

# ХРОМАТОГРАФІЧНИЙ АНАЛІЗ АМІНОКИСЛОТ

Ларіонова М.О.

Наукові керівники: Горбунова Н.І., Павлова Л.П.

Коледж Національного фармацевтичного університету, Харків, Україна

larisa.petrovna2011@gmail.com

**Вступ.** Амінокислоти – це органічні сполуки, що містять у своєму складі дві функціональні групи: – карбоксильну групу (кислотну) –  $\text{COOH}$  та аміногрупу (основну)  $-\text{NH}_2$ . Біологічна роль амінокислот в організмі людини дуже багатогранна. Дія амінокислот проявляється на різних рівнях: одні сполуки беруть участь у виробленні гормонів, травних ферментів, інші – виступають в якості енергетиків і антиоксидантів, треті – підтримують нормальну працездатність ЦНС, головного мозку, серця, печінки і нирок. Так чи інакше, білкові сполуки беруть участь практично у всіх метаболічних процесах. Тому значення амінокислот складно переоцінити.

Амінокислоти входять до складу багатьох лікарських препаратів, які застосовують при захворюваннях нервової, дихальної, серцево-судинної, травної систем, та інш. У зв'язку з цим якісне виявлення амінокислот у лікарських препаратах та визначення їх кількісного вмісту є актуальним питанням сьогодення.

З літературних джерел відомі якісні реакції на амінокислоти, такі як біуретова, ксантопротеїнова та реакція з нінгідрином. Для кількісного визначення амінокислот в лікарських препаратах застосовують методи ацидиметрії в неводному середовищі, формольного титрування (по Серенсену) та визначення Нітрогену в органічних сполуках після мінералізації сульфатною кислотою, що внесені в Державну фармакопею України.

Для розділення суміші амінокислот використовують розподільну паперову хроматографію (ПХ), яка заснована на різній ступені розподілу компонентів між двома фазами, що не змішуються. Застосовують також тонкошарову хроматографію (ТШХ) і високоефективну рідинну хроматографію, що базуються на сорбційних явищах.

**Мета дослідження:** ідентифікація амінокислот, що входять до складу лікарських препаратів та біологічно активних речовин (БАР) методом тонкошарової хроматографії.

**Матеріали та методи.** В експерименті використали як стандарти *L*-аргінін (ч.д.а., «Sigma»), гліцин (ч.д.а., «Sigma»), метіонін (ч.д.а. «Merk»), цистеїн (ч.д.а., «Sigma»). Аналізували лікарські препарати «*L*-Аргінін», «Гліцин», «Метіонін» та БАР «*L*-Цистеїн». Розділення амінокислот проводили ТШХ на платівках «Silufol».

Розчини амінокислот-стандартів готували з концентрацією 50 мг/10 см<sup>3</sup> води. Екстракцію амінокислот із ретельно подрібнених пігулок проводили з використанням у якості розчинника-екстрагента дистильованої води. Суміш струшували протягом 15 хв, центрифугували 5 хв при 2000 об/хв, надосадову рідину збирали і використовували для проведення аналізу.

Стандартні та досліджувані розчини амінокислот наносили на стартову лінію платівки «Silufol». Нанесення розчинів амінокислот проводили тонким капіляром таким чином, щоб діаметр плями не перевищував 3-5 мм. Платівку зі зразками підсушували і вносили в хроматографічну камеру так, щоб нижній її край був занурений у елюент на 0.5-0.8 см. Елюентом слугувала система фенол-вода у співвідношенні 4:96. Камеру герметично закривали. Після того, як розчинник піднімався на 10-12 см, платівку виймали з камери і висушували на повітрі. Проявлення хроматограми проводили 0.1% етанольним розчином нінгідрину нанесеним на

платівку за допомогою пульверизатора. Для підсилення фарбування плям платівку висушити у сушильній шафі при температурі не вище 100°C.

Характеристикою методу є переміщення зони компонента  $R_f$ , що чисельно дорівнює відношенню відстані від стартової лінії хроматограми до центра плями речовини (l) до відстані, яку пройшов фронт розчинника (L):

$$R_f = l/L$$

Величину  $R_f$  використовують для ідентифікації речовин. Ідентичність визначають одночасним паралельним хроматографуванням на одній платівці досліджуваного та стандартного зразка амінокислоти. Якщо до складу зразків входить ідентичний компонент, відповідні їм плями на хроматограмах мають однакові значення  $R_f$ .

**Отримані результати.** Визначення складу амінокислот проводили співставленням  $R_f$  забарвлених плям, що одержані на хроматограмі для стандартних розчинів та розчинів, приготовлених з лікарських препаратів.

З літературних джерел відомі  $R_f$  хроматографічного аналізу амінокислот у елюентах різного складу, проведеного методом ПХ (табл.1).

**Таблиця 1. Переміщення  $R_f$  амінокислот-стандартів у елюентах різного складу, одержані методом паперової хроматографії.**

Амінокислота	Елюент	
	Фенол-вода (насичений)	н-Бутанол-льодяна оцтова кислота-вода (4:1:1)
L-аргінін	0.90	0.18
Гліцин	0.41	0.34
Метіонін	0.83	0.58
Цистеїн	0.03	0.13

Механізм ПХ базується на властивості поглинати воду і утримувати її між целюлозними волокнами. Воду можна розглядати як один із розчинників, що є нерухою фазою. При переміщенні по паперу під дією капілярних сил неводного розчинника, наприклад фенолу (рухлива фаза), молекули досліджуваної речовини розподіляються між двома фазами у відповідності до їх коефіцієнтів розподілу. Чим більша розчинність речовини у рухливій фазі, тим на більшу відстань вона переміститься на папері вслід за розчинником.

Механізм ТШХ заснований на явищі адсорбції. Речовини сорбуються на адсорбенті згідно з законом адсорбційного заміщення, встановленого М.С. Цветом. Тому  $R_f$  одержані методами ПХ та ТШХ з використанням елюенту одного складу будуть різними.

Експериментальні дані хроматографічного визначення  $R_f$  амінокислот у лікарських препаратах в нашому експерименті наведені у таблиці 2.

**Таблиця 2. Переміщення  $R_f$  амінокислот-стандартів та амінокислот, що входять до складу лікарських препаратів та БАР на платівках «Silufol» в системі фенол-вода (4:96).**

Амінокислота/ лікарський препарат	Брутто- формула	Відстань від старту до центру плями, L (см)	Відстань від старту до фронту розчинника, L (см)	$R_f$
L-аргінін / «L-аргінін»	$C_6H_{14}N_4O_2$	2.0/2.0*	12.5	0.16/0.16*
Гліцин / «Гліцин»	$C_2H_5NO_2$	8.2/8.2*	9.0	0.91/0.91*
Метіонін / «Метіонін»	$C_5H_{11}NO_2S$	7.8/7.8*	8.8	0.88/0.88*
L-Цистеїн / «L-цистеїн»	$C_3H_7NO_2S$	9.0/8.9*	9.7	0.93/0.93*

Примітка: \* – у лікарських препаратах.

**Висновки.** Таким чином, одержані результати вказують на те, що використання методу ТШХ на платівках «Silufol» з елюентом складу фенол-вода (4:96) дозволяє ідентифікувати амінокислоти у лікарських препаратах. Метод є простим, зручним, потребує мінімальних затрат часу та коштів для його виконання.