



УДК 543.54:547

## ЦВЕТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ α-АМИНОКИСЛОТ В СМЕШАННЫХ РАСТВОРАХ ПОСЛЕ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

Е. И. Селифонова, Р. К. Чернова, М. В. Пысина

Саратовский государственный университет  
E-mail: selif-ei@yandex.ru

В настоящей работе исследована возможность разделения бинарных и многокомпонентных смесей – аминокислот методом зонального электрофореза на целлюлозной поддерживающей среде с последующей визуализацией выделенных зон и цветометрической обработкой полученных сигналов.

**Ключевые слова:** α-аминокислоты, цветометрия, электрофорез.

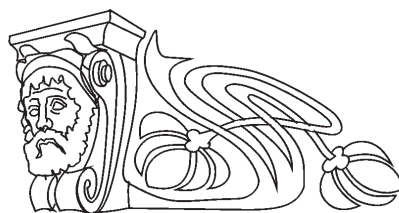
### Tsetometrichesky Definition of α-amino Acids in the Mixed Solutions after Elektroforeticheskoy Division

E. I. Selifonova, R. K. Chernova, M. V. Pysina

In this paper the possibility of separation of binary and multicomponent mixtures of amino acids by zone electrophoresis on cellulose supportive environment, followed by visualizing selected zones and Colorimetric processing of the received signals.

**Key words:** α-amino acids, colorimetry, electrophoresis.

В работе [1] было показано, что электрофоретическая подвижность аминокислот на целлюлозной поддерживающей среде в кислых буферных растворах определяется величиной отношения заряда к молекулярной массе ( $Z/Mr$ ) и в ряду 20 α-аминокислот максимальна для лизина, гистидина, аргинина, глицина и аланина ( $pH = 1,6$ ), а также аспарагиновой и глутаминовой кислот ( $pH = 5,2$ ).



Однако известно, что на электрофоретическое поведение частиц могут оказывать влияние такие факторы, как электроосмос, ток буфера, сифонный эффект, сорбционные свойства поддерживающей среды и др. В связи с этим нами исследовалось влияние указанных факторов на электрофоретическую подвижность 20 α-аминокислот. Оценка поправки на электроосмос проводилась с помощью нейтрального полисахарида – декстрана. Установлено, что в кислых средах ( $pH = 1,6$ ), когда целлюлозная поддерживающая среда практически не несет отрицательного заряда (карбоксильные группы не ионизированы), электроосмотический поток практически отсутствует, что согласуется с литературными данными [2]. Ток буфера был минимизирован путем применения «влажной камеры». Сорбции α-аминокислот на используемой фильтровальной бумаге (ТУ 6-09-1678-95, Россия) нами не наблюдалось, о чем свидетельствует отсутствие «кометных хвостов» на электрофореграммах [2].

Исследовалось влияние времени электрофореза на эффективность разделения аминокислот (табл. 1).

Таблица 1

Некоторые параметры электрофоретического разделения аминокислот в зависимости от времени электрофореза ( $pH = 1,6$ )

№	Разделяемая смесь	$t = 1$ ч			$t = 2$ ч		
		$l_1$ , см	$l_2$ , см	$R_s$	$l_1$ , см	$l_2$ , см	$R_s$
1	Лизин – глицин	4,7	2,5	39,1	7,8	4,6	154,1
2	Лизин – серин	5,5	2,9	52,4	8,0	4,0	154,5
3	Лизин – пролин	6,8	3,5	67,7	8,1	2,6	131,3
4	Лизин – цистеин	6,7	3,3	42,2	8,0	3,9	139,7
5	Лизин – изолейцин	5,4	1,6	56,4	8,5	2,8	130,0
6	Лизин – аспарагино-вая кислота	6,3	2,3	38,8	8,3	1,8	124,7
7	Лизин – фенилаланин	6,7	2,7	51,5	8,4	3,0	141,5
8	Лизин – триптофан	6,3	2,6	57,7	7,9	2,7	117,3

Примечание.  $l_1$  и  $l_2$  – расстояния от стартовой линии, пройденные соответственно лизином и второй аминокислотой смеси;  $R_s$  – разрешение для двух электрофоретически разделенных зон (пятен);  $R_s = \frac{l_1 - l_2}{\sqrt{l_1} - \sqrt{l_2}} \sqrt{N}$ ;  $N = 16 \left( \frac{l}{w} \right)^2$ ; где  $N$  – число теоретических тарелок;  $w$  – ширина зоны (пятна).



Как видно из табл. 1, с увеличением времени электрофореза смешанных растворов от 1 до 2 ч эффективность электрофоретического разделения

увеличивается в 2,5–3 раза, что существенно для ряда плохо разделяемых смесей аминокислот. Табл. 2 иллюстрирует это заключение.

Таблица 2

**Значения ширины электрофоретически разделенных зон аминокислот ( $W$ ) и расстояния между зонами ( $\Delta l$ ) (рН = 1,6 ;  $t = 2$  ч)**

№	Разделяемые аминокислоты	$w_1$ , см	$w_2$ , см	$\Delta l$ , см
1	Глицин – цистеин	0,7	0,8	1,0
2	Глицин – аспарагиновая кислота	0,8	1,1	2,0
3	Глицин – лизин	0,6	0,9	3,5
4	Глицин – фенилаланин	0,8	1,1	0,5
5	Серин – аспарагиновая кислота	1,0	0,8	1,5
6	Серин – лизин	0,7	1,1	4,0
7	Пролин – лизин	0,9	0,9	4,6
8	Цистеин – лизин	0,7	0,7	4,5
9	Изолейцин – аспарагиновая кислота	0,9	1,0	1,5
10	Изолейцин – лизин	1,0	0,7	4,0
11	Аспарагиновая кислота – лизин	0,9	0,8	5,5
12	Аспарагиновая кислота – фенилаланин	1,2	1,0	1,5
13	Лизин – фенилаланин	1,1	0,7	4,0

Примечание.  $w_1, w_2$  – относятся соответственно к первой и второй компонентам смеси.

Из 28 исследованных бинарных смешанных растворов  $\alpha$ -аминокислот хорошо разделились 13 (см. табл. 2). Такие бинарные смеси, как глицин – серин (пролин, изолейцин); серин – пролин (цистеин, изолейцин, фенилаланин); пролин – цистеин (изолейцин, аспарагиновая кислота, фенилаланин); цистеин – изолейцин (аспарагиновая кислота, фенилаланин); изолейцин – фенилаланин; триптофан – глутаминовая кислота (аспарагиновая кислота, изолейцин, треонин, пролин, серин, аланин, лейцин, цистеин, тирозин, фенилаланин) разделить не удалось.

Для количественного определения разделенных  $\alpha$ -аминокислот (рН = 1,6) важнейшим моментом является надежная визуализация соответствующих зон на электрофореграммах. Для визуализации обычно применяют 0,1–0,2% растворы нингидрина в воде или в органических растворителях. В случае электрофореграмм, полученных нами в кислых средах, визуализация стандартным способом растворами нингидрина в воде и органических растворителях приводила к образованию пурпура Руэмана красного цвета, представляющего собой, согласно [3], смесь дикетогидринденкетогидринамина ( $\lambda = 580$  нм) и гидриндантина ( $\lambda = 530$  нм). Наличие двух продуктов реакции с разным выходом, их неустойчивость на воздухе (быстрое обесцвечивание вследствие окисления кислородом) приводило к большой

нестабильности результатов. В связи с этим нами разработана специальная визуализирующая смесь на основе нингидрина, содержащая щелочной буферный раствор (рН = 8,5) с добавкой цетилпиридиний хлорида [4] и применена для визуализации зон на электрофореграммах, полученных в кислых средах. Указанная визуализирующая смесь позволила получить другую аналитическую форму – продукт гидролиза гидриндантина, окрашенную в фиолетово-синий цвет и стабилизированную катионами цетилпиридиния с образованием устойчивого ионного ассоциата. Такая аналитическая форма, в отличие от пурпура Руэмана, устойчива в течение многих недель.

Полученной визуализирующей композицией проводилась двукратная обработка (орошение из пульверизатора) выделенных на электрофореграммах зон аминокислот с последующем высушиванием в сушильном шкафу. После каждого орошения электрофореграммы высушивались в течение 10 мин при 100° С и далее проводилась их цветометрическая обработка.

С распространением цифровой фотографии и настольных сканеров возникла возможность автоматизированной оценки индикационного эффекта химической реакции на твердом носителе как по характеристикам цветности, так и по общей оценке цифрового изображения: отражающей способности или светлоте. Цвет, его интенсивность,



яркость, насыщенность, ток являются при этом основными носителями информации о содержании тестируемого вещества в сорбате. Показано, что цветовые функции (координаты цвета  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ ), светлота  $L$ , насыщенность  $S$ , цветовой ток  $T$ , белизна  $W$ , широко используемые в полиграфии, цветном телевидении, текстильной промышленности при создании непосредственно цвета объекта, могут быть использованы как чувствительные аналитические сигналы при разработке тест-методов.

Окрашенные вещества на адсорбенте представляют собой систему, в которой каждая ее точка может быть представлена не только в координатах  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ , но и в координатах основных цветов  $R$ ,  $G$ ,  $B$ . Эти индивидуальные параметры позволяют построить градуировочную усредненных цветометрических характеристик  $R$ ,  $G$ ,  $B$  от логарифма концентрации исследуемого вещества (рисунок).

Полученные электрофореграммы оцифровывали с применением сканера. Обработку электрофореграмм осуществляли с помощью программы Adobe Photoshop 6.0. Необходимую часть изображения усредняли до 1 пикселя и оценивали его цветность в стандартных единицах цветности  $R$ ,  $G$ ,  $B$ .

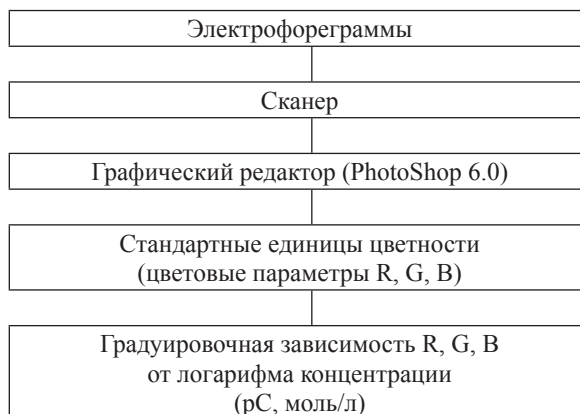


Схема процедуры построения градуировочной зависимости цветометрическим методом

В табл. 3 приведена цветометрическая оценка визуализированных электрофореграмм после отделения аминокислот, рассмотренных выше, из би- и многокомпонентных смешанных растворов, указан диапазон определяемых содержаний. Для оценки содержания аминокислот использованы линейные участки градуировочных зависимостей соответствующих параметров цветности от концентрации аминокислот.

Таблица 3

Некоторые параметры цветометрического определения  $\alpha$ -аминокислот

№	Смесь аминокислот	Определяемая аминокислота	Условия отделения	Уравнение градуировочных графиков	Диапазон определяемых содержаний, мг
1	Глицин, серин, пролин, цистеин, изолейцин, аспарагиновая кислота, фенил-аланин, триптофан, лизин	Лизин	$pH=1,6$ ; $U=360$ В; (30% $CH_3COOH$ ) $t=1$ ч; $I=10$ мА	$y_R = 21,8 x + 118$ $R^2 = 0,9947$	44–0,39
2	Глицин, глутаминовая кислота, тирозин, лейцин, валин, аланин, треонин, гистидин	Гистидин	$pH=1,6$ ; $U=340$ В; (30% $CH_3COOH$ ) $t=2$ ч; $I=8$ мА	$y_G = 27,8 x + 55,8$ $R^2 = 0,9684$	47–0,78
3	Глицин, серин, глутамин, тирозин, валин, аланин, фенилаланин, треонин, аргинин	Аргинин	$pH=1,6$ ; $U=520$ В; (30% $CH_3COOH$ ) $t=2$ ч; $I=1,5$ мА	$y_R = 24,6 x + 84,3$ $R^2 = 0,9921$	52–0,87
4	Аланин, фенилаланин	Аланин, фенилаланин	$pH=1,6$ ; $U=520$ В; (30% $CH_3COOH$ ) $t=2$ ч; $I=2$ мА	$y_B = 39,3 x + 83,2$ $R^2 = 0,9861$ $y_R = 26,3 x + 135$	27–0,45 50–0,83
5	Аланин, триптофан	Аланин, триптофан	$pH=1,6$ ; $U=520$ В; (30% $CH_3COOH$ ) $t=2$ ч; $I=1,5$ мА	$y_B = 39,3 x + 83,2$ $R^2 = 0,9861$ $y_B = 30,2 x + 119$ $R^2 = 0,9512$	27–0,45 50–0,83
6	Лизин, глутамин	Лизин, глутамин	$pH=8,9$ ; $U=290$ В; ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ HCl) $t=1$ ч; $I=2$ мА	$y_R=27,6 x + 108$ $R^2=0,9916$ $y_G=43,7 x + 42,3$ $R^2=0,9835$	53–0,28 44–0,74
7	Лизин, аспарагиновая кислота	Лизин аспарагиновая кислота	$pH=8,9$ ; $U=290$ В; ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ HCl) $t=1$ ч; $I=1,5$ мА	$y_R=27,6 x + 107$ $R^2=0,9916$ $y_G=29,2 x + 115$ $R^2=0,9896$	53–0,28 40–0,67



Для оценки содержания аминокислот использованы линейные участки градуировочных зависимостей соответствующих параметров цветности от концентрации аминокислот.

Результаты проверки правильности цветометрического определения приведены в табл. 4.

Таблица 4

**Проверка правильности цветометрического определения аминокислот после электрофоретического отделения из смешанных растворов ( $n = 3, p = 0,95$ )**

Введено отделяемой аминокислоты, мг	Найдено, отделенной аминокислоты, мг	Правильность, %	Sr
<b>ЛИЗИН</b> смесь № 1 (9 аминокислот, см. табл. 3)			
1,0	0,9 ± 0,2	90	0,09
1,4	1,5 ± 0,09	109	0,08
10	9,5 ± 0,9	95	0,04
2,0	2,2 ± 0,3	110	0,05
<b>АЛАНИН</b> (смесь Ala – Phe)			
1,0	1,1 ± 0,2	110	0,09
2,0	2,2 ± 0,5	110	0,08
0,14	0,16 ± 0,03	114	0,06
<b>ГИСТИДИН</b> смесь № 2 (7 аминокислот, см. табл. 3)			
3,0	3,1 ± 0,2	103	0,03
20	23 ± 5	115	0,08
0,45	0,48 ± 0,03	107	0,05
<b>АРГИНИН</b> смесь № 3 (8 аминокислот, см. табл. 3)			
1,0	0,9 ± 0,3	90	0,08
40	42 ± 4	105	0,09
5,0	5,3 ± 0,6	106	0,005
0,15	0,17 ± 0,04	113	0,07

Как следует из данных табл.4, погрешность определения электрофоретически отделенных аминокислот колеблется в основном в интервале 3–10%.

В результате проведенной работы исследовано влияние электроосмотического потока, тока буфера, сорбции аминокислот на бумажном носителе на электрофоретическую подвижность 20  $\alpha$ -аминокислот. Исследована возможность электрофоретического разделения более 20 смешанных растворов  $\alpha$ -аминокислот. Предложена композиция для визуализации выделенных зон на основе нингидрина, цетилпиридиний хлорида и буферной щелочной среды. Разработана простая методика цветометрического определения разделенных аминокислот на визуализированных электрофореграммах, найдены диапазоны определяемых содержаний и оценена правильность полученных результатов.

**Список литературы**

1. Селифонова Е. И., Чернова Р. К. Селективное электрофоретическое разделение ионных форм аминокислот // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2012. Т. 12, вып. 3. С. 26–32.
2. Киселева Т. Л., Фролова Л. Н., Баратова Л. А., Байбакова Г. В., Ксенофонтов А. Л. Изучение аминокислотной фракции экстракта мумие сухого // Хим.-фарм. журн. 1998. № 2. С. 47–51.
3. 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.
4. Пат. 2478932 Российская Федерация. Способ визуализации аминокислот на целлюлозной матрице, средство для его реализации и способ получения средства / Чернова Р. К., Селифонова Е. И., Пысина М. В.; опубл. 10.04.2013, Бюл. № 10.