

Фундаментальная и прикладная химия, химическая технология

УДК 543.054.22

Доцент Н.Я. Мокшина

(ВУНЦ ВВС «Военно-воздушная академия имени профессора Н.Е.Жуковского и Ю.А.Гагарина») кафедра физики и химии,
E-mail: moksнад@mail.ru

преподаватель А.А. Бычкова

(Воронеж. гос. ун-т инж. технол.) факультет среднего профессионального образования.
тел. (473) 255-07-62
E-mail: rusalka_anna@mail.ru

доцент О.А. Пахомова

(Елецкий государственный университет им. И.А.Бунина) кафедра химии и экологии
E-mail: pakhomchik@mail.ru

Associate Professor N.Ia. Mokshina

(Air Force Academy), Department of Physics and Chemistry,
E-mail: moksнад@mail.ru

lecturer A.A. Bychkova

(Voronezh State University of Engineering Technology) Faculty of secondary vocational education
E-mail: rusalka_anna@mail.ru

associate Professor O.A. Pakhomova

(Bunin Yelets State University) Department of Chemistry and Ecology
E-mail: pakhomchik@mail.ru

Экстракция ароматических аминокислот поли-N-винилпирролидоном-3500

Extraction of aromatic amino acids by poly-N-vinylpyrrolidone-3500

Реферат. Изучена экстракция фенилаланина, тирозина и триптофана из водно-солевых растворов водорастворимым полимером – поли-N-винилпирролидоном с молекулярной массой 3500. В идентичных условиях получены количественные характеристики экстракции, разработана общая схема анализа. Изучено влияние соотношения объемов водной и органической фаз на степень извлечения фенилаланина, триптофана и тирозина. Проанализирована зависимость вязкости раствора полимера и скорости расщепления систем от молекулярной массы экстрагента и его концентрации. Установлено, что изученные ароматические аминокислоты наиболее полно извлекаются раствором ПВП-3500 с концентрацией 0,12 г/см³ при соотношении равновесных объемов водной и органической фаз 10:4. Оптимизированы условия для практически полного извлечения фенилаланина, тирозина и триптофана из водно-солевых растворов. Разработана методика экстракционно-спектрофотометрического определения ароматических аминокислот в водном растворе. На основании максимумов светопоглощения предложена схема взаимодействия ПВП-3500 с извлекаемыми веществами. Разработанная нами методика характеризуется экспрессностью (продолжительность анализа 30 – 40 мин), точностью (относительная погрешность в пределах 7 %), экологичностью (отсутствие токсичных и вреднодействующих экстрагентов, «зеленая экстракция»). Изученные экстракционные системы применимы для практически полного извлечения фенилаланина, тирозина и триптофана из водных растворов.

Summary. The extraction of phenylalanine, tyrosine and tryptophan from aqueous salt solutions by water soluble polymer - poly-N-vinylpyrrolidone having a molecular weight of 3,500 has been studied. Under identical conditions set quantitative characteristics extraction has been established, general scheme of analysis has been developed. Effect the volume ratio of aqueous and organic phases to the recovery of phenylalanine, tryptophan and tyrosine has been studied. The dependence of solution viscosity of the polymer and the speed of lamination systems the molecular weight and concentration of the extractant has been set. It was established that the most studied aromatic amino fully extracted solution of PVP-3500 at a concentration of 0,12 g/cm³, while the ratio of the equilibrium amounts of aqueous and organic phases 10:4. Optimized conditions for the almost complete extraction of phenylalanine, tyrosine and tryptophan from aqueous salt solutions. The technique of extraction-spectrophotometer determination of aromatic amino acids in aqueous solution. Based high proposed scheme of interaction with PVP-3500 extractable substances. We have developed a technique characterized by express (analysis time 30 - 40 min), accuracy (relative error within 7%), ecology (and lack of toxic extragants "green extraction"). Learned extraction systems applicable to practically complete extraction of phenylalanine, tyrosine and tryptophan from aqueous solutions.

Ключевые слова: аминокислоты, экстракция, спектрофотометрический анализ.

Keywords: amino acids, extraction, spectrophotometry analysis.

© Мокшина Н.Я., Бычкова А.А., Пахомова О.А., 2014

Ароматические аминокислоты участвуют во всех жизненных процессах наряду с нуклеиновыми кислотами, углеводами и липидами. Потребность в значительных количествах незаменимых аминокислот и общеукрепляющих, оздоровительных, питательных добавок на их основе неуклонно возрастает в связи с их широким применением в биохимии, пищевой и медицинской промышленности и сельском хозяйстве, а также при исследовании растительных и животных тканей [1-3].

Сложности возникают при исследовании культуральных сред и аминокислотных препаратов, представляющих собой многокомпонентные системы, содержащие большое количество примесных и балластных веществ. В таких системах затруднено препаративное разделение и концентрирование ароматических аминокислот. Это приводит к ограничению возможностей применения хроматографических и спектральных методов анализа.

Перспективным направлением в решении такой задачи является использование в экстракционных системах водорастворимых высокомолекулярных соединений [4].

В последние годы химия поли-N-виниламидов интенсивно развивается и интегрируется во многие области науки, включая медицину и биотехнологию. Водорастворимость, биосовместимость, нетоксичность, термочувствительность в водных растворах и высокая комплексообразующая способность – такие свойства поли-N-виниламидов определяют перспективы их практического применения.

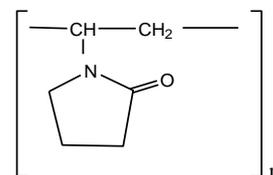
Известно, что двухфазные водные системы на основе водорастворимых полимеров наиболее полно удовлетворяют требованиям, предъявляемым к экстракционным системам. Водорастворимые полимеры, как правило, нетоксичны, нелетучи, легко доступны и обладают повышенной комплексообразующей способностью по отношению ко многим биологически активным веществам [5].

Высокая экстрагирующая эффективность таких систем позволяет применять их для пробоподготовки широкого круга объектов – лекарственных препаратов сложного состава, пищевых продуктов, кормов, экстрактов биологических жидкостей.

Цель исследования – изучение экстракции фенилаланина, тирозина и триптофана поли-N-винилпирролидоном-3500, установление общих характеристик процесса.

Изучено извлечение фенилаланина, тирозина и триптофана из водных растворов поли-N-винилпирролидоном-3500.

ПВП-3500 – аморфный полимер белого цвета, легко растворим в воде, хлороформе, этиловом спирте, практически нерастворим в ароматических углеводородах и кетонах.



поли-N-винилпирролидон

Взаимодействует со многими низко- и высокомолекулярными соединениями в водных растворах, способен к комплексообразованию с разными органическими и неорганическими веществами. Эта способность расширяет области практического применения полимера в различных отраслях [6].

Жидкостная двухфазная система получена на основе водного раствора полиэлектролита и высаливателя. При этом одна из фаз насыщается полимером, вторая – солью.

После экстракционного извлечения и разделения органических соединений, как правило, проводят анализ водного концентрата различными физико-химическими методами. Для установления количества, чистоты и подлинности различных органических соединений в растворах применяется УФ-спектроскопия.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре DR-5000 (кварцевая кювета, толщина светопоглощающего слоя 1 см).

Общую последовательность операций анализа можно представить следующей схемой (рисунок 1).

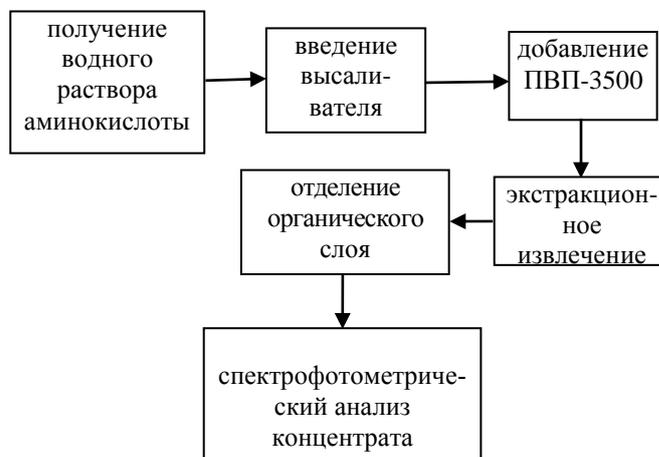


Рисунок 1. Схема анализа и определения аминокислот

В идентичных условиях установлены коэффициенты распределения (D), рассчитана степень извлечения (R , %).

Разработана методика экстракционного извлечения ароматических аминокислот с последующим спектрофотометрическим определением анализов.

Навеску фенилаланина, тирозина и триптофана фармакопейной чистоты с массами соответственно 0,035 г, 0,0075 г и 0,0035 г отбирали на аналитических весах, помещали в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводили до метки насыщенным раствором высаливателя.

В качестве высаливателя применяли сульфат аммония. Этот электролит оказывает наибольшее высаливающее действие по отношению к ароматическим аминокислотам, значительно повышает количественные характеристики экстракции (коэффициент распределения D и степень извлечения R , %).

Для экстракционного извлечения фенилаланина, тирозина и триптофана применяли карбоцепной полимер поли-*N*-винилпирролидон (ПВП) со средневязкостной молекулярной массой 3500.

В градуированные пробирки с пришлифованными пробками помещали 10 см³ раствора аминокислоты, 4 см³ водного раствора полимера ($C = 0,12$ г/см³) и экстрагировали 10 минут на вибросмесителе. Этого времени достаточно для установления межфазного равновесия. Для ускорения расслаивания системы экстракты центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 минут. Температурный интервал при экстракции устанавливали на уровне 21 ± 1 °С (термостат ТВ-20-ПЗ).

Концентрацию индивидуальных аминокислот после экстракции рассчитывали на основании данных спектрофотометрического определения при соответствующих длинах волн.

В водном растворе поли-*N*-виниламиды и вода образуют полимерный комплекс, каждая >C=O группа капролактамового или пирролидинового кольца ассоциируется с молекулами воды. Образующийся гидратный слой вблизи полимерной цепи состоит из 4-х молекул воды и 2-х звеньев полимера [7].

Изучена экстракция фенилаланина, тирозина и триптофана из водного раствора сульфата аммония (ранее установлено, что в присутствии этого высаливателя достигаются максимальные экстракционные характеристики витаминов) поли-*N*-винилпирролидоном [8]. Максимальные экстракционные характеристики аминокислот в присутствии сульфата аммония обусловлены вытеснением сульфат-ионами воды из гидратного слоя полимера.

Установлено, что на степень извлечения фенилаланина, триптофана и тирозина значительное влияние оказывает соотношение объемов водной и органической фаз (f) вследствие их высокой взаимной растворимости фаз (рисунок 2). Зависимость степени извлечения тирозина в системах с ПВП-3500 от соотношения объемов равновесных фаз свидетельствует о наибольшей эффективности систем со значением f 10:4.

Вязкость раствора полимера и скорость расслаивания с растворами солей зависят от молекулярной массы полимера и его концентрации в системе. Концентрация полимера изменялась в интервале 0,05–0,15 г/см³. Предварительные исследования показали, что при увеличении концентрации выше 0,15 г/см³ образуются ассоциаты полимера, при этом освобождается связанная вода, которая переходит в равновесную водно-солевую фазу.

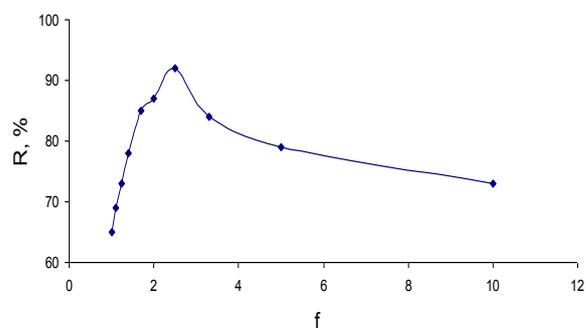


Рисунок 2. Зависимость степени извлечения тирозина от соотношения объемов равновесных фаз при экстракции ПВП-3500 в присутствии сульфата аммония

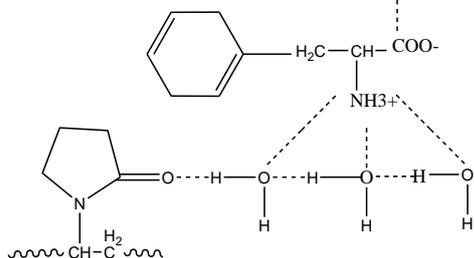
В результате соотношение объемов равновесных фаз остается постоянным и коэффициенты распределения витаминов с увеличением концентрации полимера свыше 0,15 г/см³ возрастают незначительно.

Максимальные экстракционные характеристики аминокислот достигаются при концентрации ПВП-3500 0,12 г/см³.

Приводим экстракционные характеристики фенилаланина, тирозина и триптофана в системах с поли-*N*-винилпирролидоном при различной концентрации модельных растворов аминокислот (таблица 1).

Максимальная степень извлечения фенилаланина при однократной экстракции в присутствии сульфата аммония - 90 %, триптофана - 94 %, тирозина - 92%. Очевидно, на межфазное распределение аминокислот существенное влияние оказывает строение их молекул, наличие в структурах функциональных групп, способных образовывать внутри- и межмолекулярные водородные связи.

Образование комплекса полимера с аминокислотой происходит за счет водородных связей между атомом кислорода полимера (неспаренная пара электронов) и атомом водорода в структуре аминокислоты через «мостик» воды [8]:



Т а б л и ц а 1

Экстракционные характеристики при извлечении фенилаланина, триптофана и тирозина ПВП-3500 при различной концентрации аминокислот $f = 10:4$; $n = 4$; $P = 0,95$

C, мг/см ³	D	R,%
Фенилаланин		
0,10	12± 1,2	81
0,15	13± 0,8	84
0,20	10± 2,3	80
0,25	14± 1,8	85
0,30	18± 0,9	88
0,35	23± 1,4	90
0,40	17± 2,7	87
0,45	13± 3,1	84
0,50	17± 2,9	87
Триптофан		
0,05	17± 1,3	87
0,055	19± 2,2	88
0,060	19± 2,2	88
0,065	25± 3,1	91
0,070	28± 1,2	92
0,075	36± 2,1	94
0,080	30± 2,5	93
0,085	28± 2,9	92
0,090	31± 1,8	93
Тирозин		
0,005	14± 1,4	85
0,010	12± 1,6	83
0,015	17± 1,8	87
0,020	15± 2,1	86
0,025	18± 1,5	88
0,030	21± 2,3	89
0,035	28± 2,3	92
0,040	25± 1,7	91
0,045	23± 2,4	90

Для количественного определения аминокислот в водных растворах и органической фазе предварительно построены спектральные характеристики полимера (рисунок 3) и водного раствора аминокислот (рисунок 4).

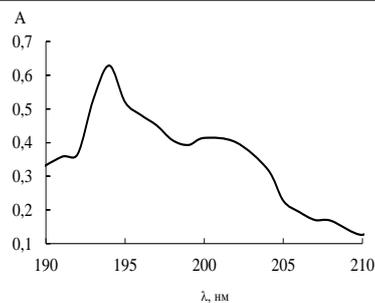


Рисунок 3. УФ-спектр светопоглощения поли-N-винилпирролидона; $\lambda_{max} = 194$ нм

На основании максимумов светопоглощения можно предположить, что при взаимодействии ПВП-3500 с ароматическими аминокислотами образуются комплексы, оптические свойства которых отличаются от исходных компонентов [9].

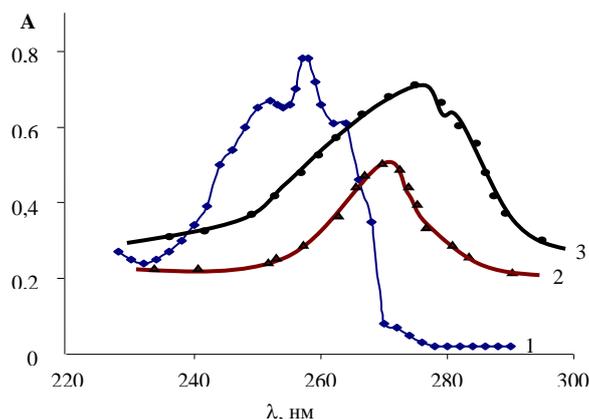


Рисунок 4. УФ-спектры светопоглощения фенилаланина (1), тирозина (2) и триптофана (3) в водном растворе

На УФ-спектрах светопоглощения систем ПВП-3500 и аминокислот в совместном присутствии проявляются максимумы светопоглощения индивидуальных компонентов (рисунок 5).

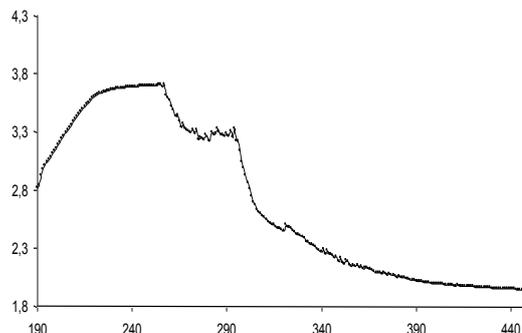


Рисунок 5. УФ-спектр светопоглощения смеси триптофан - поли-N-винилпирролидон

На межфазное распределение и эффективность экстракции ароматических аминокислот влияет молекулярная масса полимера, в зависимости от которой аминокислоты после экстракции содержатся в разных фазах [10].

Установлено, что применение полимера с меньшей молекулярной массой приводит к более высоким экстракционным характеристикам, поэтому в предлагаемых нами системах достигает-

ЛИТЕРАТУРА

1 Комов В.П., Шведова В.Н. Биохимия. М.: Дрофа, 2004. 638 с.

2 Абросимов В.К. Биологически активные вещества в растворах: структура, термодинамика, реакционная способность. М.: Наука, 2001. 403 с.

3 Будников Г.К., Зиятдинова Г.К. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии // Журнал аналитической химии. 2005. Т. 60. № 7. С. 678 – 691.

4 Шкинев В.М., Мокшина Н.Я., Хохлов В.Ю., Спиваков Б.Я. Экстракция биологически активных веществ в двухфазных водных системах на основе поли-*n*-винилпирролидона // Доклады академии наук. 2013. Т. 448. № 4. С. 1–3.

5 Мокшина Н.Я. Экстракция аминокислот и витаминов. Воронеж: ВГТА, 2007. 246 с.

6 Кузнецов В.А. Синтез и радикальная полимеризация циклических *N*-виниламидов: дис. ... канд. хим. наук. М.: Моск. гос. академия тонкой хим. технологии им. М.В. Ломоносова, 1998. 143 с.

7 Кириш Ю.Э. Поли-*N*-винилпирролидон и другие поли-*N*-виниламиды. М.: Наука, 1998. 252 с.

8 Мокшина Н.Я. Экстракция и определение ароматических α -аминокислот и водорастворимых витаминов – закономерности и новые аналитические решения: дис. ... д-ра хим. наук. Краснодар: КГУ, 2007. 328 с.

9 Чурилина Е.В., Шаталов Г.В., Коренман Я.И., Суханов П.Т. Применение водорастворимых поли-*N*-виниламидов для извлечения и концентрирования антоцианового красителя из водных сред // Журнал прикладной химии. 2008. Т. 81. № 4. С. 690 – 692.

10 Мокшина Н.Я., Быковский Д.В., Шаталов Г.В., Пахомова О.А. Общая методология межфазного распределения аминокислот и водорастворимых витаминов в разнохарактерных экстракционных системах // Конденсированные среды и межфазные границы. 2013. Т. 15. № 4. С. 423-427.

ся практически полное извлечение ароматических аминокислот при однократной экстракции.

Минимально определяемые концентрации фенилаланина, тирозина и триптофана в водных растворах по предлагаемой методике экстракционного извлечения находятся в интервале 0,005 – 0,5 мг/см³, относительная погрешность не превышает 7 %.

REFERENCES

1 Komov V.P., Shvedova V.N. Biokhimiia [Biochemistry]. Moscow, Drofa, 2004. 638 p. (In Russ.).

2 Abrosimov V.K. Biologicheski aktivnye veshchestva v rastvorakh: struktura, termodinamika, reaktsionnaia sposobnost' [Biologically active substances in solutions: structure, thermodynamics, reaction ability]. Moscow, Nauka, 2001. 403 p. (In Russ.).

3 Budnikov G.K., Ziatdinova G.K. Antioxidants as objects bioanalytical chemistry. *Zhurnal analiticheskoi khimii*. [J. Analyt. chemistry], 2005 vol. 60, no. 7, pp. 678 - 691. (In Russ.).

4 Shkinev V.M., Mokshina N. Ia., Khokhlov V.Iu., Spivakov B. Ia. Extraction of biologically active substances in two-phase water systems based on poly-*n*-vinylpyrrolidone. [Reports of the Academy of Sciences], 2013, vol. 448, no. 4. p. 1-3. (In Russ.).

5 Mokshina N.Ia. Ekstraktsiia aminokislot i vitaminov [Extraction of amino acids and vitamins]. Voronezh, VGTA, 2007. 246 p. (In Russ.).

6 Kuznetsov V.A. Sintez i radikal'naia polimerizatsiia tsiklicheskih *N*-vinilamidov. Dis. kand. khim. nauk [Synthesis and radical polymerization of cyclic *N*-vinylamides. Cand. chem. sci. dis.]. Moscow, 1998. 143 p. (In Russ.).

7 Kirsh Iu.E. Poli-*N*-vinilpirollidon i drugie poli-*N*-vinilamidy [Poly-*N*-vinyl pyrrolidone, and other poly-*N*-vinylamides]. Moscow, Nauka, 1998. 252 p. (In Russ.).

8 Mokshina N.Ia. Ekstraktsiia i opredelenie aromaticheskikh α 'fa-aminokislot i vodorastvorimyykh vitaminov - zakonomernosti i novye analiticheskie resheniia. Dis. dokt. khim. nauk. [Extraction and determination of aromatic alpha-amino acids, and water-soluble vitamins and new analytical solution. Doc. chem. sci. dis.]. Krasnodar, KGU, 2007. 328 p. (In Russ.).

9 Churilina E.V., Shatalov G.V., Korenman Ia.I., Sukhanov P.T. Application moderatori made of poly-*N*-vinylamides to extract and con-centering anthocyanin dye from water-governmental media. *Zhurnal prikladnoi khimii*. [J. appl. chemistry], 2008, vol. 81, no. 4, pp. 690 - 692. (In Russ.).

10 Mokshina N. Ia., Bykovskii D.V., Shatalov G.V., Pakhomova O.A. General methodology of interphase distribution of amino acids, and water-soluble vitamins in diverse extraction systems. *Kondensirovannyye sredy i mezhfaznye granitsy*. [Condensed media and interface boundaries], 2013, vol. 15, no. 4, pp. 423-427. (In Russ.).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках государственного задания.