՆՑ ՕՐԹՈ-ՖՏԱԼԱԼԴԵՆԻԴԱՅԻՆ ԱԾԱՆՅԻԱԼՆԵՐԻ ՍՏԱՅՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿՈՎ

Ա. Ն. ԾԱՏՈՒՐՅԱՆ, Է. Վ. ՄԻՆԱՍՅԱՆ, Ա. Ս. ԴԱԴԱՅԱՆ և Լ. Ա. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է երեքնուկի, կաթնափուշի, գուշիի պտուղների նմուշների ամինաթթվային կազմը դրանց օրթո-ֆտալալդեհիդային ածանցյալների ստացման եղանակով: Հետազոտությունները իրականացվել են “Shimadzu Nexera X2” ամինաթթվային անալիզատորով հազեցած ֆլյուրեսցենտային դետեկտորով ex:350-em450 նմ ալիքի երկարության տակ: Որպես անչարժ ֆազ օգտագործվել է “Novo-Pak C 18, 4 μ m, 3,9×150 mm” քրոմատոգրաֆիական աշտարակը, իսկ անալիտների էլյուացիան իրականացվել է դրադիենտային ռեժիմով:

DETERMINATION OF THE AMINO ACID COMPOSITION OF SOME PLANTS GROWING IN THE TERRITORY OF ARMENIA, THE METHOD OF OBTAINING THEIR ORTHOFTAL-ALDEHYDE DERIVATIVES

A. H. TSATURYAN^{1,2}, E. V. MINASYAN¹, A. S. DADAYAN^{1,2} and L. A. STEPANYAN¹

¹The Scientific and Production Center “Armbiotechnology” NAS RA

14, Gyurjyan Str., Yerevan, 0056, Armenia

Fax: (37410)654183

²Yerevan State University

Institute Pharmacy

E-mail: avetis-tsaturyan@yandex.ru

Amino acids are rather complex for chemical analysis. First of all, this is due to the presence of hydrophobic (non-polar hydrocarbonic fragments) and hydrophilic (carboxy-, amino-, hydroxy- and mercapto-) groups in molecules. Secondly, amphoteric nature of amino acids due to the presence of basic and acidic functions in their structure leads to the formation of zwitterion in neutral solutions of amino acids. Therefore, when analyzing amino acids, it is necessary to consider the value of isoelectric point (pH solutions).

The analysis of amino acids is well studied. Simultaneously, it is a developing aspect of modern analytical chemistry. The determination of amino acids in food, drink and medication is significant to control the production technology, assess the quality raw materials and final product, reveal falsification.

Chromatographic analysis is becoming more accessible, which is first of all due to the fact that the HPLC method allows not only to separate and perform qualitative and

quantitative analysis of most essential amino acids within one single analytical process, but also to determine optical isomers, which is one of the most important tasks of pharmaceutical analysis.

Separation of amino acids was performed on an amino acid analyzer "Shimadzu Nexera X2" (Japan) with a fluorescence detector RF-20A "Shimadzu". Determination of amino acids is based on obtaining their orthoptaldehyde derivatives.

To separate amino acids, a chromatographic column "Novo-Pak C 18, 4 μ m, 3.9×150 mm" was used. Separation of amino acids was performed in a gradient mode of elution. As a mobile phase, A) acetonitrile:methanol:water=45:40:15 (v/v), B) phosphate buffer pH=7 was used, flow rate was 0.5 ml/min, detection was carried out at a wavelength of ex350-em450 nm, column temperature was 30°C, injection volume – 10 μ l.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки. М., Мир, 1985, с. 82.
- [2] Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд., ч. 1, М., НЦЭСМП, 2008, с. 704.
- [3] European Pharmacopoeia. 6rd ed. Strasbourg Council of Europe, 2008, p. 3905.
- [4] Фармакопея США. 29-изд. М., ГЕОТАР-Медиа, 2009, с. 329-331, 2272, 2455, 3183.
- [5] Elbashir A.A., Suliman F.E.O., Aboul-Enein H.Y. // Gazi University Journal of Science, 2011, v. 24, №4, p. 679
- [6] Bruckner H., Westhauser T. // Journal of Amino Acids, 2003, v. 24, p. 43.
- [7] Hernandez-Orte P., Ibarz M.J., Cacho J., Ferreira V. // Journal of Chromatographia, 2003, v. 58, p. 29.
- [8] Kato M., Fukushima T., Santa T. // Journal of Biomed Chromatogr., 1995, №9, p.193.
- [9] Новикова А.Е., Стоинова Н.В., Ямпольская Т.А., Буряк А.К. // Сорбционные и хроматографические процессы, 2007, т. 7, вып. 3, с. 430.
- [10] Kaspar H. Amino acid analysis in biological fluids by GC-MS. Regenbunrg, 2009, p. 141.