

УДК 547.466:543.2

**ЭКСТРАКЦИОННЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ N-ВИНИЛФОРМАМИДА
ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ И РАЗДЕЛЕНИЯ ЦИКЛИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ**© 2020 г. Н. Я. Мокшина^{1,*}, В. М. Шкинев², Г. В. Шаталов³,
О. А. Пахомова⁴, член-корреспондент РАН Б. Я. Спиваков²

Поступило 18.04.2020 г.

После доработки 25.05.2020 г.

Принято к публикации 10.06.2020 г.

Для эффективного извлечения циклических аминокислот предложено использовать полимеры на основе N-винилформамида. В работе впервые приведены результаты экстракции фенилаланина, тирозина, гистидина и пролина в двухфазных системах на основе поли-N-винилформамида и сополимера N-винилформамида с N-винилимидазолом. Найденны системы с максимальной степенью извлечения индивидуальных аминокислот. Предложен механизм межмолекулярных взаимодействий в системах полимер–аминокислота. Приведены результаты экстракции смеси фенилаланина и тирозина сополимером N-винилформамида с N-винил-имидазолом. Предложен электрофоретический способ определения аминокислот в экстрактах.

Ключевые слова: аминокислоты, экстракция, водорастворимые полимеры, электрофоретическое определение

DOI: 10.31857/S2686953520030115

Циклические аминокислоты играют важную роль в жизни человека и животных, поэтому требуется контроль их количественного содержания в окружающей среде, продуктах питания, в фармацевтических препаратах и других продуктах, используемых в медицине. Для их концентрирования, при малом содержании в объектах анализа, часто используются системы на основе водорастворимых полимеров, например, поли-N-пирролидоны [1], полиэтиленгликоли [2]. В последнее время для увеличения эффективности таких систем в них вводят ионные жидкости [3–5]. Однако, это усложняет и удорожает методы разделения и очистки аминокислот.

Альтернативой для данных систем могут быть новые водорастворимые и нетоксичные гомо- и сополимеры N-виниламидов, и прежде всего такие как поли-N-винилпирролидон, поли-N-ви-

нилкапролактамы и некоторые другие, которые представляют значительный интерес благодаря возможности их применения в медицине, биотехнологии и в процессах экстракции [6–8]. Менее исследованными в качестве экстрагентов в ряду рассматриваемых полимеров являются продукты полимеризации простейшего представителя N-виниламидов N-винилформамида (ВФ), некоторые из которых проявляют иммуностимулирующее действие. Наличие в макроцепи таких полимеров звеньев ВФ, способных к гидролизу с образованием NH₂-групп, позволяет получать монодисперсные субмикронные частицы с многофункциональной поверхностью. В результате этого становится возможным увеличить эффективность взаимодействия макромолекул с веществами [8]. Имеющиеся данные о свойствах полимеров ВФ указывают на возможность их использования для создания высокоэффективных экстракционных систем с целью извлечения биологически активных веществ.

В работе впервые систематически изучена экстракция циклических аминокислот (фенилаланин, тирозин, гистидин, пролин) в двухфазных системах на основе поли-N-винилформамида (ПВФ) и сополимера N-винилформамида с N-винилимидазолом (ВФ-ВИ) с применением в качестве высаливателя сульфата аммония с концентрацией 20 мас. %: рН в таких системах составлял 4.2 ± 0.1. Основываясь на результатах ра-

¹ Военно-воздушная академия им. проф. Н.Е. Жуковского и Ю.А. Гагарина, Воронеж, Россия

² Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук, Москва, Россия

³ Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

⁴ Елецкий государственный университет им. И.А. Бунина, Елец, Россия

*E-mail: moksnad@mail.ru

Таблица 1. Результаты экстракции циклических аминокислот ($n = 3$; $P = 0.95$)*

Аминокислота	C , моль/дм ³	Соотношение объемов фаз r	Коэффициент распределения D	Степень извлечения R , %
Экстрагент–ПВФ				
Фенилаланин	3.5×10^{-4}	10:3	32 ± 3	91 ± 4
	4.0×10^{-4}		62 ± 6	95 ± 5
	4.5×10^{-4}		39 ± 4	93 ± 4
Тирозин	3.0×10^{-4}	10:2	256 ± 4	98 ± 1
	3.2×10^{-4}		260 ± 12	98 ± 6
	3.5×10^{-4}		234 ± 9	98 ± 5
Гистидин	2.2×10^{-4}	10:2	83 ± 7	94 ± 4
	2.5×10^{-4}		86 ± 6	95 ± 3
	3.0×10^{-4}		81 ± 5	94 ± 4
Пролин	5.0×10^{-4}	10:4	58 ± 5	94 ± 4
	5.5×10^{-4}		56 ± 6	93 ± 4
	6.0×10^{-4}		51 ± 4	93 ± 3
Экстрагент–ВФ-ВИ				
Фенилаланин	3.5×10^{-4}	10:2	99 ± 5	95 ± 3
	4.0×10^{-4}		112 ± 11	96 ± 5
	4.5×10^{-4}		100 ± 13	95 ± 4
Тирозин	3.8×10^{-4}	10:2	79 ± 5	97 ± 6
	4.0×10^{-4}		72 ± 4	96 ± 5
	4.5×10^{-4}		67 ± 6	95 ± 4
Гистидин	2.2×10^{-4}	10:2	90 ± 11	90 ± 3
	2.5×10^{-4}		103 ± 12	99 ± 5
	3.0×10^{-4}		96 ± 10	91 ± 3
Пролин	5.0×10^{-4}	10:4	67 ± 5	95 ± 3
	5.5×10^{-4}		75 ± 8	96 ± 5
	6.0×10^{-4}		69 ± 7	96 ± 4

* n – число измерений; P – доверительная вероятность

нее проведенных исследований по применению N-винилформамида для экстракции аминокислот [6, 8], нами целенаправленно использован ПВФ со средневязкостной молекулярной массой $M = 25 \times 10^3$ г/моль и величиной характеристической вязкости $[\eta] = 0.40$ дл/г в 0.2 М растворе хлорида натрия при 20°C. Сополимер ВФ-ВИ получали радикальной полимеризацией в диоксане с применением в качестве инициатора азодиизобутиронитрила с концентрацией 1 мас. % в течение 8 ч при 65°C [9]. Сополимер ВФ-ВИ синтезировали при молярном соотношении сомономеров 9 : 1 с получением сополимера, содержащего 0.49 мол. дол. звеньев ВФ. Характеристическая вязкость ВФ в сополимере составила 0.52 дл/г.

Растворы экстрагировали на вибросмесителе в течение 10 мин при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Для установления межфазного равновесия и полного расслаивания системы экстракционную систему центрифугировали при 10000 об./мин в течение 15 мин. Измеряли соотношение равновесных объемов водной и органической фаз (r). Водно-солевую фазу отделяли от органической и анализировали методом капиллярного электрофореза [10]. Рассчитаны коэффициенты распределения (D) и степень извлечения аминокислот (R , %) при их межфазном распределении и различных соотношениях исходных объемов фаз (табл. 1).

Установлено, что тирозин извлекается лучше других аминокислот в системах с ПВФ в качестве экстрагента, а гистидин экстрагируется более эф-

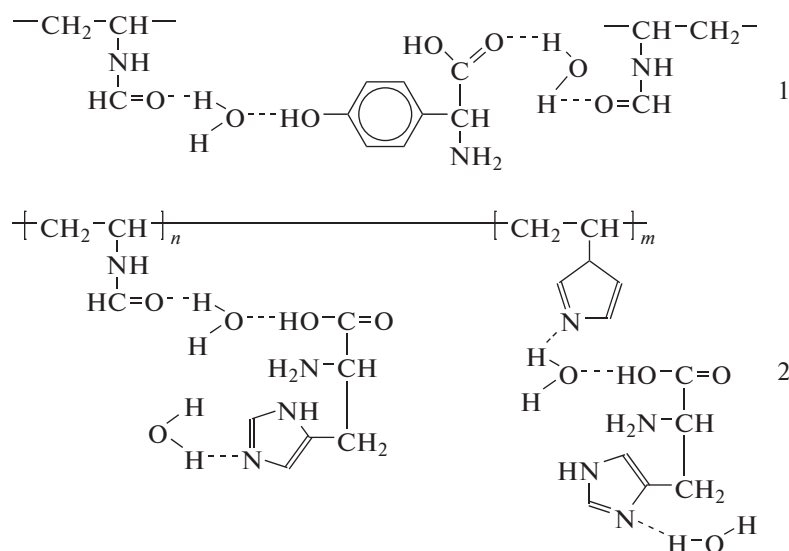


Рис. 1. Схема межмолекулярного взаимодействия в системах тирозин–ПВФ (1) и гистидин–ВФ-ВИ (2).

фективно в системах ВФ-ВИ (обе аминокислоты извлекаются более, чем на 98%) при соотношении объемов фаз 10 : 2. На основании полученных экстракционных характеристик предложен механизм межмолекулярных взаимодействий в системах полимер–аминокислота (рис. 1).

Тирозин – гораздо более полярная молекула, чем фенилаланин, а молекула пролина содержит циклическую структуру в алифатической боковой цепи, что удерживает пролин в жесткой конформации [11]. Поэтому результаты экстракции фенилаланина и пролина в системах с ПВФ несколько ниже, чем тирозина и гистидина. Можно предположить, что наличие в структуре тирозина гидроксильной группы и азота в пятичленном цикле гистидина обуславливает их большую способность к комплексообразованию, что способствует их лучшему перераспределению в фазу гомо- или сополимера в процессе экстракции по сравнению с фенилаланином и пролином. Введение в систему компонента со звеньями ВИ приводит к образованию внутримолекулярных связей между полярными группами аминокислот и N-атомами пиридинового типа в имидазольном цикле. Такой характер взаимодействия способствует более сильному сжатию макромолекул, находящихся в конформации клубка, что отражается на результатах экстракции. Это объясняется тем, что в макроцепи сополимеров появляются звенья, проявляющие комплексообразующую способность и характеризующиеся неравномерным распределением электронной плотности и наличием нуклеофильных центров [9].

Учитывая результаты экстракции индивидуальных аминокислот, нами предложены оптимальные системы для разделения и селективного

определения двухкомпонентных растворов аналитов при $r = 10 : 2$ (табл. 2). В качестве примера приводим результаты экстракции смеси фенилаланин–тирозин, так как раздельное определение этих аминокислот имеет существенное значение: лечение фенилкетонурии заключается в соблюдении специальной диеты, при которой белок замещается смесью аминокислот с низким содержанием фенилаланина и высоким содержанием тирозина.

Для идентификации и раздельного определения аминокислот нами применен электрофоретический метод. Электрофоретический анализ проводили на приборе “Капель-105 М” (производитель “Люмэкс”, Россия). Определение проводили при условиях: ввод пробы при давлении 300 мбар в течение 5 с, длина волны – 254 нм, напряжение +25 кВ, температура 30°C, время ввода пробы 7 мин, ведущий электролит – фосфатный буферный раствор с рН 7.8 ± 0.2 с добавкой β -циклодекстрина. Регистрировали электрофореграммы, проверяли правильность автоматиче-

Таблица 2. Результаты экстракции смеси фенилаланина (1) и тирозина (2) сополимером ВФ-ВИ ($n = 3$; $P = 0.95$).

C, моль/дм ³		Результаты экстракции			
Фенилаланин	Тирозин	D_1	$R_1, \%$	D_2	$R_2, \%$
3.0×10^{-4}	2.5×10^{-4}	77 ± 4	94 ± 3	85 ± 5	94 ± 2
3.5×10^{-4}	3.0×10^{-4}	85 ± 5	94 ± 3	88 ± 6	94 ± 1
3.8×10^{-4}	3.5×10^{-4}	83 ± 4	95 ± 2	86 ± 5	95 ± 3
4.0×10^{-4}	3.8×10^{-4}	124 ± 11	96 ± 3	88 ± 8	96 ± 3
5.0×10^{-4}	4.5×10^{-4}	99 ± 9	95 ± 2	80 ± 7	94 ± 2

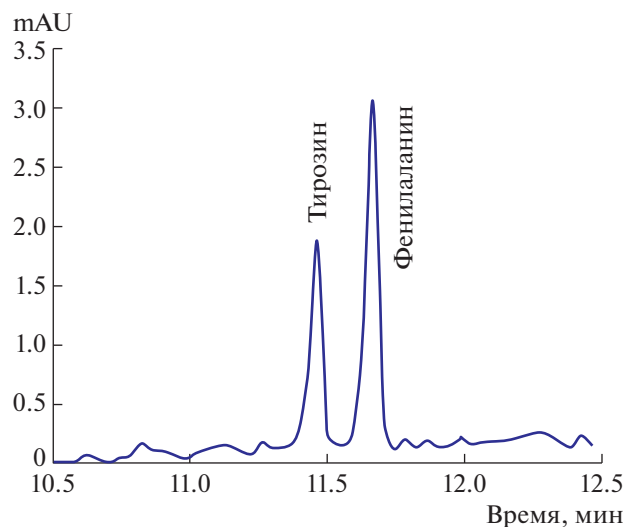


Рис. 2. Электрофореграмма смеси фенилаланина и тирозина.

ской разметки пиков, с помощью программного обеспечения “Эльфوران” идентифицировали компоненты. Для исключения влияния буферного раствора и экстрагента предварительно были получены их электрофореграммы.

На электрофореграмме отчетливо проявляются пики фенилаланина и тирозина, имеющие хорошее разрешение (рис. 2). Использование поли-N-винилформамида позволяет провести экстракционно-электрофоретическое определение аминокислот в таблетированных фармацевтических препаратах “Гистидин” (“ОЗОН”, Россия) и “Пролин” (“Vitaline”, США). Производителями заявляется содержание гистидина 500 мг на одну таблетку, нами найдено 487 ± 6 мг; содержание пролина заявляется 25 мг, найдено 24.6 ± 0.2 мг.

В результате проведенного исследования установлена высокая экстрагирующая способность гомо- и сополимеров на основе N-винилформамида. Максимальная эффективность экстракции индивидуальных аминокислот достигается при использовании в качестве экстрагента поли-N-винилформамида и соотношении объемов фаз 10 : 2; в этих условиях степени извлечения аминокислот достигают 93–98%. Впервые проведенное экстракционное разделение двухкомпонентной смеси аминокислот наиболее эффективно в системах на основе сополимера ВФ-ВИ. Разработаны условия электрофоретического определения аминокислот после их экстракции растворами полимеров. Полученные результаты экстракции и определения циклических аминокислот позволяют рекомендовать предложенные методики при анализе объектов окружающей среды, пищевых и фармацевтических продуктов, содержащих циклические аминокислоты.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы выражают благодарность Российскому научному фонду за финансовую поддержку работы, грант № 18-17-00184.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шкинев В.М., Мокшина Н.Я., Хохлов В.Ю., Свищев Б.Я. // ДАН. 2013. Т. 448. № 4. С. 427–429. <https://doi.org/10.7868/S0869565213040166>
2. Salabat A., Abnosi M.H., Motahari A. // J. Chem. Eng. Data. 2008. V. 53. № 9. P. 2018–2021.
3. Hatti-Kaul R. // Mol. Biotechnol. 2001. V. 19. № 3. P. 269–277. <https://doi.org/10.1385/MB:19:3:269>
4. McQueen L., Lai D. // Front. Chem. 2019. V. 7. P. 135. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00135>
5. Pereira J.F.B., Lima Á.S., Freire M.G., Coutinho J.A.P. // Green Chem. 2010. V. 12. № 9. P. 1661–1669. <https://doi.org/10.1039/C003578E>
6. Мокшина Н.Я., Быковский Д.В., Шаталов Г.В., Пахомова О.А. // Журнал аналитической химии. 2016. Т. 71. № 2. С. 208–211. <https://doi.org/10.1134/S1061934816020106>
7. Шаталов Г.В., Лавлинская М.С., Мокшина Н.Я., Пахомова О.А., Кузнецов В.А. // Журнал прикладной химии. 2016. Т. 89. № 1. С. 112–118. <https://doi.org/10.1134/S1070427216010225>
8. Мокшина Н.Я., Пахомова О.А., Шаталов Г.В., Косинова И.И. // Известия вузов. Сер. Химия и хим. технология. 2019. Т. 62. № 1. С. 4–10. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20196201.5763>
9. Kuznetsov V.A., Lavlinskaya M.S., Ostankova I.V., Shatalov G.V., Shikhaliyev Kh.S., Ryzhkova E.A. // Polym. Bull. 2018. V. 75. № 3. С. 1237–1251. <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2091-2>

10. Карцова Л.А. Проблемы аналитической химии. Т. 18 / Капиллярный электрофорез. Москва: Наука, 2014. 438 с.
11. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2011. Т. 1. 694 с.

EXTRACTION SYSTEMS BASED ON N-VINYLFORMAMIDE FOR THE EXTRACTION AND SEPARATION OF CYCLIC AMINO ACIDS

N. Ya. Mokshina^{a,#}, V. M. Shkinev^b, G. V. Shatalov^c,

O. A. Pakhomova^d, and Corresponding Member of the RAS B. Ya. Spivakov^b

^a N.E. Zhukovsky and Yu. A. Gagarin Air Force Academy, Voronezh, Russian Federation

^b Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^c Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

^d I.A. Bunin Yelets State University, Yelets, Russian Federation

[#] E-mail: moksnad@mail.ru

For effective extraction of cyclic amino acids, it is proposed to use polymers based on N-vinylformamide. This paper presents for the first time the results of extraction of phenylalanine, tyrosine, histidine and proline in two-phase systems based on poly-N-vinylformamide and N-vinylformamide copolymer with N-vinylimidazole. Systems with the maximum degree of extraction of individual amino acids were found. The mechanism of intermolecular interactions in polymer–amino acid systems is proposed. The results of extraction of a mixture of phenylalanine and tyrosine by a copolymer of N-vinylformamide with N-vinylimidazole are presented. An electrophoretic method for determining amino acids in extracts is proposed.

Keywords: amino acids, extraction, water-soluble polymers, electrophoretic determination