

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ РІДИННО-ХРОМАТОГРАФІЧНОГО РОЗДІЛЕННЯ АМІНОКИСЛОТ ІЗ ДЕРИВАТИЗАЦІЄЮ ПЕРЕД КОЛОНКОЮ 1-ФЛУОР-2,4-ДИНІТРОБЕНЗЕНОМ

Р. Д. Остапів, канд. біол. наук,

В. І. Ткаченко, канд. біол. наук

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок

м. Львів, вул. Донецька, 11, 79019, Україна

У статті описано етапи оптимізації параметрів рідинно-хроматографічного розділення дванадцяти амінокислот (аргініну, глутаміну, серину, аспарагіну, треоніну, гліцину, аланіну, проліну, метіоніну, триптофану, орнітину, лізину) із дериватизацією перед колонкою 1-флуор-2,4-динітробенzenом. Досліджено ізократичні та градієнтні схеми елюювання. Зазначено зміни у кількісних параметрах хроматографічних піків за різних умов розділення дериватизованих амінокислот. Наведено деякі валідаційні характеристики, такі як повторюваність (RSD, %), діапазон лінійності та межа кількісного визначення. Параметри піків та досліджені валідаційні характеристики не виходять за межі, рекомендовані у Державній фармакопеї України (ДФУ), що дозволить у подальшому здійснити більш повну валідацію методики для кількісного визначення амінокислот у різноманітних матрицях: ін'єкційних та пероральних розчинах, кормах та преміксах.

Ключові слова: ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, АМІНОКИСЛОТИ, ДЕРИВАТИЗАЦІЯ, 1-ФЛУОР-2,4-ДИНІТРОБЕНЗЕН.

Амінокислоти – органічні сполуки, які одночасно містять у своєму складі амінні (NH_2) та карбоксильні ($-\text{COOH}$) групи [1]. У ветеринарії вони застосовуються як важливі компоненти ін'єкційних та пероральних розчинів для лікування, а також складові преміксів та кормів для збільшення продуктивності тварин: ВРХ, свиней та птиці. Кількість таких ветеринарних препаратів на ринку України щороку зростає [2, 3]. Амінокислотовмісні ветпрепарати, премікси та корми значно відрізняються один від одного за складом, як амінокислот, так і матриці (особливо це стосується кормів і преміксів) [3]. У зв'язку з цим часто постає необхідність в адаптації існуючих рутинних методик кількісного визначення вмісту амінокислот, з метою підвищення їх селективності для аналізу ветеринарних препаратів та кормових добавок. Відома методика визначання кількості вільних амінокислот у тканинах із дериватизацією перед колонкою 1-флуор-2,4-динітробенzenом, яка дозволяє ідентифікувати та кількісно визначити більшість амінокислот [4]. Описана методика є нескладною у виконанні та вимагає порівняно невеликих витрат часу та ресурсів.

Метою даної роботи було перевірити вплив зміни ряду умов хроматографічного розділення на селективність методики (величину фактора розділення та кількості одночасно визначуваних амінокислот).

Матеріали і методи. У роботі використовували сертифіковані стандартні зразки амінокислот (таурин, серин, треонін, аспарагін, глутамін, аргінін, аланін, гліцин, триптофан, лізин, метіонін, пролін, орнітин) виробництва Sigma-Aldrich. Основний розчин кожної амінокислоти з концентрацією 500 мкг/мл готували з урахуванням чистоти зразка, зазначений у сертифікаті, шляхом розчинення у 0,05 М розчині натрій тетраборату 10-водного. Після цього основні розчини амінокислот розводили тим самим розчинником до потрібних концентрацій робочих розчинів 1–10 мкг/мл. Готували такі суміші амінокислот:

- 1) таурин, треонін, метіонін, триптофан та лізин;
- 2) аргінін, таурин, треонін, глутамін, гліцин, аланін;
- 3) аргінін, таурин, треонін, глутамін, гліцин, аланін, метіонін, триптофан, орнітин, лізин;
- 4) аргінін, глутамін, серин, аспарагін, гліцин, аланін, пролін, метіонін, триптофан, орнітин, лізин.

До 4 мл робочого розчину амінокислот додавали 1 мл 0,05 М розчину 1-флуор-2,4-динітробензену у діоксані, зразки дериватизували за температури 40 °С впродовж 40 хв. Після дериватизації ємність з розчином швидко охолоджували у темному місці під струменем води і додавали 5 мл 50 % розчину ацетонітрилу. Розчином плацебо слугував 0,05 М розчин натрій тетраборату 10-водного. Для готування зразків використовували ацетонітрил виробництва LabScan, натрій тетраборат 10-водний виробництва Sigma-Aldrich та 1-флуор-2,4-динітробензен виробництва Fluka.

Хроматографічний аналіз виконано на рідинному хроматографі фірми Waters, оснащеному сепараційним модулем Alliance 2690 з діодноматричним детектором PAD 996. Вихідні (початкові) умови розділення зразків: хроматографічна колонка Luna C18 (2) 250 × 4,6 мм, 5 μм; рухома фаза: суміш ацетонітрилу з 0,1 М розчином NaH₂PO₄, підкисленим до рН 2,0 1 М фосфатною кислотою) у співвідношенні 45 : 55. Об'єм інжекції складав 0,01 мл, швидкість потоку рухомої фази становила 1,0 мл/хв, температура колонки 25 °С, час одного розділення – 20 хвилин. Довжина хвилі детекції – 350 нм. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2010 [5].

Результати і обговорення. Хроматограми плацебо та розчинів амінокислот таурину та метіоніну, одержані за вищеописаних початкових умов розділення, представлені на рис 1.

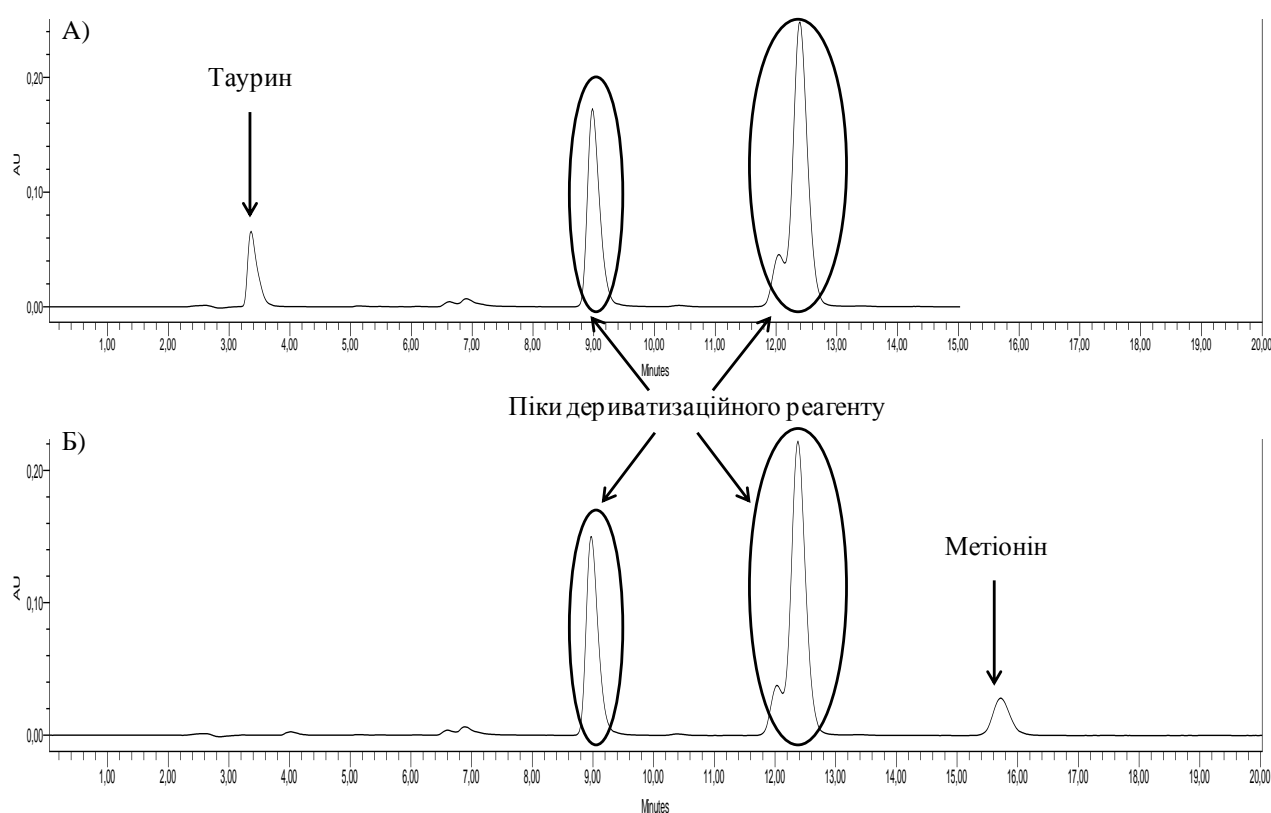


Рис. 1. Хроматограми зразків розчинів таурину (А); та метіоніну (Б).
Концентрація кожної амінокислоти – 10 мкг/мл.

Окрім таурину і метіоніну у склад преміксів та кормів для продуктивних та непродуктивних тварин подекуди входять треонін, лізин та триптофан [2]. Тому наступним кроком у дослідженні було включення цих амінокислот до складу тестової суміші, їх дериватизація та розділення, використовуючи ту саму вихідну схему хроматографічного аналізу (рис. 2).

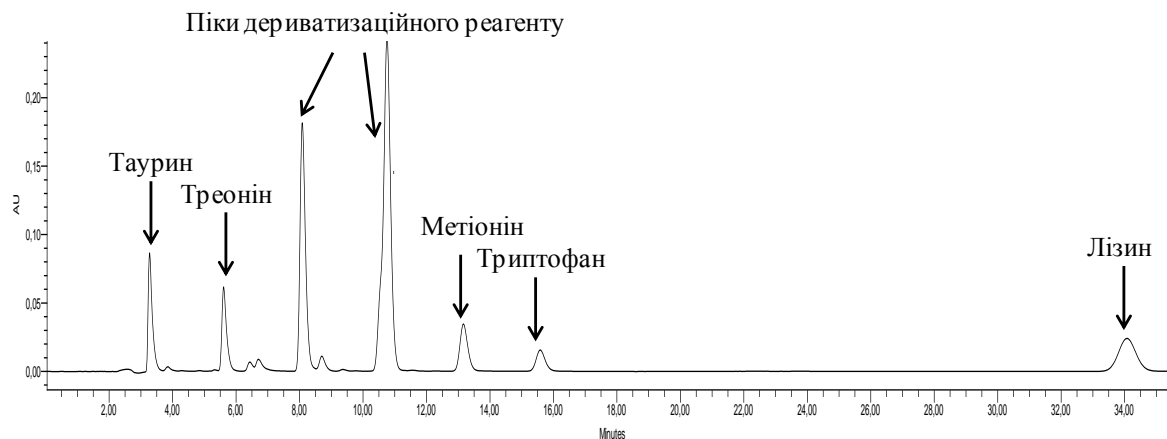


Рис. 2. Хроматограма суміші амінокислот (таурину, треоніну, метіоніну, триптофану та лізину) за початковою схемою аналізу (концентрація кожної – 10 мкг/мл).

Параметри хроматографічних піків амінокислот відповідали вимогам ДФУ (табл. 1).

Таблиця 1

Параметри хроматографічних піків амінокислот, розділених за початковою схемою аналізу

Назва піку	Кількісні параметри хроматографічних піків			
	Коефіцієнт розділення	Асиметричність	Кількість теоретичних тарілок	Ширина піку (хв)
Таурин	2,0	1,84	3000	0,76
Треонін	2,0	1,57	7000	0,71
Метіонін	5,4	1,16	16000	0,95
Триптофан	4,9	1,13	14000	0,98
Лізин	2,35	1,04	17000	1,71
Вимоги (згідно р ДФУ [5])	≥2,0	0,8–2,0	>1000	≥2,0

Незважаючи на те, що більшість преміксів містять 3–4 амінокислоти, зокрема метіонін, триптофан, треонін та лізин, є низка кормових добавок, до складу яких входять 10–14 амінокислот. Найбільш часто у таких кормових добавках використовуються аргінін, глютамін, аланін та гліцин [2]. Враховуючи це, було приготовано тестову суміш, яка містила амінокислоти аргінін, таурин, треонін, глютамін, гліцин і аланін. Проведено дериватизацію суміші та піддано хроматографічному розділенню. Оскільки суміш ускладнилась, для уникнення злиття піків чи неповного розділення амінокислот було зменшено частку органічної складової у рухомій фазі і збільшено частку буферу на 10 % (ацетонітрил : 0,1 М NaH₂PO₄ рН 2,0 35 : 65). З наведеної хроматограми (рис. 3) видно, що таке збільшення полярності рухомої фази виявилось недостатнім для повного розділення піків.

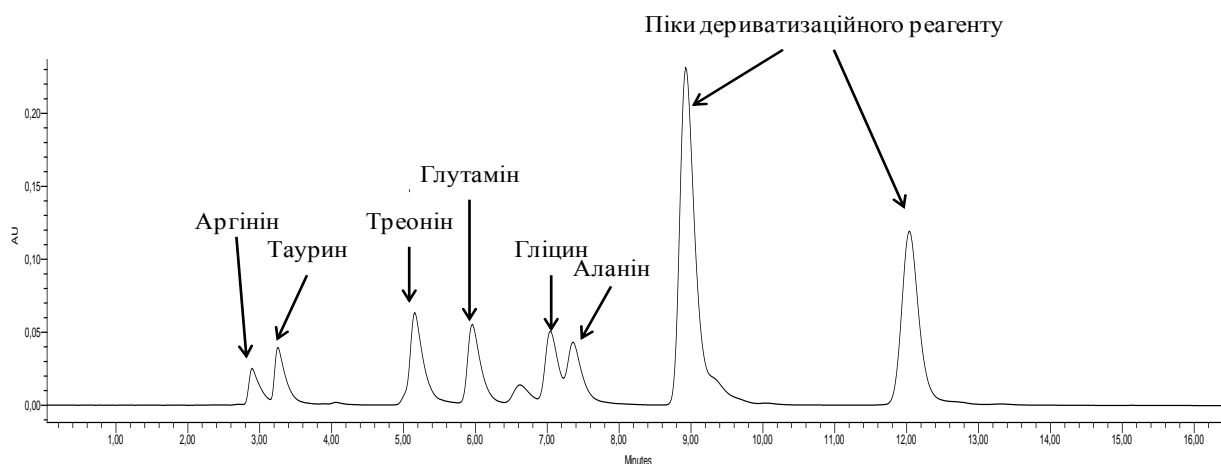


Рис. 3. Хроматограма суміші амінокислот (концентрація кожної амінокислоти 10 мкг/мл) за модифікованих умов ізократичного елюювання (ацетонітрил : 0,1 М NaH_2PO_4 рН 2,0 35 : 65).

Оскільки не вдалось розділити амінокислоти за ізократичних умов елюювання, було застосовано градієнтне (табл. 2), і при цьому до тестової суміші було додано ще метіонін, триптофан, орнітин та лізин.

Таблиця 2

Умови градієнтного елюювання (перший варіант)

T, хв	A, %	B, %
0	30	70
10	30	70
11	30	70
18	35	65
30	45	55
35	55	45
45	70	30
50	70	30

Примітка: тут і далі: T – час від початку розділення (хв);

A – вміст ацетонітрилу в рухомій фазі (%);

B – вміст 0,1 М NaH_2PO_4 рН 2,0 в рухомій фазі (%)

За таких умов аналізу не вдалось повністю розділити піки таурину та аргініну, однак орнітин добре відділявся від піку триптофану та лізину (коефіцієнт розділення становив 3,7 (рис. 4).)

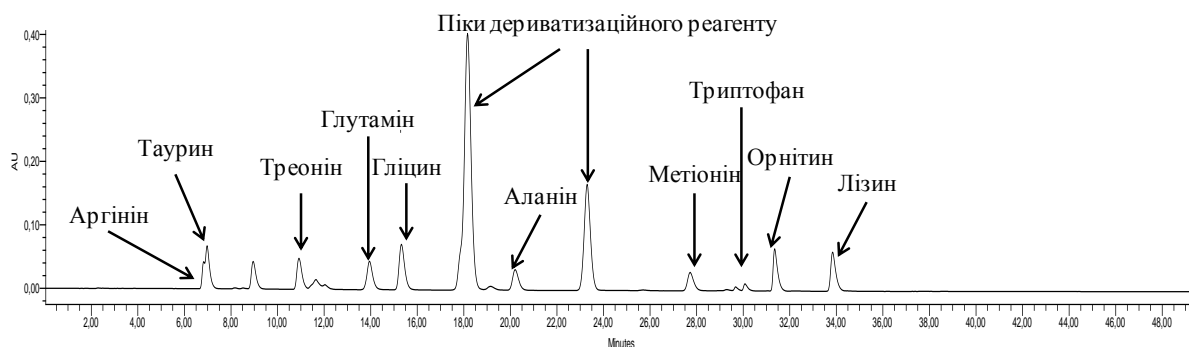


Рис. 4. Хроматограма суміші амінокислот за градієнтного елюювання (перший варіант, концентрація кожної амінокислоти 10 мкг/мл).

Наступним завданням було досягти задовільного розділення таурину та аргініну та дослідити можливість додавання до тестової суміші ще амінокислот проліну, аспарагіну та серину. Було змінено також профіль градієнту, який відображено в табл. 3.

Таблиця 3

Умови градієнтного елюювання (другий варіант)

T, хв	A, %	B, %
0	20	80
14	20	80
15	30	70
29	30	70
30	45	55
35	55	45
45	60	40
50	60	40
70	20	80
80	20	80

Градієнт модифікували, змінивши частку ацетонітрилу з 45 до 60 % на етапі від 30 до 50 хвилин елюювання. Таким чином було досягнуто кращих параметрів хроматографічних піків: ширина піку метіоніну, орнітину та лізину зменшилась відповідно на 30, 15 та 10 %, коефіцієнт розділення триптофану збільшився на 10%. Однак, за рахунок ускладнення градієнтного профілю, а також необхідності в достатній мірі врівноважувати хроматографічну колонку стартовим складом рухомої фази, зріс загальний час розділення суміші амінокислот. Проте, як видно на рис. 5, така схема градієнтного елюювання дала змогу додати ще до суміші і розділити такі амінокислоти, як пролін, аспарагін та серин. Оскільки таурин використовується в більшості випадків у преміксах та кормах для котятчих, і відсутній у рецептах інших кормів та добавок [2], з тестової суміші амінокислот його вилучили. Хроматограма даної суміші амінокислот представлена на рис 5.

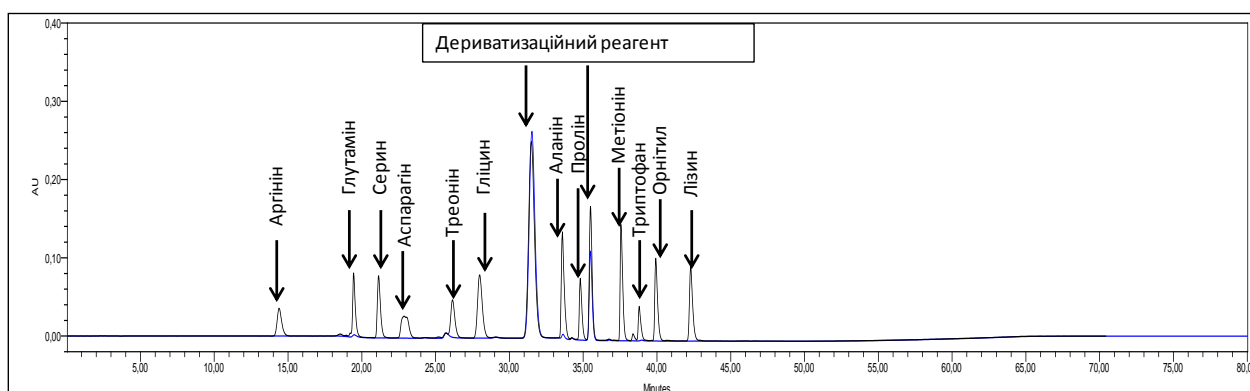


Рис. 5. Хроматограма суміші амінокислот за градієнтного елюювання (другий варіант, концентрація кожної амінокислоти 10 мкг/мл)

Параметри піків та деякі валідаційні характеристики методики наведені у таблиці 4, та відповідають вимогам, рекомендованим у ДФУ [5].

Параметри хроматографічних піків амінокислот за умов градієнтного елюювання (другий варіант)

Амінокислоти	Кількісні параметри хроматографічних піків					
	RSD, %	Асиметрія	Кількість теоретичних тарілок	Коефіцієнт розділення	Лінійність	Межа кількісного визначення мкг/мл
Аргінін	0,08	1,22	10600	7,1	0,9995	0,14
Глутамін	0,09	1,12	58592	3,0	0,9991	0,09
Серин	0,25	1,38	47347	2,1	0,9995	0,86
Аспарагін	0,07	1,98	12691	2,6	0,9998	0,22
Треонін	0,10	1,38	47192	2,2	0,999	0,03
Гліцин	0,09	1,22	36485	2,2	0,9998	0,16
Аланін	0,11	1,39	167470	4,0	0,9995	0,01
Пролін	0,15	1,60	185577	2,0	0,9997	0,07
Метіонін	0,09	1,65	223444	2,5	0,9997	0,09
Триптофан	0,12	1,66	240755	2,0	0,9991	0,05
Орнітин	0,16	1,62	220275	3,1	0,9993	0,16
Лізін	0,23	1,47	190266	6,3	0,9996	0,29
Вимоги згідно з ДФУ [5])	<2,0	0,8-2,0	>1000	≥2,0	>0,997	-

Примітка: діапазон лінійності 1-15 мкг/мл (крок 2,5 мкг/мл).

В И С Н О В К И

Запропоновано оптимізацію рутинної методики рідинно-хроматографічного визначення амінокислот із дериватизацією перед колонкою 1-флуор-2,4-динітробенzenом, що полягає у зміні режимів елюювання. Це дозволяє визначати одночасно 12 амінокислот, які найчастіше входять до складу ветеринарних препаратів, кормів та преміксів. При цьому кількісні характеристики хроматографічних піків, такі як асиметрія, кількість теоретичних тарілок, коефіцієнт розділення не виходить за межі, рекомендовані у ДФУ. Показано, що межа визначення складає 1 мкг/мл; лінійність методу забезпечується в діапазоні концентрацій амінокислот 1-15 мкг/мл (крок 2,5 мкг/мл).

Перспективи досліджень. Валідація методики визначення амінокислот із дериватизацією перед колонкою 1-флуор-2,4-динітробенzenом у різних матрицях, зокрема у пероральних та ін'єкційних розчинах, преміксах та кормах.

OPTIMIZATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS TO SEPARATE AMINO ACIDS WITH 1-FLUORO-2,4-DINITROBENZENE PRECOLUMN DERIVATIZATION

R. D. Ostapiv, V. I. Tkachenko

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

S U M M A R Y

The article describes the optimization stages of liquid chromatographic separation parameters for amino acids (arginine, glutamine, serine, asparagine, threonine, glycine, alanine, proline, methionine, tryptophan, ornithine, lysine) with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene precolumn derivatization. Isocratic and gradient schemes of elution have been investigated. Changes in the quantitative parameters of chromatographic peaks are indicated for different conditions of

separation of derivatized amino acids. Some validation characteristics are given, such as repeatability (RSD,%), linearity range and quantification limit. The parameters of the peaks and the studied validation characteristics do not go beyond the limits recommended by the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU), which will allow further validation of the method for the quantitative determination of amino acids in different matrices: injectable and oral solutions, feeds and premixes.

Keywords: HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, AMINO ACIDS, DERIVATIZATION, 1-FLUORO-2,4-DINITROBENZENE.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЖИДКОСТНО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ С ДЕРИВАТИЗАЦИЕЙ ПЕРЕД КОЛОНКОЙ 1-ФТОР-2,4-ДИНИТРОБЕНЗОЛОМ

Р. Д. Остапів, В. І. Ткаченко

ГНИКИ ветеринарных препаратов и кормовых добавок
ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье описаны этапы оптимизации параметров жидкостно-хроматографического разделения двенадцати аминокислот (аргинина, глутамина, серина, аспарагина, треонина, глицина, аланина, пролина, метионина, триптофана, орнитина, лизина) с дериватизацией перед колонкой 1-фтор-2,4-динитробензолом. Исследованы изократические и градиентные схемы элюирования. Отмечены изменения в количественных параметрах хроматографических пиков при различных условиях разделения дериватизированных аминокислот. Приведены валидационные характеристики, такие как повторяемость (RSD, %), диапазон линейности и предел количественного определения. Параметры пиков и исследованные валидационные характеристики не выходят за пределы, рекомендованные в Государственной фармакопее Украины (ГФУ), что позволит в дальнейшем осуществить более полную валидацию методики для количественного определения аминокислот в различных матрицах: инъекционных и пероральных растворах, кормах и премиксах.

Ключевые слова: ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, АМИНОКИСЛОТЫ, ДЕРИВАТИЗАЦИЯ, 1-ФТОР-2,4-ДИНИТРОБЕНЗОЛ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Nelson D. L., Cox M. M. Lehninger Principles of biochemistry. Fifth edition. New York: W. H. Freeman and company, 2011. – 1282 p.
2. Довідник кормових добавок і преміксів / кол. авт.: І. Я. Коцюмбас, Ю. М. Косенко та ін. Укладачі: Г. Й. Бойко, О. С. Везденко та ін. – Львів: ТзОВ ВФ «Афіша», 2015. –1408 с.
3. Toyoka T. Modern Derivatization Methods for Separation Sciences. New York: John Wiley and sons, 1999. – 303 p.
4. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту // Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – Харків: РІРЕГ. –Доповнення 1. – 2004. – С.196–198.
5. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с. Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.

Рецензент – Т. Р. Левицький, к. с.-г. н., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок .