

Таблица 2

Фазовые реакции и фазовые равновесия для элементов *t-x*-диаграмм систем тетрахлорэтилен – *n*-гептадекан и четыреххлористый углерод – *n*-гептадекан

Система	Участок диаграммы	Фазовая реакция	Фазовое равновесие
C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> – <i>n</i> -C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	a <sub>1</sub> e <sub>1</sub> , линия	Ж = C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub>	Моновариантное
	e <sub>1</sub> , точка	Ж = C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> + β-C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	Нонвариантное
	e <sub>1</sub> p <sub>1</sub> , линия	Ж = β-C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	Моновариантное
	p <sub>1</sub> , точка	Ж + α-C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> = β-C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	Нонвариантное
	p <sub>1</sub> b <sub>1</sub> , линия	Ж = α-C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	Моновариантное
CCl <sub>4</sub> – <i>n</i> -C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	a <sub>2</sub> e <sub>2</sub> , линия	Ж = CCl <sub>4</sub>	Моновариантное
	e <sub>2</sub> , точка	Ж = CCl <sub>4</sub> + β-C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	Нонвариантное
	e <sub>2</sub> p <sub>2</sub> , линия	Ж = β-C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	Моновариантное
	p <sub>2</sub> , точка	Ж + α-C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> = β-C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	Нонвариантное
	p <sub>2</sub> b <sub>2</sub> , линия	Ж = α-C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	Моновариантное

дующего состава: 3,30 мас.% *n*-гептадекана и 96,70 мас.% четыреххлористого углерода; 3,60 мас.% *n*-гептадекана и 96,40 мас.% тетрахлорэтилена.

Ликвидусы систем представлены тремя ветвями кристаллизации; α и β-C<sub>17</sub>H<sub>36</sub> и CCl<sub>4</sub> (C<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>). Фазовые равновесия для различных участков диаграмм приведены в табл. 2.

Экспериментально найденные и рассчитанные значения точек невариантного равновесия сравнимы между собой. Относительное отклонение содержания перхлорпроизводного углеводорода и температуры плавления эвтектического состава не превышают

2,7% и 1,7% соответственно. Это свидетельствует о том, что изученные системы близки к идеальным и использование уравнения Шредера – Ле-Шателье для прогнозирования свойств эвтектических составов возможно.

Список литературы

1. Моценский Ю.В. Дифференциальный сканирующий колориметр ДСК-500 // Приборы и техника эксперимента. 2003. №6. С.143–144.
2. Гаркушин И.К., Люстрицкая Д.В., Агафонов И.А. Анализ, прогнозирование и экспериментальное исследование рядов двухкомпонентных систем с участием *n*-декана и *n*-ундекана. Екатеринбург, 2008. 118 с.

УДК 543.54:547

## ЦВЕТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИЗИНА ПОСЛЕ ЕГО ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ ОТ СМЕСИ α-АМИНОКИСЛОТ

Е. И. Селифонова\*, И. В. Косырева, Р. К. Чернова\*

Саратовский государственный университет, Институт химии

\* ОНИ наноструктур и биосистем  
E-mail: selif-ei@yandex.ru

Найдены условия избирательного электрофоретического выделения лизина из смеси аминокислот и цветометрического его определения путем визуализации нингидрином. Исследованы продукты взаимодействия лизина с нингидрином в водной среде и на целлюлозной матрице. Приведен пример цветометрического определения лизина после электрофоретического отделения.  
**Ключевые слова:** аминокислоты, лизин, электрофоретическое разделение, цветометрическое определение.



Definition on Color of a Lysine after it Electroforetic's Branches from a Mix of α-Amino Acids

E. I. Selifonova, I. V. Kosyreva, R. K. Chernova

Conditions selective electroforetic's allocation of lysine from a mix of amino acids and its definition on color by visualization by a ningidrin are found. Products of interaction of lysine with ningidrin in the water



environment and on a cellulose matrix are investigated. The example definition on color of a lysine after electroforetic's branches is resulted.

**Key words:** amino acids, lysine, electroforetic's branches, definition on color.

Лизин, относящийся к группе 20-ти незаменимых  $\alpha$ -аминокислот, обладает широким спектром биологической активности. Он является одним из исходных веществ для синтеза антител, гормонов, ферментов, способствует снижению уровня холестерина в крови, участвует в формировании коллагена и восстановлении тканей, улучшает усвоение кальция, его транспорт в костную ткань и др. Лизин добавляют в корма животных, входит он и в состав многих смесей  $\alpha$ -аминокислот, применяемых для парэнтерального питания больных.

Для экспресс-контроля за содержанием лизина в условиях рядовых клинических и производственных лабораторий не всегда доступно и экономически оправданно применение таких дорогостоящих методов, как высокоэффективная жидкостная хроматография или капиллярный электрофорез. В связи с этим возникает необходимость в разработке простых и эффективных способов его определения в различных смесях с другими  $\alpha$ -аминокислотами в биологических жидкостях, лекарственных препаратах и др. Поскольку избирательные реакции на лизин отсутствуют, перед определением необходимо выделять его из смесей  $\alpha$ -аминокислот.

Цель настоящей работы состояла в изыскании условий избирательного электрофоретического выделения лизина с последующим его определением методом цветометрии. Диаграмма распределения ионизированных форм лизина (рис. 1) свидетельствует о том, что в кислых средах лизин выступает в роли катиона, причем имея две протонированные аминогруппы ( $\alpha$ - и  $\epsilon$ -), его положительный заряд вдвое больше, чем у других аминокислот (исключая гистидин и аргинин как представителей группы основных аминокислот).

В связи с этим можно было полагать, что подвижность лизина в кислых средах будет отличаться от подвижности других классов аминокислот (неполярных, полярных, отрицательно заряженных – дикарбоновых кислот).

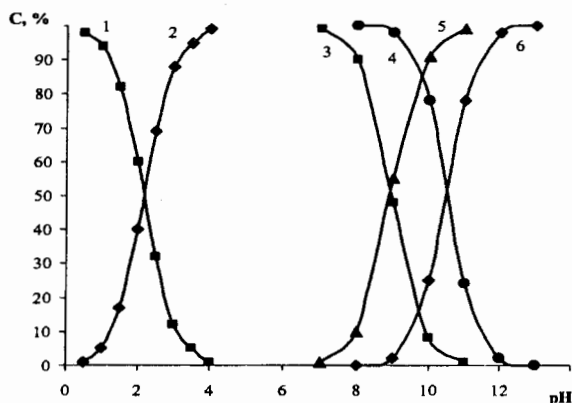


Рис. 1. Диаграмма распределения ионизированных форм лизина: 1 –  $[RH^+H^+COOH]$ ; 2, 3 –  $[RH^+H^+COO^-]$ ; 4, 5 –  $[RH^+COO^-]$ ; 6 –  $[RCOO^-]$

На рис. 2 представлена диаграмма зависимости относительной подвижности аминокислот в кислой среде (30%  $CH_3COOH$ , цитратно-фосфатный буферный раствор). Как следует из рис. 2 наибольшая подвижность, как и предполагалось, имеет место в случае лизина, что было положено в основу его избирательного электрофоретического отделения.

Электрофорез бинарных смесей лизин-аминокислота ( $E = 360$  В,  $t = 1$  ч,  $pH = 2.6$ ) показал, что лизин четко отделяется от фенилаланина, глицина, серина, пролина, цистеина, изолейцина, аспарагиновой кислоты, триптофана, а также из смесей указанных кислот (рис. 3).

Для визуализации зон выделенного из смеси аминокислот лизина полоски фильтровальной бумаги ( $3 \times 30$  см) высушивали при  $t^\circ = 80-100^\circ C$  в сушильном шкафу и равно-

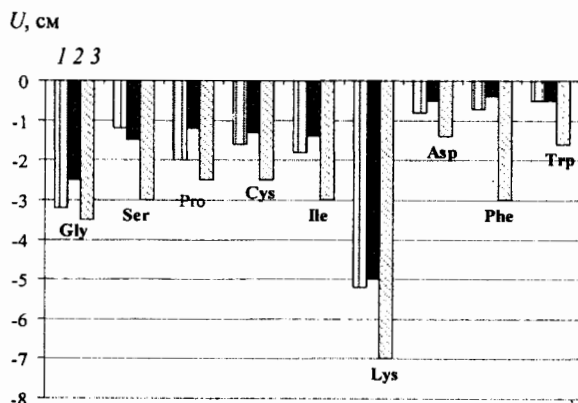


Рис. 2. Относительные подвижности ( $U$ )  $\alpha$ -аминокислот в 30%  $CH_3COOH$ :  $pH = 2.6$ ; 1 – без ПАВ, Triton X-305; 2 – ЦПХ; 3 – ДДС



мерно опрыскивали 0.1% водным раствором нингидрина. При повторном высушивании ( $t^\circ = 80-100^\circ\text{C}$ ) в течение 10–15 мин проявлялись зоны разделяемых аминокислот.



Рис. 3. Визуализированная нингидрином электрофореграмма после отделения лизина от смеси аминокислот

Методами электронной спектроскопии и спектроскопии диффузного отражения (СДО) исследовались продукты взаимодействия лизина с нингидрином в водной среде и на целлюлозной матрице (рис. 4).

Как видно из рис. 4, спектры диффузного отражения, характеризующие продукты взаимодействия лизина с нингидрином на

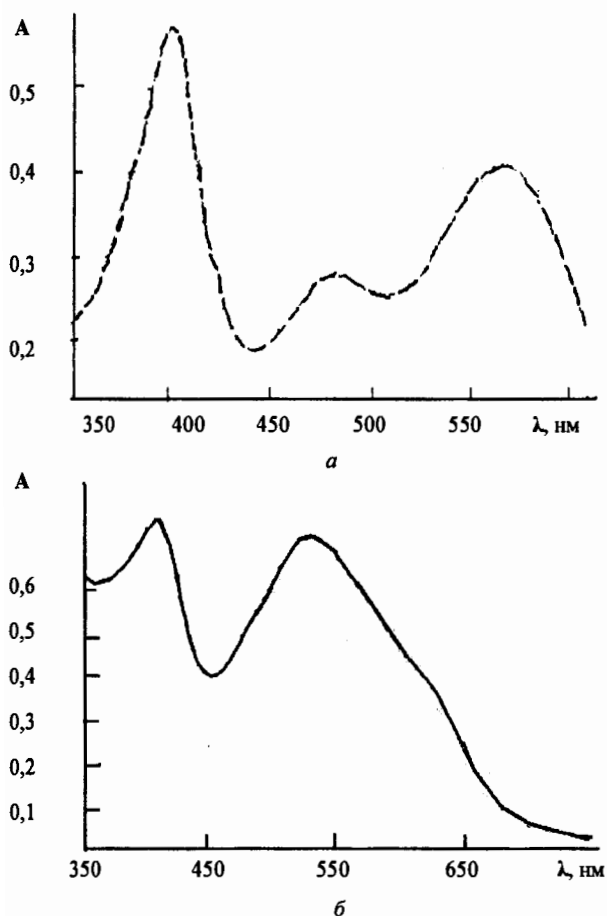
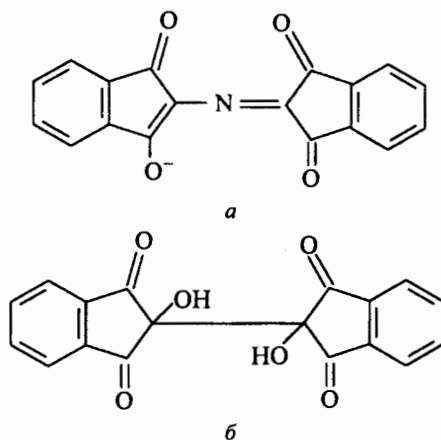


Рис. 4. Спектр поглощения продуктов взаимодействия лизина с нингидрином в воде (а); спектр диффузного отражения в виде функции Гуревича–Кубелки–Мунка продуктов взаимодействия лизина с нингидрином на бумажном носителе (б)

целлюлозной матрице при визуализации выделенных зон лизина, отличаются от электронных спектров поглощения продуктов взаимодействия лизина с нингидрином в водных растворах (рис. 4, а). Так, согласно СДО, в длинноволновой области спектра наблюдается два максимума поглощения с  $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ нм}$  и  $620 \text{ нм}$  (см. рис. 4, а). В спектре поглощения также можно выделить две полосы, с  $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ нм}$  и  $560-580 \text{ нм}$ .

Согласно [1], продукты взаимодействия лизина с нингидрином в водных растворах неустойчивы. Электронные спектры поглощения их отличаются наличием максимума поглощения в области 480 нм и низкой интенсивностью полосы поглощения в области 580 нм.

В связи с этим отнесение наблюдаемых длинно-волновых полос поглощения затруднено. На бумажном носителе продукты реакции более устойчивы, и наличие двух полос в спектре СДО (рис. 4, б) при  $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ нм}$  и  $620 \text{ нм}$  можно предположительно отнести к образованию двух продуктов реакции: дикетогидринденкетогидринамина (а) и гидриндантина (б) [2].



В табл. 1 представлены параметры эффективности и селективности отделения лизина от смеси вышеуказанных аминокислот.

Нами было установлено, также, что добавление в буферный электролит додецилсульфата натрия (ДДС) в концентрации 1 г/л (до ККМ) существенно увеличивает электрофоретическую подвижность ряда указанных аминокислот. В то время как добавки



Таблица 1

**Параметры эффективности при отделении разных концентраций лизина от смеси 8 α-аминокислот**

C, M	-lgC	U <sub>1</sub> , см	w <sub>1</sub> , см	N	H	U <sub>2</sub> , см	w <sub>2</sub> , см	α
5·10 <sup>-1</sup>	0.3	4.2	3.3	25.92	0.162	0.3	1.6	13.22
1·10 <sup>-1</sup>	1.0	5.3	2.3	84.96	0.062	0.4	1.9	27.06
5·10 <sup>-2</sup>	1.3	5.2	1.7	149.70	0.035	0.4	1.5	35.65
1·10 <sup>-2</sup>	2.0	6.0	1.0	576.00	0.010	0.6	2.1	77.38
5·10 <sup>-3</sup>	2.3	6.3	0.6	1764.00	0.004	0.5	2.0	135.12

Примечание. N – эффективность, α – селективность отделения лизина, H – размывание зоны, U<sub>1</sub> – электрофоретическая подвижность лизина, U<sub>2</sub> – электрофоретическая подвижность смеси аминокислот, где W – ширина зоны;  $H = \frac{l'}{N} = \frac{W^2}{16l'}$ ;  $\alpha = \sqrt{N} \cdot \frac{U_1 - U_2}{\sqrt{U_1} - \sqrt{U_2}}$ ;  $N = 16 \cdot \left(\frac{l'}{W}\right)^2$ ; l' – расстояние от линии старта до начала зоны.

цетилпиридиний хлорида и неионного ПАВ Тритон X-305 (также до ККМ) мало сказываются на подвижности аминокислот (см. рис. 2) и даже в ряде случаев ее уменьшают. Добавки ДДС оказались особенно эффективными при электрофорезе водных растворов лизина, простоявших в течение 3–4 недель (табл. 2).

Таблица 2

**Электрофоретическая подвижность и параметры эффективности разделения α-аминокислот при добавлении в буферный электролит (рН = 2.6) малых концентраций ПАВ различной природы**

Аминокислота	ЦПХ (кПАВ)				Triton X305 (нПАВ)			
	U <sub>1</sub> , см	w, см	N	H	U <sub>2</sub> , см	w, см	N	H
Глицин	1.3	1.0	22.35	0.058	2.2	1.0	77.44	0.028
Серин	1.4	1.6	1.00	0.400	1.2	1.0	57.76	0.033
Пролин	1.5	0.5	0.64	0.156	1.9	0.6	53.78	0.020
Аспарагиновая кислота	0.7	0.9	9.68	0.072	0.4	1.2	1.78	0.225
Лизин	4.8	1.7	97.66	0.043	5.2	2.2	107.40	0.053
Аминокислота	ДДС (аПАВ)-1 гр				В отсутствие ПАВ			
	U <sub>1</sub> , см	w, см	N	H	U <sub>2</sub> , см	w, см	N	H
Глицин	3.5	1.2	136.11	0.026	3.2	1.2	113.78	0.028
Серин	2.8	1.0	125.44	0.022	1.2	1.4	11.76	0.102
Пролин	2.5	0.9	104.49	0.022	2.0	0.8	100.00	0.020
Аспарагиновая кислота	1.4	1.2	21.78	0.064	0.8	1.1	8.46	0.094
Лизин	7.0	1.4	400.00	0.018	5.3	2.1	101.91	0.052

Наибольшее изменение величины подвижности аминокислот в присутствии додецилсульфата натрия можно объяснить изменением ассоциативных равновесий в водных

растворах аминокислот как за счет электростатических взаимодействий разнозаряженных ионов аминокислот и ДДС, так и за счет влияния ДДС на структуру воды.

Наибольшее изменение величины подвижности аминокислот в присутствии додецилсульфата натрия можно объяснить изменением ассоциативных равновесий в водных растворах аминокислот как за счет электростатических взаимодействий разнозаряженных ионов аминокислот и ДДС, так и за счет влияния ДДС на структуру воды.

Общим для всех α-аминокислот является образование водородных связей между амино- и карбоксильными группами. Причем для моноаминомонокарбоновых (валин, лейцин) и ароматических кислот, не содержащих активные группы в радикале (фенилаланин), структурообразование за счет водородных связей идет исключительно по NH<sub>2</sub><sup>+</sup> и COOH-группам. В результате образуются двухмерные сетки водородных связей. Такие структуры имеют слоистый характер, между двойными слоями действуют только слабые силы Ван-дер-Ваальса [3].

В структурах аминокислот, содержащих дополнительные группировки, способные образовывать Н-связи независимо от размера молекул, действуют пронизывающие весь каркас трехмерные сетки водородных ассоциатов. В образовании таких трехмерных структур биполярных ионов участвуют и молекулы гидратной воды [4].

При концентрациях меньше ККМ ионы способны к электростатическим взаимодействиям с ионами аминокислот. Это, по видимому, приводит к разрушению (разрыву) сложных агрегатов аминокислот, образованных за счет водородных связей и молекул воды и, как следствие, к увеличению подвижности катионов аминокислот. Следует отметить, что процесс агрегации в водных растворах аминокислот происходит во времени. Так, подвижность аминокислот из свежеприготовленных водных растворов с течением времени уменьшается и при длительном стоянии исходных растворов (месяц и более) может упасть до нуля. В этих случаях добавки ДДС особенно сильно влияют на увеличение подвижности аминокислот в процессе проведения электрофореза.



Стабилизации водных растворов аминокислот (уменьшению ассоциативных процессов во времени) способствует подкисление растворов соляной кислотой.

Надежное отделение лизина с помощью электрофореза от смеси аминокислот позволило перейти к количественному определению выделенного лизина.

В последние годы усилия многих аналитиков направлены на разработку простых и чувствительных тест-методов определения различных неорганических и органических соединений. Большинство тест-методов основано на химических реакциях с видимым и легко регистрируемым визуальным эффектом.

Современный уровень развития компьютерных технологий позволяет использовать стандартные средства ввода и анализа цифровых образов для целей разработки тест-средств химического анализа и цветометрического контроля. В частности, сканеры высокого класса пригодны для проведения цветометрических исследований, а сканеры потребительского класса – для рядовых измерений. При этом обнаруживается сходимость результатов определения концентраций в пределах 3–5% относительно результатов, полученных на стандартном колориметре. Показано, что основным преимуществом изученного подхода является высокая производительность, экспрессность и возможность математической обработки результатов тестирования.

В данной работе изучены возможности одного из способов численной оценки интенсивности окраски веществ с применением цифрового фотоаппарата и компьютерных программ цифровой обработки изображений. Способ основан на сканировании окрашенных образцов с помощью настольного сканера, обработке цветных изображений в графическом редакторе Adobe Photoshop 8.0 и построении градуировочных зависимостей в координатах: яркость одного из выбранных каналов ( $R$ ,  $G$ ,  $B$ ) – концентрация определяемого компонента.

Отделение лизина от смеси аминокислот проводилось методом электрофореза на бумаге в течение 1 ч при концентрации лизина  $5 \cdot 10^{-3}$ – $5 \cdot 10^{-1}$  М и концентрации остальных

$\alpha$ -аминокислот  $10^{-2}$  М. Для построения градуировочного графика готовили серию растворов смесей аминокислот с содержанием лизина в диапазоне концентраций  $5 \cdot 10^{-1}$ – $5 \cdot 10^{-3}$  М ( $5 \cdot 10^{-1}$ ;  $1 \cdot 10^{-1}$ ;  $5 \cdot 10^{-2}$ ;  $1 \cdot 10^{-2}$ ;  $5 \cdot 10^{-3}$  М). Пример градуировочной зависимости приведен на рис. 5.

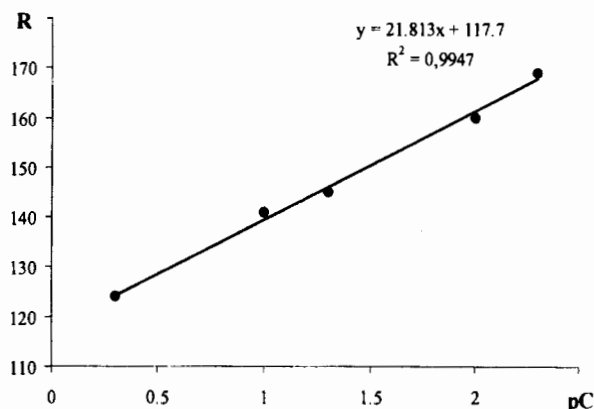


Рис. 5. Градуировочная зависимость параметра  $R$  от концентрации лизина в смеси аминокислот

Проверка правильности разработанной методики осуществлялась методом «введено–найдено» (табл. 3). Погрешность определения не превысила 12%, что согласуется с литературными данными для величин погрешности цветометрических определений.

Таблица 3

Значения параметров  $R$ ,  $G$ ,  $B$  при определении лизина методом «введено–найдено»

Номер задачи	1			2		
	$R$	$G$	$B$	$R$	$G$	$B$
Найденные значения параметров	152	129	142	122	92	113
	159	137	150	131	99	119
	161	138	153	125	95	114
	157	135	149	133	98	120
Найденные усредненные значения	$157 \pm 6$	$135 \pm 6$	$149 \pm 7$	$128 \pm 8$	$96 \pm 5$	$117 \pm 6$
Заданные значения pC	2,000			0,523		
Найденные значения pC	1,822	1,789	1,832	0,460	0,490	0,493
Относительная погрешность, %	9	11	8	12	6	6

Из приведенной табл. 3 также следует, что результаты, полученные с использованием всех трех каналов  $R$ ,  $G$ ,  $B$ , достаточно



близки, однако наиболее оптимальный коэффициент корреляции ( $R^2 = 0.9947$ ) получен для канала  $R$ .

#### Список литературы

1. Симонян А. В., Саламатов А. А., Покровская Ю. С., Аванесян А. А. Использование нингидриновой реакции для определения  $\alpha$ -аминокислот в различных объектах : метод. рекомендации. Волгоград, 2007. 106 с.

2. Khan A. A. Studies of kinetics and mechanism of interaction of  $\alpha$ -aminoacids with ninhydrin // J. Indian Chem. Soc. 1989. Vol. 66, № 7. P. 454–456.

3. Hamabaha A., Chang S., Hippel P. H. Model studies on the effects of neutral salts on the conformational stability of biological macromolecules. III. Solubility of fatty acid amino in ionic solutions // Biochem. 1973. Vol. 12, № 7. P. 1271–1278.

4. Мокшина Н. Я. Экстракция аминокислот и витаминов. Воронеж, 2007. 246 с.

УДК 543.544:577.18

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ АНТИБИОТИКОВ ТЕТРАЦИКЛИНОВОГО И ХИНОЛОНОВОГО РЯДОВ МЕТОДОМ ТСХ

Т.Д. Смирнова, А.Ю. Удалова, С.А. Птицкая

Саратовский государственный университет  
E-mail: Smirnova@sgu.ru

Представлены результаты выбора оптимальных подвижных фаз, содержащих различные ПАВ,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -циклодекстрины, ионы европия, позволяющих осуществить эффективное разделение антибиотиков, присутствующих в комбинированных лекарственных препаратах методом тонкослойной хроматографии.

**Ключевые слова:** тонкослойная хроматография, поверхностно-активные вещества, циклодекстрины, антибиотики.

#### Determination of Some Antibiotics of Quinolone and Tetracycline Groups Using TLC

T.D. Smirnova, A.Yu. Udalova, S.A. Ptickay

The results of the study of the influence of various surfactants,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclodextrins, and ions of Europium on the antibiotics separation according to the method of the thin layer chromatography in medical products are presented.

**Key words:** thin-layer chromatography, surfactants, cyclodextrins, antibiotics.

Хинолоновые и тетрациклиновые антибиотики являются важнейшими биологически активными веществами, клиническими препаратами, обладающими широким спектром действия и имеющие высокую химиотерапевтическую эффективность. В зависимости от конкретной задачи, стоящей перед исследователем для анализа антибиотиков, используют спектрофотометрические [1], флуориметрические [2, 3] методы, а также методы колоночной [4, 5] и планарной хроматографии (ТСХ) [6]. Необходимо отметить, что метод ТСХ является наиболее пер-



спективным для осуществления контроля качества сырья и готовой продукции комбинированных лекарственных препаратов.

В последнее время для определения биологически активных веществ, таких как антибиотики, антикоагулянты, нуклеотиды и белки, широко используют флуориметрический метод анализа. Однако интенсивность собственной флуоресценции органических соединений невелика, поэтому актуальны различные подходы, позволяющие увеличить квантовый выход флуоресценции. Одним из них является метод сенсibilизированной люминесценции, возникающей при внутримолекулярном переносе энергии возбуждения в хелатах европия и тербия [7, 8]. Он отличается высокой чувствительностью, простотой выполнения и применяется для решения задач токсикологии, медицинской диагностики, фармакокинетики, контроля качества лекарственных препаратов.

Второй подход к увеличению квантового выхода антибиотиков заключается в использовании мицеллярных растворов поверхностно-активных веществ и циклодекстринов, роль которых заключается в изменении микровязкости, полярности среды, к формированию более «жесткой» структуры молекулы антибиотика и экранирования ее