

УДК 543.544

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ОБРАЗОВАНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ С 5-ДИМЕТИЛАМИНОНАФТАЛИН-1-СУЛЬФОНИЛХЛОРИДОМ

М.В. Шунина, М.Г. Чернобровкин, А.В. Башилов, Е.Н. Шаповалова, О.А. Шпигун

(кафедра аналитической химии; e-mail: shapovalova@analyt.chem.msu.ru)

Проведено сравнение различных способов получения производных аминокислот с 5-диметиламинонафталин-1-сульфонилхлоридом: при комнатной температуре, при нагревании реакционной смеси до 40°C и под действием микроволнового (МВ)-поля при 40°C. Показано, что нагревание реакционной смеси до 40°C и действие МВ-поля существенно ускоряют реакцию образования производных аминокислот, но уменьшают их выход. Выбраны оптимальные условия получения производных.

Аминокислоты – класс органических соединений, широко востребованный во многих сферах деятельности человека. Для определения аминокислот часто используют обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ОФ ВЭЖХ) с предварительным переводом аминокислот в активные соединения, а также ионообменную хроматографию (ИОХ) с постколоночной дериватизацией. ОФ ВЭЖХ по ряду параметров превосходит ИОХ: возможна более высокая скорость элюирования, сорбенты более устойчивы к повышенному давлению и возможно использование чувствительного флуоресцентного детектирования [1].

Реакция присоединения 5-диметиламинонафталин-1-сульфонилхлорида (дансилхлорида) по первичным и вторичным аминогруппам достаточно давно используется для детектирования аминокислот в ВЭЖХ [2]. При взаимодействии дансилхлорида с аминокислотами значительно увеличивается гидрофобность последних и улучшаются возможности их хроматографического разделения. Известно, что дансилхлорид обладает хорошими спектрофотометрическими и флуоресцентными характеристиками, что повышает чувствительность детектирования аминокислот. Это один из самых чувствительных реагентов для предколоночной дериватизации аминокислот с последующим флуоресцентным детектированием [3]. Дансилхлорид широко используют в разных хроматографических методах анализа аминокислот (среди других модификаторов занимает восьмое место [4]). Существенным недостатком метода считается неодинаковый выход дансильрованных производных разных аминокислот при обработке их смеси и длительность их получения, поэтому необходимы его дальнейшие исследования. Ускорение реакции дериватизации по-

зволило бы сократить время анализа аминокислот за счет ликвидации лимитирующей стадии – образования дансильных производных. Известно, что воздействие микроволнового (МВ) поля может давать как положительный результат (ускорять реакцию), так и отрицательный (не влиять или вообще тормозить процесс образования изучаемого соединения) [5]. Нам кажется интересным изучить влияние МВ-излучения на процесс дериватизации.

Данная работа посвящена изучению влияния температуры и МВ-излучения на получение дансильных производных аминокислот для последующего разделения и определения ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором на примере серина, валина и лейцина.

Экспериментальная часть

Стандартные растворы аминокислот, таких, как серин, валин и лейцин ($6,8 \cdot 10^{-3}$ моль/л), готовили растворением точной навески аминокислот особой чистоты (“Merck”, Германия) в дистиллированной воде. Полученные растворы хранили в холодильнике и использовали в течение месяца. Стандартный раствор (0,75 мг/мл) 5-диметиламинонафталин-1-сульфонилхлорида (“Sigma”, 95%) готовили по точной навеске, растворяя в смеси ацетонитрил–вода (7:3) с помощью ультразвуковой бани. Полученный раствор использовали в день приготовления.

Применяли коммерческие препараты дансильных производных валина, серина и лейцина (“Merck”, Германия), фосфатный (Na_2HPO_4 ; 0,01 М) с рН 7,0 и боратный ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; 0,1 М) с рН 9,6 буферные растворы и ацетонитрил квалификации “х.ч.”, (“Криохром”, Россия).

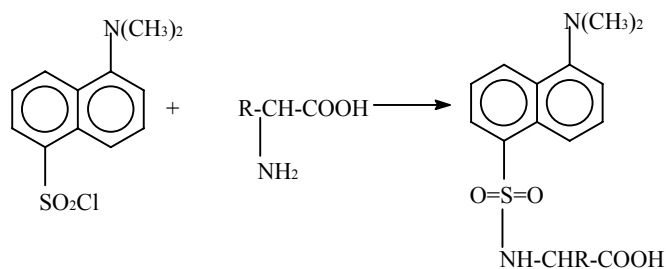
Работу выполняли на жидкостном хроматографе “Shimadzu SLC-10A”, состоящем из насоса “LC-10AT” и спектрофотометрического детектора “SPD-10

AV" ($\lambda = 325$ нм), скорость подвижной фазы 1 мл/мин. Для записи хроматограмм использовали программное обеспечение *CLASS-VP v.5.0.3*. Разделение проводили на колонке "*Hypersil BDS-C18*" ("*Hewlett-Packard*", США) размером (125×4) мм, диаметр частиц сорбента 5 мкм. Пробу ввели с помощью крана-дозатора фирмы "*Rheodyne*", объем пробы 20 мкл. Смесь дансильных производных элюировали подвижной фазой (20:80) ацетонитрил – 0,01 М фосфатный буферный раствор (рН 7,0). В работе использовали микроволновую печь "*ETHOS touch control*" фирмы "*Mielestone*" (Италия) при фиксированной частоте 2450 МГц при температуре 40°C и ультразвуковую баню УЗВ-4,0 л ("*Canfup*").

Спектры поглощения снимали в диапазоне 180–500 нм на спектрофотометре фирмы "*Shimadzu*" *UV-2201* с использованием кювет толщиной 1 см.

Результаты и их обсуждение

Образование дансильных производных аминокислот показано на схеме:



Дансилхлорид взаимодействует с непротонированной аминогруппой в щелочной среде только при рН >9 [6], так как в более кислых растворах амино-группа находится в неактивном состоянии в виде NH₃⁺ [7]. Однако с повышением рН среды растет вероятность протекания конкурирующей образованию производных реакции – гидролиза органического реагента. При рН>9,6 константа скорости реакции гидролиза резко возрастает, и гидролиз протекает очень интенсивно, что приводит к полной деструкции реагентов реакционной смеси уже при рН 10. Таким образом, оптимальное значение рН для реакции дериватизации составляет 9,5–9,6 [7].

Для поддержания рН реакционной смеси необходим буферный раствор. Получены противоречивые данные по этому вопросу. Авторы [8] предложили использовать 500 мМ боратный буферный раствор с рН 9,0. Другие исследователи [9] использовали 40 мМ литий-карбонатный буферный раствор с рН 9,5 и допускали использование 200 мМ натрий гидрокарбонатного буферного раствора с рН 9,5 [9].

Наши предварительные исследования показали, что степень образования производных серина, валина и лейцина несущественно отличается в карбонатном,

боратном и меньше в гидрокарбонатном буферных растворах. Поскольку флуктуации базовой линии и величина фонового сигнала заметно ниже, если применять боратный буферный раствор, то именно он использовался в данной работе.

Согласно литературным данным [1–4], полнота образования производных зависит от температуры, времени проведения реакции и соотношения дансилхлорида и аминокислоты. Поэтому в работе было исследовано влияние данных факторов на образование дансильных производных серина, валина и лейцина. Влияние факторов оценивали по выходу реакции дансильрования. Выход реакции рассчитывали по отношению аналитического сигнала, полученного в растворе аминокислоты после дериватизации, и сигнала раствора коммерческого препарата дансильного производного аминокислоты той же концентрации, принимая его отклик за 100%. Предварительно были построены градуировочные графики дансильных производных серина, валина и лейцина в диапазоне 1·10⁻⁴–4·10⁻⁴ М. Смесь дансильных производных элюировали подвижной фазой ацетонитрил–фосфатный буферный раствор (20:80). Для детектирования использовали поглощение при длине волны 325 нм, соответствующей максимуму спектра поглощения дансильных производных. В табл. 1 приведены параметры полученных градуировочных прямых.

Получение производных при комнатной температуре проводили как для эквимольного соотношения дансилхлорида и аминокислот, так и для полуторного избытка дериватизирующего реагента. На рис. 1. показана зависимость сигнала детектора от времени проведения реакции дериватизации, из которой видно, что при комнатной температуре реакцию можно считать завершённой через 50 мин после смешения реагентов. Сравнение кривых на рис. 1 показывает, что при избытке дансилхлорида выход реакции де-

Т а б л и ц а 1

Параметры градуировочных графиков определения дансильных производных аминокислот

Соединение	Уравнение градуировочного графика	Величина достоверности аппроксимации R ²
Дансилсерин	$Y = 5,6861 \cdot X$	0,9972
Дансилвалин	$Y = 5,4233 \cdot X$	0,9969
Дансиллейцин	$Y = 5,2835 \cdot X$	0,9911

Примечание. Подвижная фаза ацетонитрил–0,01 М фосфатный буферный раствор (20:80, рН 7,0), скорость подвижной фазы 1 мл/мин, $\lambda = 325$ нм; X – концентрация дансильного производного, С·10⁻⁴, М; Y – площадь пика дансильного производного, S·10⁻⁵, усл. ед.

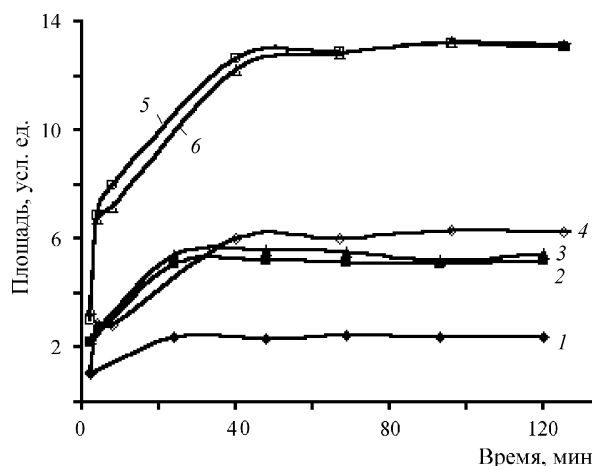


Рис. 1. Кривые образования дансильных производных: 1, 4 – серина, 2, 5 – лейцина, 3, 6 – валина без нагревания для эквимольного соотношения дансилхлорида и аминокислот (1–3) и при полуторном избытке органического реагента (4–6); 0,1 М боратный буферный раствор, pH 9,6; объем раствора 5 мл; исходная концентрация аминокислот $2,72 \cdot 10^{-4}$ М

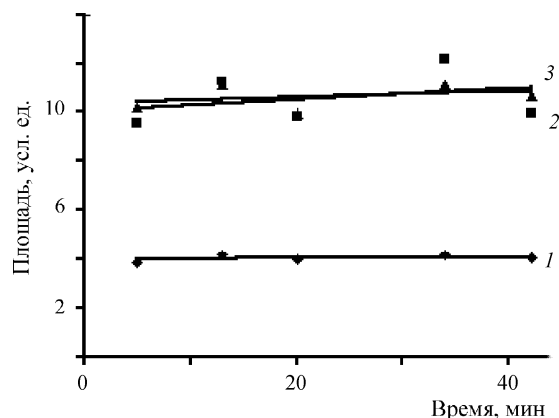


Рис. 2. Кривые образования дансильных производных: 1 – серина, 2 – лейцина, 3 – валина при полуторном избытке дансилхлорида и нагревании ($40 \pm 4^\circ\text{C}$); условия получения производных в подписи к рис. 1

риватизации увеличивается в 2,6 раза. Необходимо учитывать, что в условиях большого избытка реагента [1, 7] возможно протекание побочной реакции с образованием дансиламида, поэтому большие избытки реагента не используют.

В условиях избытка органического реагента было изучено влияние нагрева и действие МВ-излучения при 40°C на полноту и скорость образования дансильных производных. Эта температура была выбрана как оптимальная при изучении реальных биологических объектов. Полученные данные приведены на рис. 2, 3 и в табл. 2.

Нагревание образцов проводили на водяной бане при 40°C . Образцы помещали в баню на заданное время, затем быстро их извлекали, охлаждали в те-

чение 1 мин и вводили в колонку. Температурный профиль нагревания образцов в МВ-печи задавался и контролировался программным обеспечением. Нагрев образца осуществлялся за счет поглощения излучения с частотой 2450 МГц. Для этого реакционную смесь помещали в закрытый автоклав и подвергали излучению в течение заданного времени, затем быстро извлекали, охлаждали в течение 1 мин и вводили в колонку.

На рис. 2, 3 показано, что под действием МВ-поля реакцию образования производных можно считать завершенной через 5 мин, при нагревании на водяной бане – через 15 мин, т.е. использование МВ-излучения или нагревания, действительно, заметно ускоряет образование дансильных производных аминокислот. Но степень образования продукта реакции в этих условиях меньше, чем при нахождении образца при комнатной температуре. Нагревание до 40°C уменьшает выход производных на 20%, а МВ-излучение в 3 раза. Необходимо отметить, что использование МВ-излучения позволяет повысить воспроизводимость выхода реакции дериватизации и аналитического сигнала (табл. 2).

Таким образом, исходя из полученных данных, можно утверждать, что получение дансильных производных аминокислот лучше проводить при комнатной температуре в затемненном месте. Несмотря на продолжительность реакции дериватизации, выход продуктов реакции в этом случае значительно выше. Получение дансильных производных в МВ-поле может быть полезно для автоматизации процесса в режиме «on-line» при сочетании дериватизации аминокислот и их разделения ВЭЖХ.

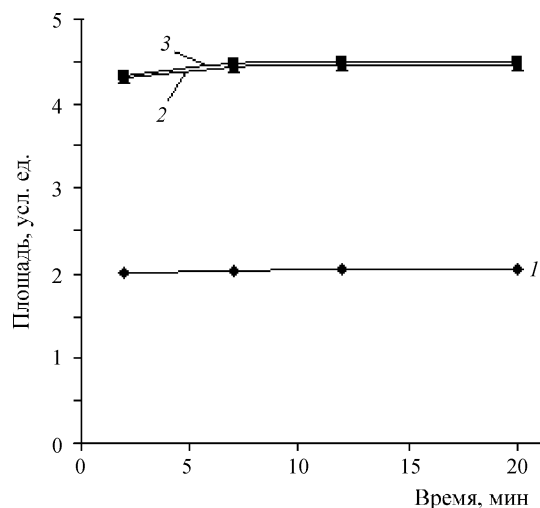


Рис. 3. Кривые образования дансильных производных: 1 – серина, 2 – лейцина, 3 – валина при полуторном избытке дансилхлорида и воздействии микроволнового излучения; условия получения производных в подписи к рис. 1

Т а б л и ц а 2

Сравнительная характеристика условий получения дансильных производных аминокислот при полуторном избытке дансилхлорида (0,1 М боратный буферный раствор, pH 9,6; объем раствора 5 мл)

Соединение	Комнатная температура (18±4)°C	Водяная баня, (40±4)°C	Микроволновое поле, 40°C
	время образования, мин		
	50	10	5
	выход, % (n = 3, P = 0,95)		
Дансилсерин	41±3	35±2	14,0±0,3
Дансилвалин	89±4	71±3	33,2±0,5
Дансиллейцин	92±5	75±4	33,4±0,6

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 03-03-32164).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bayer E., Grom E., Kaltenecker B. // *Anal. Chem.* 1976. **48**. P. 1106.
2. Teerlink T. // *J. Chromatogr. B.* 1994. **659**. P. 185.
3. Simmaco M., Biase D., Barra D., Bossa F. // *J. Chromatogr.* 1990. **504**. P. 129.
4. Molhar-Perl I. // *J. Chromatogr. A.* 2001. **913**. P. 283.
5. Microwave-enhanced chemistry. Fundamentals, sample preparation and applications. Washington, 1997.
6. Sanz M.A., Gastillo G., Hernandez A. // *J. Chromatogr. A.* 1996. **719**. P. 195.
7. Gros G., Labouesse B. // *European J. Biochem.* 1969. **7**. P. 463.
8. Zhou J., Lunte S.M. // *Anal. Chem.* 1995. **67**. P. 13.
9. Jong C., Hughes G.J., Wilson K.J. // *J. Chromatogr.* 1982. **241**. P. 345.

Поступила в редакцию 17.06.05

THE INFLUENCE OF TEMPERATURE AND MICROWAVE RADIATION ON THE PREPARATION OF SOME AMINO ACIDS DERIVATIVES

M.V. Shunina, M.G. Chernobrovkin, A.V. Bashilov, E.N. Shapovalova, O.A. Shpigun
(Division of Analytical Chemistry)

It was investigated three ways of the preparation of dansyl chloride (5 – dimethylamino – naphthalenesulfonic acid chloride) derivatives of amino acids: under room temperature, under heating the reactionary mixture upon 40°C and under the influence of microwave-field upon 40°C. It was shown that heating reactionary mixture to 40°C and action microwave oven do not improve the condition of the preparation dansyl chloride derivatives of amino acids essentially. It was found that carrying out the reaction of derivatization is most effectively upon room condition. Optimum conditions of the preparation of dansyl chloride derivatives were chosen.