

Рекомендована д.ф.н., професором П.О.Безуглим

УДК 54.061/062:543.544

ДАНСИЛХЛОРИД ЯК ДЕРИВАТИЗУЮЧИЙ РЕАГЕНТ В АНАЛІЗІ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Л.Ю.Клименко, В.В.Болотов, І.М.Іванчук

Національний фармацевтичний університет
Івано-Франківський державний медичний університет

Проведено вивчення літературних джерел щодо застосування дансилхлориду в аналізі біологічно активних речовин. Показано перспективність подальшої роботи з дансилхлоридом як дериватизуючим реагентом для сполук, що містять аміногрупи, з метою розробки схеми дослідження даних сполук у фармацевтичному і хіміко-токсикологічному аналізі при проведенні як спрямованого, так і неспрямованого аналізу.

Дериватизація, тобто отримання похідних аналізованої речовини, які мають інші (кращі з погляду використовуюваного аналітичного методу) аналітичні властивості (наприклад, інший УФ-спектр, флуоресценцію, термічну стабільність, леткість тощо), є одним з найважливіших напрямів аналітичної хімії, що постійно розвивається. Необхідність дериватизації визначається використовуваним для дослідження інструментальним методом аналізу [1, 5, 16, 19]. Так, наприклад, у газовій хроматографії її застосування пов'язане з отриманням більш летких сполук, зниженням полярності функціональних груп, і, як наслідок, поліпшенням хроматографічних властивостей речовини або отриманням продуктів, специфічних для певного типу детекторів (електронозахоплюючий, термоіонний детектор тощо) [1, 5]. Для рідинної хроматографії із застосуванням спектрофотометричних і флуоресцентних детекторів дериватизація дозволяє отримувати сполуки, що поглинають в УФ-області спектра або мають флуоресценцію відповідно [16, 19].

Метод тонкошарової реакційної (деривативної) хроматографії в загальному випадку передбачає отримання похідного (деривату) досліджуваної речовини за допомогою будь-якої хімічної реакції, елюювання його у відповідній системі розчинників, проявлення відповідним проявником і встановлення значення R_f . Такий підхід дозволяє у ряді випадків поліпшити розділення досліджуваної речовини з речовинами-аналогами, а також підібрати для нього селективний або навіть специфічний проявник. Крім того, спів-

відношення значень R_f для вихідної речовини та її деривату може бути додатковим фактором у процесі ідентифікації речовини [2].

На теперішній час в аналізі біологічно активних речовин широко використовується дериватизація дансилхлоридом — 5-диметиламінонафталін-1-сульфонілхлоридом (ДНС-хлорид) [6-53].

Вперше дериватизацію дансилхлоридом було використано в аналізі амінокислотної послідовності білків і поліпептидів. Метод ґрунтується на здатності даного реагенту вступати в реакцію з первинними α -аміногрупами з утворенням відповідних амідів, що мають флуоресценцію і стійких в умовах повного розщеплення білка до амінокислот при кислотному гідролізі [10, 14-16, 19, 22, 26, 28-30, 45].

Проведення аналізу можна описати таким чином: ДНС-хлорид реагує з непротонованою α -аміногрупою пептиду з утворенням дансильного похідного пептиду (ДНС-пептиду). Після завершення дериватизації проводять кислотний гідроліз модифікованого ДНС-пептиду, який приводить до розриву пептидних зв'язків і утворення ДНС-похідного N-кінцевої амінокислоти [16, 19, 31-33, 35, 36, 45].

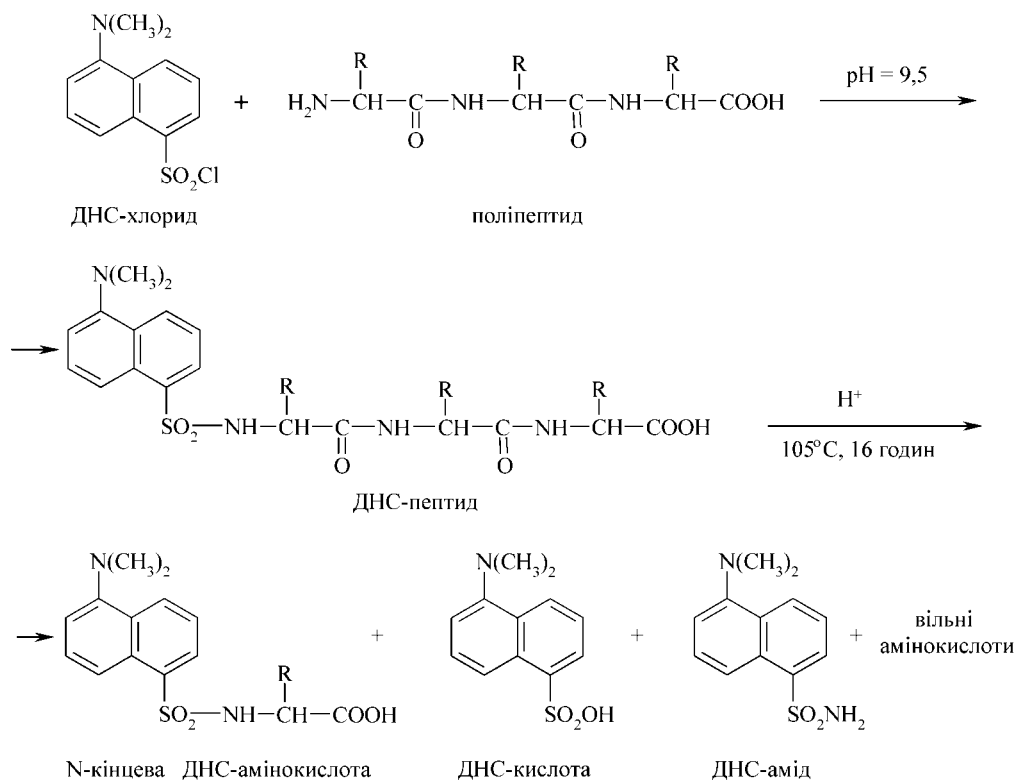
Схематично описаний процес можна відобразити таким чином [16, 19, 36] (схема).

Ця реакція проводиться в лужному середовищі у змішаному водно-органічному розчиннику (органічний компонент вводять для розчинення ДНС-хлориду). У цих умовах конкурують два процеси: дансилювання і гідроліз дансилхлориду до кислоти (ДНС-кислота) [3, 4, 36, 45].

Стадія дериватизації є лімітуючою у визначенні амінокислотного складу білків [3, 4].

Необхідно відзначити, що дансилхлорид реагує не тільки з кінцевими α -аміногрупами пептидів, а також з боковими аміно- і гідроксигрупами цистеїну, тирозину, лізину і гістидину, але з похідних, що утворюються за боковими групами, після гідролізу зберігаються тільки ϵ -ДНС-лізін і о-ДНС-тирозин [3, 4, 36, 45].

Що стосується значення рН середовища, оптимального для проведення аналізу, то дансилхлорид взаємодіє з аміногрупою в лужному сере-



Схема

довищі лише при $\text{pH} > 9$, оскільки в кисліших розчинах аміногрупа перебуває в неактивному стані у вигляді NH_3^+ . Проте з підвищенням pH середовища зростає ймовірність перебігу реакції, що конкурує з реакцією утворення ДНС-похідних, — гідролізу органічного реагента. При $\text{pH} > 9,6$ константа швидкості реакції гідролізу різко зростає, і гідроліз проходить дуже інтенсивно, що призводить до повної деструкції реагентів реакційної суміші вже при $\text{pH} = 10$. Таким чином, оптимальне значення pH для реакції дериватизації становить 9,5-9,6 [2-4, 16, 19, 36, 45].

Для підтримання pH реакційної суміші потрібний буферний розчин. З цього питання отримані суперечливі відомості — автори [3, 4] пропонують використовувати 500 мМ боратний буферний розчин з pH 9,6, інші дослідники використовують 40 мМ літій-карбонатний буферний розчин з pH 9,5 і допускають використання 200 мМ натрій-гідрокарбонатного буферного розчину з pH 9,5 [16, 19, 36].

Слід зазначити, що процес дансильовання не перебігає повністю, тому дериватизацію проводять при полуторному надлишку дериватизуючого агента. При цьому вихід реакції дериватизації збільшується в 2,6 рази в порівнянні з її проведенням при еквімолярному співвідношенні реагентів. Але при цьому необхідно враховувати, що в умовах надмірного надлишку реагенту можливий перебіг побічної реакції з утворенням дансиламіду (ДНС-амід), тому надмірні надлишки реагенту не використовують [3, 4, 36].

ДНС-похідні, як вже було зазначено, мають інтенсивну флуоресценцію в УФ-області спектра ($\lambda = 366$ нм), і зазвичай для їх ідентифікації використовують високоефективну двомірну тонкошарову хроматографію (ВЕТШХ) на силікагелі або поліаміді, ВЕРХ на колонці з оберненою фазою, електрофорез на папері або в тонкому шарі [2-4, 36, 45].

На користь цих методів ідентифікації свідчить те, що в ході взаємодії дансилхлориду з амінокислотами значно збільшується гідрофобність останніх і покращуються можливості їх хроматографічного розділення. Дансилхлорид є одним з найчутливіших реагентів у ВЕРХ для передколонкової дериватизації амінокислот з подальшою флуоресцентною детекцією (серед інших модифікаторів амінокислот він посідає восьме місце) [3, 4, 36].

Оскільки ДНС-похідні амінокислот мають електроактивні групи (аміногрупи і нафтильний фрагмент), досліджено їх електрохімічне детектування і показано, що межа виявлення за допомогою амперометричного детектування на два порядки нижча, ніж спектрофотометричного і близька до флуориметричного [3].

Основним недоліком використання дансилхлориду є тривалість (мінімальний час 20-30 хв) і складність дериватизації, оскільки перебіг конкурентних реакцій зменшує кількісний вихід ДНС-похідних [3, 4, 36].

Авторами [4] вивчено вплив нагрівання і дії мікрохвильового випромінювання (МВ) при 40°C на повноту і швидкість утворення ДНС-похідних в оптимальних для дериватизації амінокислот умо-

Таблиця

Застосування реакції дансилювання в аналізі біологічно активних речовин

Речовини	Метод визначення	Межа виявлення
Біогенні аміни (брадикінін, кадаверин, гістамін, путресцин, спермідин, спермін, тирамін) у консервах [2, 36] та біологічних рідинах [23]	ВЕРХ	0,1 мг/кг [36] 0,2 нг/мл [23]
Поліаміни в біологічних рідинах (цереброспінальна рідина, сеча, кров, гідролізат тканин) [11, 24]	ВЕРХ	
Фенілалкіламіни (метамфетамін, амфетамін, метилендіоксипохідні амфетаміну, N-етиламфетамін, фенетилін) у біологічних рідинах [49-51]	ВЕРХ з флуоресцентним або спектрофотометричним детектором [49, 50]. Газова хроматографія з мас-спектрометричною детекцією [51]	20 нмоль/мл
Симпатоміметичні засоби (фенфлурамін, фентермін, норфедрин, ефедрин, 2-фенілетиламін, 4-бром-2,5-диметоксифенілетиламін у біологічних рідинах [12]	ВЕРХ	
Флуоксетин, норфлуоксетин, оксамніхін, деякі похідні індолу, що мають психотропну активність у лікарських формах і плазмі людини [6, 40]	ВЕРХ з мас-спектрометричною детекцією	0,02 мкг/мл
Канцерогенні N-нітрозаміни в продуктах харчування [37, 38, 52, 53]	ТШХ після денітрозування мінеральними кислотами	
Хлорфеноли [9]	ТШХ	
Хлорпромазин та його більш ніж 20 метаболітів, що містять фенольні —ОН-групи і первинні та вторинні аміногрупи, у біологічних рідинах [13]	ВЕРХ	
Естрадіол, етинілестрадіолу, естрону в плазмі і сечі [7, 17, 27, 34, 48]	ВЕРХ з мас-спектрометричною детекцією	5 нг/мл
Гербіциди — похідні фенілсечовини та карбамати [8, 19-21]	ТШХ [8, 18, 20] ВЕРХ [18]	

вах. Використання мікрохвильового випромінювання або нагрівання помітно прискорює утворення ДНС-похідних амінокислот, але ступінь утворення продукту реакції в цих умовах менший, ніж при знаходженні зразка при кімнатній температурі. Нагрівання до 40°C зменшує вихід похідних на 20%, а мікрохвильове випромінювання — в 3 рази. Але при цьому необхідно зазначити, що використання мікрохвильового випромінювання дозволяє підвищити відтворюваність виходу реакції дериватизації і аналітичного сигналу [3, 4].

Особливо хотілося б відзначити, що всі вищезгадані умови дериватизації стосуються визначення сполук, що містять первинні і вторинні аміногрупи.

Надалі методику дериватизації було застосовано і для визначення сполук, що містять третинні аміногрупи, але в даному випадку модифікацію аміногруп проводять у жорсткіших умовах — при роздільному нагріванні проби і реагенту до 60-70°C, а після зливання розчинів (реагент використовується у вигляді насиченого розчину в органічному розчиннику, тобто в надлишку) суміш витримують при цій температурі не менше 30 хв. Так, описано визначення деяких третинних аліфатичних амінів (N,N-диметилетиламін, буфотенін, корденін, тропанові алкалоїди) з використанням техніки дансилювання в зазначених умовах. Можливим механізмом перебігу даної реакції є моно-

дезалкілювання досліджуваної речовини на першій стадії, а далі реакція перебігає згідно зі схемою, описаною вище для первинних і вторинних амінів [36, 45, 46].

На теперішній час модифікацію аміногруп дансилхлоридом використовують в аналізі не тільки білків, але й інших сполук, що містять аміногрупи, а також сполук, що містять функціональні групи, які перетворюються на аміногрупи. Крім того, показано, що дансилхлорид реагує з —SH і —ОН-групами, тому використовується в аналізі тіолів і фенолів [7-9, 17, 18-21, 25, 27, 34, 48].

Необхідно звернути увагу на те, що в цьому випадку використовують лише першу частину описаної вище класичної методики — кислотний гідроліз після дериватизації не проводять.

В загальному варіанті методику визначення амінів з використанням попередньої дериватизації можна подати наступним чином: пробу речовини в середовищі буферного розчину з рН 9,5 обробляють розчином дансилхлориду з концентрацією 0,75 мг/мл в суміші ацетонітрил — вода (7:3) таким чином, щоб співвідношення речовина — реагент становило приблизно 1:1,5. Реакцію виконують при кімнатній температурі в темному місці протягом 30-60 хв, після чого суміш хроматографують з використанням відповідного методу — ВЕРХ, ГРХ або ТШХ [11-13, 23, 24, 40, 49-51].

Дані щодо описаних в літературі методик визначення різноманітних речовин за допомогою реакції дансилювання наведені в таблиці.

ВИСНОВКИ

Таким чином, проведений аналіз літературних джерел показав перспективність подальшої робо-

ти з дансилхлоридом як дериватизуючим реагентом для сполук, що містять аміногрупи, з метою розробки схеми дослідження даних сполук у фармацевтичному і хіміко-токсикологічному аналізі при проведенні як спрямованого, так і неспрямованого аналізу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Березкин В.Г. *Химические методы в газовой хроматографии*. — М., 1980. — 487 с.
2. Курхнер Ю. *Тонкослойная хроматография: в 2-х т.* — М.: Мир, 1981. — Т. 1. — 616 с.
3. Чернобровкин М.Г. *Определение аминокислот и их оптических изомеров в виде о-фталевых и дансильных производных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Автореф. дис. ... канд. хим. наук.* — М., 2006. — 25 с.
4. Шунина М.В., Чернобровкин М.Г., Башилов Д.В. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* — 2006. — Т. 47, №4. — С. 262-265.
5. Blau K., King G.S. *Handbook of derivatives for chromatography*. — London, Philadelphia: Rheine, 1978. — 448 p.
6. El-Enany N., Belal F., Rizk M. // *J. Fluoresc.* — 2008. — Vol. 18 (2). — P. 349-355.
7. Fishman S. // *J. Pharm. Sci.* — 1975. — Vol. 64. — P. 674.
8. Frei R.W., Lawrence J.F. // *J. Chromatogr.* — 1972. — Vol. 67. — P. 87.
9. Frei-Hausler M., Frei R. W. // *J. Chromatogr.* — 1973. — Vol. 84. — P. 214.
10. Gray W.R. // *Methods Enzymol.* — 1972. — Vol. 25. — P. 121-138.
11. Hunter K.J. // *Polyamine Protocols*. — 1997. — Vol. 79. — P. 119-123.
12. Kaddoumi A., Nakashima M.N., Wada M. // *J. of Liquid Chromatogr. and Related Technol.* — 2001. — Vol. 24, №1. — P. 57-67.
13. Kaul P.N., Conway M.W., Clark M.L. // *Nature*. — 1970. — Vol. 226. — P. 372-373.
14. Kosoy A., Moller C., Perdomo D. // *J. of Biochem. and Molecular Biol.* — 2004. — Vol. 37, №2. — P. 260-267.
15. Koyama H., Sugioka N., Hirata I. // *J. Chromatogr. Sci.* — 1996. — Vol. 34. — P. 326.
16. Krull I.S. *Reaction detection in liquid chromatography*. — N.Y.-Basel, 1986. — 845 p.
17. Kushnir M.M., Rockwood A.L., Bergquist J. // *Am. J. Clin. Pathol.* — 2008. — Vol. 129 (4). — P. 530-539.
18. Lawrence J.F., Frei R.W. *Chemical derivatization in liquid chromatography*. — N.Y., 1976. — 546 p.
19. Lawrence J.F., Legay D.S., Frei R.W. // *J. Chromatogr.* — 1972. — Vol. 66. — P. 295.
20. Lawrence J.E., Renault C., Frei R.W. // *J. Chromatogr.* — 1976. — Vol. 121. — P. 343.
21. Lawrence J.F., Frei R.W. // *J. Chromatogr.* — 1972. — Vol. 66. — P. 93.
22. Maraschiello C., Miranda E., Millan E. // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* — 2003. — Vol. 791. — P. 1.
23. Molins-Legua C., Campins-Falco P., Sevillano-Cabeza A. // *Analyst*. — 1998. — Vol. 123. — P. 2871.
24. Molins-Legua C., Campins-Falco P., Sevillano-Cabeza A. // *Analyst*. — 1999. — Vol. 124 (4). — P. 477-482.
25. Naassner M., Mergler M., Wolf K. // *J. Chromatogr. A*. — 2002. — Vol. 945. — P. 133.
26. Negro A., Garbisa S., Gotte L. // *Anal. Biochem.* — 1987. — Vol. 160. — P. 39.
27. Nelson R.E., Grebe S.K., O'Kane D.J. // *Clin. Chem.* — 2004. — Vol. 50 (2). — P. 373-384.
28. Neurath G., Piermann B., Duenger M. // *Chemische Berichte*. — 1964. — Bd. 97. — S. 1631-1636.
29. Okada M., Hirose S., Tamaura Y. // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1974. — Vol. 162. — P. 316.
30. Paye M., Simion F.A., Pierard G.E. // *Contact Dermatitis*. — 1994. — Vol. 30. — P. 91.
31. Pierard G.E., Pierard-Franchimont C. // *Dermatol.* — 1993. — Vol. 186. — P. 133.
32. Pierard G.E. // *Dermatol.* — 1992. — Vol. 185. — P. 37.
33. Prakash C., O'Donnell J., Khojasteh-Bakht S.C. // *Drug Metab. Dispos.* — 2007. — Vol. 35 (7). — P. 1071-1080.
34. Reza Anari M., Bakhtiar R., Zhu B. // *Anal. Chem.* — 2002. — Vol. 74 (16). — P. 4136-4144.
35. Ridge B.D., Batt M.D., Palmer H.E. // *Br. J. Dermatol.* — 1988. — Vol. 118. — P. 167.
36. Seiler N. // *Methods Biochem. Anal.* — 1970. — Vol. 18. — P. 259-337.
37. Sen N.P., Claudette D.A. // *Analyst*. — 1972. — Vol. 97. — P. 216-220.
38. Serfontein W.J., Hurter P. // *Nature*. — 1966. — Vol. 209, №5029. — P. 1238-1239.
39. Sikorski A.F., Daczynska R.B. // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1982. — Vol. 690. — P. 302.

39. Suckow R.F., Zhang M.F., Cooper T.B. // *Clin. Chem.* — 1992. — Vol. 38 (9). — P. 1756-1761.
40. Takahashi M., Machida Y., Marks R. // *Arch. Dermatol. Res.* — 1987. — Vol. 279. — P. 281.
41. Tao T. // *FEBS Lett.* — 1978. — Vol. 93. — P. 146.
42. Uratani Y. // *J. Bacteriol.* — 1982. — Vol. 149. — P. 523.
43. Vehar G.A., Reddy A.V., Freisheim J.H. // *Biochemistry.* — 1976. — Vol. 15. — P. 2512.
44. Vera J.C. // *Anal. Biochem.* — 1988. — Vol. 174. — P. 38-45.
45. Wiechmann M. // *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie.* — 1977. — Vol. 358 (8). — P. 967-980.
46. Wyroba E., Bottiroli G., Giordano P. // *Histochemistry.* — 1981. — Vol. 73. — P. 459.
47. Xu L., Spink D.C. // *Anal. Biochem.* — 2008. — Vol. 375 (1). — P. 105-114.
48. Yamada H., Yamahara A., Yasuda S. // *J. Anal. Toxicol.* — 2002. — Vol. 26. — P. 17.
49. Yamada H., Ikeda-Wada S., Oguri K. // *Biol. Pharm. Bull.* — 1998. — Vol. 21. — P. 778.
50. Yamada H., Yamahara A., Oguri K. // *Japan. J. of Forensic Toxicol.* — 1999. — Vol. 17, №2. — P. 150-151.
51. Young J.C. // *JARC Sci. Publ. Lion.* — 1978. — №19. — P. 63-73.
52. Young K.W., Brown E.V. // *Analytical Lett.* — 1972. — №5. — P. 293-294.

УДК 54.061/062:543.544

ДАНСИЛХЛОРИД КАК ДЕРИВАТИЗИРУЮЩИЙ РЕАГЕНТ В АНАЛИЗЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Л.Ю.Клименко, В.В.Болотов, И.М.Иванчук

Проведено изучение литературных источников относительно применения дансилхлорида в анализе биологически активных веществ. Показана перспективность дальнейшей работы с дансилхлоридом как дериватизирующим реагентом для соединений, содержащих аминогруппы, с целью разработки схемы исследования данных соединений в фармацевтическом и химико-токсикологическом анализе при проведении как направленного, так и ненаправленного анализа.

UDC 54.061/062:543.544

DANSYL CHLORIDE AS A DERIVATIVE REAGENT IN ANALYSIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

L.Yu.Klimenko, V.V.Bolotov, I.M.Ivanchuk

The literary sources in relation to application of dansyl chloride in the analysis of biologically active substances has been studied. The perspective of further work with dansyl chloride as a derivative reagent for compounds containing aminogroups has been shown with the purpose of development of the research scheme of these compounds in pharmaceutical and chemical-toxicological analysis when carrying out both directed and non-directed analysis.