

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЕЛЕЦКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.А. БУНИНА»

На правах рукописи

Иванчура Павел Владимирович

**ЭКСТРАКЦИОННЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРОВ
В АНАЛИЗЕ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ, СОДЕРЖАЩИХ ГИСТИДИН,
МЕТИОНИН, ПРОЛИН И ТРЕОНИН**

1.4.2. Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
химических наук

Научный руководитель:
Мокшина Надежда Яковлевна,
доктор химических наук, доцент

Елец – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	5
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1 Аминокислоты: области применения и значение для организма	11
1.2 Методы определения аминокислот	13
1.2.1 Капиллярный электрофорез.....	13
1.2.2 Жидкостная хроматография.....	16
1.2.3 Сочетание жидкостной хроматографии с тандемной масс- спектрометрией.....	21
1.2.4 Энантиоселективный анализ аминокислот.....	22
1.3 Применение экстракции для извлечения и отдельного определения аминокислот.....	25
1.3.1 Экстракция аминокислот с применением двухфазных водных систем на основе полимеров.....	28
1.3.2 Другие варианты экстракции аминокислот.....	32
1.3.3 Анализ реальных объектов с применением экстракции аминокислот.....	37
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
2.1 Характеристика аминокислот.....	43
2.2 Синтез и характеристика водорастворимых полимеров.....	48
2.3 Методика экстракции аминокислот.....	51
2.4 Спектрофотометрическое определение аминокислот.....	53
2.5 ИК-спектроскопия аминокислот и полимеров	53
2.6 Метрологическая обработка результатов эксперимента.....	56

ГЛАВА 3 ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖФАЗНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ В СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИМЕРОВ	58
3.1 Анализ межмолекулярных взаимодействий в системе аминокислота – полимер методом ИК-спектроскопии.....	59
3.2 Квантово-химическое исследование межфазных взаимодействий между полимерами и аминокислотами.....	63
3.3 Закономерности экстракции аминокислот гомополимерами.....	70
3.4 Экстракция аминокислот сополимерами.....	85
ГЛАВА 4 ЭКСТРАКЦИОННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ БИНАРНЫХ СМЕСЕЙ АМИНОКИСЛОТ	89
4.1 Экстракционное разделение смесей аминокислот гомополимерами.....	89
4.2 Разделение смесей аминокислот с применением экстракции сополимерами.....	96
ГЛАВА 5 АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК, СОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТЫ.....	99
5.1 Исследованные объекты.....	99
5.2 Экстракция и определение аминокислот в лекарственных средствах и биологически активных добавках.....	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	131

ОСНОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

АК – аминокислота

Met – метионин

His – гистидин

Pro – пролин

Thr – треонин

ПВП – поли-*N*-винилпирролидон

ПВК – поли-*N*-винилкапролактам

ПВИ – поли-*N*-винилимидазол

ПВФ – поли-*N*-винилформамид

ПАА – полиакриламид

ПВТ – поли-1-винил-1,2,4-триазол

M_η – средневязкостная молекулярная масса полимеров

R_h – гидродинамический радиус

D – коэффициент распределения

R – степень извлечения

β – фактор разделения

γ – соотношение объемов фаз

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Аминокислоты осуществляют жизненно важные для организма человека функции, а лекарственные препараты на их основе отличаются разнообразными видами фармакологической активности. Поэтому важной и актуальной задачей современного химико-фармацевтического анализа является разработка доступных способов количественного определения аминокислот в субстанциях, лекарственных формах и растительном сырье. Создание новых, совершенствование и развитие известных способов концентрирования и разделения аминокислот позволяет расширить возможности аналитических методов в области технологий лекарственных средств.

Особую актуальность приобретает необходимость контроля содержания аминокислот в продукции специального назначения без разрушения многокомпонентной матрицы объекта. При этом жидкостная экстракция является наиболее эффективной стадией пробоподготовки для выделения аминокислот и последующего их определения в водных средах физико-химическими методами.

Экстракционные системы на основе водорастворимых полимеров представляют собой вариант «зеленой» химии, при котором применяются безвредные, экологически безопасные реагенты. Полимеры на основе N-винилазолов и N-виниламидов характеризуются высокой комплексообразующей способностью, в том числе по отношению к биологически активным веществам, низкой токсичностью, водорастворимостью, доступностью. Это позволяет считать их перспективными материалами, которые можно применять для решения многих научных и практических задач.

Исследование возможности применения водорастворимых азотсодержащих карбоцепных полимеров в качестве экстрагентов аминокислот представляется важной аналитической и биотехнологической

задачей, решение которой направлено на разработку новых способов определения аминокислот в объектах со сложной матрицей.

Степень разработанности темы исследования. Водные двухфазные системы на основе водорастворимых полимеров, ионных жидкостей или глубоких эвтектических растворителей являются альтернативой традиционным органическим растворителям жидкостной экстракции. В научной литературе существует ряд работ, в которых эти соединения успешно применены для извлечения и разделения широкого спектра веществ, включая биомолекулы. Также имеются сведения о применении экстракции для анализа реальных объектов, содержащих аминокислоты. Однако систематические данные об использовании водорастворимых гомо- и сополимеров в качестве экстрагентов метионина, гистидина, пролина и треонина и возможности применения таких экстракционных систем в анализе биологически активных добавок отсутствуют.

Цель работы. Разработка эффективных экстракционных систем на основе полимеров для извлечения, разделения и определения аминокислот в водных растворах, лекарственных средствах и биологически активных добавках.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

- изучить влияние молекулярной массы, гидродинамического радиуса, концентрации гомополимеров, состава сополимеров, температуры, pH среды на извлечение аминокислот из водно-солевых растворов;
- установить закономерности экстракции гистидина, метионина, пролина и треонина в системах на основе водорастворимых гомо- и сополимеров;
- разработать способ экстракционного разделения бинарных смесей аминокислот с применением гомо- и сополимеров;
- разработать методику экстракционно-спектрофотометрического определения аминокислот в лекарственных средствах и биологически активных добавках, содержащих гистидин, метионин, пролин и треонин.

Научная новизна. Установлены количественные характеристики экстракции гистидина, метионина, пролина и треонина с применением нетоксичных, негорючих, экологически безопасных водорастворимых гомо- и сополимеров в качестве экстрагентов. Предложены наиболее эффективные экстракционные системы, в которых достигается практически полное (97-98 %-ное) извлечение аминокислот, при этом экстрагирующая способность полимеров возрастает в ряду ПАА→ПВП→ПВТ→ПВФ→ПВК→ПВИ для всех исследованных аминокислот.

Показана возможность осуществления бессолевой экстракции полимерами и прогнозирования коэффициентов распределения аминокислот. Установлены концентрация и состав сополимеров, при которых происходит максимальное извлечение анализов.

Осуществлено экстракционное разделение бинарных смесей аминокислот с применением гомо- и сополимеров. Наиболее эффективные экстракционные системы на основе гомо- и сополимеров применены для анализа лекарственных препаратов и биологически активных добавок, содержащих гистидин, метионин, пролин и треонин.

Теоретическая и практическая значимость. Проведен анализ межфазного взаимодействия в системах аминокислота – водно-солевой раствор – водорастворимый полимер и предложены схемы образования ассоциатов в изученных экстракционных системах. Установлены условия, обеспечивающие практически полное (97 %-ное и более) извлечение гистидина, метионина, пролина и треонина из водных растворов.

Разработана методика экстракционного разделения бинарных смесей метионин – гистидин, метионин – треонин и гистидин – пролин с применением гомо- и сополимеров. Для извлечения и определения аминокислот в различных пищевых и лекарственных продуктах без разрушения многокомпонентной матрицы объекта предложена экспрессная экстракционно-спектрофотометрическая методика. Новизна практических разработок подтверждена материалами Роспатента (патент № 2852962).

Методология и методы исследования. Синтез водорастворимых гомо- и сополимеров, используемых в качестве экстрагентов, осуществляли методом радикальной полимеризации (инициатор – динитрил азо-бис-изомасляной кислоты). Методом динамического светорассеяния для всех полимеров определены размеры гидродинамических радиусов частиц в разбавленном водном растворе.

Методом жидкостно-жидкостной экстракции установлена степень извлечения аминокислот из водно-солевого раствора в фазу полимеров. Определение аналитов в водной фазе после экстракции проведено методом УФ-спектрофотометрии. Методами ИК-спектроскопии и квантово-химического моделирования проведен анализ взаимодействия аминокислот с молекулами воды и экстрагентов.

На защиту выносятся следующие положения:

- обоснование применения водорастворимых полимеров в качестве экстрагентов аминокислот;
- закономерности извлечения гистидина, метионина, пролина и треонина из водных растворов водорастворимыми полимерами;
- результаты разделения бинарных смесей аминокислот с применением гомо- и сополимеров в качестве экстрагентов;
- экстракционно-спектроскопическая методика определения аминокислот в таблетированных лекарственных препаратах и биологически активных добавках.

Степень достоверности результатов подтверждается применением современных инструментальных методов анализа: УФ- и ИК-спектроскопии, динамического светорассеяния, квантово-химического моделирования, а также надежными средствами проведения эксперимента, осуществлением обработки полученных результатов методами математической статистики, интерпретацией результатов.

Соответствие диссертации паспорту специальности.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.2.

Аналитическая химия: 8. Методы маскирования, разделения и концентрирования; 10. Анализ органических веществ и материалов; 13. Анализ пищевых продуктов; 15. Анализ лекарственных препаратов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, 2 статьи в изданиях, индексируемых в Scopus, 1 статья в журнале РИНЦ, материалы 11 конференций. Получен патент на изобретение РФ.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены на научных мероприятиях: Всероссийской конференции по фундаментальной и прикладной химии «Химия–XXI век» (29-30 ноября 2022, г. Ижевск); IV Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием (24-30 сентября 2023, г. Краснодар); I Всероссийской научно-практической конференции «Достижения современной науки: биотехнология, химия и фармация» (25-27 октября 2023, г. Симферополь); XI Международной научно-технической конференции «Новое в технологии и технике функциональных продуктов питания на основе медико-биологических воззрений» (4-5 июля 2024, г. Воронеж); XXII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (7-12 октября, 2024 г., Федеральная территория «Сириус»); XI Международной научно-практической конференции «Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение» (28-29 ноября 2024, г. Воронеж); II и III Международных научно-практических конференций «Путохинские чтения» (10-11 декабря 2024, 11-12 декабря 2025, г. Кинель), XVII Международной научно-практической конференции «Образование и наука для устойчивого развития» (15-18 апреля 2025, г. Москва), XIII Всероссийской конференции «Экоаналитика» (19-23 мая 2025, г. Санкт-Петербург), XII Международной научно-практической конференции «Биотехнология: взгляд в будущее» (28 марта 2026, г. Ставрополь).

Личный вклад автора заключается в поиске, систематизации и анализе литературных данных по теме работы; формулировании цели исследования, постановке задач, планировании и проведении экспериментов;

обработке и интерпретации полученных результатов, обобщении и подготовке к публикациям результатов проведенных исследований.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и списка цитируемой литературы. Работа включает аналитический обзор, характеристику объектов и методов анализа, результаты исследования межфазного распределения аминокислот в системах на основе водорастворимых гомо- и сополимеров, экстракционного разделения бинарных смесей аминокислот, анализ таблетированных лекарственных препаратов и биологически активных добавок, содержащих гистидин, метионин, пролин и треонин. Материал изложен на 132 страницах, содержит 21 рисунок и 38 таблиц, в списке цитируемой литературы 160 источников.

ГЛАВА I Литературный обзор

1.1 Аминокислоты: области применения и значение для организма

Аминокислоты (АК) – это природные соединения, участвующие в синтезе белка, регуляции метаболических путей, секреции гормонов, экспрессии генов и т.д., которые можно безопасно использовать в фармацевтических целях: производстве новых лекарственных препаратов, в системах доставки лекарств и для улучшения свойств уже разработанных лекарственных средств [1]. Все это возможно благодаря структурным особенностям, например, АК с α -карбоксилатом, α -аминогруппой и боковыми цепями оптимальны для образования связей с лекарственными средствами. Следовательно, АК могут образовывать различные межмолекулярные ассоциаты посредством водородных связей, гидрофобных и/или ионных взаимодействий [1]. Поэтому АК являются удобными ко-формирователями, способными использоваться в качестве новой платформы в лекарственных формах с улучшенными свойствами [2].

В этом направлении существуют многочисленные отчеты (статьи), опубликованные в последнее время. В работе [3] изучено влияние сопряжения алкилового эфира L-аминокислоты (пропилового, изопропилового или бутилового) на образование новых препаратов API-IL. Приведено описание наиболее распространенных методов приготовления различных составов АК и их применение для солюбилизации, проницаемости и стабилизации нескольких активных фармацевтических ингредиентов, показано влияние составов АК на терапевтическую эффективность препаратов [4]. Имеется описание 12 новых фармацевтических препаратов производства США на основе АК: *Tazverik* (эпителиоидная саркома), *Gemtesa* (гиперактивный мочевой пузырь), *Zeposia* (рассеянный склероз), *Byfavo* (индукция и поддержание процедурной седации), *Cu 64 dotatate* и *Gallium 68 PSMA-11* (оба ПЭТ-визуализация), *Rimegepant* (острая мигрень), *Zepzelca* (рак легких), *Remdesivir* (COVID-19), *Amisulpride* (тошнота и рвота), *Setmelanotide*

(ожирение) и *Lonafarnib* (синдром прогерии) [5], а также 34 соединений, полученных из циклических АК [6, 7].

Молекулы аминокислот представляют собой основные строительные блоки живых систем, которые могут быть обнаружены в качестве клеточных компонентов, либо в свободном виде в плазме человеческих организмов. Перорально вводимые аминокислоты доступны для всасывания тонким кишечником без переваривания. Тем не менее, серьезные побочные эффекты могут быть следствием более высокого присутствия АК, чем необходимо [1]. Из-за высокой реакционной способности АК и сходства между несколькими аминокислотами они также могут быть вовлечены во вредные реакции или в неродственные взаимодействия и, таким образом, могут быть токсичными. Как и любой фармацевтический препарат перед применением необходима консультация специалиста и применение строго по рекомендациям квалифицированных кадров. К некоторым возможным побочным эффектам относятся усталость, тошнота, головные боли, нарушения сна, ухудшение настроения и даже нарушение работы почек и печени и др. Возможно также ингибирование всасывания других аминокислот.

Анализ рынка препаратов на основе аминокислот в России показал актуальность и предпочтительность использования аминокислот в лечебных и профилактических целях. Получение фармацевтических препаратов на основе аминокислот перспективно и востребовано. В смеси или отдельно аминокислоты применяют в медицине при изготовлении лекарственных препаратов, в том числе при заболеваниях большинства систем организма [8]. Использование свободных аминокислот, в отличие от белка, не требует от организма энергетических затрат на расщепление при всасывании, а уровень этих аминокислот в крови возрастает быстрее, чем при использовании белка.

Аминокислоты находят широкое применение в качестве добавок к кормам для домашних и сельскохозяйственных животных. Например,

лизином, триптофаном, треонином и метионином обогащают корма сельскохозяйственных животных [9]. Аминокислоты используются при изготовлении биологически активных добавок к пище («протеиновых коктейлей»), добавление глутамата натрия придаёт ряду продуктов мясной вкус, поэтому его включают в состав колбас и консервированной продукции [10]. Аминокислоты также используются для производства красителей, моющих средств, синтетических волокон, в парфюмерной промышленности.

1.2 Методы определения аминокислот

1.2.1 Капиллярный электрофорез

Цвиттер-ионы АК – это низкомолекулярные вещества, хорошо растворимые в воде и содержащие по крайней мере одну аминогруппу и одну карбоксильную группу. Данные функциональные группы слабо диссоциированы и протонируются/депротонируются в зависимости от pH окружающего раствора, присутствуют в виде катионов, нейтральных молекул или анионов. Следовательно, АК являются подходящими анализируемыми веществами для электрофоретического разделения, проводимого в капиллярах (СЕ) или микрочипах (МСЕ) [1]. Поскольку капиллярный электрофорез (КЭ) не требует непрерывного потока подвижной фазы для разделения, необходимый объем химикатов и образующихся отходов сводятся к минимуму.

В работе [11] авторами предлагается проводить электрофоретическое разделение 11 распространенных АК в следующих условиях: фоновый электролит уксусная кислота концентрации 8,5 М, pH 1,37, рабочее напряжение 30 кВ, время разделения 4,5 мин, предел обнаружения находится в диапазоне 0,12-0,28 мкМ.

В настоящее время КЭ применяется для определения АК в клетках и тканях человека, продуктах питания и лекарственных растениях. Предложена схема электрофоретического определения аминокислот в образцах биологических жидкостей с применением ионных жидкостей в качестве

экстрагента и псевдостационарной фазы. Степени извлечения аминокислот составили 92–100%. Пределы обнаружения аминокислот составляют 30–55 нг/мл, что обеспечивает их определение в биологических жидкостях [12].

Капиллярный электрофорез с обменом хиральных лигандов является привлекательным и мощным аналитическим методом энантиомерного разделения, который имеет высокое разрешение энантиомеров и позволяет настраивать порядок их миграции [1,2]. Этот метод обеспечивает хорошую селективность энантиомеров за счет разницы в термодинамической стабильности тройных комплексов, образованных между аналитами, центральными ионами металлов и хиральными лигандами.

Авторами работы [13] D- и L-олигопептиды были предложены как хиральные лиганды для разделения полученных энантиомеров D- и L-аминокислот. Оценивалось влияние четырех D- и L-олигопептидов на эффективность разделения энантиомеров аминокислот. Результаты контролировались с помощью высокопроизводительного капиллярного электрофорезного анализатора, оснащенного высоковольтным источником питания, УФ-детектором и электрокинетической/сифонной моделью инъекции.

Имеются сведения о простом методе определения свободных аминокислот в различных образцах диетических добавок на основе маточного молочка с использованием специально разработанной двухканальной электрофорезной системы с емкостно-связанным бесконтактным определением проводимости (*combining with capacitively coupled contactless conductivity detection, C4D*) [14]. Данное устройство обладает преимуществами с точки зрения цены оборудования, портативности для мобильного развертывания и гибких настроек.

Аналогичная система применялась для анализа АК с разветвленной цепью в плазме человека. Отделение пяти аминокислот от других компонентов плазмы достигается на короткой эффективной длине капилляра 18 см в уксусной кислоте концентрации 3,2 моль/дм³ с добавлением метанола в качестве фонового электролита [15]. Определение второстепенных

метаболитов азота, креатина, 2-аминомасляной кислоты и ацетилкарнитина в плазме человека также выполнены методом КЭ в капилляре из плавленого кварца [16]. В приведенных условиях быстро мигрирующие аналиты остаются под действием силы разделения в течение более длительного периода времени, что способствует их разделению.

Капиллярный электрофорез применен для селективного и количественного определения нативных АК и молочной кислоты при культивировании штаммов *Lactobacillus helveticus* D75 и D76 на питательных средах MRS-1 и молоке. Аналиты разделены и обнаружены в виде комплексов с ионами Cu^{2+} , в то время как предложенное применение β -циклодекстрина и его производных (сульфатированный β -циклодекстрин и 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин) в качестве псевдостационарных фаз обеспечило лучшую селективность разделения. Исследовано влияние концентраций циклодекстрина, Cu^{2+} , ацетата натрия и pH фонового электролита на электрофоретическую подвижность АК [17].

Исследовано применение КЭ с УФ-детектированием для классификации крафтового пива. Для этого АК (цистеин, гистидин, фенилаланин, лизин, триптофан и аргинин) извлекались с помощью катионообменной смолы. Разделение аминокислот проводилось в капилляре из плавленого кварца с внутренним диаметром 50 мкм, общей и эффективной длиной 600 мм и 515 мм соответственно [18].

Разработана стратегия онлайн-derivатизации с использованием КЭ (система Agilent CE, оснащенная детектором с диодной матрицей), которая была успешно применена для предварительной концентрации мультиаминокислот в двух образцах продуктов питания [19]. Derivatизация проводилась для создания новых хромофорных соединений с помощью 4-хлоро-7-нитро-1,2,3-бензоксадиазола.

1.2.2 Жидкостная хроматография

В качестве альтернативы КЭ жидкостная хроматография (ЖХ) с различными типами детекторов и детектированием позволила одновременно определять множество соединений в сложных матрицах с использованием простого процесса извлечения аналитов [20]. Этот аналитический подход использует чрезвычайную чувствительность флуоресценции для определения сверхнизких уровней интересующих аналитов в сочетании со способностью ЖХ эффективно разделять такие аналиты и устранять помехи.

Тем не менее, сложность обнаружения аминокислот с использованием спектрофотометрического (СФ) или флуоресцентного (ФЛ) детектора заключается в отсутствии сильных хромофоров или флуорофоров, которые могут поглощать или испускать свет. В табл. 1 представлены различные варианты жидкостной хроматографии для определения аминокислот.

Таблица 1 – Применение жидкостной хроматографии для определения аминокислот

*Детектирование	Аналиты	Матрица	Предел обнаружения	Ссылка
ВЭЖХ-ФЛ система Agilent Technology-Series 1200; $\lambda_{\text{воз}} = 340 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 450 \text{ нм}$	Глицин, аланин, серин, аргинин, глутаминовая кислота, тирозин, фенилаланин, триптофан	11 коммерческих образцов чая (Шри-Ланка)	0,97 – 16,94 нМ	[21]
ВЭЖХ-ДМД системы ВЭЖХ Agilent Infinity II 1260; $\lambda = 338$ и 262 нм	20 аминокислот	Стандартный раствор	0,005 мМ	[22]
УВЭЖ-МС/МС система ACQUITY в сочетании с тройным квадрупольным масс-спектрометром API 5500	40 эндогенных аминокислот	Экстракт лизата клеток, очищенный с помощью угля	0,3–3 нг/мл	[23]
Жидкостная хроматография высокого разрешения в сочетании с tandemной масс-спектрометрией, оснащенной системой ВЭЖХ серии Agilent 1260 и масс-спектрометром Agilent 6460 Triple Quadrupole	20 аминокислот	Плазма крови крыс	1-20 мкмоль/л	[24]
ЖХ-МС Agilent Infinity II UHPLC	L-аминокислоты	Стандартная смесь АК	0,002-1,21 нМ	[25]

*Детектирование	Аналиты	Матрица	Предел обнаружения	Ссылка
ЖХ-МС/МС Agilent 6460 Triple Quadrupole (QqQ) с источником ESI Agilent Jet Stream Technology	18 аминокислот	Растительные экстракты		[26]
ЖХ-МС Agilent 6460 Triple Quadrupole (QqQ) с источником ESI Agilent Jet Stream Technology	18 аминокислот	Сельскохозяйственные отходы растений	0,2-5,6 мкг/кг	[27]
УВЭЖХ-МС/МС 1290 Infinity UHPLC в сочетании с тройным квадрупольным масс-спектрометром 6490	21 аминокислота	5 видов чая	$4,50 \times 10^{-7} - 1,05 \times 10^{-4}$ мкг/мл	[28]
ЖХ-МС Agilent 1260 Infinity II LC в сочетании с тройным квадрупольным масс-спектрометром	27 аминокислот	Плазма крови крупнорогатого скота	0,51-71,01 нг/л	[29]
ГХ-МС (GC8890 GC System, 5977B GC/MSD, Agilent) Ионизация происходила при 260 °С при 70 эВ, диапазон сканирования – 45-700 m/z	17 аминокислот	Молочная сыворотка и ее гидролизаты	0,03–0,77 мкг/мл	[30]
LC-ESI-МС/МС Sciex5500 Q TRAP использовался в сочетании с системой Shimadzu LC20ADXR	Таурин, креатинин, глутатион, серосодержащие аминокислоты	Плазма крови человека	0,001–1,80 мкМ	[31]
ЖХ-МС/МС Shimadzu Nexera-2, оснащенной автосемплером SIL-30AC	36 аминокислот	Коммерческие сорта батата	0,00001–0,09000 мкмоль/л	[32]
ЖХ-МС/МС Agilent серии 6530 (QTOF-MS), оснащенный автосемплером Agilent серии 1260	17 аминокислот	Образцы мочи и плазмы человека	0,03 – 2,26 мкмоль/кг	[33]
ЖХ-МС/МС LC-QqQ-MS, 1260 Infinity, Agilent), бинарного насоса и автосамплера (серия 1260 Infinity II, Agilent)	17 пар энантиомеров аминокислот	Образцы приготовленной пищи	0,075-27,8 пг (ПКО)	[34]
ЖХ-МС/МС Shimadzu Nexera X2	21 аминокислота	Образцы волос	0,0001 – 1 пкмоль/мл	[35]
ВЭЖХ-УФ 1260 Infinity II LC Agilent Technologies.	25 аминокислот	Плазма крови человека	–	[36]
ЖХ-МС Shimadzu MS-8050 с источником ESI (Turbo IonSpray)	17 аминокислот	Сыворотка крови	0,011-0,057 фмоль,	[37]
ВЭЖХ-МС/МС Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000RS	52 аминокислоты	Плазма крови человека	1-20 мкмоль/л	[38]
2D-ЖХ Agilent 1290 Infinity II 2D-LC от Agilent Technologies	24 аминокислоты	Природные (липо-/цикло-) пептиды	–	[40]

*Детектирование	Аналиты	Матрица	Предел обнаружения	Ссылка
ЖХ-МС Waters® ACQUITY UPLC® H-Class PLUS	19 рацемических аминокислот	Макроциклические гликопептиды	—	[41]
ЖХ/МС Nexera (насос: LC-30AD, автосэмплер: SIL-30A, дегазатор: DGU-20A5, термостат колонок: CTO-30A, Shimadzu)	18 пар протеиногенных аминокислот	Смешанный стандартный раствор	—	[42]
УВЭЖХ-МС/МС Agilent 6470 тройной квадрупольный МС/МС	21 аминокислота	Свежие овощи	0,5-42,19 нг/мл	[43]
GC-FT-Orbitrap-MS Trace 1310, соединенного с МС Q-Exactive Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific)	47 энантиомеров аминокислот	Твердые каменные материалы	10^{-7} М	[44]
ЖХ-ЭСИ-МСМ колонка Acclaim™ 120 C18	Глутамин, глутамат и аспарат	Мозговая ткань	1,11-37,45 нг/мл	[45]
ЖХ-МС/МС Nexera HPLC, подключенная к LCMS-8060 (Shimadzu)	11 аминокислот	Образцы пищевых продуктов	0,005–0,1 нмоль/мл	[46]
ЖХ-МС/МС Ultimate 3000 ultra-HPLC (UHPLC)	Селенометионин, метилселеноцистеин и селеноцистин	Оливковое масло	Ниже 1 мкг/кг	[48]
ЖХ-МС/МС Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific) в сочетании с установкой для ЖХ UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific)	17 аминокислот	Мозг мышей	0,01–0,3 мкмоль/л	[50]
ВЭЖХ-ПДА	Моно- и дийодтирозин	Образцы ламинарии	50,6 нг/г, 168,3 нг/г,	[51]
УВЭЖХ-МС/МС Bruker MaXis Impact, с источником ESI	18 аминокислот	Синтетическая моча	1-250 нг/мл	[53]
ВЭЖХ-УФ ВЭЖХ Agilent 1260 Series	17 аминокислот	Коммерческая пчелиная пыльца	Менее 0,034 мкг/мл	[54]
ВЭЖХ-ФЛ	14 аминокислот	Человеческий пот	10 нмоль/л	[55]
ВЭЖХ-ПДА	Треонин, лейцин, метионин, фенил аланин и гистамин	Твердые напитки	5–250 нмоль/л	[56]
ЖХ-МС/МС Waters Acquity UPLC	Лейцин, изолейцин и аллоизолейцин	Образцы плазмы и моча	—	[57]
ЖХ-МС LC-30AD UPLC, сопряженной с масс-спектрометром Ion Trap (IT)-TOF (Shimadzu)	11 аминокислот	Мозговая ткань	—	[58]
ЖХ-УФ ThermoFisher Scientific	17 аминокислот	Белковый изолят	0,06–1 мкг/мл	[59]

*Детектирование	Аналиты	Матрица	Предел обнаружения	Ссылка
ЖХ-МС Agilent 1290 Infinity II UHPLC (Agilent Technologies)	19 аминокислот	Стандартные растворы	–	[61]
ЖХ–МС Nexera Lite HPLC (Shimadzu)	21 аминокислота	Молочные продукты	1-10 мкмоль/л	[63]
ЖХ-МС/МС Shimadzu LC-20ADXR	13 аминокислот	Клетки плеврального выпота, полученные от пациентов с аденокарциномой легких	40-200 нг/мл	[64]
ЖХ-МС/МС AB SCIEX Triple Quad TM 4500MD (ABSciex, Канада)	Глутаминовая, аспарагиновая, γ -аминомасляная, глициновая и тауриновая кислоты	Плазма крови	1-50 мкмоль/л	[65]
ЖХ-МС/МС Shimadzu Nexera	48 аминокислот	Мочевина	0,01 мкмоль/л	[66]
ЖХ-МС/МС Shimadzu Nexera	24 аминокислоты	Клетки MGC803	0,1 – 25 нг/мл	[67]
УВЭЖХ-МС/МС QTRAP 4500 (Sciex), с системой ACQUITY TM UPLC (Waters)	49 аминокислот	Овощи	0,06–17 мкг/кг	[68]

*Примечание: ДМД – детектор на диодной матрице; УВЭЖХ-МС/МС – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография-МС/МС; ЖХ-МС/МС – жидкостная тандемная хромото-масс-спектрометрия; LC-ESI-МС/МС – жидкостная хроматография с электрораспылительной ионизацией и тандемной масс-спектрометрией; 2D-ЖХ – энантиоселективная многослойная онлайн-двумерная жидкостная хромато-масс-спектрометрия; ВЭЖХ-ПДА – высокоэффективная жидкостная хроматография с детектором на фотодиодной матрице.

Разработан метод одновременного обнаружения восьми АК в различных видах чая, основанный на использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектором, который обеспечивает сверхчувствительное обнаружение. Для преобразования нефлуоресцентных АК во флуоресцентные виды была проведена предколоночная дериватизация с использованием специального реагента – о-фталевого диальдегида и 3-меркаптопропионовой кислоты в соотношении 3:1 [21, 22].

Аналиты в работе [26] дериватизируются с помощью диэтилэтоксиметиленмалоната, реакция между которым и аминокислотами приводит к образованию енамина и этанола, что является еще одним преимуществом такого реагента для дериватизации. Разработанный метод был успешно применен при анализе экстракта из растительного вида *Carduus nutans subsp. macrocephalus (Desf.)*, при этом были идентифицированы 18 АК и 3 других амина. Предложенный подход может быть использован для прямой идентификации известных и неизвестных аминосоединений в различных типах матриц. Оптимизированный метод, включающий использование 0,1 М HCl в 30 % растворе метанола, добавление чистого реагента диэтилэтоксиметиленмалоната и гашение реакции гидроксиламином через 2 ч, воспроизводим для первичных аминов [23]. Аналогичный дериватирующий агент применялся при анализе АК в образцах шелухи семян конопли, жмыхе и листьях облепихи методом жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии [27].

Процесс дератизации может осуществляться по-разному, как это следует из анализа образцов чая и гомогенизированной продукции [28,34]. В более сложных объектах, например, плазме крови человека [36] применяются программируемые инжекторы, в которых образцы дериватизировали с помощью о-фталальдегида в игле инжектора непосредственно перед инъекцией в колонку.

Кроме перечисленных дериватизаторов, применялись ацилхлориды [53], 6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидилкарбамата [54], 4-фтор-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол [55], 9-флуоренилметилоксикарбонилхлорид (рН 9,0 с использованием боратного буфера и этанола в качестве растворителя) [58], смесь метанола, диэтилэтоксиметиленмалоната, 1М боратного буфера (рН 9,0) и внутреннего стандарта (2-аминоадипиновая кислота) [60], дансилхлорид [65], пропионовый ангидрид [69].

1.2.3 Сочетание жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией

Методы дериватизации аминокислот обычно имеют много недостатков, таких как длительный процесс реакции, нестабильность полученных производных и плохая воспроизводимость. Поэтому разрабатываются новые методы определения полярных соединений, в том числе и аминокислот. Одним из них является жидкостная хроматография с гидрофильным взаимодействием в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (HILIC-MS/MS). Принцип разделения HILIC основан на сильном взаимодействии полярных соединений с гидрофильной фазой, что может обеспечить хорошее удерживание и разделение АК. Кроме того, использование водно-органического растворителя в качестве элюента может повысить эффективность ионизации электрораспылительного источника ионизации MS и, таким образом, улучшить чувствительность обнаружения.

Часто такой метод применяют для хирального разделения АК и их эндогенных метаболитов в биообразцах [61, 62, 71, 72]. Авторами [23] разработан быстрый, высокопроизводительный, чувствительный и надежный количественный метод для одновременного детектирования 40 недериватизированных АК и их производных, основанный на сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии-электроспрейной tandemной масс-спектрометрии (UHPLC-MS/MS) с использованием колонки для жидкостной хроматографии с гидрофильным взаимодействием (HILIC). АК и их производные были обнаружены с помощью UHPLC-MS/MS в режиме мониторинга множественных реакций положительных ионов (MRM). Ионы-предшественники использовались для целевых соединений и их внутренних стандартов. Кроме этого метод UHPLC-HRMS применяется для определения молекулярной массы, пептидного картирования и определения первичной аминокислоты [47]. HILIC позволяет проводить анализ АК без дериватизации, например, при количественном определении 20 аминокислот в плазме крыс [24]. Разработан чувствительный и быстрый метод

определения профилей свободных аминокислот в батате. Метод использует систему HILIC в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (MS/MS) [32].

Использование колонок с цвиттерионно-гидрофильным взаимодействием для жидкостной хроматографии (Z-HILIC) для анализа недериватизированных аналитов позволило упростить подготовку образцов. Авторами [29] для определения АК и метаболитов в плазме крупного рогатого скота предложен надежный метод с использованием Z-HILIC в сочетании с тройным квадрупольным МС (TQMS).

Масс-спектрометрия с изотопным разбавлением (IDMS) предлагается как метод референтных измерений относительно известных и точных результатов анализа. Потенциал анализа IDMS основан на его неоспоримом метрологическом преимуществе по сравнению с классическими методами количественной оценки, включая внешнюю и внутреннюю калибровки и стандартные добавки [30, 31]. Известна аналитическая процедура, которая включает прямой анализ образцов мочи и плазмы на содержание 17 аминокислот с последующим простым протоколом осаждения белка [33].

1.2.4 Энантиоселективный анализ аминокислот

Энантиоселективный анализ аминокислот приобретает все большее значение в фармацевтических, биомедицинских и пищевых науках. Хотя существует множество методов разделения энантиомеров аминокислот, одновременный анализ всех хиральных протеиногенных аминокислот одним методом с одной колонкой и одним условием по-прежнему является сложной задачей. Имеются сведения об энантиоселективном анализе высокоэффективной жидкостной хроматографией-тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС) с использованием Chiralpak QN-AX в качестве хиральной колонки. Метод был проверен и применен для энантиоселективного анализа АК в бактериальном ферментативном бульоне-гидросисукцинимидилкарбамат [25].

Также для энантиомерного разделения АК разработана система трехмерной высокоэффективной жидкостной хроматографии (3D-ВЭЖХ) для определения пяти протеиногенных и трех непротеиногенных аминокислот [39]. Применимость аналитической системы к внеземным образцам была оценена путем анализа нескольких типов углеродистых метеоритов перед применением системы к образцам Рюгу. При анализе образцов Рюгу все целевые АК были успешно определены количественно. Непротеиногенные АК, включая 2-аминомасляную кислоту, изовалин и норвалин, редко присутствующие в земной среде, были обнаружены в виде почти рацемических смесей.

В работе [40] представлена уникальная и полностью автоматизированная аналитическая платформа для энантиоселективного анализа аминокислот с использованием метода многократного хирального разрезания. Этот метод позволяет полностью энантиоселективно разделять 20 протеиногенных аминокислот и еще 5 изобарных аналогов, а именно алло-треонин, гомосерин, алло-изолейцин, трет-лейцин.

По аналогии с [25] разработан аналитический метод, основанный на жидкостной хроматографии с электрораспылительной ионизацией в сочетании с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (LC-ESI-MS/MS), который применяется для точной количественной оценки спектра аминокислот, в частности таурина, креатинина, глутатиона и серосодержащих аминокислот (метионин, цистеин и гомоцистеин) [31].

С целью решения проблемы элюирования аналитов с одним временем удержания, например, D-алло-треонин, D-треонин и D-гомосерин, авторы [46] применяли несколько хиральных колонок с хиральным краун-эфиром [CROWNPAK CR-I (+) и CROWNPAK CR-I (-)]. По аналогичной схеме с применением неподвижных фаз типа цвиттер-ионного хинина и хинидина Chiralpak ZWIX(+) и Chiralpak ZWIX(-) проведено стереоселективное разделение АК [70].

Авторами [49] применялись четыре хроматографических градиента и два состава подвижной фазы в сочетании с твердофазной экстракцией. Благодаря этому время разделения в 3 раза быстрее, чем у классических методов, предел количественного определения – менее 5 мкг/л. Помимо разделения полярных АК, их обнаружение также может быть сложной задачей, если их структуры не содержат поглощающих УФ-излучение элементов. В качестве альтернативы применяют один из универсальных аэрозольных детекторов [52].

Способ добавления ионно-парных реагентов в подвижную фазу был применен для улучшения удерживания и разделения аминокислот. В работе [37] использованы пара легких и тяжелых изотопомеров диазозондов для маркировки аминокислот.

Для определения DL-аминокислот в различных продуктах питания и напитках методом жидкостной хроматографии–масс-спектрометрии (ЖХ–МС) с использованием колонки октадецил создан аналитический метод, который может точно идентифицировать пик каждой DL-аминокислоты [63]. Одновременное количественное определение АК в твердых напитках без предварительной дериватизации проведено с помощью ВЭЖХ, сопряженной с потенциометрическим детектором собственной конструкции авторов [56].

Определение свободных аминокислот в образцах молочных продуктов с использованием ГХ–МС требует дериватизации на этапе подготовки образца или химической модификации аминных и карбоксильных групп аминокислот. Это позволяет получать производные с более высокой термостабильностью и летучестью, что, в свою очередь, улучшает обнаружение/чувствительность аналита, предотвращает ложные срабатывания и защищает хроматографическую колонку. Одной из наиболее используемых методик является реакция с использованием N-метил-N-(трет-бутилдиметилсилил)трифторацетамида для получения производных соединений, содержащих полярные функциональные группы. Для этого был проведен анализ свободных аминокислот с депротеинизацией, где

сравнивалась эффективность ацетонитрила и трихлоруксусной кислоты перед дериватизацией с N-метил-N-(трет-бутилдиметил-силил)трифторацетамидом перед анализом ГХ–МС. Результаты показали, что использование трихлоруксусной кислоты позволило определить 13 свободных аминокислот в концентрате белка сырной сыворотки и гидролизате. Метод был проверен с точки зрения извлечения, пределов обнаружения и количественного определения. Эта методология ГХ–МС может использоваться в пищевых лабораториях для количественного определения некоторых свободных аминокислот, включая АК с разветвленной цепью, в твердых молочных продуктах [30].

1.3 Применение экстракции для извлечения и отдельного определения аминокислот

Экстракция – важный метод разделения в химических процессах и биотехнологии, который конкурирует с другими методами разделения, такими как адсорбция, осаждение, хроматография, дистилляция, мембранное разделение, кристаллизация, ионный обмен. В сводной таблице 2 представлены различные варианты экстракции аминокислот из водных сред, пищевых и биологических объектов.

Таблица 2 – Экстракция аминокислот из объектов со сложной матрицей

Аналиты	Объект анализа	Способ экстракции	Экстрагенты (экстракционный растворитель)	Степень извлечения, %	Ссылка
22 АК	Мясо дикого кабана	Микроэкстракция/дериватизация	HCl или КОН (гидролиз)	92-106	[73]
Триптофан, тирозин, фенилаланин	Кровь крупного рогатого скота	ТФЭ	Цеолитный имидазолатный каркас-8 (ZIF-8)	90,1-95,1	[76]
Тирозин, фенилаланин, триптофан	Белковый раствор	ЖЖЭ	Водная двухфазная система на основе полимерного ГЭР	92,25-99,10	[77]
17 АК	Листья тутового дерева	Микроволоновый кислотный гидролиз	HCl (гидролиз)	Более 85	[78]

Аналиты	Объект анализа	Способ экстракции	Экстрагенты (экстракционный растворитель)	Степень извлечения, %	Ссылка
18 АК	Плазма крови	ЖЖЭ	Ацетонитрил и вода	82,4-113	[79]
L-аргинин, L-фенилаланин и L-тирозин	Водные растворы	ЖЖЭ	Диметиловый эфир полиэтиленгликоля и природный ГЭР	73,8-78,2	[80]
17 АК	Белковый раствор или сырой осадок	УЭ	Щелочная протеаза (pH 9-12) и ультразвук низкой интенсивности (pH 10, 21кГц)	93,3	[81]
17 АК	Личинки мучного хрущака с высоким содержанием белка (<i>Tenebrio molitor</i>)	ЖЭ	Фосфорная и лимонная кислота	Установлено только общее содержание АК	[82]
21 АК	Морские водоросли	ЖЭ	Сверхчистая вода, α-амилаза и стимулированная слюна	60-85	[83]
L-аспарагиновая кислота	Разбавленные ферментационные бульоны	Реактивная экстракция	1-октанол, 1-деканол и циклогексан (растворители) + триалкилфосфат (экстрагент)	67,2-86,3	[84]
23 АК	Образец необработанной кожи филе угря	УЭ	Этанол	Установлено только общее содержание АК	[85]
Свободные селеноаминокислоты	Порошковое и лиофилизированное молоко	УЭ	Природные ГЭР	94,49-100	[86]
15 АК	Хризантема (<i>Chrysanthemum morifolium</i>)	Механохимическая экстракция <i>in situ</i>	Бетаинэтиленгликоль (эвтектический растворитель)	90,3-122,5	[87]
21 АК	Вода с очистных сооружений	ТФЭ	Картриджи Oasis MAX	63-84	[88]
Йодосодержащие АК	Образцы морских водорослей	Ферментативный гидролиз в сочетании с микроволновым и ультразвуковым воздействием	Раствор панкреатина	Установлено только общее содержание АК	[91]
Аргинин и тирозин	Водные растворы	ЖЭ	Магнитные ионные жидкости на основе полипропиленгликоля	95,8 (аргинин) 9,4	[93]

Аналиты	Объект анализа	Способ экстракции	Экстрагенты (экстракционный растворитель)	Степень извлечения, %	Ссылка
			ля 600	(тирозин)	
L-триптофан	Разбавленные водные растворы	Метод сублимации растворителя, включающий реакцию экстракцию в периодическом режиме	ди(2-этилгексил) фосфорная кислота	74,7	[94]
Мономерные АК	Отходы человеческих волос	Процесс направленной деполимеризации/изоляции с использованием ионных жидкостей	1-бутил-3-метилимидазолий хлорид	34,6	[95]
Аспарагиновая и глутаминовая кислоты, лизин, аланин	Сахарная свекла и тростниковая патока	СФЭ	Поток CO ₂ и метанол	20-63	[97]
17 АК	Глинистые минералы и астробиологические образцы	УЗ	Метанол и вода	65	[98]
Свободные АК	Безглютеновая мука	ЖЭ	Трихлоруксусная кислота (1 %) и этанол	83,2-99,6	[99]
Низкомолекулярные АК	Плазма крови	ЖЭ	Метанол	81-98	[102]
17АК	Ирландские бурые водоросли (<i>Ascophyllum nodosum</i> и <i>Fucus vesiculosus</i>)	ЖЭ	0,1 М HCl	31-38	[104]
15 АК	Питьевая вода	ТФЭ	CNW SCX SPE Cartridge, (ANPEL Laboratory Technologies, China)	69,8-117,9	[108]
21 АК	Соевый творог	ЖЭ	20% водный раствор метанола	80,6-100,1	[109]
Аланин, глицин, цистеин, гистидин, глутаминовая кислота	Коммерческие таблетки с пищевыми добавками	СФЭ	Поток CO ₂ и дихлорметан	1,69-3,66 коэффициенты селективности)	[110]
17 АК	Детское питание	Микроволновый кислотный гидролиз	6 М HCl с 1 % фенолом	98-104	[112]

Аналиты	Объект анализа	Способ экстракции	Экстрагенты (экстракционный растворитель)	Степень извлечения, %	Ссылка
19АК	Пчелиная пыльца	УЭ	Сверхчистая вода и этанол	94-99	[116]
L-серин, L-глутаминовая кислота и глицин	Морская вода и плазма крови человека	ДЖЖМЭ	Дихлорметан, метанол, хлорид натрия	86-94	[117]

Примечание: ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция; ТФЭ – твердофазная экстракция, УЭ – ультразвуковая экстракция, ЖЭ – жидкостная экстракция, СФЭ – сверхкритическая флюидная экстракция ДЖЖМЭ – дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция

1.3.1 Экстракция аминокислот с применением двухфазных водных систем на основе полимеров

Водные двухфазные системы (**ВДС**) привлекают всё больше внимания как альтернатива традиционным системам жидкостной экстракции в части поиска экологически чистых и биоразлагаемых экстрагентов. ВДС на основе ионных жидкостей (**ИЖ**) считаются перспективными для экстракции, очистки и разделения широкого спектра веществ, включая биомолекулы (аминокислоты, белки, ферменты, алкалоиды, фармацевтические препараты и т. д.) [74].

Перед количественным определением (ВЭЖХ-ФЛ) 22 аминокислот в мясе диких животных (*Sus scrofa*) разного возраста и пола авторами [73] приводилась микроэкстракция с помощью кислотного (3 мл 6М соляная кислота) и щелочного гидролиза (4М гидроксид калия). Обнаружены значительные различия в аминокислотном составе мяса разных животных (например, содержание аспарагиновой кислоты и таурина было немного выше у молодняка, чем у взрослых особей).

В работе [75] получены экспериментальные данные о распределении L-триптофана в водных смесях 1-алкил-3-метилимидазолия, $[C_n\text{mim}]X$, с различной длиной углеводородной цепи ($n = 4, 8$) и аминокислотными анионами: L-лейцинат, L-валинат, L-лизинат и неорганической солью (K_3PO_4). Полученные новые данные обсуждаются с точки зрения структуры

аминокислот и, учитывая низкую токсичность систем, они обладают высоким потенциалом для извлечения небольших биомолекул.

Например, L-аспарагиновую кислоту можно получить путём экстракции, химического синтеза, ферментации и ферментативных процессов. Отделение L-аспарагиновой кислоты от гидролизатов белка, ферментационных бульонов и водных растворов довольно сложно. Также она диссоциирует в водных растворах, образуя различные ионы, количество которых зависит от pH водного раствора [11], поэтому она является гидрофильной при любых значениях pH, что значительно усложняет традиционную экстракцию растворителем. Однако экстракция может быть осуществлена за счет повышения экстракционного потенциала органических растворителей с помощью метода реактивной экстракции путем добавления липофильных анионных или катионных экстрагентов, которые при определенных значениях pH могут образовывать комплексы с кислотой, преимущественно растворимой в органической фазе. Основная цель реактивной экстракции – добиться высокого выхода продукта при улучшенной селективности, что может быть достигнуто в оптимальных условиях с использованием подходящей комбинации экстрагентов и разбавителей.

В ходе исследования [95] разработан процесс направленной деполимеризации/экстракции с использованием ионных жидкостей (IL-TDI) для одновременного извлечения меланина и мономерных аминокислот из бычьей кожи с удовлетворительным выходом и превосходной чистотой. Процесс состоял из четырёх этапов: деполимеризации, разделение жидкости и твёрдого вещества, экстракции и извлечение ионной жидкости. В результате получено 6,02 % меланина и 34,58 % мономерной аминокислоты, а экологически чистый 1-бутил-3-метилимидазолия хлорид можно было использовать повторно.

Две чувствительные к температуре магнитные ионные жидкости на основе полипропиленгликоля-600 и мицеллярных растворов с солями натрия

и калия использованы для селективного разделения смесей аргинина и тирозина. В процессе разделения фаз капли магнитной жидкости притягиваются внешним магнитным полем, и две водные фазы легко отделяются друг от друга без этапа центрифугирования. После экстракции из фазы, богатой метил-L-аргинином, путём нагревания были получены как чистый аргинин, так и метил-L-аргинин. Из фазы, богатой солью, путём изменения pH и охлаждения получен чистый тирозин. Все процессы разделения и извлечения были простыми и не требовали использования органических растворителей [93].

В последнее время всё больше внимания уделяется созданию реагирующих на раздражители двухфазных систем на водной основе (ATPS) для экстракции и разделения различных биологически активных соединений. Исследованы водные двухфазные системы, состоящие из диметилового эфира полиэтиленгликоля с молярной массой 250 г/моль и природного глубокого эвтектического растворителя (ГЭР) [80]. Природные глубокоэвтектические растворители – смеси, состоящие из молекулярных компонентов: сахара, спиртов, АК, органических кислот и производных холина. Авторами изучено применение двухфазных водных систем для разделения L-аргинина, L-фенилаланина и L-тирозина.

В работе [77] впервые была создана ATPS на основе реагирующего на pH полимерного эвтектического растворителя (ПГЭР) – нового типа глубокоэвтектических растворителей, которые содержат полимеризуемые звенья, и фосфатной соли. ПГЭР был получен свободнорадикальной полимеризацией хлорида тетрабутиламмония и акриловой кислоты. С помощью серии экспериментов были изучены свойства ПГЭР, реагирующие на pH. Новый ATPS на основе ПГЭР использовался для извлечения ароматических АК (тирозина, фенилаланина и триптофана) со степенью извлечения 95,25-99,10%. Высокая степень извлечения аналитов объясняется эффектом высаливания, π - π -взаимодействием, а также электростатическим эффектом и эффектом Ван-дер-Ваальса. Сильное электростатическое

взаимодействие между ПГЭР и АК объясняется их амфотерными свойствами, то есть их ионизацией в растворе. АТРС полученные с использованием природных ГЭР, имеют ряд преимуществ: низкая токсичность и более высокая стабильность по сравнению с АТРС на основе полимеров [77, 80].

Для извлечения свободных селеноаминокислот из образцов лиофилизированного и сухого молока использованы природные ГЭР (основа – молочная кислота, глюкоза, лимонная кислота и их смеси). Извлечение АК оптимизировано с помощью планирования эксперимента (применен план Бокса-Бенкена с использованием программного обеспечения Design Expert). Факторами, влияющими на экстракцию, были: разбавление ГЭР, объём, количество образца и время воздействия ультразвука. Селеноаминокислоты определяли с помощью жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Пределы обнаружения для селеноцистеина, селенометионина и селено-метил-селеноцистеина составляет 7,37, 8,63 и 9,64 мкг/кг соответственно. Низкая токсичность процесса подтверждена 2 штрафными баллами по шкале EcoScale [86].

Синтезированы новые ГЭР на основе нингидрина [89], нонанола из различных солей аммония в качестве акцепторов водородных связей в сочетании с 1-нонанолом в качестве донора водородных связей [90]. Синтезированные гидрофобные ГЭР [90] охарактеризованы путём измерения их физических свойств, включая плотность, скорость звука, вязкость, электропроводность, поверхностное натяжение и показатель преломления в зависимости от температуры. Один из синтезированных десульфураторов был использован в качестве качественного и количественного индикатора аланина, лейцина, серина, глутамина, метионина и глицина аминокислот методом спектрофотометрии.

Разработана высокоэффективная и экологически безопасная технология экстракции для извлечения АК с помощью ГЭР – механохимической экстракции и двухфазной водной системы. ГЭР – прозрачная, однородная жидкость, образующуюся при смешивании бетаина и этиленгликоля и

нагревании смеси на водяной бане при температуре 80°C. Далее образцы хризантем помещали в ступку и механически растирали с 1 мл ГЭР; в раствор порциями добавляли по 10 мл дистиллированной воды для переноса измельченных гомогенных образцов в центрифужную пробирку объемом 15 мл; образец центрифугировали, надосадочную жидкость переносили в новую центрифужную пробирку, добавляли K_2HPO_4 и перемешивали до растворения, что привело к явному расслоению, и в верхнем слое обогатились анализируемые вещества. Наконец, раствор из концентрированного слоя был удалён и разбавлен в пять раз для дериватизации. Механическое измельчение способствовало высвобождению ароматических аминокислот из хризантемы, а водная двухфазная система обогащала целевые аналиты в растворе, что привело к увеличению выхода ароматических аминокислот. Метод позволяет эффективно извлечь 15 активных веществ из хризантем за 5 мин [87].

В исследовании [111] для получения ГЭР использовались хлорид холина, соль аммония (акцепторы водородной связи) и уксусная кислота (донор), а для снижения вязкости, увеличения скорости и эффективности массообмена полученную смесь разбавляли водой. Затем полученную смесь применяли для извлечения АК из образцов пчелиного хлеба (функционально-натуральный продукт, который получается в результате ферментации пчелиной пыльцы в ячейках сот) и установления их общего количества в продукте (Индивидуальный аминокислотный профиль).

1.3.2 Другие варианты экстракции аминокислот

В последнее время экстракция сверхкритической жидкостью (СЖ) с использованием углекислого газа в качестве метода без использования растворителей применяется для извлечения витаминов, антиоксидантов и пищевых волокон из побочных продуктов пищевой промышленности [96]. Обычно экстракция сверхкритическим углекислым газом (СК- CO_2) считается эффективным методом извлечения компонентов с низкой

полярностью, но для экстракции аминокислот, которые являются полярными веществами, следует использовать полярные модификаторы или сорастворители, такие как метанол и этанол, чтобы повысить растворимость вещества [96].

Так, в работе [97] для извлечения свободных аминокислот из свекловичной и тростниковой патоки использовалась сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ). Чтобы добиться минимального содержания воды мелассу поместили в фарфоровую ступку, содержащую 70 г безводного сульфата, и перемешивали смесь в течение нескольких минут до получения практически сухого материала. 75 г высушенного порошка с содержанием воды 2–3 % по массе смешали со стеклянными шариками (диаметром 2 мм; соотношение по массе 1:2), чтобы предотвратить агломерацию и использовать в качестве носителя. Полученный порошок засыпали в экстракционную ячейку объёмом 100 мл, на верхнюю часть сосуда поместили ещё один фильтр и закрыли сосуд. Система (проточно-инжекционный режим) была оснащена пневматическим насосом для подачи CO_2 в экстракционную камеру, которая была помещена в печь с регулируемой температурой. Наконец, статическая экстракция была проведена для улучшения контакта между образцом и растворителем. По истечении заданного времени статической экстракции клапан сепаратора открывался, и CO_2 поступал в сборник экстракта, где газ CO_2 отделялся от экстракта. Для оптимизации процесса экстракции с помощью метода поверхности отклика оценивалось влияние различных переменных: давление (150–350 бар), температура (40–60 °C) и время экстракции (10–90 мин).

Обнаружено, что СФЭ позволяет селективно извлекать аланин, глицин, цистеин, гистидин и глутаминовую кислоту в зависимости от температуры и давления в экстракторе [110]. Однако СФЭ показала низкую эффективность извлечения других аминокислот в изученном рабочем диапазоне. В результате оптимизации была достигнута наивысшая степень селективности для глутаминовой кислоты ($P = 14$ МПа, $T = 20$ °C, $t = 40$ мин), глицина ($P =$

12 МПа, $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 40$ мин), гистидина ($P = 20$ МПа, $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 20$ мин), аланина и серина ($P = 20$ МПа, $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 60$ мин).

Для определения аминокислот в образцах морской воды из залива Чабакхар и плазмы крови человека использована новая дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция с применением вихревого движения в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией [118]. После экстракции экстрагирующий растворитель, находящийся над образцом воды или в осажденной фазе, отбирается с помощью шприца и затем вводится в ВЭЖХ или другой подходящий прибор для анализа. Изучено влияние различных параметров, включая тип и объём экстрагента и дисперсионного растворителя, концентрацию соли, время экстракции, скорость и время перемешивания (вихревого движения), а также время и скорость центрифугирования. Микроэкстракцию, предварительное концентрирование и дериватизацию проводили с использованием метанола в качестве диспергирующего растворителя, О-фталальдегида и 3-меркаптопропионовой кислоты в качестве дериватизирующего агента и дихлорметана в качестве экстрагирующего растворителя. В оптимальных условиях пределы обнаружения находились в диапазоне $0,8\text{--}1,3\text{ мкг л}^{-1}$, и была получена хорошая линейность от 5 до 75 мкг л^{-1} при коэффициенте обогащения в 94, 91 и 86 раз для Glu, Ser и Gly соответственно. Метод показал хорошие относительные показатели извлечения ($86,8\text{--}100,0\%$) с относительным стандартным отклонением ниже $9,5\%$ для реальных образцов (воспроизводимость метода была удовлетворительной). Предложенный метод можно считать доступным, эффективным и быстрым способом извлечения и определения аминокислот в заливе Чабакхар и плазме крови человека [117]. Масштабируемые и экономичные методы производства оптически чистых аминокислот, как природных, так и ненатуральных, необходимы для их использования в качестве синтетических строительных блоков [120].

Металлоорганические каркасные структуры, как класс пористых материалов, идеально подходят в качестве адсорбентов для твердофазной экстракции (ТФЭ) благодаря большой удельной площади поверхности, настраиваемому размеру пор и множеству функциональных возможностей. В работе [76] предложен метод определения следовых количеств АК в крови крупного рогатого скота путем сочетания ТФЭ и капиллярного электрофореза. Были приготовлены наночастицы цеолитного имидазолатного каркаса-8 (ZIF-8) и использованы в качестве адсорбентов для одновременной экстракции трех АК (триптофана, тирозина и фенилаланина).

Также данный метод применяли для динамического концентрирования и последующего определения метионина, пролина, глицина, гистидина, аргинина, лизина в биологических препаратах с помощью ВЭЖХ с гидрофильным взаимодействием и УФ-детектированием [107].

Для определения следовых количеств 15 свободных аминокислот в пробах воды из источников питьевого водоснабжения разработан метод ТФЭ в сочетании с жидкостной хроматографией высокого давления и tandemной МС. Авторы установили, что картридж с сильным катионообменным сорбентом более эффективен по сравнению с обращенно-фазовым. Разработанный метод показал низкие пределы обнаружения (0,01–0,27 нмоль/л) и степени извлечения АК 69,8–117,9% [108].

В отличие от свободных аминокислот, общий аминокислотный анализ обычно делится на три этапа: гидролиз образца, хроматографическое разделение, обнаружение и количественная оценка. Подготовка образца путём гидролиза считается основным препятствием, поскольку только один этап не позволяет полностью извлечь аминокислоты из цельного белка [78]. Для полного аминокислотного анализа по-прежнему требуются три типа гидролиза-экстракции: кислотный гидролиз, окисление перуксусной кислотой перед кислотным гидролизом для определения серосодержащих аминокислот и щелочной гидролиз, например, для определения триптофана [113].

Принцип ферментативного гидролиза-экстракции для извлечения аминокислот из субстрата заключается в использовании специальных ферментов для расщепления субстрата на составляющие его аминокислоты, который можно использовать для извлечения высококачественных аминокислот из широкого спектра субстратов, таких как пептиды, белки и другие биополимеры [91, 115].

Например, разработан способ ферментативного гидролиза с использованием микроволнового излучения и ультразвука для извлечения моно- и диiodотирозина из ламинарии. Для оптимизации условий экстракции применяли метод поверхности отклика, который был использован для оценки влияния независимых переменных на концентрацию экстрагированного тирозина. Экстракция проводилась с предварительной обработкой ламинарии микроволновым излучением: образцы ламинарии смешали с 35 мл буферного раствора и обработали при мощности 100 Вт. Затем добавили 0,20 г панкреатина и помещали образец в ультразвуковую ванну. Ультразвук, так и микроволновое излучение, способен разрушать клеточную стенку ламинарии, что позволяет органическому йоду внутри ламинарии быстрее и на большей площади контактировать с ферментом в буфере, благодаря чему аминокислота эффективно высвобождается посредством гидролиза [91].

В работе [81] для извлечения сложных аминокислот из белка ила был использован перспективный метод, основанный на низкоинтенсивном ультразвуковом ферментативном гидролизе, а для экстракции использовалась щелочная протеаза с ферментативной активностью 280 000 Ед/г. По сравнению со значениями, полученными при однократном ферментативном гидролизе, после 20-минутной предварительной обработки при комнатной температуре с использованием низкоинтенсивного ультразвука (0,15 Вт/мл), активность фермента увеличилась на 28,7 %, а степень гидролиза белка (СГБ) соответственно возросла на 93,3 %.

Личинки мучного хрущака с высоким содержанием белка были обработаны органическими и неорганическими экстрагентами, чтобы проверить возможность применения полученных из них кислотных гидролизатов для получения наибольшего количества аминокислот [82]. В качестве экстрагирующей среды использовали различные кислоты (лимонная, уксусная, фосфорная) и их смесь.

Метод микроволнового экстрагирования и гидролиза белков и пептидов для получения АК заключается в воздействии на нагреваемое вещество на молекулярном уровне (тепло, выделяемое при трении молекул, мгновенно испаряет воду из образца, создавая высокое давление пара, разрушая клеточные стенки образцов и обеспечивая извлечение белка из матрицы образца в растворитель), что значительно сокращает время экстракции и расход растворителя [114]. В процессе экстракции на целевой выход влияют время и температура экстракции, соотношение твёрдого вещества и жидкости и другие параметры [78].

Таким образом, процесс экстракции АК состоял в основном из двух этапов: экстракция белка из растительной или пищевой матрицы [78, 112] и разложение белков на аминокислоты. На первом этапе белки быстро диффундировали из матрицы в растворитель; на втором – большое количество белков в растворителе разложилось на аминокислоты.

1.3.3 Анализ реальных объектов с применением экстракции аминокислот

Разработан метод одновременной экстракции, отдельной очистки и анализа 21 свободных аминокислот, содержащихся в морских водорослях. В качестве экстрагирующих растворителей были протестированы сверхчистая вода, α -амилаза, стимулированная и искусственная слюна. Были обнаружены значительные различия в общем содержании свободных аминокислот в экстрактах, полученных с помощью разных растворителей [83].

В исследовании [104] основное внимание уделяется влиянию времени экстракции (1 и 2 часа) и растворителей (0,1 М HCl, 1 % лимонная кислота и деионизированная вода) на экстракцию белка и свободных аминокислот, в том числе свободных аминокислот из ирландских бурых водорослей (*Ascophyllum nodosum* и *Fucus vesiculosus*). На выход экстрагируемых веществ влияли как растворитель, так и время экстракции, а также вид используемых водорослей. Установлено, что обе исследованные водоросли являются хорошим источником белка, свободных аминокислот, что свидетельствует об их потенциальном применении в качестве вкусовых добавок в пищевой промышленности.

Для выделения и определения содержания аминокислот в плазме крови разработан метод, который требует небольшое количество образца, а его количественная оценка осуществляется с помощью меченого внутреннего стандарта аминокислот [100]. Свежезабранную плазму (собранную в пробирку с ЭДТА) поместили в микроцентрифужную пробирку, добавили 200 мкл рабочей смеси внутренних стандартов из метанола, гидрата гидразина, щавелевой кислоты, ацетонитрила и воды, содержащей стабильные изотопные меченые внутренние стандарты, и 10 мкл дитиотреитола. Пробирку встряхнули и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Образец дополнительно центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 минут, после чего для дальнейшего анализа использовали 20 мкл надосадочной жидкости. В качестве подвижной фазы в градиентном методе для получения четкого разделения использовались вода, муравьиная кислота и метанол. Для обнаружения аминокислот на масс-спектрометре Shimadzu 8030 использовался оптимизированный метод множественного реакционного мониторинга. Степень извлечения аминокислот находилась в диапазоне от 92,1 до 108,2 %.

Разработаны адсорбенты на основе различных подложек (диоксида кремния и сополимера стирола с дивинилбензолом) для определения аминокислот методом жидкостной хроматографии с гидрофильным

взаимодействием и масс-спектрометрии. Предложен оптимальный вариант структуры функционального слоя в двух сериях полученных неподвижных фаз, который обеспечивает наилучшую гидрофилизацию для каждой подложки. Изучены механизмы удерживания, выбраны условия для масс-спектрометрического обнаружения, разделения, определения 16 аминокислот и проведена оценка применимости полученных адсорбентов для анализа почвенных вытяжек [101].

По аналогии с работой [100] подготовка образцов сыворотки крови для анализа и дериватизация аминокислот включала следующие этапы: к образцу добавляли 5 %-ый раствор хлорной кислоты; смесь перемешивали и центрифугировали (13 000 об/мин, 10 мин), после чего отбирали 150 мкл надосадочной жидкости. Для нейтрализации хлорной кислоты было добавлено 6 мкл 10 М раствора NaOH. Затем в полученный раствор добавили 20 мкл раствора норлейцина с концентрацией 5 мкг/мл (внутренний стандарт) и 280 мкл 0,2 М боратного буферного раствора с pH 9,5, а затем 100 мкл раствора дансила хлорида (7 мг/мл в ацетонитриле). Предложенный подход позволяет проводить высокочувствительное определение низкомолекулярных жирных кислот и аминокислот в образцах сыворотки крови пациенток с диагнозом «эндометриоз» с помощью газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и ВЭЖХ с диодным матричным детектором [102].

Производные каликсарена являются отличными соединениями-носителями для ионных соединений при жидкостной экстракции. Каликсарены представляют собой циклические олигомеры, образованные фенольными звеньями, соединенными метиленовыми мостиками. Размер полости каликсаренов можно регулировать, изменяя количество фенольных звеньев. Кроме того, были разработаны различные производные каликсарена путём введения нескольких функциональных групп в верхнюю и нижнюю части для обеспечения сродства к определённым целевым компонентам [103]. Однако многие исследования с использованием производных

каликсарена проводились с применением высокотоксичного хлороформа в качестве растворителя из-за их плохой растворимости в обычных углеводородах. В настоящее время при экстракции биомолекул в качестве растворителей для производных каликсарена применяются ароматические эфиры, что повышает их промышленную применимость [105]. Аналогичный экстрагент применяли для количественного анализа первичных АК и установления их содержания в сыворотки крови (аминокислотный состав) при оценки различных видах рака [104, 106].

Разработан и валидирован метод УВЭЖХ-МС/МС для определения 18 аминокислот в плазме крови человека беременных женщин с предварительной ЖЖЭ. Показано, что изменения в уровнях аланина, лизина, триптофана, глутаминовой кислоты и фенилаланина могут быть связаны с нарушениями сна во время беременности. Этот метод стал ценной платформой для оценки уровней аминокислот в плазме крови человека и дальнейшего изучения их взаимосвязи с нарушениями сна на разных этапах беременности [79].

В исследовании [84] триоктиламин используется в качестве экстрагента в различных растворителях. Максимальная эффективность экстракции составила 86,25 %, 67,25 % и 58,50 % при использовании 1-октанола, 1-деканола и циклогексана с триоктиламином соответственно.

Содержание аминокислот в коже угря анализировали по методу Хендерсона с небольшими изменениями. Перед количественным определением АК проводили экстракцию образца этанолом и обработкой ультразвуком [85].

Для мониторинга содержания АК в воде очистных сооружений перед их детектированием (HILIC-MS/MS) предварительно проведено извлечение аналитов с помощью инъекции большого объема (*large volume inject*, LVI) или ТФЭ [88]. Метод LVI-HILIC-MS/MS может обеспечить быстрое и чувствительное обнаружение АК, но на результаты анализа влияет матричный эффект (изменение формы хроматографического пика с течением времени после многократных инъекций образцов), кроме этого значительно

сокращается срок службы колонки. Таким образом, несмотря на то, что ТФЭ требует больше времени на саму процедуру (подготовка картриджа, динамическая сорбция, десорбция) по сравнению с LVI, она может удалять матрицу (мешающие компоненты), обеспечивая улучшенное разделение АК и их обнаружение.

Благодаря использованию LVI проведена онлайн преконцентрация образцов и анализ тиоловых АК и промежуточных продуктов метаболизма серы в клеточной линии глиомы человека U-251 [119]. Метод инъекции позволил сократить время анализа соединений, участвующих в метаболизме серы, до 4 минут на образец, производительность метода увеличилась в пять раз.

АК, содержащиеся в водных экстрактах зеленого чая, могут быть получены ультразвуковой экстракцией, экстракцией перемешиванием, экстракцией горячей водой и обычной экстракцией. Суммарное содержание аминокислот в экстрактах составило 54,57, 54,35, 27,11 и 12,67 (мг/100г) соответственно. Результаты исследования показали, что эффективный метод экстракции может значительно увеличить выход летучих и нефенольных метаболитов в водном экстракте зелёного чая [92].

Изучена и оптимизирована простая процедура экстракции образцов муки с последующим определением свободных аминокислот [99]. Обсуждены условия реакции дериватизации аминокислот с нингидрином для хроматографического определения суммы свободных аминокислот. Кроме того, для определения отдельных свободных аминокислот в двенадцати образцах безглютеновой муки (кукурузной, овсяной, соевой, рисовой, тыквенной, пшённой, арахисовой, конопляной, гречневой, амарантовой, гороховой и нутовой) были использованы методы капиллярного изотахофореза и ВЭЖХ. Полученные результаты сравнили с результатами, полученными для пшеничной муки. Эффективность экстракции оценивали путем определения суммы свободных аминокислот с помощью нингидриновой реакции. Наибольшая концентрация свободных аминокислот была в тыквенной муке, а наименьшая – в амарантовой

муке. Тыквенная мука является богатым источником каротиноидов, поэтому её используют в качестве функционального ингредиента в пищевой промышленности.

При традиционном методе экстракции возникает проблема эмульгирования, а количество необходимого растворителя больше, чем при сублимационном методе, что благоприятно сказывается на окружающей среде. Уникальной особенностью сублимационной экстракции является то, что исключается тесный контакт между экстрагирующим растворителем и сточными водами, поскольку основным механизмом переноса являются пузырьки воздуха. Поднимающиеся пузырьки переносили коллоид (аминокислоту и поверхностно-активное вещество) на поверхность пузырьков и переносили его в вышележащий неподвижный слой растворителя. Затем растворённое вещество можно было извлечь путём дистилляции.

Целью исследования [94] является извлечение L-триптофана из разбавленного водного раствора. Метод извлечения основан на традиционной экстракции растворителем и сублимационной экстракции. Метод реализуется с учётом нескольких факторов: количества экстрагента, поверхностно-активного вещества, исходного pH и скорости потока газообразного азота. Созданы модели для оценки показателей выхода и обогащения аминокислоты, которые хорошо объясняют влияние и взаимодействие между собой различных факторов. Максимальная степень извлечения аминокислоты составила 70,29 %, а коэффициент распределения 7,276 при молярном соотношении аминокислоты и лаурилсульфата натрия 1:1, молярном соотношении аминокислоты и экстрагента (ди-(2-этилгексил) фосфорной кислоты) 1:1500, и соотношении объёмов водной и органической фаз 3:1. При использовании метода сублимации растворителя максимальная степень извлечения триптофана составила 74,77 %, коэффициент распределения при этом 3,552. Экстракционная сублимация растворителя

предпочтительнее обычной экстракции растворителем, поскольку в первом случае используется меньшее количество растворителя.

Изучение органических молекул в метеоритах и возвращённых образцах позволяет понять химические процессы, происходящие в нашей Солнечной системе. Работа авторов [98] направлена на изучение метода экстракции с помощью ультразвука как эффективного способа извлечения этих молекул из внеземных образцов и их аналогов. В результате исследования влияния ультразвуковой частоты, продолжительности облучения и растворителя на выход аминокислот, азотистых оснований и дипептидов из модельной минеральной матрицы, богатой глиной, были выбраны оптимальные условия экстракции с использованием ультразвука: частота 20 кГц, время облучения 20 минут и соотношение метанола и воды.

ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика аминокислот

Аминокислоты участвуют в биосинтезе полипептидов и белков, а также в синтезе фосфатидов, порфиринов и нуклеотидов. Свободные аминокислоты нужны в живом организме и для выполнения специфических задач [121,122]. В качестве объектов исследования выбраны гистидин, метионин, пролин и треонин, их структуры и некоторые свойства представлены на рис. 1 и в табл. 1 [10]. Природные аминокислоты хорошо растворимы в воде, как правило, весьма гидрофильны, в широком диапазоне pH существуют в цвиттерионной форме (рис. 2) [123-125].

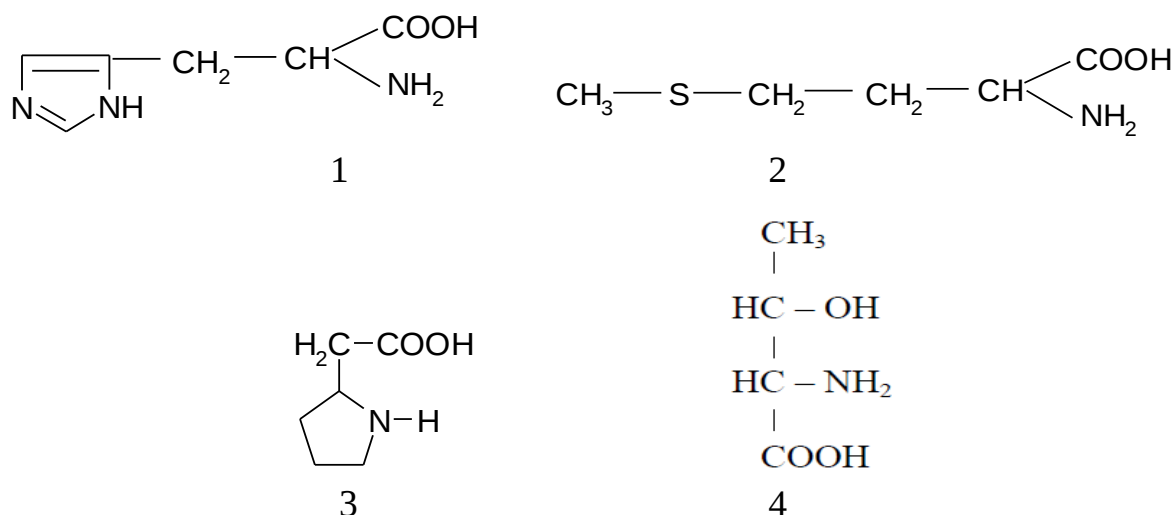


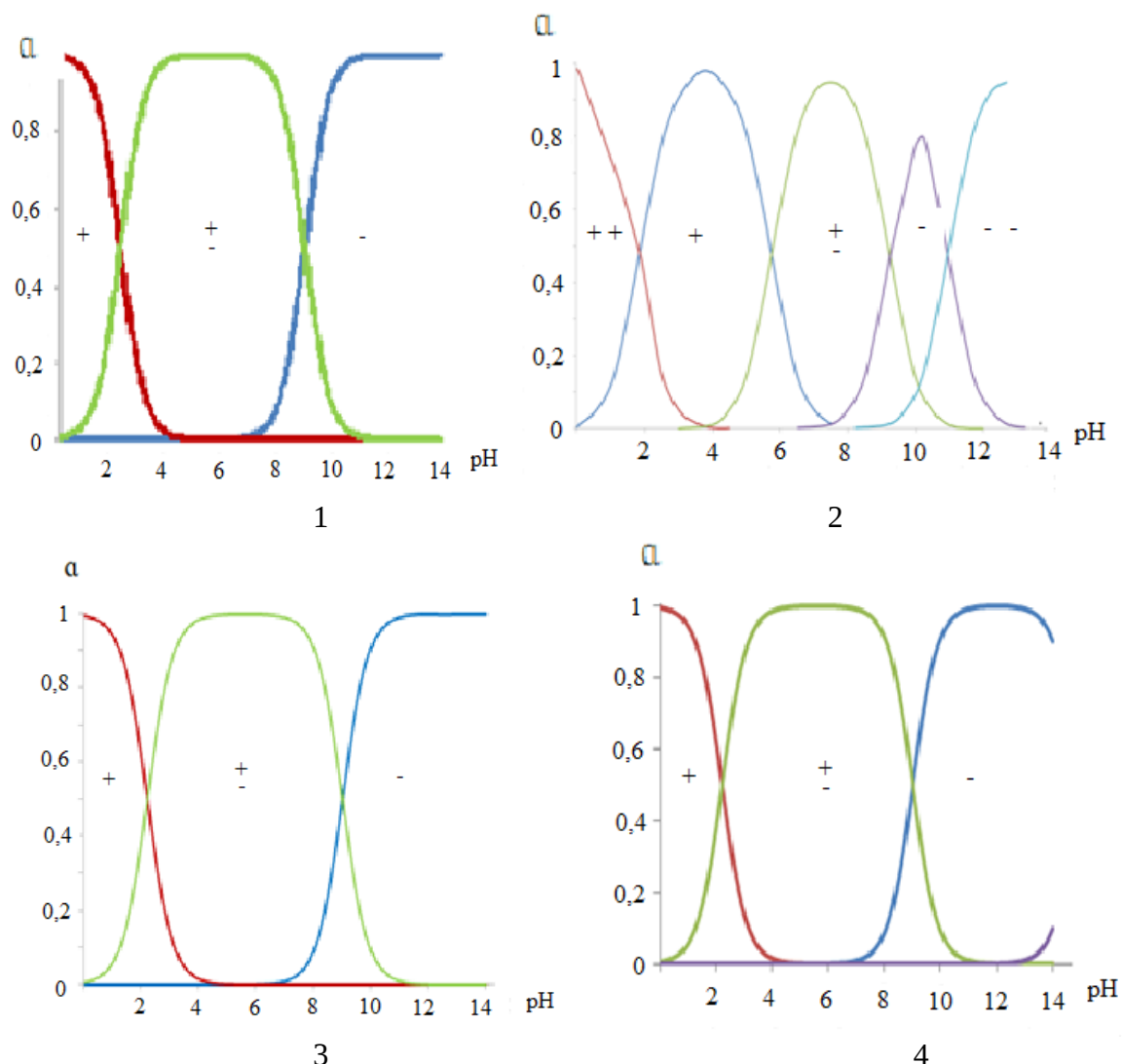
Рисунок 1– Структуры гистидина (1), метионина (2), пролина (3), треонина (4)

Метионин. Алифатическая серосодержащая α-аминокислота, в чистом виде представляет собой бесцветные кристаллы со специфическим запахом. *Met* служит донором метильных групп при образовании адреналина, холина, а также источником серы при биосинтезе цистеина и в создании вторичной структуры белков за счет образования дисульфидных мостиков. *Met* обладает радиопротекторным свойством, защищает организм при отравлениях бактериальными эндотоксинами и прочими ядами, поэтому ее часто используют для защиты организма от токсикантов окружающей среды [126, 127].

Таблица 1 – Некоторые характеристики аминокислот [10]

Аминокислота	Обозначение	М, г/моль	Растворимость, г/100 см ³ Н ₂ О при 25 °С	Т _{разл} , °С	pI	pK ₁ (-COOH)	pK ₂ (-NH ₃ ⁺)	R-группа
Метионин (2-амино-4-(метилтио) бутановая кислота)	Met	149,21	3,35	283	5,74	2,28	9,21	Неполярная
Гистидин (L-α-амино-β- имидазолилпропионовая кислота)	His	155,16	4,19	277	7,64	1,77	9,18	Заряженная полярная*
Пролин (пирролидин-α-карбоновая кислота)	Pro	115,13	162,30	222	6,30	2,00	10,60	Неполярная
Треонин 2-амино-3-гидроксипутановая кислота)	Thr	119,12	20,50	253	5,59	2,63	10,43	Незаряженная полярная

*у гистидина pK₃ (имидазольной группы в боковом фрагменте) = 5,92



двузарядный катион (++) ; однозарядный катион (+) ; цвиттер-ион (±) ;
однозарядный анион (-) ; двузарядный анион (- -)

Рисунок 2 – Диаграммы долевого распределения ионных форм метионина (1), гистидина (2), пролина (3) и треонина (4) в зависимости от рН водного раствора

Гистидин. Незаменимая α -аминокислота гетероциклического типа, характеризующаяся наличием имидазольной функциональной группы, которая может служить как донором, так и акцептором образования водородных связей, и проявлять свойства как кислоты, так и основания в зависимости от диапазона рН. *His* выполняет ряд важных функций в организме человека, является неотъемлемой составляющей многих белков, способствует росту и восстановлению тканей. *His* применяется в качестве биологически активной добавки, является составной частью многих

витаминных комплексов; он используется при лечении глазных заболеваний, ревматоидных артритов, аллергий, язв и анемии [128].

Пролин. Представляет собой бесцветные, легко растворимые в воде кристаллы, является протеиногенной иминокислотой. *Pro* участвует в синтезе белков и в месте своего нахождения вызывает “излом” их структуры. Находясь внутри фрагментов белков, обеспечивает жесткость и стабильность их структуры в области изломов, что защищает белки от неспецифической протеолитической деградации. Важным примером модификации аминокислотных остатков является превращение остатков пролина в остатки гидроксипролина, которое происходит при образовании коллагена. *Pro* входит в состав инсулина, адренокортикотропного гормона, грамицидина С и других биологически важных пептидов, способствует заживлению ран, укрепляет сухожилия и суставы, повышает работоспособность, укрепляет сердечную мышцу [129, 130].

Треонин участвует в биосинтезе белка, являясь незаменимой аминокислотой, молекулу которой характеризуют два разных хиральных центра. Треонин относится к аминокислотам с недиссоциирующими полярными, но не заряженными боковыми радикалами, которые способны образовывать между собой водородные связи. *Thr* способен поддерживать иммунную систему человека, способствует выработке антител, вместе с метионином принимает участие в синтезе коллагена. *Thr* активно используется в качестве биодобавки к комбикормам, способствующих быстрому росту животных и домашних птиц. Повышенные дозы треонина применяются для восстановления после операций и травм. Недостаток треонина приводит к дисбалансу всех аминокислот, которые производятся на его основе [131], и к негативным последствиям для центральной нервной системы.

Все объекты исследования осуществляют жизненно важные для организма человека функции: структурную, пищеварительную, антиоксидантную, нейромедиаторную, иммуномодулирующую и другие.

2.2. Синтез и характеристика водорастворимых полимеров

В работе были синтезированы гомополимеры N-винилпирролидона, N-винилкапролактама, N-винилимидазола, 1-винил-1,2,4-триазола, N-винилформамида и акриламида из мономеров («Sigma Aldrich», Германия) с различной величиной средневязкостных молекулярных масс M_n (табл. 2). Структуры элементарных звеньев полимеров приведены на рис. 3.

Таблица 2 – Синтезированные полимеры

Полимер	Обозначение	Интервал M_n
Поли-N-винилпирролидон	ПВП	10000-94000
Поли-N-винилкапролактam	ПВК	12000-50000
Поли-N-винилимидазол	ПВИ	14000-76000
Поли-N-винилформамид	ПВФ	25000-108000
Полиакриламид	ПАА	20000-82000
Поли-1-винил-1,2,4-триазол	ПВТ	17000-120000

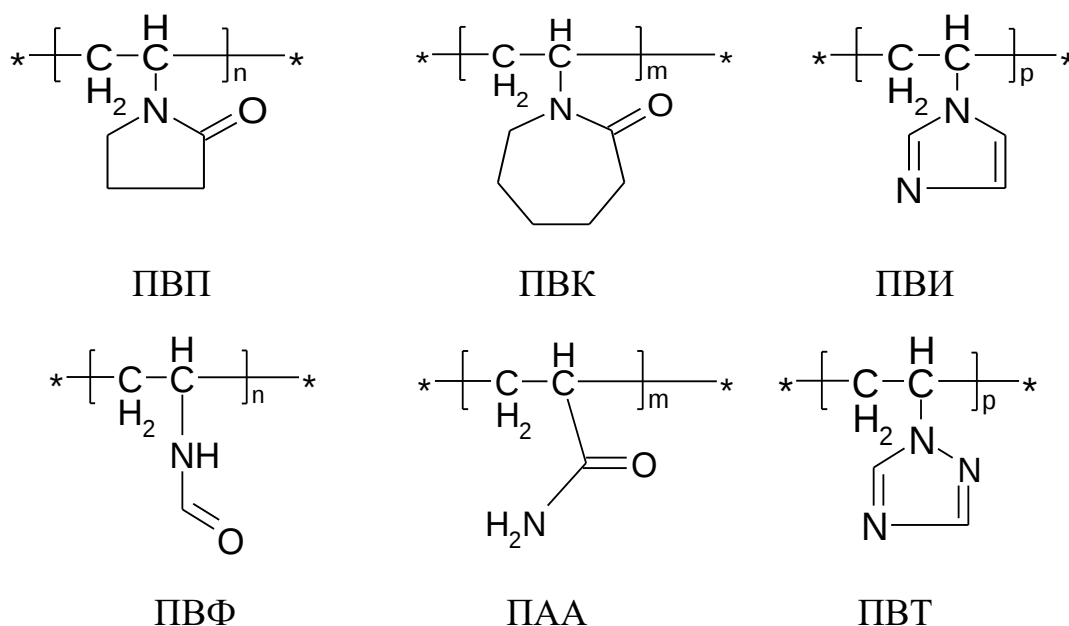


Рисунок 3 – Структуры элементарных звеньев синтезированных полимеров

Радикальную полимеризацию проводили в течение 8 час. при температуре 65 °С в изопропиловом спирте при разной концентрации мономеров. В качестве инициатора применяли динитрил азо-бис-изомасляной кислоты (ДАК) концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ [132-134].

В аналогичных условиях получены сополимеры ВК-ВИ, ВК-ВФ и ВФ-ВИ (рис. 4), различающиеся содержанием сомономеров.

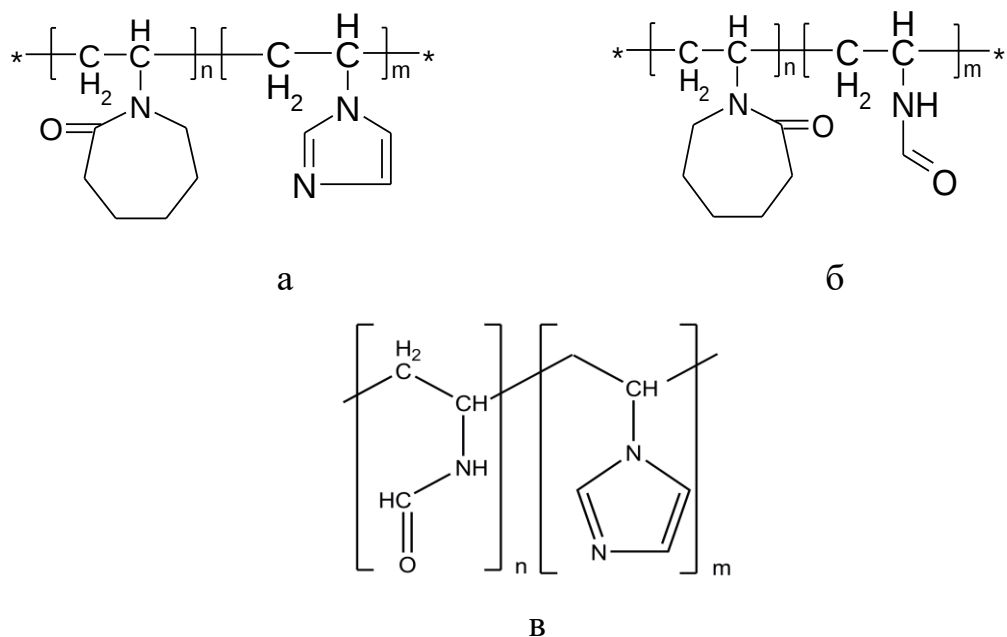


Рисунок 4 – Структуры сополимеров ВК-ВИ (а), ВК-ВФ (б), ВФ-ВИ (в)

Для расчета характеристической вязкости полимеров в вискозиметре Уббелюде с висющим уровнем при $T = 20 \pm 1$ °C проводили измерение времени истечения чистого растворителя (τ_0) и растворов полимеров. Из полученных экспериментальных данных рассчитывали относительную вязкость $\eta_{\text{отн}} = \tau_i / \tau_0$, удельную вязкость $\eta_{\text{уд}} = 1 - \eta_{\text{отн}}$ и приведенную вязкость $\eta_{\text{уд}}/c$. Экстраполяцией к нулевой концентрации графической зависимости приведенной вязкости определяли характеристическую вязкость $[\eta]$. Величину средневязкостной молекулярной массы полимеров M_η вычисляли по уравнению Марка-Куна-Хаувинка из экспериментально найденных величин характеристической вязкости [135]:

$$[\eta] = 1,5 \cdot 10^{-4} M_\eta^{0,68}.$$

Для всех синтезированных полимеров определены размеры гидродинамических радиусов частиц R_h в разбавленном водном растворе. Данные по динамическому светорассеянию получали на модульном спектрометре динамического и статического рассеяния света «Photocor-

Complex» (Россия) в кварцевых кюветах, оборудованном He-Ne лазером мощностью 25 мВт и длиной волны $\lambda = 632,8$ нм. Съемка осуществлялась под углом 90° при 25°C , время измерения составляло 120 секунд. Для определения R_h в кварцевую кювету спектрометра «*Photocor-Complex*» помещали 10 мл водного раствора полимера известной концентрации и измеряли изменения интенсивности прошедшего через кювету лазерного излучения. На основании полученных данных с помощью программного обеспечения «*DynaLS*» рассчитывали гидродинамический радиус частиц [136]. В табл. 3 приведены значения средневязкостной молекулярной массы и гидродинамического радиуса полимеров в зависимости от концентрации мономеров в изопропиловом спирте. Состав синтезированных сополимеров, величины характеристической вязкости и гидродинамических радиусов R_h приведены в табл. 4.

Таблица 3 – Влияние концентрации мономеров на величину молекулярной массы и гидродинамического радиуса полимеров

№ п/п	Концентрация мономера		Характеристическая вязкость $[\eta]$, г/дл	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм
	масс. %	C , моль/ дм ³			
Поли- <i>N</i> -винилпирролидон					
1	10	0,94	0,16	18	145
2	15	1,41	0,21	26	173
3	20	1,87	0,36	52	196
4	25	2,35	0,44	70	211
5	30	2,82	0,56	94	253
Поли- <i>N</i> -винилкапролактam					
1	1	0,07	0,09	12	149
2	2	0,14	0,12	18	168
3	5	0,26	0,17	32	220
4	10	0,58	0,24	50	247
Поли- <i>N</i> -винилимидазол					
1	10	0,94	0,16	14	210
2	15	1,41	0,21	29	254
3	20	1,87	0,36	41	263
4	25	2,35	0,44	53	297
5	30	2,82	0,56	76	352
Поли-1-винил-1,2,4-триазол					
1	10	0,91	0,11	17	187
2	20	1,78	0,29	49	206

№ п/п	Концентрация мономера		Характеристическая вязкость $[\eta]$, г/дл	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм
	масс. %	C , моль/ дм ³			
3	25	2,21	0,46	70	244
4	30	2,63	0,53	120	331
Полиакриламид					
1	10	1,50	0,09	20	83
2	20	2,99	0,13	34	97
3	25	3,75	0,17	56	119
4	30	4,51	0,39	82	135
Поли- <i>N</i> -винилформамид					
1	10	1,50	0,22	25	94
2	20	2,99	0,35	38	107
3	25	3,75	0,48	59	123
4	30	4,51	0,71	108	140

Таблица 4 – Характеристика синтезированных сополимеров

№ п/п	Содержание ВК (ВФ) в мономерной смеси, мол. дол.	ВК (ВФ) в сополимере, мол.дол.	Характеристическая вязкость $[\eta]$, г/дл	R_h , нм
ВК-ВФ				
1	0,10	0,22	0,50	102
2	0,30	0,43	0,49	119
3	0,50	0,55	0,33	137
4	0,70	0,76	0,24	163
5	0,90	0,87	0,15	189
ВК-ВИ				
1	0,10	0,18	0,51	261
2	0,30	0,32	0,42	224
3	0,50	0,46	0,33	196
4	0,70	0,54	0,29	171
5	0,90	0,74	0,19	157
ВФ-ВИ				
1	0,10	0,11	0,52	269
2	0,30	0,36	0,43	204
3	0,50	0,49	0,32	159
4	0,70	0,66	0,23	136
5	0,90	0,59	0,17	104

2.3 Методика экстракции аминокислот

В градуированные пробирки вместимостью 25 см³ помещали по 10 см³ раствора аминокислот и 1; 2 или 4 см³ водного раствора полимера. Вследствие полной растворимости полимеров в воде обязательным условием экстракции является насыщение водного раствора электролитом, понижающим растворимость распределяемого вещества в воде и обеспечивающим расслаивание системы [137]. Жидкостные двухфазные системы получены на основе водных растворов полимеров и высаливателя (насыщенный раствор сульфата аммония или сульфита натрия), при этом одна из фаз насыщается полимером, вторая – солью.

Каждую систему экстрагировали на вибросмесителе в течение 10 минут при температуре 20±1°C. Для установления межфазного равновесия и полного расслаивания системы экстракционную систему центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 минут. Объем после экстракции изменяется из-за частичного растворения полимеров в воде по сравнению с соотношением исходных объемов. Измеряли соотношение равновесных объемов водно-солевой (V_в) и органической (V_о) фаз ($r = V_v/V_o$). При необходимости растворы разбавляли в известное число раз дистиллированной водой и учитывали кратность разбавления при расчете экстракционных характеристик.

Рассчитывали коэффициенты распределения (D), степень извлечения (R, %) и фактор разделения (β) аминокислот по формулам [134,137]:

$$D = \frac{C_o}{C_v}, \quad R = \frac{D}{D+r} \times 100, \quad \beta = \frac{D_2}{D_1}$$

где C_о и C_в – концентрация аминокислоты в органической и водно-солевой фазах соответственно, моль/дм³.

Для определения влияния хлорид-анионов на экстракционные процессы на стадии растворения аминокислоты в смесь добавлялся водный

раствор хлорида натрия с концентрацией в интервале $1 \cdot 10^{-4} - 9 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³, далее экстракция осуществлялась по описанной методике.

2.4 Спектрофотометрическое определение аминокислот

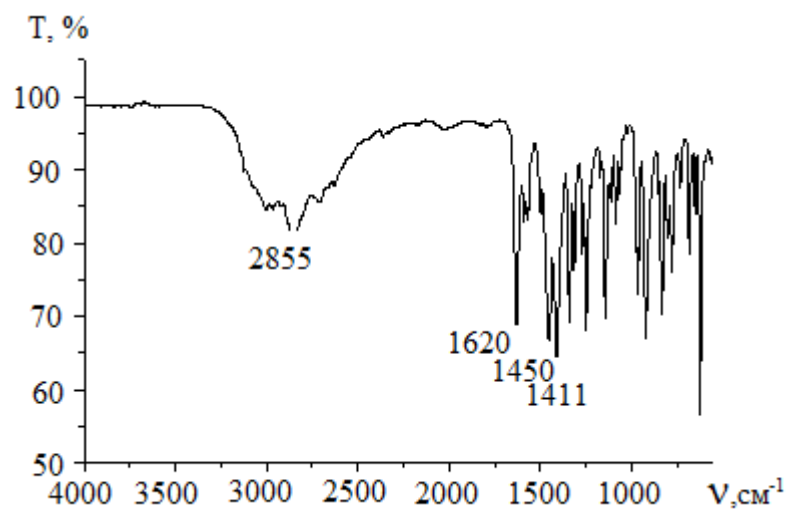
Для определения концентрации аминокислот в водной фазе после жидкостной экстракции полимерами применяли метод УФ-спектрофотометрии. Характеристические максимумы светопоглощения ($\lambda_{\max}$) получены на приборе «Shimadzu» (Япония) в кварцевых кюветах толщиной 1 см в диапазоне длин волн 190–450 нм. Параметры регистрации: ширина щели 0,5 мм, режим «slow», интервал регистрации 0,5 нм. Для построения градуировочных графиков при выбранных длинах волн готовили серии растворов гистидина, метионина, пролина и треонина в дистиллированной воде и измеряли оптическую плотность (A) в интервале 0,2–1,0 [125,128,138]. Результаты УФ-спектрофотометрического определения аминокислот приведены в табл. 5.

Таблица 5 – УФ-определение аминокислот в водных растворах

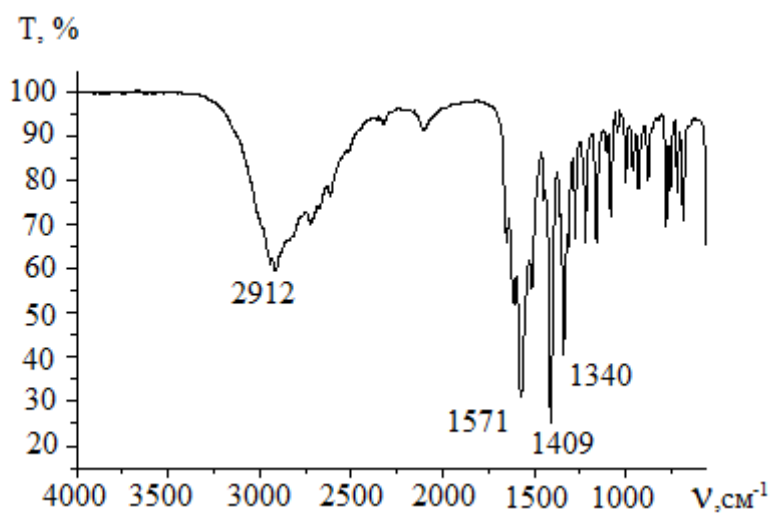
Аминокислота	$\lambda_{\max}$, нм	Уравнение градуировочных прямых
Метионин	226	$A = 3000 \times C + 0,31$
Гистидин	211	$A = 5000 \times C + 0,01$
Пролин	191	$A = 1625 \times C + 0,05$
Треонин	205	$A = 0,045 \times C + 0,006$

2.5 ИК-спектроскопия аминокислот и полимеров

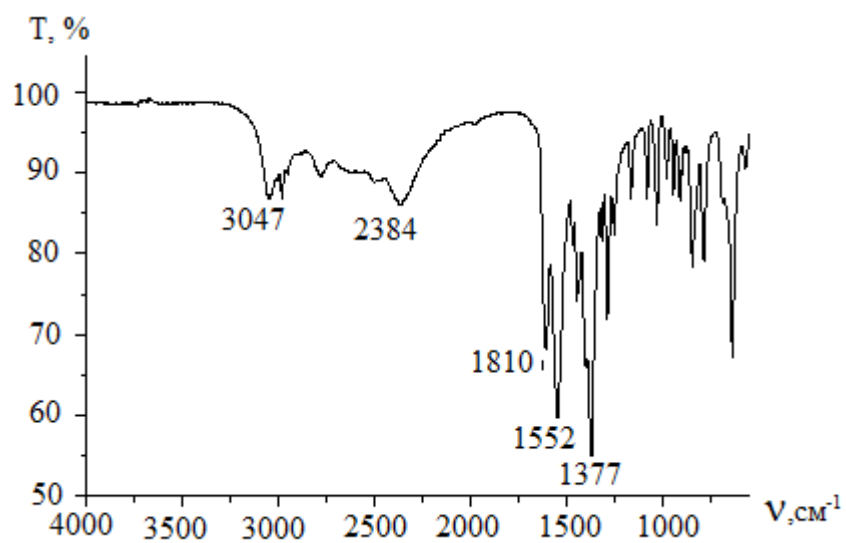
Характер взаимодействия аминокислот с молекулами воды и экстрагента изучены методом инфракрасной спектроскопии. ИК-спектры образцов получены на приборе «Bruker Vertex 70» («Bruker Optics», Германия), с приставкой «DIKE Miracle», с Фурье преобразователем методом нарушенного полного внутреннего отражения. Условия сканирования: 32 сканирования, разрешение 4 см⁻¹, диапазон съемки: 4000–550 см⁻¹. Приводим ИК-спектры аминокислот и водных растворов полимеров (рис. 5,6).



1

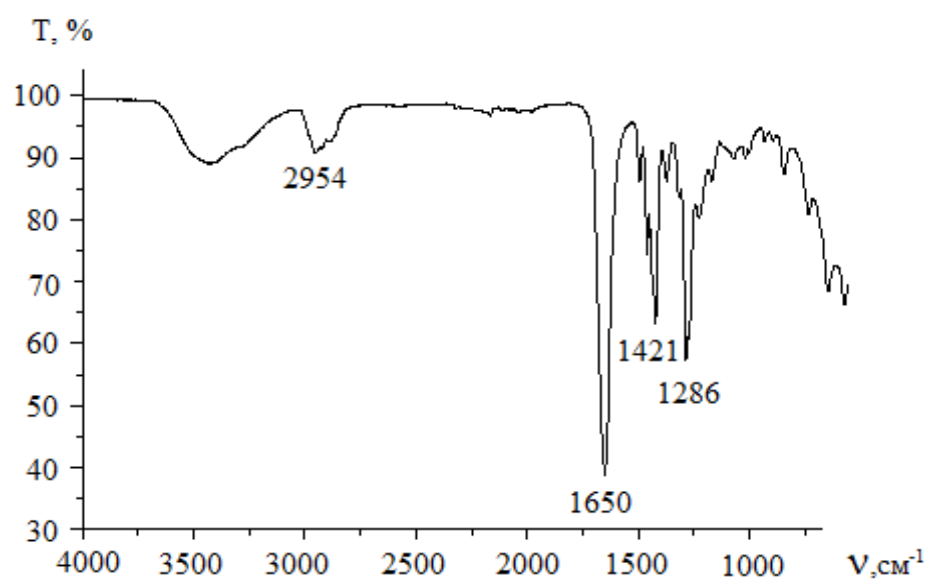


2

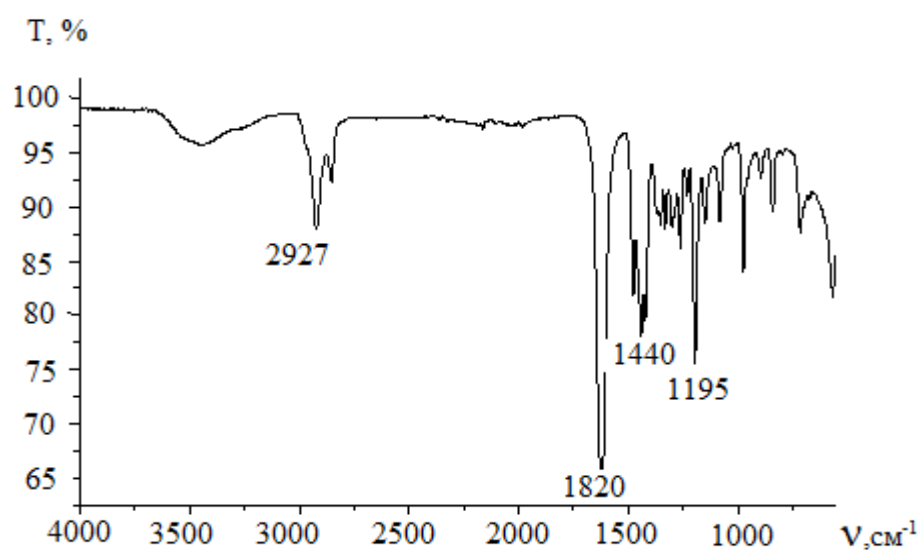


3

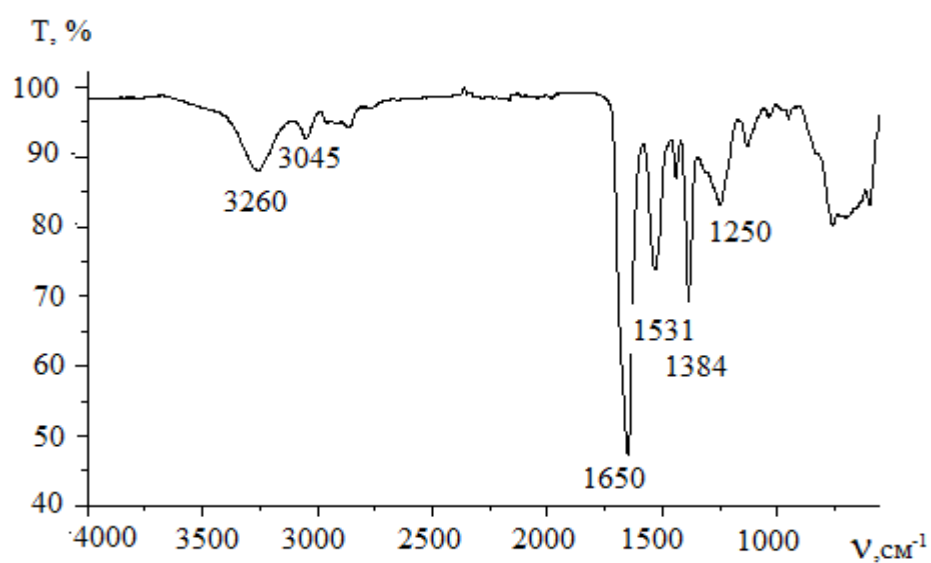
Рисунок 5 – ИК-спектры водных растворов гистидина (1), метионина (2) и пролина (3)



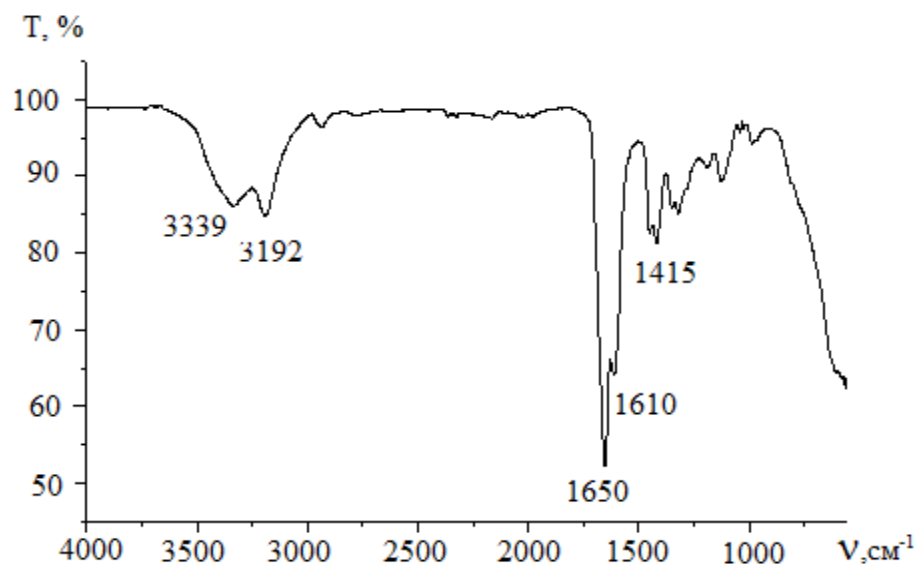
1



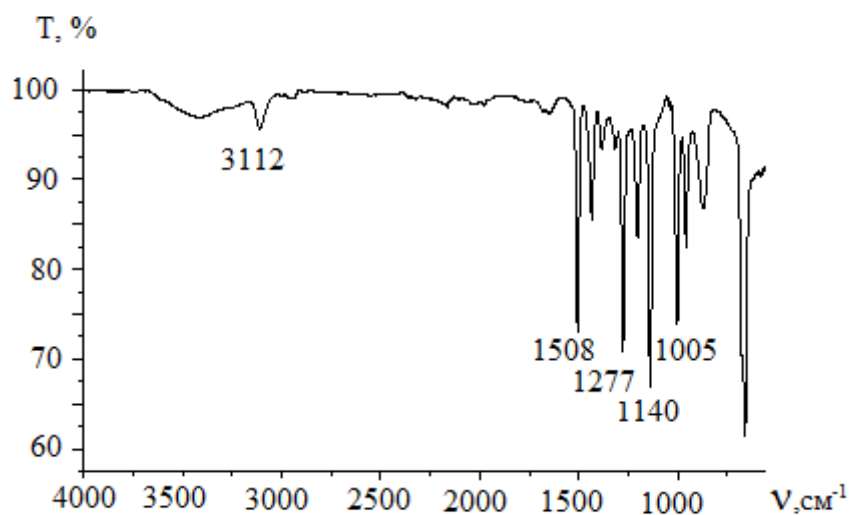
2



3



4



5

Рисунок 6 – ИК-спектры водных растворов ПВП (1), ПВК (2), ПВФ (3), ПАА (4), ПВТ (5)

2.6. Метрологическая обработка результатов эксперимента

Метрологическую обработку результатов проводили в соответствии с [139, 140]. С целью уменьшения и устранения систематических погрешностей экстракцию аминокислот проводили в идентичных условиях. При статистической обработке малого числа измерений ($n = 3$) применяли распределение Стьюдента (t-распределение). Для характеристики рассеяния

результатов в выборочной совокупности применяли стандартное отклонение S_n , характеризующее воспроизводимость результатов.

$$S_n = \sqrt{\frac{\Delta\bar{x}_1^2 + \Delta\bar{x}_2^2 + \dots + \Delta\bar{x}_n^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \Delta\bar{x}_i^2}{n-1}},$$

$$\text{где } \Delta\bar{x}_1 = x_1 - \bar{x}, \Delta\bar{x}_2 = x_2 - \bar{x}$$

Для оценки воспроизводимости и правильности результатов анализа рассчитывали доверительный интервал δ . Численное значение ширины доверительного интервала δ зависит как от числа выполненных измерений n , так и от выбранного значения доверительной вероятности p :

$$\delta_{p,n} = \pm \frac{t_{p,n} \cdot S_n}{\sqrt{n}}$$

Методом «введено – найдено» установлено (табл. 6), что погрешность определения аминокислот в водных растворах не превышает 5 %.

Таблица 6 – Метрологические характеристики определения аминокислот в водных растворах; $n = 3$, $P = 0,95$

Аналит	Введено, мг	Найдено, мг	S_n	$\Delta\bar{x} = \frac{t_{p,f} \cdot S}{\sqrt{n}}$	$\bar{x} \pm \frac{t_{p,f} \cdot S}{\sqrt{n}}$
Гистидин	5,00	4,93	0,04	0,10	4,93±0,10
	50,0	49,7	0,21	0,5	49,7±0,5
Метионин	5,00	4,90	0,16	0,30	4,90±0,30
	50,0	49,9	0,20	0,4	49,9±0,4
Пролин	5,00	4,92	0,16	0,30	4,90±0,30
	50,0	49,7	0,20	0,5	49,7±0,5
Треонин	5,00	4,90	0,16	0,30	4,90±0,30
	50,0	49,6	0,20	0,5	49,6±0,5

ГЛАВА 3 ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖФАЗНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ В СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИМЕРОВ

При анализе сложных матриц, содержащих аминокислоты (фармацевтические препараты, спортивное питание, энергетические напитки и другие объекты), стадия подготовки образца является наиболее трудоемкой и ответственной. Эта стадия должна обеспечить необходимые условия и метрологические характеристики для последующего количественного определения аминокислот. Производство пищевых и кормовых добавок, создание новых лекарственных препаратов, содержащих незаменимые аминокислоты, требуют проведения анализа содержания аминокислот на всех этапах получения такой продукции. Выход и качество конечного продукта зависят не только от строгого соблюдения технологического регламента, но и от применения надежных аналитических способов постадийного контроля и оценки качества сырья и готовой продукции.

Жидкостная экстракция позволяет применять экологически безопасные, не горючие и не токсичные растворители («зеленая экстракция») при пробоподготовке образцов для последующего анализа [132, 134]. Известно, что выбранные в настоящей работе в качестве экстрагентов водорастворимые полимеры N-виниламидного и N-винилазольного классов отвечают требованиям «зеленой химии» и характеризуются высокой комплексообразующей способностью к аминокислотам [141, 142].

Исследование возможности применения водорастворимых азотсодержащих карбоцепных полимеров в качестве экстрагентов аминокислот представляется важной аналитической и биотехнологической задачей, решение которой направлено на разработку новых способов определения аминокислот в объектах со сложной матрицей.

3.1 Анализ межмолекулярных взаимодействий в системе аминокислота – полимер методом ИК-спектроскопии

Комплексообразование полимеров с аминокислотами происходит в результате формирования водородных связей между $>C=O$ группами ПВП, ПВК, ПВФ, ПАА, ПВТ, ПВИ и группами $COOH$, COO^- и $^+NH_3$ аминокислот.

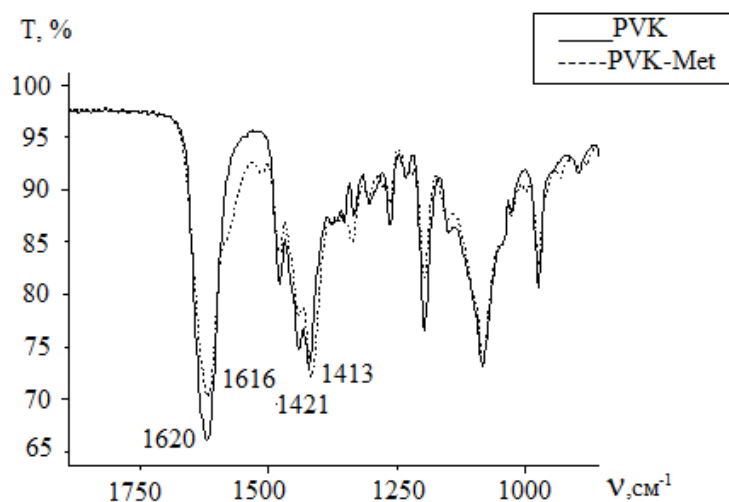
На участие в образовании водородных связей между $>C=O$ группой бокового заместителя полимера с метионином в воде указывают данные ИК-спектроскопии (табл. 7). Как и ожидалось, в ИК спектрах образцов синтезированных полимеров отсутствуют полосы поглощения $\nu_{C=C}$, отвечающие валентным колебаниям $C=C$. Это позволяет заключить, что полимеризация мономеров протекает за счёт раскрытия двойной связи винильной группы [133]. Полосы поглощения связей $C=O$ -групп полимеров с метионином смещаются в случае ПВП, ПВК, ПВФ и ПАА на 12-19 cm^{-1} , а связей $C=N$ -групп циклов ПВИ и ПВТ с аминокислотой на 13 cm^{-1} .

Таблица 7 – Отнесение характеристических полос поглощения в ИК-спектрах водных растворов полимеров до (1) и после (2) взаимодействия с метионином

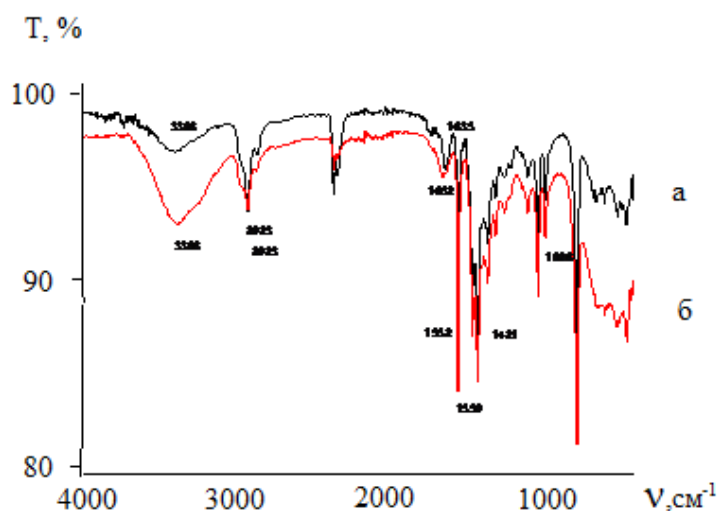
Полосы поглощения связей	Волновое число ν , cm^{-1}	
	1	2
$C=O$ группы ПВП с метионином	1633	1621
$C=O$ группы ПВК с метионином	1627	1610
$C=O$ группы ПВФ с метионином	1643	1624
$C=O$ группы ПАА с метионином	1637	1629
$C=N$ имидазольного цикла ПВИ с метионином	1550	1537
$C=N$ триазольного цикла ПВТ с метионином	1550	1537
COO^- ассиметричные метионина	1590	1555
$^+NH_3$ симметричные метионина	1390	1380
OH -группы воды, связанные с $>C=O$ группами ПВК	3367	3390

Так, например, в системе ПВК-метионин-вода наблюдается смещение полосы валентных колебаний $\nu_{C=O}$ лактамного цикла полимера вблизи 1627 cm^{-1} по сравнению с $\nu_{C=O}$ для системы ПВК-вода, которая проявляется при 1610 cm^{-1} (рис. 7). Считается [141], что комплексообразование с участием атома азота

циклов ПВП и ПВК маловероятно в связи с проявлением стерического фактора со стороны основной цепи.



1



2

Рисунок 7 – ИК-спектры водных растворов ПВК-метионин (1) и ПВТ-метионин (2): а – спектр ПВТ, б – спектр смеси ПВТ-метионин

Об упрочнении связи между $>C=O$ -группой и NH -группами молекулы гистидина свидетельствует снижение частоты $\nu_{C=O}$ ВК с 1618 до 1614 см⁻¹. Валентные колебания ионизированной $-COO^-$ -группы гистидина проявляются в области 1587–1567 см⁻¹, валентные колебания группы $-N^+H_3$ – в области 1330–1230 см⁻¹. Увеличение частоты валентных колебаний OH -групп молекул воды, связанных с $>C=O$ -группой ПВК, с 3367 до 3390 см⁻¹,

свидетельствует об ослаблении водородной связи в полимер-гидратном комплексе.

Для ПВТ и ПВИ происходит смещение полосы колебания $\nu_{C=N}$ азольного цикла с 1550 см^{-1} до 1537 см^{-1} (рис. 7). Для ПВФ и ПАА наблюдается смещение полос поглощения аминогрупп полимеров, что указывает на возможное образование *H*-связей с аминокислотами. Данные о смещении характеристических полос поглощения в ИК-спектрах модельных смесей аминокислот и полимеров приведены в табл. 8.

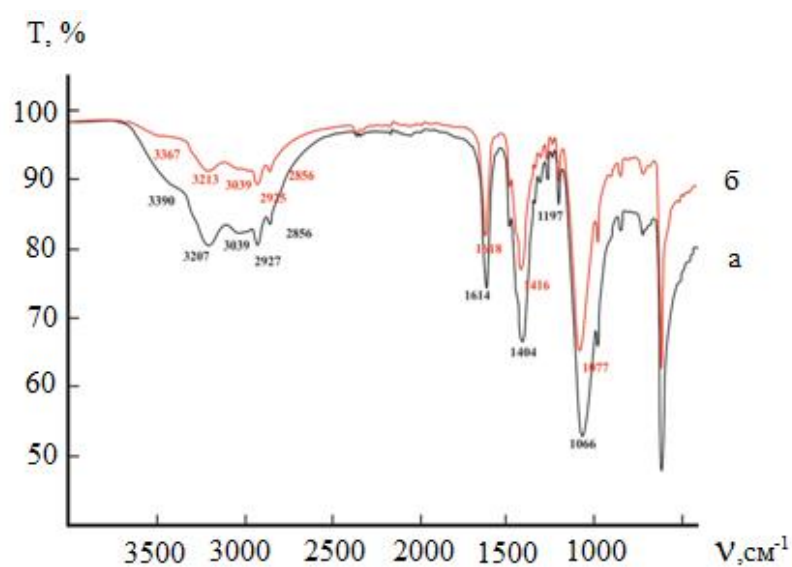
Таблица 8 – Сдвиги характеристических максимумов поглощения

Полимер	Смещение максимумов, см^{-1}		
	<i>His</i>	<i>Met</i>	<i>Pro</i>
ПВП	17	13	11
ПВК	20	17	15
ПВИ	23	19	16
ПВТ	16	14	11
ПВФ	15	13	10
ПАА	13	11	9

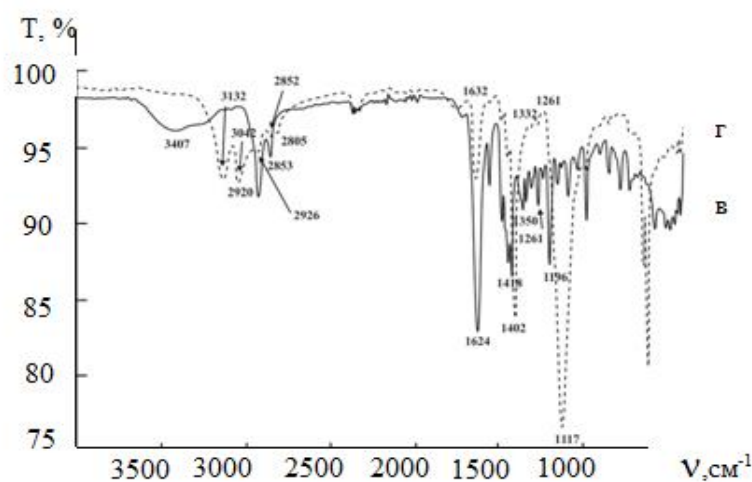
Не исключается также взаимодействие функциональных групп полимера с биполярными ионами, а также с недиссоциированной аминокислотой по схожему механизму. Возможны также и диполь-дипольные, ион-ионные, ион-дипольные взаимодействия, а также гидрофобные взаимодействия метиленовых групп основной цепи полимера и бокового заместителя с соответствующими фрагментами аминокислот.

Для уточнения механизма взаимодействия полимеров с аминокислотами в водные растворы последних осуществлялось введение дополнительного компонента – хлорид-иона, блокирующего $^+NH_3$ -группы аминокислот. В ИК-спектрах таких смесей практически отсутствуют изменения в характеристических полосах поглощения, соответствующих аминогруппам аминокислот. В то же время для систем, содержащих гистидин, пролин и полимеры с циклическими заместителями, сохраняется смещение характеристических полос колебания циклов. Это указывает на наличие взаимодействия между гетероциклами полимеров и аминокислот.

На комплексообразование в системе сополимер – аминокислота также указывают данные ИК-спектроскопии (рис. 8). В ИК-спектрах сополимеров отсутствует характеристическая полоса поглощения при 1640 см^{-1} [141, 142]. Взаимодействие в экстракционных системах осуществляется за счет карбонильных групп ВФ и ВК (смещение полосы поглощения с 1643 до 1625 см^{-1} для ВК и с 1618 до 1610 см^{-1} для ВФ), а также атомов азота имидазольного цикла гистидина (смещение полосы поглощения с 1550 до 1537 см^{-1}).



1



2

Рисунок 8 – ИК-спектры сополимера ВК-ВИ (а,в) с гистидином (б) (1) и пролином (г) (2)

3.2 Квантово-химическое исследование межфазных взаимодействий между полимерами и аминокислотами

Квантово-химические исследования проведены в рамках теории функционала плотности с использованием приближений обобщённого градиента (функционал mPBE) и скалярно-релятивистского приближения [143, 144]. Все атомы описывались с помощью базиса L1 [145]. Расчёты выполнялись с помощью персонального компьютера на базе процессора Intel® Core™ i9 с операционной системой Linux openSUSE Leap 15.5 в программном пакете Priroda 23 [146]. Для визуализации структуры частиц использовалась программа ChemCraft версии 1.8. Соответствие структур точке минимума на поверхности потенциальной энергии проверялось отсутствием мнимых частот колебаний.

Анализ квантово-химического моделирования водородных связей в молекулах аминокислот [147] и расчетов энергетических характеристик, приведенных в табл. 9-12, показал, что для гистидина и пролина энергия по -ОН фрагменту карбоксильной группы выше, чем для связи по аминогруппе. При этом для всех аминокислот энергия связи ПВП-Н₂О-аминокислота значительно выше, чем для фрагментов без участия воды. Соответствующие значения энергии связей свидетельствуют о существовании водородной связи средней силы между группами -COO- и -ОН в аминокислотах. Очевидно, механизмы межфазного взаимодействия аминокислот с другими экстрагентами виниламидного ряда будут аналогичны.

На основании данных ИК-спектроскопии и полученных результатов квантово-химических расчетов можно сделать вывод о структуре образующихся ассоциатов. На рис. 9 и 10 представлены также схемы взаимодействия в системах ПВП (ПВФ) – аминокислота, учитывающие особенности строения аминокислот (рис. 1). Наличие метильных групп в аминокислотах приводит к стерическим затруднениям при образовании водородной связи.

Таблица 9 – Вид оптимизированного репрезентативного фрагмента системы ПВП и гистидина

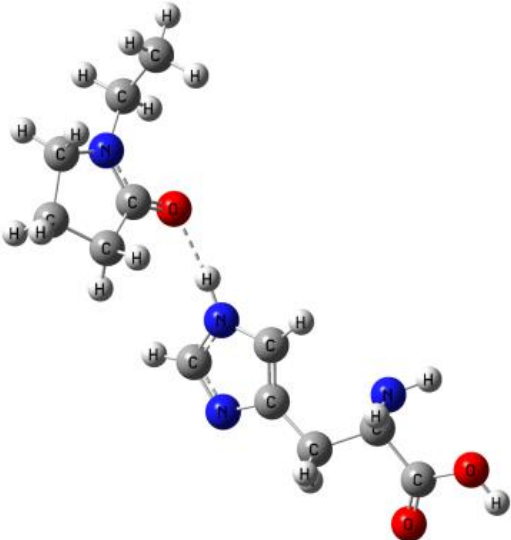
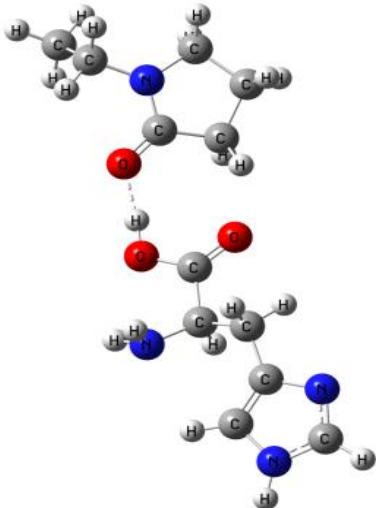
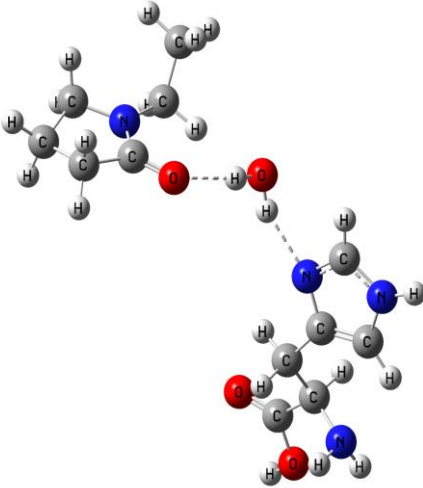
Связь по аминогруппе	Связь по -ОН фрагменту карбоксильной группы	Связь ПВП-Н ₂ О-гистидин
Энергия связи, кДж/моль		
90,20	92,54	137,00
		

Таблица 10 – Вид оптимизированного репрезентативного фрагмента системы ПВП и пролина

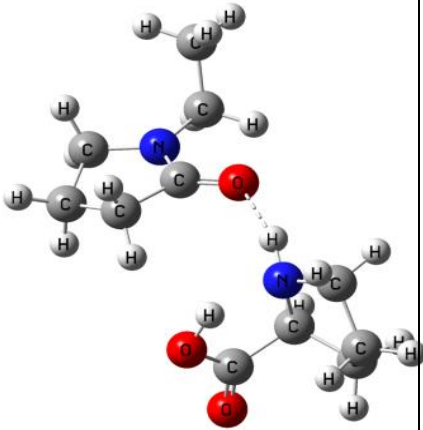
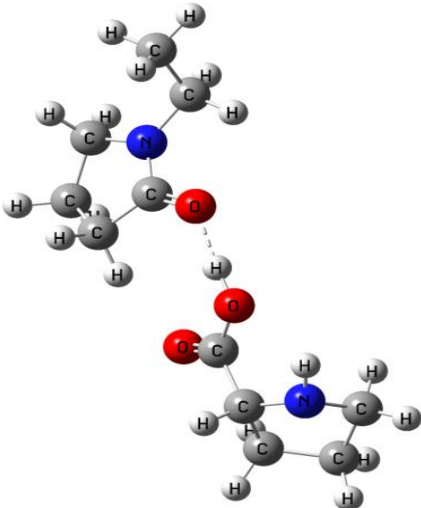
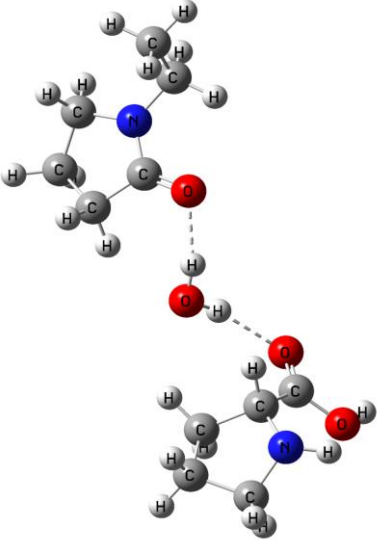
Связь по аминогруппе	Связь по -ОН фрагменту карбоксильной группы	Связь ПВП-Н ₂ О-пролин
Энергия связи, кДж/моль		
65,83	78,37	98,78
		

Таблица 11 – Вид оптимизированного репрезентативного фрагмента системы ПВП и метионина

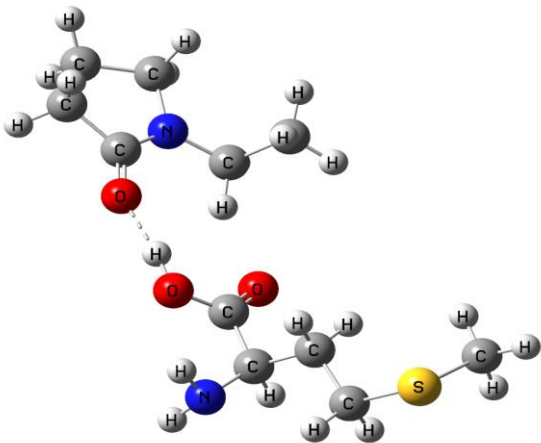
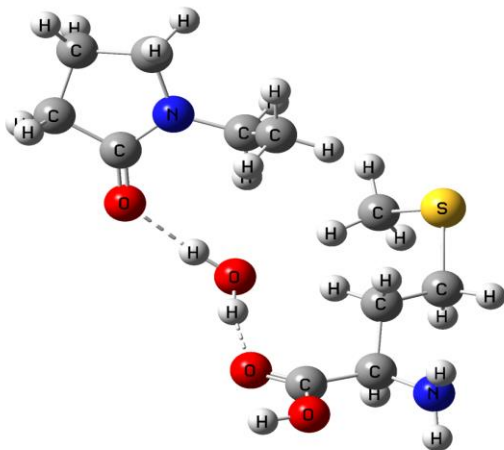
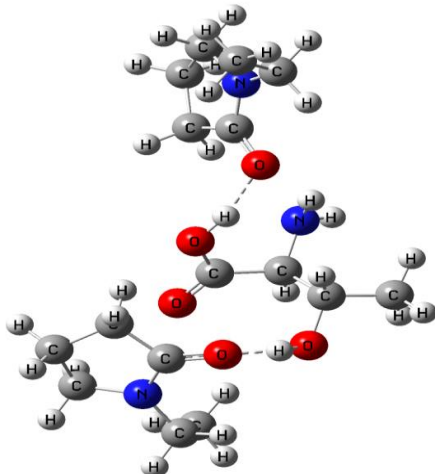
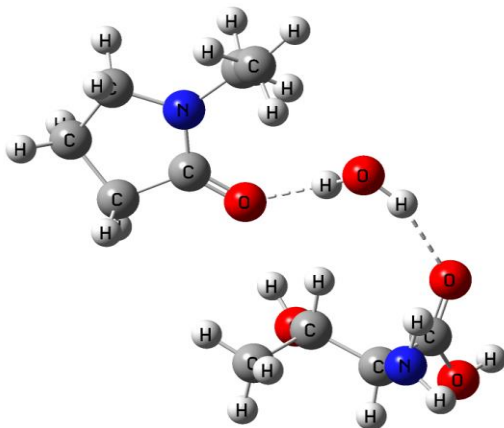
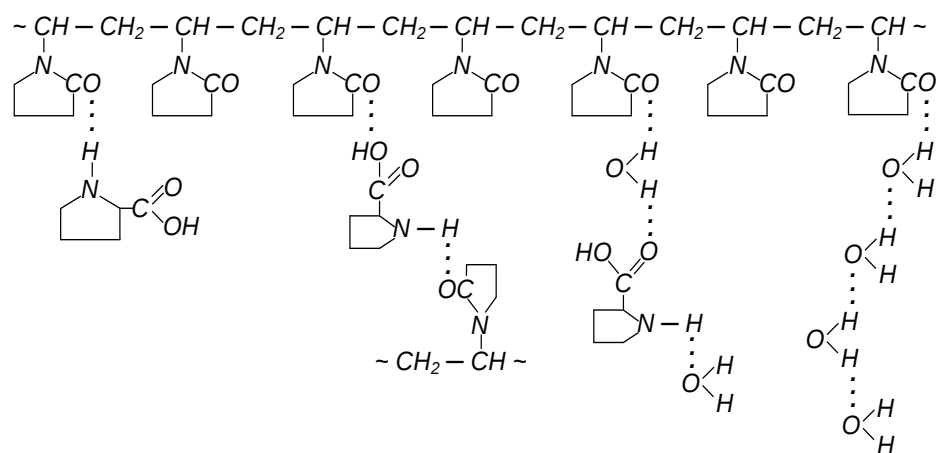
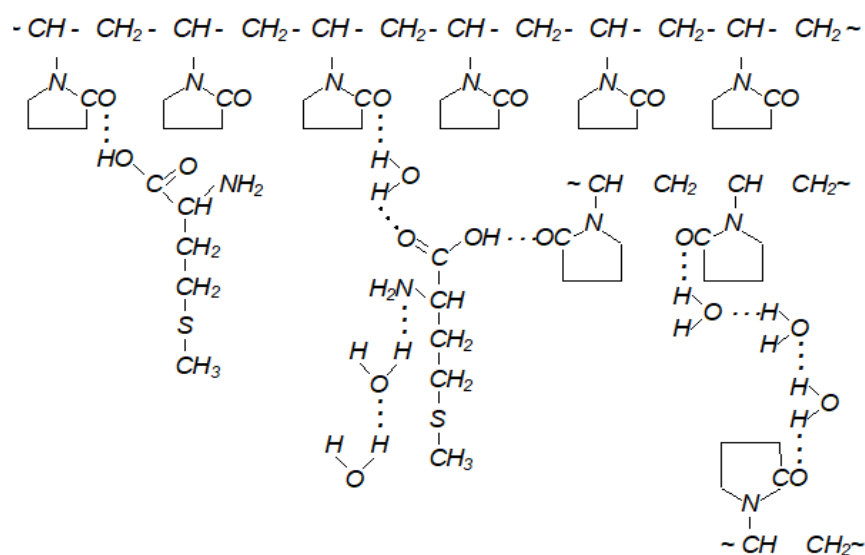
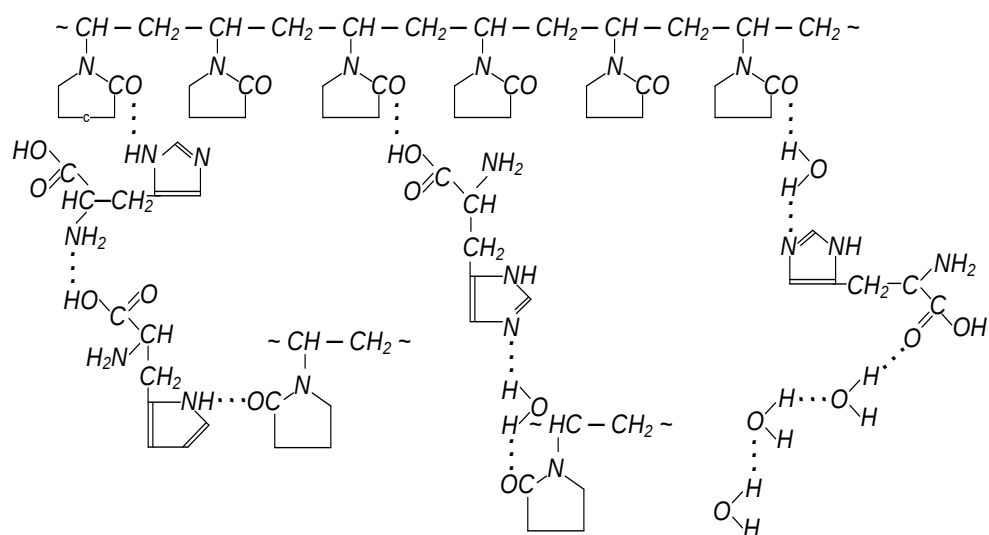
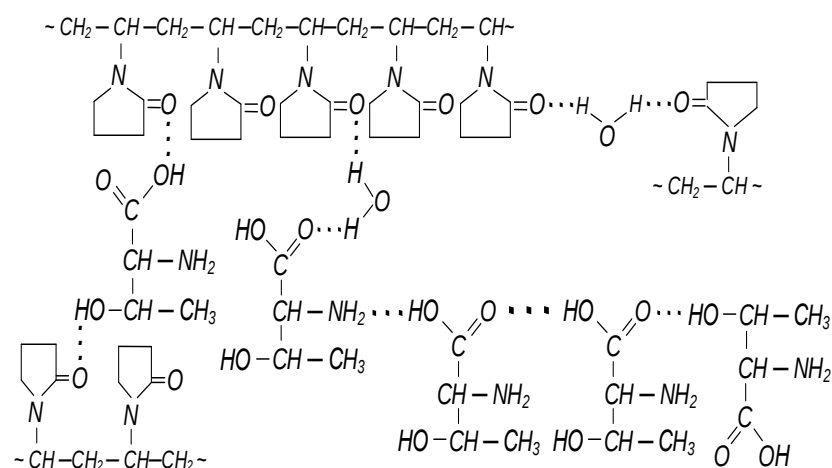
Связь по -ОН фрагменту карбоксильной группы	Связь ПВП-Н ₂ О-метионин
Энергия связи, кДж/моль	
51,70	79,86
	

Таблица 12 – Вид оптимизированного репрезентативного фрагмента системы ПВП и треонина

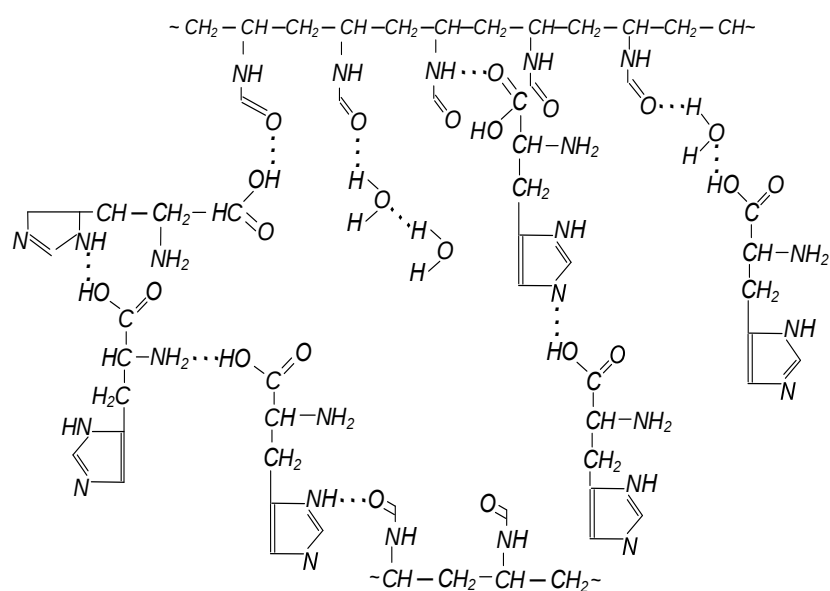
Связь по -ОН фрагменту карбоксильной группы	Связь ПВП-Н ₂ О-треонин
Энергия связи, кДж/моль	
87,97	116,82
	



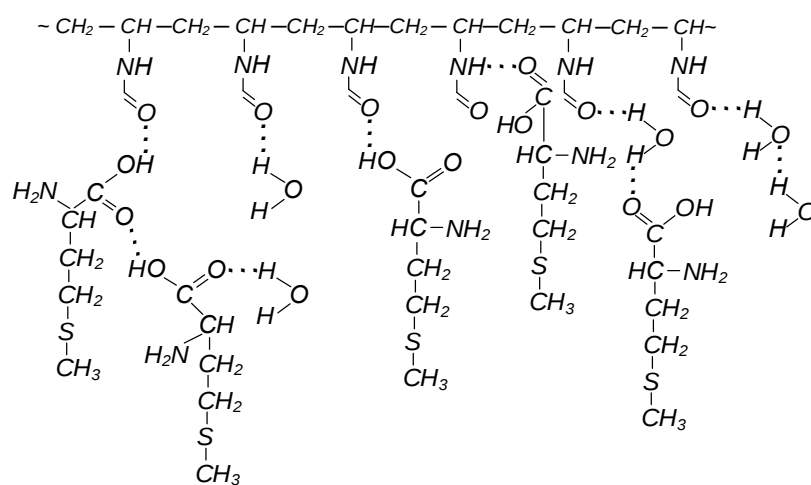


4

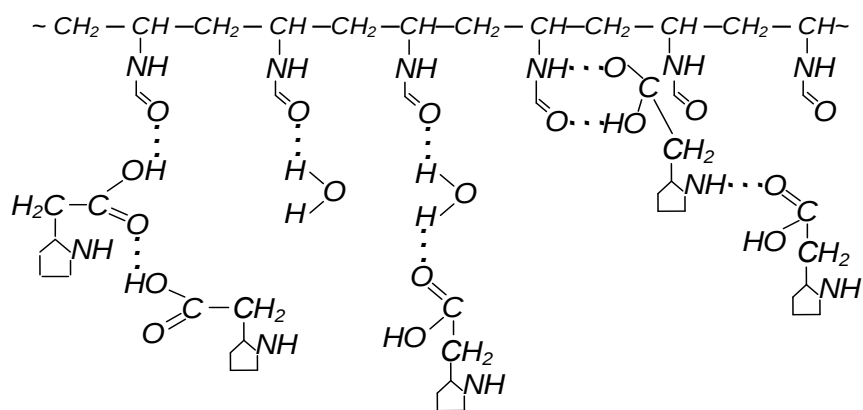
Рисунок 9 – Схемы образования ассоциатов ПВП – аминокислота с участием молекул воды: 1– гистидин; 2 – метионин; 3 – пролин; 4 – треонин



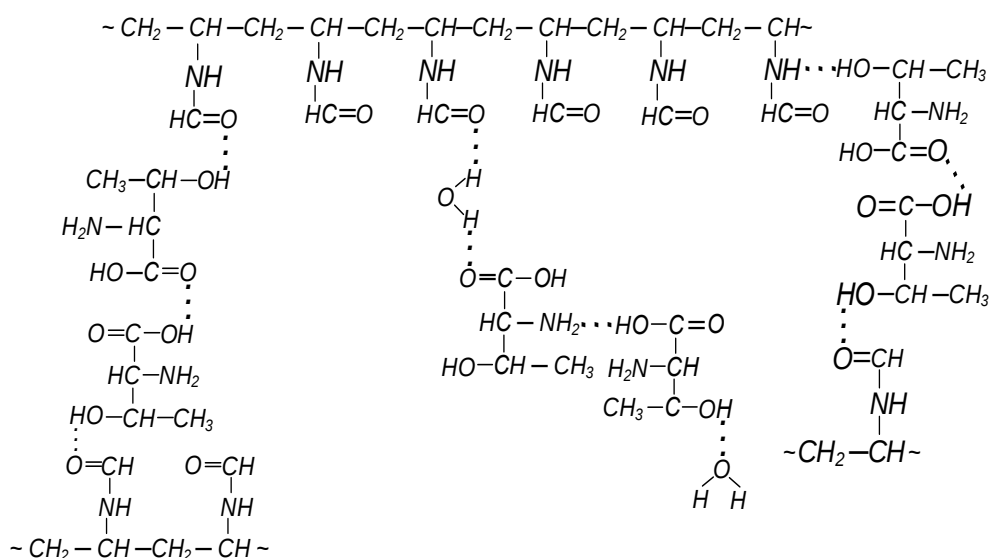
1



2



3



4

Рисунок 10 – Схемы образования ассоциатов ПВФ – аминокислота с участием молекул воды: 1– гистидин; 2 – метионин; 3 – пролин; 4 – треонин

Таким образом, взаимодействие водорастворимых полимеров с аминокислотами, содержащими амфотерные группы, имеет многоцентровой характер, при этом во взаимодействии функциональных групп полимера и биологически активного вещества принимают участие молекулы воды.

3.3 Закономерности экстракции аминокислот гомополимерами

На примере метионина можно показать влияние температуры на количественные характеристики экстракции аминокислот (табл. 13). Установлено [138], что в интервале 10-30 °С при соотношении объемов водно-солевой и органической фаз 10:1 (высаливатель – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) с увеличением температуры незначительно уменьшаются величины R и D , что объясняется разрушением ассоциатов, образующихся между макромолекулами полимера и аминокислоты в процессе экстракции [148]. Аналогичные зависимости характерны и для других аминокислот.

Таблица 13 – Влияние температуры на экстракционные параметры метионина

Полимер	$T, ^\circ\text{C}$	D	$R, \%$
ПВП	10	10,2	53,4
	20	9,5	51,2
	30	8,7	48,9
ПВК	10	61,7	89,1
	20	60,4	87,4
	30	58,4	84,6
ПВФ	10	99,2	96,3
	20	96,0	94,1
	30	94,6	91,9
ПВТ	10	98,4	95,0
	20	95,2	92,1
	30	91,8	90,2
ПАА	10	22,1	51,5
	20	21,3	50,1
	30	20,6	48,7
ПВИ	10	63,2	77,8
	20	59,3	76,1
	30	54,1	74,1

Рассчитаны коэффициенты распределения и степень извлечения аминокислот в системах на основе азотсодержащих карбоцепных полимеров (табл. 14-18). С целью выделения отдельной фазы при экстракции использовалось два различных высаливателя: водный раствор сульфата аммония имеет $pH\ 4,2\pm0,3$, сульфита натрия – $9,7\pm0,3$. Величина pH оказывает существенное влияние на структуру образующихся ассоциатов за счет различных форм существования аминокислоты в растворе (гл. 2, рис. 2): в кислой среде усиливается электростатическое взаимодействие между

разноименными фрагментами полимера и аминокислоты, что повышает эффективность извлечения. Установлено, что использование сульфата аммония в качестве высаливателя приводит к более высоким количественным характеристикам экстракции аминокислот для всех полимеров и соотношений объемов фаз, чем сульфита натрия. Дальнейшее увеличение концентрации раствора полимера приводит к агрегации полимерных клубков, что негативно сказывается на экстрагирующей способности полимеров.

Величина молекулярной массы не влияет на структуры ассоциатов, но оказывает существенное влияние на экстрагирующую способность полимеров. Для всех синтезированных полимеров установлена обратная зависимость эффективности процесса извлечения от величины молекулярной массы: с возрастанием последней величины D и R уменьшаются. Для гистидина максимальная степень извлечения (94,1 %) достигается в системе на основе ПВФ в присутствии сульфата аммония при соотношении $r = 10:4$, а для метионина – в системе на основе ПВИ (93,5 %) при тех же условиях. Незначительная часть молекул воды в процессе экстракции переносится в органическую фазу, поэтому изначальное соотношение водной и органической фаз изменяется и учитывается при расчете количественных характеристик экстракции аминокислот. Отметим низкую эффективность ПАА по отношению ко всем изученным аминокислотам, что может быть связано с особенностями строения этого полимера.

Степень извлечения обратно пропорциональна гидродинамическому радиусу молекул полимера R_h (табл. 14-18), что указывает на взаимодействие аминокислот с активными центрами на поверхности макромолекулярного клубка. Это связано с тем, что большему значению R_h соответствует более развернутая конформация макромолекул, приводящая к увеличению доступности активных центров макромолекул полимера [149].

Таблица 14 – Экстракционные характеристики гистидина при извлечении полимерами (высаливатель – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

r	ПВП				ПВК				ПВИ			
	$M_\eta \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R ,%	$M_\eta \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R ,%	$M_\eta \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R ,%
10:1	10	127	34,2	62,4	12	149	79,3	82,7	14	210	74,1	87,1
	18	145	17,1	39,5	18	168	52,4	75,4	29	254	72,3	85,4
	26	173	11,6	22,9	32	220	39,6	69,3	53	297	66,6	82,2
	70	211	4,3	13,0	50	247	29,8	63,1	76	352	64,0	81,0
10:2	10	127	43,0	71,6	12	149	93,6	91,9	14	210	91,8	93,9
	18	145	19,2	55,7	18	168	73,4	87,4	29	254	86,1	91,5
	26	173	14,7	46,2	32	220	50,6	82,2	53	297	76,5	87,4
	70	211	4,2	23,9	50	247	37,1	79,3	76	352	73,8	85,2
10:4	10	127	91,0	91,1	12	149	105,0	94,1	14	210	107,9	96,3
	18	145	27,4	75,3	18	168	91,7	91,4	29	254	103,1	94,7
	26	173	15,3	63,7	32	220	55,3	86,6	53	297	92,8	91,1
	70	211	10,9	52,4	50	247	41,1	82,7	76	352	86,3	88,2
r	ПВТ				ПВФ				ПАА			
	$M_\eta \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R ,%	$M_\eta \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R ,%	$M_\eta \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R ,%
10:1	17	187	26,2	46,3	25	94	76,3	79,7	20	83	11,6	22,9
	49	206	6,3	20,2	38	107	50,4	69,4	34	97	5,4	17,7
	70	244	4,9	15,0	59	123	33,6	51,3	56	119	4,3	13,0
	120	331	2,1	11,1	108	140	25,8	43,1	82	135	2,1	11,2
10:2	17	187	35,0	68,6	25	94	92,6	90,9	20	83	14,7	46,2
	49	206	7,8	30,7	38	107	71,4	86,4	34	97	7,4	28,6
	70	244	4,5	25,6	59	123	59,6	84,2	56	119	4,2	23,9
	120	331	3,8	17,2	108	140	35,1	78,3	82	135	3,6	15,2
10:4	17	187	95,2	92,1	25	94	96,0	94,1	20	83	21,3	50,1
	49	206	54,4	61,2	38	107	91,7	88,4	34	97	17,4	36,2
	70	244	21,2	53,5	59	123	54,3	84,6	56	119	10,2	22,5
	120	331	17,5	45,8	108	140	39,1	79,7	82	135	6,5	19,8

Таблица 15 – Экстракционные характеристики гистидина при извлечении полимерами (высаливатель – Na₂SO₃)

<i>r</i>	ПВП				ПВК				ПВИ			
	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %
10:1	10	127	18,0	51,1	12	149	30,3	71,3	14	210	65,4	83,2
	18	145	8,1	32,2	18	168	19,4	62,4	29	254	62,6	81,1
	26	173	4,2	20,9	32	220	16,8	56,7	53	297	56,9	78,3
	70	211	1,8	8,2	50	247	10,1	46,6	76	352	55,1	77,9
10:2	10	127	21,3	62,6	12	149	36,6	81,8	14	210	76,4	86,8
	18	145	11,4	50,5	18	168	28,8	76,3	29	254	74,6	85,4
	26	173	7,6	30,4	32	220	18,1	69,4	53	297	68,5	81,5
	70	211	2,2	17,8	50	247	13,0	60,9	76	352	64,2	78,0
10:4	10	127	39,0	85,1	12	149	57,0	89,0	14	210	91,0	89,6
	18	145	13,3	67,3	18	168	43,2	85,1	29	254	86,4	88,5
	26	173	8,5	56,4	32	220	27,7	79,5	53	297	78,2	84,1
	70	211	3,7	33,8	50	247	18,6	72,1	76	352	76,3	83,6
<i>r</i>	ПВТ				ПВФ				ПАА			
	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %
10:1	17	187	20,0	37,1	25	94	28,3	69,3	20	83	4,2	20,9
	49	206	2,6	13,4	38	107	18,4	59,4	34	97	2,4	11,5
	70	244	1,9	10,1	59	123	14,8	50,7	56	119	1,9	10,1
	120	331	1,1	6,2	108	140	9,1	44,6	82	135	1,1	6,2
10:2	17	187	23,3	56,6	25	94	33,6	81,8	20	83	7,6	30,4
	49	206	3,1	28,4	38	107	26,8	76,3	34	97	2,7	29,3
	70	244	2,5	19,5	59	123	16,1	69,4	56	119	2,2	17,8
	120	331	2,1	11,2	108	140	12,0	60,9	82	135	1,6	10,4
10:4	17	187	42,0	83,2	25	94	54,0	85,0	20	83	19,0	48,1
	49	206	11,9	42,6	38	107	40,2	79,1	34	97	16,9	30,6
	70	244	4,9	36,9	59	123	25,7	76,5	56	119	10,7	25,9
	120	331	3,1	30,9	108	140	15,6	65,1	82	135	4,5	17,9

Таблица 16 – Экстракционные характеристики пролина при извлечении полимерами (высаливатель – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

r	ПВП				ПВК				ПВИ			
	$M_n \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %	$M_n \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %	$M_n \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %
10:1	10	127	41,6	58,2	12	149	50,2	73,4	14	210	63,1	80,2
	52	196	33,9	51,4	32	220	41,0	64,2	41	263	61,8	75,6
	94	253	19,3	42,8	50	247	24,1	57,8	76	352	55,6	72,4
10:2	10	127	32,1	67,6	12	149	49,1	81,3	14	210	75,1	86,3
	52	196	23,7	61,4	32	220	33,1	76,9	41	263	68,2	81,5
	94	253	18,5	53,5	50	247	28,4	72,4	76	352	64,3	78,3
10:4	10	127	29,2	78,0	12	149	43,7	84,1	14	210	92,3	91,2
	52	196	21,1	73,1	32	220	28,9	80,7	41	263	88,5	87,5
	94	253	18,4	67,2	50	247	23,3	75,3	76	352	86,4	82,2
r	ПВТ				ПВФ				ПАА			
	$M_n \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %	$M_n \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %	$M_n \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %
10:1	17	187	46,2	61,6	25	94	42,3	68,3	20	83	17,2	31,4
	49	206	37,4	56,8	59	123	35,4	60,1	56	119	13,6	19,6
	120	331	22,0	47,3	108	140	20,6	52,4	82	135	10,4	8,5
10:2	17	187	45,7	71,3	25	94	37,8	78,4	20	83	14,5	36,2
	49	206	30,1	66,1	59	123	26,4	72,5	56	119	11,1	21,8
	120	331	25,6	60,4	108	140	21,6	67,0	82	135	9,7	10,3
10:4	17	187	40,4	79,9	25	94	34,2	83,0	20	83	12,9	43,1
	49	206	27,2	75,2	59	123	23,1	79,6	56	119	7,5	28,5
	120	331	21,9	69,1	108	140	19,7	72,4	82	135	5,7	12,9

Таблица 17 – Экстракционные характеристики метионина при извлечении полимерами (высаливатель – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

r	ПВП				ПВК				ПВИ			
	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %
10:1	10	127	13,4	33,5	12	149	52,1	75,1	14	210	62,1	79,2
	18	145	10,0	27,4	18	168	40,0	70,1	29	254	59,3	76,1
	26	173	7,2	21,3	32	220	29,3	63,2	53	297	48,1	65,4
	70	211	2,0	7,0	50	247	23,8	57,3	76	352	40,0	61,5
10:2	10	127	10,2	42,0	12	149	58,7	84,5	14	210	76,4	87,0
	18	145	6,9	33,1	18	168	44,4	80,7	29	254	72,9	85,3
	26	173	5,0	26,1	32	220	33,6	75,9	53	297	65,4	79,6
	70	211	1,9	11,7	50	247	27,2	71,1	76	352	60,6	75,7
10:4	10	127	9,5	51,2	12	149	60,4	87,4	14	210	98,2	93,5
	18	145	7,4	45,2	18	168	47,5	84,6	29	254	91,5	91,8
	26	173	5,6	38,4	32	220	36,3	80,1	53	297	80,4	85,0
	70	211	1,5	14,4	50	247	29,5	76,3	76	352	77,6	81,2
r	ПВТ				ПВФ				ПАА			
	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	R_h , нм	D	R , %
10:1	17	187	34,1	57,2	25	94	43,6	68,4	20	83	9,8	20,6
	49	206	16,2	42,3	38	107	31,1	61,8	34	97	6,4	11,5
	70	244	14,0	33,8	59	123	21,7	53,6	56	119	2,2	7,5
	120	331	12,6	28,5	108	140	17,2	41,8	82	135	1,1	4,6
10:2	17	187	36,8	69,9	25	94	49,3	78,1	20	83	7,5	31,5
	49	206	19,2	53,4	38	107	39,4	72,2	34	97	4,8	21,2
	70	244	17,1	47,4	59	123	25,1	66,7	56	119	1,8	10,2
	120	331	14,3	41,6	108	140	20,9	58,9	82	135	0,9	6,1
10:4	17	187	41,4	73,7	25	94	53,2	81,3	20	83	6,8	42,9
	49	206	23,2	57,2	38	107	40,2	75,8	34	97	3,3	28,6
	70	244	20,1	48,6	59	123	29,3	72,5	56	119	1,6	14,6
	120	331	17,0	40,0	108	140	22,2	67,9	82	135	0,6	7,5

Таблица 18 – Экстракционные характеристики метионина при извлечении полимерами (высаливатель – Na_2SO_3)

r	ПВП			ПВК			ПВИ		
	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	D	$R, \%$	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	D	$R, \%$	$M_{\eta} \cdot 10^{-3}$	D	$R, \%$
10:1	10	6,1	26,1	12	20,2	62,0	14	51,1	71,2
	18	4,7	21,4	18	17,1	58,1	29	46,5	67,3
	26	4,6	17,2	32	13,2	51,6	53	37,5	58,8
	70	0,9	5,0	50	10,5	43,1	76	31,4	55,4
10:2	10	5,7	34,2	12	21,6	71,3	14	64,8	78,0
	18	4,4	28,6	18	18,7	68,4	29	59,8	74,6
	26	2,8	20,1	32	14,9	63,5	53	37,5	58,8
	70	1,1	9,0	50	12,3	58,7	76	31,4	55,4
10:4	10	5,0	42,4	12	22,7	76,8	14	81,3	86,4
	18	4,1	37,4	18	19,1	73,6	29	75,0	79,7
	26	3,0	30,3	32	16,1	69,3	53	64,7	72,2
	70	0,9	11,3	50	13,3	64,6	76	58,9	69,6

Однако, следует отметить, что при однократной экстракции не достигается количественное извлечение аминокислот. Например, извлекается не более 91 % пролина и 93 % метионина, что недостаточно для решения аналитических и биотехнологических задач. Расчет количества необходимых экстракций для практически полного извлечения аминокислот двумя способами можно продемонстрировать на примере пролина [136].

Например, используя лучшие результаты экстракции пролина раствором ПВП ($r = 10:4$; $D = 29,2$; $R_1 = 78 \%$), рассчитаем, какова будет степень извлечения пролина при повторной экстракции:

$$R_2 = (100 - 78) \cdot 78 / 100; R_2 = 17,2 \%$$

Суммируя извлечение пролина в результате двух экстракций, получаем, что при двукратной экстракции можно извлечь 95,2 % пролина.

Необходимую кратность экстракции при заданных условиях с целью достижения требуемой степени экстракции можно рассчитать и по формулам:

$$R = 100 \cdot [1 - (V_B / (D \cdot V_O + V_B))^n]$$

$$n = [\lg (1 - (R/100))] / [\lg (V_B / (D \cdot V_O + V_B))]$$

где n - кратность экстракции, $R = 99$, $V_B = 10 \text{ см}^3$; $V_O = 4 \text{ см}^3$; $D = 29,2$.

Для достижения 99 %-го извлечения пролина также потребуется провести двукратную экстракцию.

Отметим, что экстракция треонина растворителями разных классов является наименее изученной по сравнению с другими аминокислотами. В табл. 19 приведены установленные в идентичных условиях коэффициенты распределения и степень извлечения треонина раствором ПВП при разных концентрациях аминокислоты, молекулярной массе полимера и соотношении объемов водной и органической фаз. Полученные результаты свидетельствуют о принципиальной возможности извлечения треонина растворами полимеров, но экстракция ПВП эффективна только при соотношении фаз 10:3.

Таблица 19 – Экстракционные характеристики треонина при извлечении ПВП

г	$M_n, 10^3$	$R_n, \text{нм}$	$C_{\text{Тре}}, \text{мг/см}^3$					
			1.0		2.0		3.0	
			D	$R, \%$	D	$R, \%$	D	$R, \%$
10:1	94	253	15	46,4	21	54,8	24	58,1
	70	211	17	49,5	23	57,1	25	59,1
	52	196	19	52,3	26	60,0	29	62,6
	26	173	21	54,8	30	63,4	33	65,6
	18	145	24	58,1	34	66,3	36	67,5
	10	127	27	60,9	36	67,5	41	70,3
10:2	94	253	30	84,2	32	85,1	35	86,2
	70	211	32	85,1	35	86,2	36	86,5
	52	196	35	86,2	37	86,8	40	87,7
	26	173	37	86,8	40	87,7	44	88,7
	18	145	40	87,7	43	88,5	48	89,5
	10	127	44	88,7	47	87,6	51	90,1
10:3	94	253	30	89,5	35	91,0	44	92,6
	70	211	32	90,1	37	91,4	50	93,5
	52	196	33	90,4	40	92,0	56	94,1
	26	173	35	91,0	45	92,8	62	94,6
	18	145	38	91,6	48	93,2	68	95,1
	10	127	42	92,3	50	93,5	77	95,6

На примере экстракции треонина водорастворимыми полимерами можно показать, как влияют на межфазное распределение аналитов концентрации аминокислот и полимеров. В табл. 20 приведены коэффициенты распределения и степень извлечения треонина при его

экстракции ПВФ [150]. Концентрация ПВФ составляла 0,15 и 0,2 г/см³; концентрация треонина варьировалась от 1,0 до 3,0 мг/см³. Для всех систем рассчитаны экстракционные характеристики при разных концентрациях аминокислоты и соотношениях водно-солевой и органической фаз. При $r = 10:3$ и концентрации треонина 3,0 мг/см³ получены максимальные степени извлечения треонина, однако следует отметить, что разница в величинах R в системах с $r = 10:2$ и $r = 10:3$ незначительная [150].

Таблица 20 – Экстракционные характеристики треонина при извлечении ПВФ

Концентрация треонина, мг/см ³	Концентрация полимера 0,15 г/см ³		Концентрация полимера 0,2 г/см ³	
	D	R, %	D	R, %
$r = 10:1$				
1,0	84	89,4	86	89,6
2,0	86	89,6	74	88,1
2,5	97	90,7	126	92,6
3,0	99	90,8	132	92,9
$r = 10:2$				
1,0	121	96,0	109	95,6
2,0	128	96,2	128	96,2
2,5	134	96,4	132	96,4
3,0	130	96,3	125	96,2
$r = 10:3$				
1,0	98	97,0	94	96,9
2,0	112	97,4	89	96,7
2,5	110	97,3	110	97,3
3,0	124	97,6	101	97,1

При соотношении фаз 10:1 количественное извлечение треонина достигается в результате двукратной экстракции. Отметим, что в ранее изученной системе на основе *N*-винилкапролактама степень извлечения треонина составляет 97 % при соотношении фаз 10:4 [134]. В системах на основе *N*-винилформамида также можно достигнуть практически полного извлечения треонина (97 % и выше) при такой же концентрации аминокислоты в растворе, но при соотношении фаз 10:3, что позволяет уменьшить расход экстрагента. Гомо- и сополимеры *N*-винилформамида показали практически одинаковую высокую экстрагирующую способность

по отношению к треонину, которая значительно превышает эффективность экстракции аминокислот, например, поли-*N*-винилпирролидоном (табл. 19).

Дальнейшее повышение концентрации треонина не приводит к увеличению степени его извлечения, что может быть связано с ограниченной способностью треонина образовывать межмолекулярные связи с экстрагентами. Треонин относится к аминокислотам с недиссоциирующими полярными, но не заряженными боковыми радикалами, которые способны образовывать между собой водородные связи [147]. На рис. 9,10 раздела 3.2. представлены схемы взаимодействия в системах полимер – треонин, учитывающие особенности строения аминокислоты. Наличие метильной группы в треонине приводит к стерическим затруднениям при образовании водородной связи. Анализ квантово-химического расчета в молекулах треонина, приведенных в работе [147], показал, что энергия стабилизации водородной связи $O...H-O$ в треонине составляет 13,65 ккал/моль, а величина переноса заряда 0,032. Эти данные свидетельствуют о существовании *H*-связи средней силы между группами $-COO-$ и $-OH$ в треонине. Очевидно, механизмы межфазного взаимодействия треонина с другими экстрагентами будут аналогичным.

На примере экстракции метионина показана возможность осуществления бессолевой экстракции аминокислот [138] (табл. 21). Для осуществления экстракции водный раствор смеси ПВК-*Met* нагревается до температуры фазового разделения ($T_{фр}$). Предварительно установлено, что проведение такого вида экстракции возможно только с ПВК, другие синтезированные полимеры оказались не способны извлекать метионин без высаливателя. Рассчитанные количественные характеристики экстракции метионина указывают на меньшую эффективность бессолевой экстракции аминокислоты из водного раствора по сравнению с извлечением из систем, содержащих сульфат аммония в качестве высаливателя (табл. 17). Видимо, это объясняется рядом факторов: *pH* среды (при бессолевой экстракции pH $5,9 \pm 0,3$), конформационные изменения структуры макромолекул полимера,

разрушение ассоциатов полимер-аминокислота при повышении температуры (происходит сжатие клубков ПВК и уменьшение их объема) [138].

Таблица 21 – Экстракционные характеристики метионина при бессолевой экстракции поли-*N*-винилкапролактамом

$M_n \cdot 10^{-3}$	r	$T_{фр}, ^\circ C$	D	R, %
12	10:1	38	40,8	70,4
18		37	31,2	67,2
32		36	25,7	59,8
50		36	18,6	53,1
12	10:2	37	45,1	80,3
18		36	33,0	75,2
32		36	26,2	70,7
50		35	16,7	65,1
12	10:4	35	57,2	83,1
18		35	45,4	81,0
32		33	30,3	76,9
50		32	28,1	72,2

На рис. 11-19 приведены билогарифмические зависимости коэффициентов распределения гистидина и метионина от молекулярных масс полимеров в присутствии двух высаливателей и разном соотношении объемов фаз. Линейный характер полученных зависимостей позволяет прогнозировать экстракционные характеристики аминокислот. Например, при экстракции гистидина ПВП с молекулярной массой $17 \cdot 10^3$ в присутствии $(NH_4)_2SO_4$ коэффициент распределения этой аминокислоты составляет 40,2. Аналогичные зависимости можно представить для пролина и треонина. Для прогнозирования коэффициентов распределения аминокислот можно также воспользоваться уравнениями линейной аппроксимации, как это представлено в табл. 22 для гистидина.

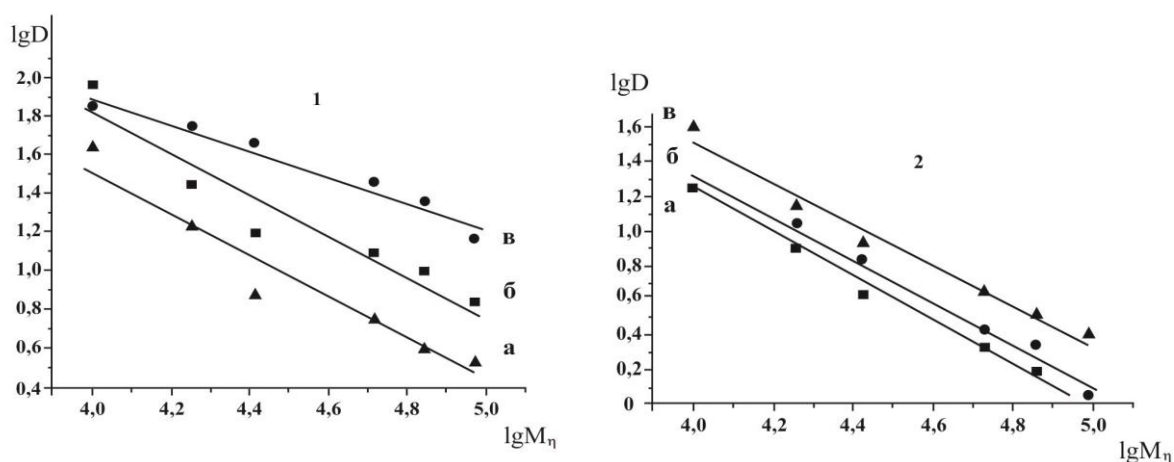


Рисунок 11 – Билогарифмические зависимости коэффициентов распределения гистидина от молекулярной массы ПВП в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1) и Na_2SO_3 (2); соотношение фаз: 10:1 (а); 5:1 (б); 5:2 (в)

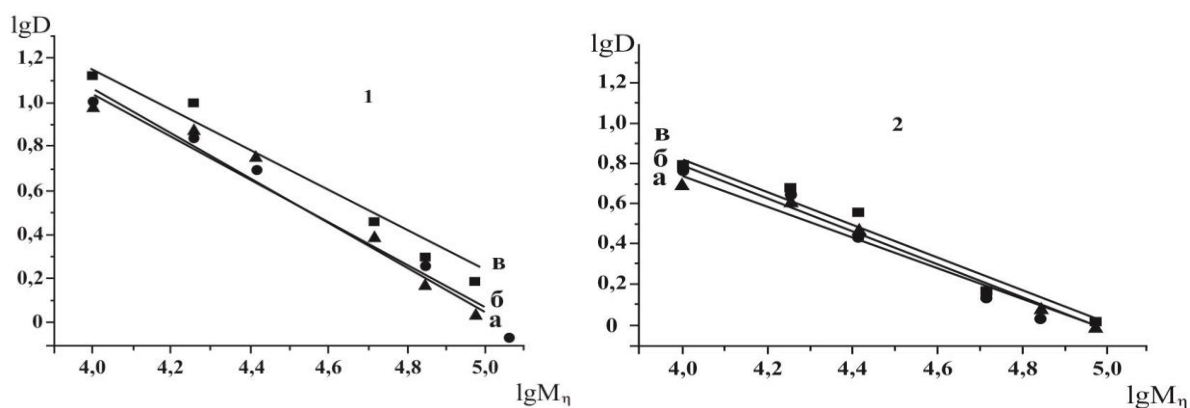


Рисунок 12 – Билогарифмические зависимости коэффициентов распределения метионина от молекулярной массы ПВП в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1) и Na_2SO_3 (2); соотношение фаз: 10:1 (а); 5:1 (б); 5:2 (в)

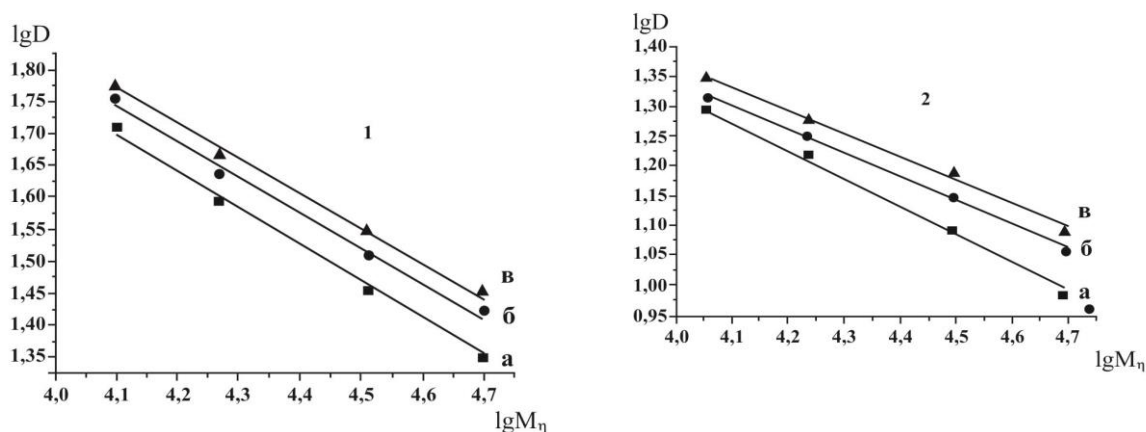


Рисунок 13 – Билогарифмические зависимости коэффициентов распределения гистидина от молекулярной массы ПВК в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1) и Na_2SO_3 (2); соотношение фаз: 10:1 (а); 5:1 (б); 5:2 (в)

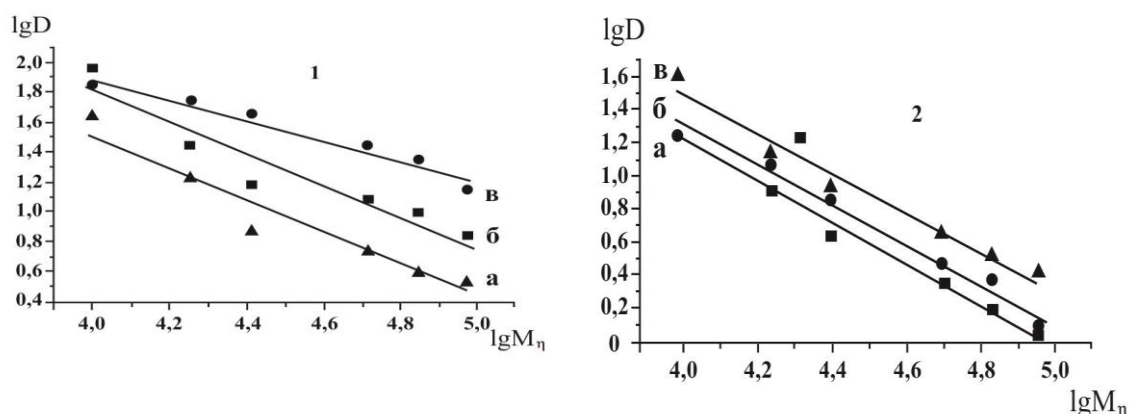


Рисунок 14 – Билогарифмические зависимости коэффициентов распределения метионина от молекулярной массы ПВК в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1) и Na_2SO_3 (2); соотношение фаз: 10:1 (а); 5:1 (б); 5:2 (в)

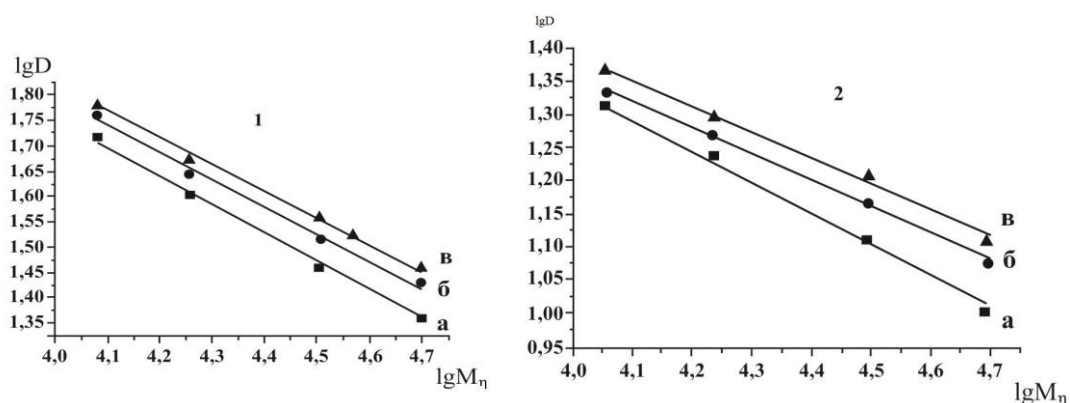


Рисунок 15 – Билогарифмические зависимости коэффициентов распределения гистидина от молекулярной массы ПВИ в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1) и Na_2SO_3 (2); соотношение фаз: 10:1 (а); 5:1 (б); 5:2 (в)

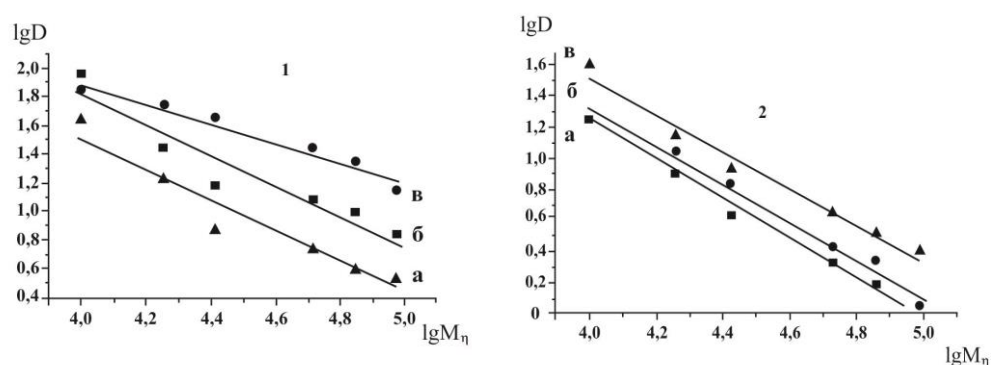


Рисунок 16 – Билогарифмические зависимости коэффициентов распределения метионина от молекулярной массы ПВИ в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1) и Na_2SO_3 (2); соотношение фаз: 10:1 (а); 5:1 (б); 5:2 (в)

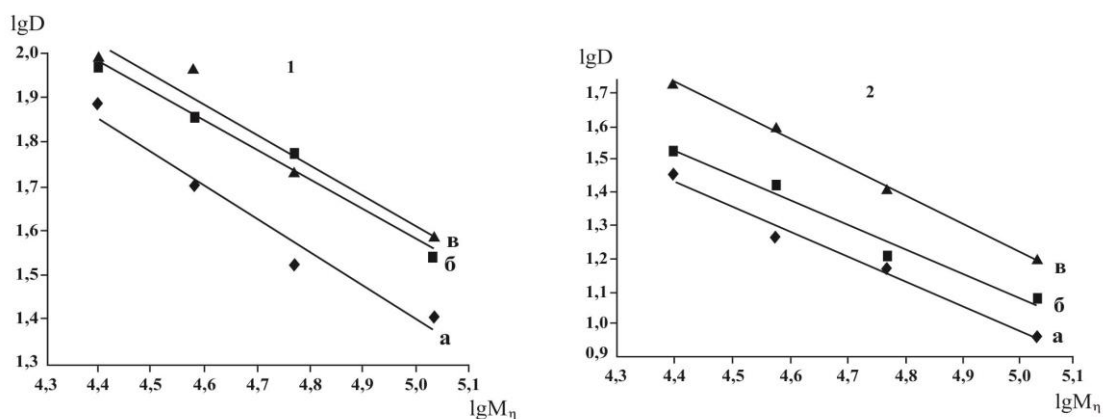


Рисунок 17 – Билогарифмические зависимости коэффициентов распределения гистидина от молекулярной массы ПВФ в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1) и Na_2SO_3 (2); соотношение фаз: 10:1 (а); 10:2 (б); 10:4 (в)

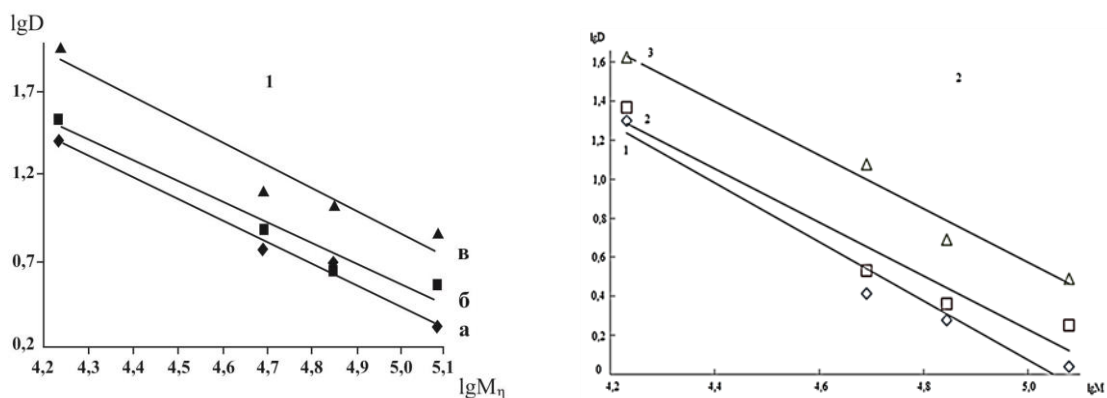


Рисунок 18 – Билогарифмические зависимости коэффициентов распределения гистидина от молекулярной массы ПБТ в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1) и Na_2SO_3 (2); соотношение фаз: 10:1 (а); 10:2 (б); 10:4 (в)

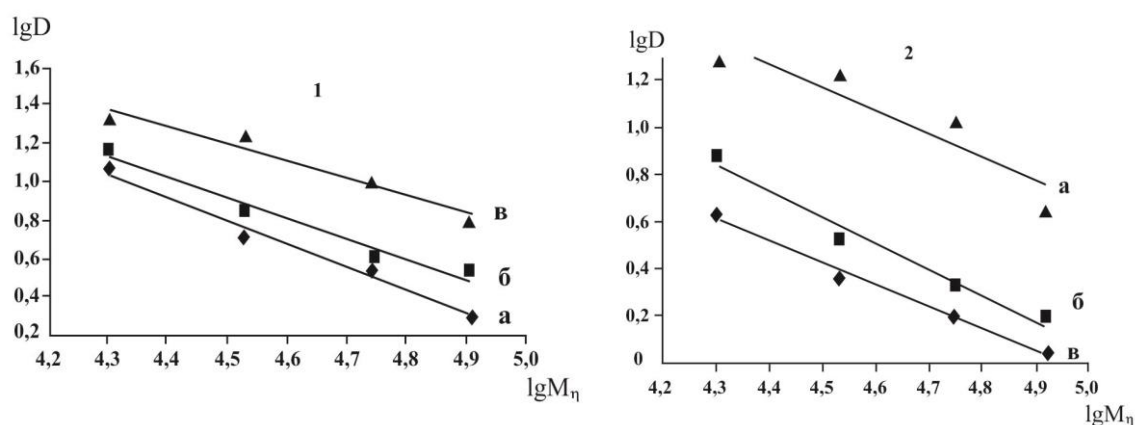


Рисунок 19 – Билогарифмические зависимости коэффициентов распределения гистидина от молекулярной массы ПАА в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1) и Na_2SO_3 (2); соотношение фаз: 10:1 (а); 10:2 (б); 10:4 (в)

Таблица 22 – Билогарифмические зависимости коэффициентов распределения гистидина от молекулярной массы ПВФ, ПВТ и ПАА

Полимер	Высаливатель	r	Уравнение линейной аппроксимации
ПВФ	(NH ₄) ₂ SO ₄	10:1	$\lg D = -1,2672 \lg M_{\eta} + 6,7700$
		10:2	$\lg D = -1,1961 \lg M_{\eta} + 6,5520$
		10:4	$\lg D = -1,3317 \lg M_{\eta} + 7,5314$
ПВФ	Na ₂ SO ₃	10:1	$\lg D = -1,5113 \lg M_{\eta} + 7,6290$
		10:2	$\lg D = -1,3727 \lg M_{\eta} + 7,0941$
		10:4	$\lg D = -1,3766 \lg M_{\eta} + 7,4557$
ПВТ	(NH ₄) ₂ SO ₄	10:1	$\lg D = -1,2672 \lg M_{\eta} + 6,7010$
		10:2	$\lg D = -1,1961 \lg M_{\eta} + 6,5520$
		10:4	$\lg D = -1,3317 \lg M_{\eta} + 7,5314$
ПВТ	Na ₂ SO ₃	10:1	$\lg D = -1,5113 \lg M_{\eta} + 7,6290$
		10:2	$\lg D = -1,3727 \lg M_{\eta} + 7,0941$
		10:4	$\lg D = -1,3766 \lg M_{\eta} + 7,4557$
ПАА	(NH ₄) ₂ SO ₄	10:1	$\lg D = -1,1665 \lg M_{\eta} + 6,0631$
		10:2	$\lg D = -1,0251 \lg M_{\eta} + 5,5436$
		10:4	$\lg D = -0,8541 \lg M_{\eta} + 5,0468$
ПАА	Na ₂ SO ₃	10:1	$\lg D = -0,9793 \lg M_{\eta} + 5,5754$
		10:2	$\lg D = -1,0886 \lg M_{\eta} + 5,5258$
		10:4	$\lg D = -0,9793 \lg M_{\eta} + 5,5754$

Из полученных данных установлено, что экстрагирующая способность полимеров возрастает в ряду ПАА→ПВП→ПВТ→ПВФ→ПВК→ПВИ для всех исследованных аминокислот. В этом ряду возрастает комплексообразующая способность полимеров, связанная с особенностями их строения и доступностью активных центров. Степень извлечения аналитов обратно пропорциональна гидродинамическому радиусу молекул полимера, что указывает на взаимодействие аминокислот с активными центрами на поверхности макромолекулярного клубка.

3.4 Экстракция аминокислот сополимерами

В качестве сомономеров были выбраны ВК, ВФ и ВИ, так как полимеры на их основе показали наибольшие экстракционные характеристики по отношению к аминокислотам (п. 3.3). Предварительно изучено влияние температуры, соотношения фаз и природы высаливателя на количественные характеристики экстракции аминокислот (табл. 23,24). Установлено, что с увеличением температуры наблюдается незначительное уменьшение R и D , что объясняется разрушением ассоциатов, образующихся между макромолекулами сополимера и аминокислоты в процессе экстракции. Дальнейшие исследования проведены при $T = 20 \pm 1$ °С.

Таблица 23 – Влияние температуры на экстракцию аминокислот (высаливатель $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $r = 10:4$)

Сополимер (мол.доли)	T , °С	D	R , %	D	R , %
	Метионин			Гистидин	
ВК-ВФ (0,87:0,13)	10	84,7	93,8	147,1	97,8
	20	83,2	92,6	141,2	97,1
	30	81,4	91,5	139,4	96,5
ВК-ВИ (0,18:0,82)	10	117,5	96,5	246,9	98,2
	20	115,3	96,1	245,4	98,0
	30	112,0	94,8	241,4	97,1
ВФ-ВИ (0,11:0,89)	10	98,0	96,1	114,5	98,6
	20	95,2	96,0	110,3	98,4
	30	90,2	94,7	104,4	97,6

Как и при экстракции гомополимерами максимально эффективное извлечение аминокислот достигается при $r = 10:4$ в присутствии сульфата аммония. Отметим, что гистидин, в отличие от других изученных аминокислот, можно количественно извлечь в результате однократной экстракции: степень извлечения гистидина достигает 97 %.

Таблица 24 – Влияние соотношения фаз и природы высаливателя на экстракцию аминокислот в системах с сополимером ВК-ВФ

Аминокислота	г	Высаливатели			
		$(NH_4)_2SO_4$		Na_2SO_3	
		<i>D</i>	<i>R</i> , %	<i>D</i>	<i>R</i> , %
Гистидин	10:1	96±2	92,5	86±2	87,3
	10:2	101±2	95,2	90±2	91,1
	10:4	104±2	97,1	92±2	92,6
Метионин	10:1	71±1	87,4	39±1	68,1
	10:2	74±1	89,2	44±1	74,2
	10:4	83±2	92,6	49±1	79,1
Пролин	10:1	49±1	80,0	18±1	58,2
	10:2	51±2	84,2	20±1	62,3
	10:4	57±2	87,9	24±1	68,8
Треонин	10:1	59±1	80,1	16±1	43,6
	10:2	62±1	84,1	19±1	51,0
	10:4	70±1	86,8	21±1	54,1

Использование сополимеров для экстракции аминокислот приводит к более высоким коэффициентам распределения и степени извлечения анализов (табл. 24,25). Одна из причин повышения экстракционных характеристик в системах на основе сополимеров по сравнению с системами на основе гомополимеров заключается в появлении новых стерически доступных функциональных групп в макромолекулах экстрагентов. Например, макромолекулы ПВК в водных растворах имеют ламинарную структуру, а его сополимеры – более развернутую конформацию, обладают большей проницаемостью. В связи с чем, сополимеры ВК имеют большее количество стерически доступных активных центров на поверхности по сравнению с гомополимером. Введение в систему мономера со звеньями ВИ приводит к образованию внутримолекулярных связей между полярными группами аминокислот и *N*-атомами пиридинового типа в имидазольном цикле (рис. 1). Это способствует более сильному сжатию макромолекул, находящихся в конформации клубка, что отражается на результатах экстракции [151].

Таблица 25 – Экстракционные характеристики аминокислот в системах на основе сополимеров (высаливатель $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $r = 10:4$)

Состав сополимера, мол.доли	R_h , нм	Гистидин		Метионин		Пролин		Треонин	
		D	$R, \%$	D	$R, \%$	D	$R, \%$	D	$R, \%$
	БК-ВИ								
0,18:0,82	102	245±4	98,0	115±3	96,1	99±2	94,2	81±1	96,2
0,32:0,68	119	162±3	97,3	107±3	95,3	81±2	91,5	78±1	92,1
0,46:0,54	137	95±3	95,2	86±2	94,7	67±2	89,7	73±2	86,4
0,54:0,46	163	78±1	94,6	73±2	91,2	59±1	87,4	68±2	83,2
0,74:0,26	189	66±1	93,1	64±1	88,5	48±1	85,3	63±1	81,2
	БК-ВФ								
0,22:0,78	261	102±2	94,7	59±1	83,8	29±1	71,3	57±2	69,4
0,43:0,57	224	117±3	95,2	64±1	85,7	36±1	73,9	59±2	72,2
0,55:0,45	196	123±3	95,8	72±2	89,1	43±1	78,6	64±1	77,4
0,76:0,24	171	135±3	96,4	78±2	91,0	52±2	85,4	68±1	82,2
0,87:0,13	157	141±2	97,1	83±2	92,6	57±2	87,9	70±2	86,8
	ВФ-ВИ								
0,11:0,89	269	110±3	98,4	95±2	96,0	84±2	97,4	80±1	96,3
0,36:0,64	204	108±4	97,3	91±1	95,1	75±1	96,0	76±2	92,4
0,49:0,51	159	107±5	96,3	88±3	94,7	70±1	92,2	71±2	88,6
0,66:0,34	136	106±6	95,1	80±1	90,0	61±2	90,1	62±1	82,1
0,89:0,11	104	105±2	84,2	74±2	88,7	52±2	87,4	58±1	80,1

Из табл. 25 видно, что экстракционная способность сополимеров, содержащих в составе имидазольные циклы, выше, чем сополимеров, в состав которых входят пиразольные фрагменты. Очевидно, более высокая основность «пиридинового» атома азота, входящего в состав имидазального цикла, способствует лучшему комплексообразованию по отношению к аминокислотам. Можно предположить, что межмолекулярное взаимодействие между молекулами аминокислоты и сополимера будет осуществляться по схеме, представленной на рис. 20 [151].

На примере экстракции треонина можно оценить влияние концентрации аминокислоты, сополимеров, соотношения равновесных объемов фаз на степень извлечения аминокислот (табл. 26).

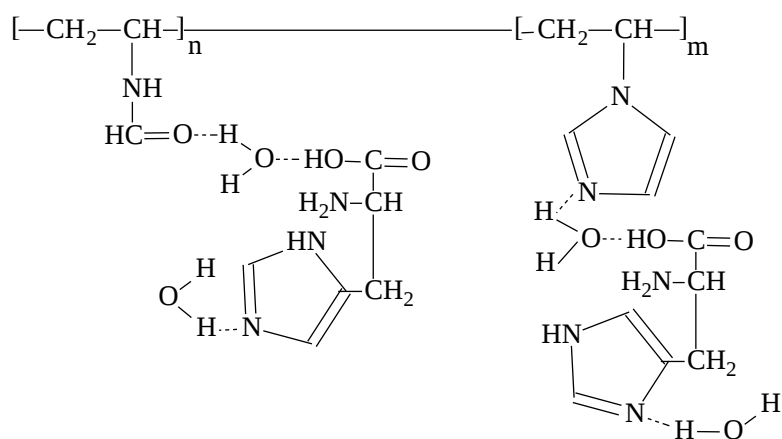


Рисунок 20 – Схема межмолекулярного взаимодействия в системе
гистидин – ВФ-ВИ

Таблица 26 – Экстракционные характеристики треонина при извлечении
сополимером ВФ-ВИ (концентрация сульфата аммония 20 % масс.)

Концентрация треонина, мг/см ³	Концентрация сополимера 0.1 г/см ³		Концентрация сополимера 0.2 г/см ³	
	D	R, %	D	R, %
r = 10:1				
1,0	45	81,8	61	85,9
2,0	54	84,4	64	86,5
2,5	61	85,9	77	88,5
3,0	78	88,6	68	87,1
r = 10:2				
1,0	94	81,8	101	95,3
2,0	56	84,4	123	96,1
2,5	113	85,9	120	96,0
3,0	110	88,6	118	95,9
r = 10:3				
1,0	80	96,4	74	94,8
2,0	94	96,9	88	94,6
2,5	121	97,6	91	96,8
3,0	98	95,1	78	93,4

Максимальные экстракционные характеристики получены при концентрации треонина 2,5 мг/см³ и соотношении фаз 10:3 [150]. Следует отметить, что разница в величинах R в системах с r = 10:2 и r = 10:3 и концентрации сополимера 0,2 г/см³ незначительная. Очевидно, механизмы межфазного взаимодействия других аминокислот с сополимерами на основе ВФ, ВИ и ВК, будут аналогичны.

ГЛАВА 4 ЭКСТРАКЦИОННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ БИНАРНЫХ СМЕСЕЙ АМИНОКИСЛОТ

4.1 Экстракционное разделение смесей аминокислот гомополимерами

Установленные закономерности экстракции индивидуальных аминокислот, а также разница в экстрагирующей способности одного и того же полимера по отношению к разным аминокислотам позволяют осуществить разделение бинарных смесей аминокислот. В ходе работы было изучено экстракционное разделение смесей Met-Pro, His-Pro и Met-Thr с применением водорастворимых полимеров (табл. 27-30).

Таблица 27 – Характеристики экстракционного разделения смесей аминокислот при $r = 10:1$

$M_n \cdot 10^3$	Met(1)-Pro(2)					His(1)-Pro(2)				
	D ₁	R ₁ , %	D ₂	R ₂ , %	β	D ₁	R ₁ , %	D ₂	R ₂ , %	β
ПВП										
26	0,4	3,6	36,1	78,3	90,2	0,5	4,8	34,8	77,7	69,6
52	0,3	3,2	28,3	73,9	94,3	0,4	3,5	30,5	75,3	76,2
94	0,2	1,7	19,3	65,9	96,5	0,2	1,6	16,1	61,7	80,2
ПВК										
12	0,5	4,8	50,2	83,4	100,4	1,5	12,2	46,7	83,1	31,1
32	0,3	2,9	31,0	75,9	103,3	0,7	5,9	28,6	75,1	40,8
50	0,2	2,0	24,1	70,7	120,5	0,4	3,9	21,1	68,9	52,7
ПВИ										
29	2,4	19,2	90,3	90,0	37,6	4,0	27,4	85,4	89,3	21,3
41	2,2	18,0	88,5	89,6	40,2	3,5	25,2	81,7	88,9	23,3
76	1,9	15,9	86,4	89,1	45,7	2,9	21,6	77,4	88,3	26,7
ПАА										
34	1,3	11,5	17,6	63,7	13,5	2,1	17,3	17,8	64,0	8,5
56	1,0	10,0	14,4	59,0	14,4	1,5	13,8	14,3	56,7	9,5
82	0,7	6,5	11,3	53,0	16,1	1,1	9,9	12,8	53,2	11,6
ПВФ										
8	2,9	22,0	77,4	88,6	26,7	4,7	32,1	78,6	88,8	16,7
59	2,3	17,3	74,6	86,7	32,4	4,3	29,4	75,4	87,9	17,5
108	1,8	14,8	71,2	84,3	39,5	3,2	24,2	73,4	85,1	22,9
ПВТ										
49	1,4	14,2	71,2	83,5	50,8	2,4	20,3	69,6	81,7	29,0
70	0,9	10,9	65,3	78,3	72,5	1,9	16,2	66,4	79,1	34,9
120	0,7	8,7	62,4	74,7	89,1	1,4	14,8	64,2	76,4	45,8

Результаты получены для различных соотношений объемов равновесных водной и органической фаз и молекулярных масс полимеров. Спектры светопоглощения аминокислот при совместном присутствии в растворе не перекрываются, что позволяет проводить их отдельное определение по градуировочному графику (кроме смесей треонин – пролин и треонин – гистидин). Концентрация полимеров не должна превышать $0,12 \text{ г/см}^3$, так как при более высоких значениях концентраций экстрагентов в системах водно-солевой раствор аминокислоты – раствор полимера происходит комплексообразование и освобождается вода, которая переходит в равновесную водно-солевую фазу [8, 137].

Таблица 28 – Характеристики экстракционного разделения смесей аминокислот при $r = 10:2$

$M_{\eta} \cdot 10^3$	Met(1)-Pro(2)					His(1)-Pro(2)				
	D ₁	R ₁ , %	D ₂	R ₂ , %	β	D ₁	R ₁ , %	D ₂	R ₂ , %	β
ПВП										
26	0,6	10,7	38,4	88,5	64,0	0,6	10,7	36,5	88,0	60,8
52	0,5	9,1	35,2	87,5	70,4	0,5	9,1	34,7	87,1	69,4
94	0,3	5,7	26,5	83,4	88,3	0,3	5,7	23,3	82,3	77,7
ПВК										
12	1,4	21,8	55,3	91,7	39,5	1,8	26,4	48,9	90,2	27,2
32	0,6	10,7	35,6	87,7	59,3	0,9	15,2	32,1	86,2	35,7
50	0,4	7,4	29,2	85,3	73,0	0,6	10,7	24,2	82,9	40,3
ПВИ										
29	3,9	43,8	91,6	94,8	23,5	5,2	50,1	90,7	94,8	17,4
41	3,5	41,1	90,1	94,7	25,7	4,4	46,8	87,3	94,5	19,8
76	2,7	35,1	87,2	94,5	32,3	3,8	43,2	81,7	94,2	21,5
ПАА										
34	2,1	29,6	25,2	83,4	12,0	2,6	34,2	21,4	81,0	8,2
56	1,8	26,4	23,6	82,5	13,1	2,2	30,5	19,5	79,6	8,9
82	1,6	24,2	22,1	81,5	13,8	1,9	29,5	17,8	78,1	9,4
ПВФ										
38	4,2	45,6	86,4	94,5	20,6	6,4	56,1	81,3	94,2	12,7
59	3,7	42,5	83,1	94,3	22,5	5,8	53,7	77,9	94,0	13,4
108	3,3	39,7	79,9	94,1	24,2	5,1	50,1	75,3	93,7	14,8
ПВТ										
49	3,4	23,9	78,3	95,1	23,0	5,0	50,0	76,3	93,8	15,3
70	2,6	18,1	75,6	93,8	29,0	4,3	46,2	72,8	93,5	16,9
120	2,0	15,8	71,2	93,4	35,6	3,7	42,5	69,3	93,2	18,7

Таблица 29 – Характеристики экстракционного разделения смесей аминокислот при $r = 10:4$

$M_{\eta} \cdot 10^3$	Met(1)-Pro(2)					His(1)-Pro(2)				
	D ₁	R ₁ , %	D ₂	R ₂ , %	β	D ₁	R ₁ , %	D ₂	R ₂ , %	β
ПВП										
26	1,1	30,5	41,6	94,3	37,8	1,1	30,6	38,7	93,9	35,2
52	0,9	26,4	37,9	93,6	42,1	0,9	26,5	36,1	93,5	40,1
94	0,6	19,4	30,8	92,3	51,3	0,5	16,7	24,3	90,7	48,6
ПВК										
12	3,1	55,3	58,2	95,9	18,8	3,3	56,9	51,2	95,3	15,5
32	1,6	39,0	41,1	94,2	25,7	2,0	44,4	40,7	94,2	20,3
50	1,0	28,6	33,8	93,1	33,8	1,4	35,9	34,1	93,2	24,4
ПВИ										
29	8,3	76,8	93,2	97,4	11,2	14,2	85,7	91,2	97,3	6,4
41	7,1	74,0	91,1	97,3	12,8	12,5	83,3	88,9	97,2	7,1
76	5,1	67,1	88,9	97,2	17,4	7,3	74,5	83,3	97,1	11,4
ПАА										
34	3,1	55,3	31,2	92,5	10,1	4,1	62,1	30,4	92,4	7,4
56	2,5	50,0	27,6	91,7	11,0	3,6	59,0	27,1	91,6	7,5
82	2,3	47,9	26,3	91,3	11,4	3,2	56,1	26,3	91,3	8,2
ПВФ										
38	5,8	70,0	91,4	97,3	15,7	8,6	77,5	88,7	97,3	10,3
59	5,3	67,9	88,1	97,2	16,6	7,9	76,0	87,3	97,2	11,0
108	5,0	66,7	83,9	97,1	16,8	7,3	74,5	85,2	97,1	11,7
ПВТ										
49	4,3	63,2	86,3	97,2	20,1	7,0	73,7	82,7	97,0	11,8
70	3,8	60,3	83,2	97,1	21,9	6,3	71,6	79,2	97,0	12,6
120	3,2	56,1	80,4	97,0	25,1	5,8	69,9	77,6	96,9	13,4

Для смесей аминокислот, содержащих треонин, оказалось возможным раздельное определение только для системы метионин – треонин (из-за слишком близких значений максимумов светопоглощения у гистидина, пролина и треонина). Наиболее эффективной для разделения метионина и треонина является система на основе ПВФ, при условии $r = 10:1$, $M_{\eta} = 108 \cdot 10^3$ ($\beta = 97,0$) (табл. 30).

На основании результатов разделения бинарных смесей аминокислот, приведенных в табл. 27-30, можно сделать несколько общих выводов:

1) наиболее эффективным для разделения является соотношение объемов водно-солевой и органической фазы 10:1. При других соотношениях объемов фаз факторы разделения аминокислот β существенно ниже, поэтому

разделение аналитов с целью последующего количественного определения возможно в результате многократной экстракции;

Таблица 30 – Характеристики экстракционного разделения смеси метионин – треонин в системах с ПВФ

r	$M_{\eta} \cdot 10^3$	Met(1)- Thr (2)				
		D ₁	R ₁ , %	D ₂	R ₂ , %	β
10:1	38	0,8	7,4	63,5	86,4	79,4
	59	0,5	4,8	43,2	81,2	86,4
	108	0,4	3,8	38,8	79,5	97,0
10:2	38	0,5	9,1	14,6	74,5	29,2
	59	0,4	7,4	12,5	70,2	31,2
	108	0,3	5,7	11,6	67,8	38,7
10:4	38	0,4	13,8	3,5	58,4	8,8
	59	0,3	10,7	3,1	53,8	10,3
	108	0,2	7,4	2,9	50,1	14,5

2) с увеличением молекулярной массы полимеров M_{η} происходит значительный рост фактора разделения (β). Наиболее высокие факторы разделения метионина и пролина получены в системе на основе ПВК с $M_{\eta}=50 \cdot 10^3$ ($\beta = 120,5$), гистидина и пролина – в системе на основе ПВП с $M_{\eta}=94 \cdot 10^3$ ($\beta = 80,2$) при $r = 10:1$ в обоих случаях. Очевидно, что имеющиеся в структурах гистидина и пролина гетероциклы затрудняют их разделение;

3) для всех пар аминокислот наиболее слабые результаты разделения получены в системах на основе ПАА, что связано с особенностями строения полимера.

Для повышения фактора разделения бинарных смесей аминокислот в экстракционную систему дополнительно введен хлорид натрия (таблицы 31-34) [8]. Для этого в водно-солевой раствор высаливателя вводили навеску хлорида натрия, концентрации хлорид-ионов варьировали от $0,6 \cdot 10^{-4}$ до $9,0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³. При этом в растворе возрастает доля аминокислот в анионной форме. Можно предположить, что при введении ионов хлора происходит образование соли аминокислоты и блокируется заряженная

аминогруппа, с участием которой в дальнейшем комплексообразование невозможно.

Таблица 31 – Характеристики экстракционного разделения смесей аминокислот при $r = 10:1$ и дополнительном введении хлорид-ионов с концентрацией $0,6 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³

$M_n \cdot 10^3$	Met(1)-Pro(2)					His(1)-Pro(2)				
	D ₁	R ₁ , %	D ₂	R ₂ , %	β	D ₁	R ₁ , %	D ₂	R ₂ , %	β
ПВП										
26	0,4	3,3	34,3	77,4	85,7	0,5	4,1	33,1	76,8	66,2
52	0,3	2,9	32,2	76,3	107,3	0,4	3,4	29,0	74,3	72,5
94	0,2	1,5	28,3	64,7	141,5	0,2	1,6	15,3	60,5	76,5
ПВК										
12	0,5	8,4	47,7	83,4	95,4	1,5	11,9	44,4	82,4	29,6
32	0,3	4,1	29,5	74,9	98,3	0,7	5,7	27,2	74,1	38,8
50	0,2	2,9	22,9	70,6	114,5	0,4	67,8	16,8	30,0	42,0
ПВИ										
29	2,2	17,8	85,8	89,3	39,0	3,9	26,8	81,1	88,8	20,8
41	2,0	16,2	84,1	89,1	42,0	3,4	24,6	77,6	88,4	22,8
76	1,7	14,5	82,1	88,6	48,3	2,8	21,1	73,5	87,8	26,2
ПАА										
34	1,2	12,2	16,7	52,1	13,9	2,0	14,8	16,9	54,1	8,5
56	0,9	10,8	13,7	47,0	15,2	1,5	14,4	13,6	45,4	9,1
82	0,6	9,3	10,7	39,8	17,8	1,1	12,0	12,2	41,9	11,1
ПВФ										
38	2,6	20,4	73,5	88,1	28,2	4,6	31,4	74,7	88,3	16,2
59	2,1	16,0	70,9	86,1	33,7	4,2	28,8	71,6	87,3	17,0
108	1,6	13,6	67,6	83,6	42,2	3,1	23,6	69,7	84,4	22,5
ПВТ										
49	1,3	13,1	67,6	82,8	52,0	2,3	19,8	66,1	80,9	28,7
70	0,8	10,0	62,0	77,4	77,5	1,8	15,8	63,1	78,2	35,1
120	0,5	8,0	59,3	73,7	118,6	1,4	14,4	61,0	75,5	43,6

Для метионина и треонина это полностью соответствует экспериментальным данным, для пролина и гистидина наблюдается лишь частичное снижение степени извлечения и вероятности комплексообразования. Это связано с особенностями структурного строения аминокислот и полимеров (глава 2): непосредственное комплексообразование сопровождается взаимодействием между циклами полимеров и аминокислот [152], а в молекулах метионина, треонина, ПАА и

ПВФ нет циклических группировок, поэтому вероятность комплексообразования очень низка.

Таблица 32 – Характеристики экстракционного разделения смесей аминокислот при $r = 10:2$ и дополнительном введении хлорид-ионов с концентрацией $2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³

$M_{\eta} \cdot 10^3$	Met(1)-Pro(2)					His(1)-Pro(2)				
	D ₁	R ₁ ,%	D ₂	R ₂ ,%	β	D ₁	R ₁ ,%	D ₂	R ₂ ,%	β
ПВП										
26	0,3	2,7	31,8	76,0	106,0	0,6	3,7	30,6	75,4	51,0
52	0,2	2,4	29,8	74,9	149,0	0,4	3,1	22,8	72,8	57,0
94	0,1	1,3	17,0	63,0	170,0	0,2	1,4	14,2	58,6	71,0
ПВК										
12	0,4	7,0	44,2	82,3	110,5	1,3	10,9	41,1	81,2	31,6
32	0,2	3,4	26,4	73,5	132,0	0,6	5,2	25,2	72,6	42,0
50	0,1	2,4	21,2	69,0	212,0	0,4	3,4	18,6	66,1	46,5
ПВИ										
29	1,8	15,0	79,5	88,6	44,2	3,5	24,9	75,2	88,0	21,5
41	1,6	13,6	77,9	88,3	48,7	3,1	22,9	71,9	87,6	23,2
76	1,4	12,1	76,0	87,8	54,3	2,6	19,5	68,1	86,9	26,2
ПАА										
34	1,0	10,1	15,5	50,2	15,5	1,8	13,6	15,7	52,2	8,7
56	0,7	8,9	12,7	45,1	18,1	1,3	13,3	12,6	43,5	9,7
82	0,5	7,7	9,9	37,9	19,8	1,0	11,0	11,3	40,1	11,3
ПВФ										
38	2,1	17,3	68,1	87,2	32,4	4,1	29,4	69,2	87,5	16,9
59	1,7	13,4	65,6	85,2	38,6	3,8	26,8	66,4	86,5	17,5
108	1,3	11,4	62,7	82,5	48,2	2,8	21,9	64,6	83,4	23,1
ПВТ										
49	1,0	10,9	62,7	81,7	62,7	2,1	18,3	61,2	79,7	29,1
70	0,7	8,3	57,5	76,0	82,1	1,7	14,5	58,4	76,9	34,3
120	0,4	6,6	54,9	72,2	137,2	1,2	13,3	56,5	74,0	47,1

Отметим, что введение ионов хлора в экстракционную систему повысило факторы разделения аминокислот в несколько раз (по сравнению с данными табл. 27-30): для ПВП величина β изменяется примерно от 96 до 170, для ПВК – от 120 до 212, для ПВИ – от 45 до 198, для ПАА – от 16 до 44, для ПВФ – от 40 до 93, для ПВТ – от 89 до 377.

Таблица 33 – Характеристики экстракционного разделения смесей аминокислот при $r = 10:4$ и дополнительном введении хлорид-ионов с концентрацией $9,0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³

$M_{\eta} \cdot 10^3$	Met(1)-Pro(2)					His(1)-Pro(2)				
	D ₁	R ₁ ,%	D ₂	R ₂ ,%	β	D ₁	R ₁ ,%	D ₂	R ₂ ,%	β
ПВП										
26	0,2	0,7	24,9	71,3	124,5	0,3	2,5	24,0	70,6	80,0
52	0,2	0,6	23,4	70,0	117,0	0,2	2,1	21,0	67,8	105,0
94	0,1	0,3	13,3	57,1	133,0	0,1	1,0	11,1	52,6	111,0
ПВК										
12	0,2	1,9	34,6	78,5	173,0	0,9	7,6	32,2	77,2	35,8
32	0,1	0,9	20,7	68,5	207,0	0,4	3,6	19,7	67,5	49,2
50	0,1	0,6	20,9	63,6	209,0	0,2	2,3	14,6	60,5	73,0
ПВИ										
29	0,5	4,3	62,3	85,9	124,6	2,4	18,2	58,9	85,2	24,5
41	0,4	3,9	61,1	85,6	152,7	2,1	16,6	56,4	84,7	26,8
76	0,3	3,4	59,6	84,9	198,7	1,7	14,0	53,4	83,9	31,4
ПАА										
34	0,3	2,8	6,9	30,9	23,0	0,6	5,1	6,9	32,6	11,5
56	0,2	2,5	5,6	26,7	28,0	0,4	5,0	5,7	25,5	14,2
82	0,1	2,1	4,4	21,3	44,0	0,3	4,0	5,0	22,9	16,7
ПВФ										
38	0,6	5,1	30,2	75,2	50,3	1,4	12,4	30,7	75,6	21,9
59	0,4	3,8	29,1	71,8	72,7	1,3	11,1	29,4	73,9	22,6
108	0,3	3,2	27,8	67,7	92,7	1,0	8,7	28,6	69,0	28,6
ПВТ										
49	0,3	3,0	49,1	77,7	163,7	1,4	13,1	48,0	75,5	34,3
70	0,2	2,3	45,1	71,3	225,5	1,1	10,2	45,8	72,3	41,6
120	0,1	1,8	37,7	67,1	377,7	0,8	9,3	44,3	69,1	55,3

Таблица 34 – Результаты разделения смеси метионин - треонин при $r = 10:1$ и дополнительном введении хлорид-ионов с концентрацией $0,6 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³

$M_{\eta} \cdot 10^3$	Met(1)- Thr (2)				
	D ₁	R ₁ ,%	D ₂	R ₂ ,%	β
38	0,9	8,2	81,6	89,1	90,7
59	1,2	10,7	122,0	92,4	101,7
108	1,4	12,3	151,5	93,8	108,2

Для бинарной смеси метионин – треонин результаты экстракционного разделения приведены в табл. 34. Фактор разделения двух аминокислот также превышает этот показатель для систем без хлорид-ионов. Для ПВФ изменения фактора разделения являются незначительными и составляют от 97 до 108.

4.2 Разделение смесей аминокислот с применением экстракции сополимерами

В таблицах 35 и 36 приведены данные о разделении бинарных смесей аминокислот с применением сополимеров ВК-ВИ и ВК-ВФ в качестве экстрагентов. На факторы разделения аминокислот существенное влияние оказывает соотношение мономеров в составе сополимеров. Введение одного из мономеров в систему изменяет конформацию макромолекулы, что отражается на ее способности к самоассоциации [141, 142].

Таблица 35 – Экстракционное разделение смесей аминокислот сополимерами при разных соотношениях фаз

Состав со- полимера	Met (1)-Pro (2)					His (1)-Pro (2)				
	D ₁	R ₁ , %	D ₂	R ₂ , %	β	D ₁	R ₁ , %	D ₂	R ₂ , %	β
r = 10:1										
ВК-ВИ										
0,18:0,82	3,8	27,5	108,5	91,6	28,6	5,8	36,7	96,6	90,4	16,7
0,32:0,68	2,9	22,5	99,5	90,9	34,3	4,8	32,3	88,6	89,6	18,4
0,46:0,54	2,0	16,7	82,6	89,2	41,3	3,2	24,0	73,5	88,0	22,9
0,54:0,46	1,7	14,5	72,6	87,9	42,7	2,3	18,7	64,6	86,6	28,1
0,74:0,26	1,0	9,1	51,7	83,8	51,7	1,2	10,6	46,0	82,0	38,3
ВК-ВФ										
0,22:0,78	3,6	26,9	88,8	89,9	24,7	6,5	39,4	91,6	90,1	14,1
0,43:0,57	3,1	23,5	81,5	89,1	26,3	5,5	35,6	84,1	89,7	15,3
0,55:0,45	2,3	16,8	67,7	87,1	29,4	3,6	26,6	69,7	87,4	19,3
0,76:0,24	1,5	12,8	59,5	85,6	39,7	2,6	20,9	61,3	85,8	23,6
0,87:0,13	0,7	9,3	42,4	80,9	60,6	1,3	12,0	43,6	81,2	33,5
r = 10:2										
ВК-ВИ										
0,18:0,82	5,2	51,0	116,5	95,8	22,4	8,5	63,0	104,1	95,1	12,2
0,32:0,68	4,1	45,1	104,7	95,4	25,5	7,7	60,6	95,3	95,0	12,4
0,46:0,54	3,0	37,5	89,6	94,7	29,9	4,6	47,9	79,4	94,1	17,3
0,54:0,46	2,5	33,3	78,2	94,0	31,3	3,2	39,0	70,2	93,3	21,9
0,74:0,26	1,6	24,2	62,3	92,6	38,9	2,0	28,6	54,5	91,6	27,3
ВК-ВФ										
0,22:0,78	5,5	52,4	96,2	95,0	17,5	9,7	66,0	102,2	95,3	10,5
0,43:0,57	4,3	46,2	87,7	94,6	20,4	7,1	58,7	90,5	94,7	12,7
0,55:0,45	3,5	41,1	71,3	93,4	20,4	5,2	52,0	85,7	94,5	16,5
0,76:0,24	2,7	35,1	58,4	92,1	21,6	3,9	43,8	84,6	94,4	21,7
0,87:0,13	1,1	18,0	49,0	90,1	44,5	2,0	28,6	50,1	90,1	25,0
r = 10:4										
ВК-ВИ										
0,18:0,82	12,1	82,8	121,4	98,0	10,0	15,2	85,8	107,7	97,7	7,1
0,32:0,68	9,8	79,7	109,2	97,8	11,1	14,6	85,4	102,1	97,6	7,0

Состав со-полимера	Met (1)-Pro (2)					His (1)-Pro (2)				
	D ₁	R ₁ ,%	D ₂	R ₂ ,%	β	D ₁	R ₁ ,%	D ₂	R ₂ ,%	β
0,46:0,54	8,6	77,4	94,5	97,4	11,6	10,1	80,1	87,1	97,2	8,6
0,54:0,46	7,0	73,7	85,1	89,1	12,2	9,6	79,3	84,2	97,1	8,8
0,74:0,26	4,2	62,7	70,4	87,8	16,7	8,4	77,1	77,4	96,8	9,2
BK-BΦ										
0,22:0,78	10,1	80,1	103,0	97,6	10,2	19,1	88,4	105,8	97,6	5,5
0,43:0,57	8,8	77,7	92,4	97,3	10,5	15,7	86,2	96,1	97,4	6,1
0,55:0,45	7,2	74,2	84,7	97,1	11,7	12,0	82,7	84,9	97,1	7,1
0,76:0,24	4,7	65,2	76,9	96,8	16,4	10,2	80,3	78,5	96,9	7,7
0,87:0,13	2,0	44,4	64,5	96,3	32,3	8,8	77,8	66,8	96,4	7,6

Таблица 36 – Экстракционное разделение смесей аминокислот сополимерами при разных соотношениях фаз в присутствии хлорид-ионов

Состав со-полимера	Met (1)-Pro (2)					His (1)-Pro (2)				
	D ₁	R ₁ ,%	D ₂	R ₂ ,%	β	D ₁	R ₁ ,%	D ₂	R ₂ ,%	β
r = 10:1; C _{Cl} = 0,6·10 ⁻⁴ моль/дм ³										
BK-BИ										
0,18:0,82	3,5	25,7	103,1	91,0	29,4	5,6	35,5	91,8	90,1	16,4
0,32:0,68	2,6	20,8	94,5	90,3	36,3	4,7	31,6	84,2	89,1	17,9
0,46:0,54	1,8	15,3	78,5	88,5	43,6	3,1	23,4	69,8	87,2	22,5
0,54:0,46	1,5	13,6	69,0	87,0	46,0	2,2	18,2	61,4	85,7	27,9
0,74:0,26	0,9	8,3	49,1	82,8	54,5	1,2	10,3	43,7	81,0	36,4
BK-BΦ										
0,22:0,78	3,3	24,8	84,4	89,4	25,6	6,3	38,8	87,0	89,6	13,8
0,43:0,57	2,8	21,8	77,4	88,6	27,6	5,3	34,9	79,9	89,2	15,0
0,55:0,45	2,1	17,4	64,3	86,5	30,6	3,5	26,0	66,2	86,8	18,9
0,76:0,24	1,4	12,3	56,5	84,9	40,3	2,5	20,4	58,2	85,2	23,3
0,87:0,13	0,6	5,7	40,3	80,1	67,2	1,3	11,7	41,4	80,4	31,8
r = 10:2; C _{Cl} = 2,4·10 ⁻⁴ моль/дм ³										
BK-BИ										
0,18:0,82	2,8	35,9	95,5	95,0	34,1	5,1	50,5	85,0	94,4	16,7
0,32:0,68	2,1	29,6	87,6	94,6	41,7	4,2	45,6	78,0	94,0	18,5
0,46:0,54	1,5	23,0	72,7	93,5	48,5	2,8	35,9	64,7	92,8	23,1
0,54:0,46	1,3	20,1	63,9	92,7	49,1	2,0	28,6	56,8	94,9	28,4
0,74:0,26	0,7	12,2	45,5	90,0	65,0	1,1	18,0	40,5	80,2	36,8
BK-BΦ										
0,22:0,78	2,7	35,1	78,1	94,0	28,9	5,7	53,2	80,6	94,1	14,1
0,43:0,57	2,3	31,5	71,7	93,5	31,1	4,8	49,0	74,0	93,6	15,4
0,55:0,45	1,7	25,3	59,6	92,2	35,0	3,2	39,0	61,3	92,4	19,1
0,76:0,24	1,1	18,0	52,4	91,3	47,6	2,3	31,5	53,9	91,5	23,4
0,87:0,13	0,5	9,1	37,3	88,1	74,6	1,1	18,0	38,4	88,4	34,9
r = 10:4; C _{Cl} = 9,0·10 ⁻⁴ моль/дм ³										
BK-BИ										
0,18:0,82	0,7	21,8	74,9	96,7	107,0	3,4	57,6	66,7	96,4	19,6
0,32:0,68	0,6	19,5	68,7	96,5	114,5	2,8	52,8	61,1	96,1	21,8

Состав со-полимера	Met (1)-Pro (2)					His (1)-Pro (2)				
	D ₁	R ₁ ,%	D ₂	R ₂ ,%	β	D ₁	R ₁ ,%	D ₂	R ₂ ,%	β
0,46:0,54	0,4	13,8	57,0	95,8	142,5	1,9	43,2	50,7	95,3	26,7
0,54:0,46	0,3	10,7	50,1	95,2	167,0	1,4	35,9	44,6	94,7	31,8
0,74:0,26	0,2	7,4	35,7	93,4	178,5	0,7	21,8	31,7	92,7	45,3
ВК-ВФ										
0,22:0,78	0,7	21,8	61,3	96,1	87,5	3,8	60,3	63,2	96,2	16,6
0,43:0,57	0,6	19,2	56,2	95,7	93,7	3,2	56,1	58,0	95,9	18,1
0,55:0,45	0,4	18,8	46,7	95,0	116,7	2,1	45,6	48,1	95,0	22,9
0,76:0,24	0,3	10,7	41,1	94,3	137,0	1,5	37,5	42,3	94,4	28,2
0,87:0,13	0,1	3,8	29,3	92,1	293,0	0,8	24,2	30,1	92,3	37,6

Однако применение сополимеров не позволило существенно повысить факторы разделения аминокислот по сравнению с экстракцией гомополимерами. Степень извлечения пролина из бинарных смесей с метионином и гистидином в несколько раз превышает этот показатель для других аминокислот. Отметим, что в самых эффективных системах ($r = 10:1$, экстрагент ВК-ВИ состава 0,74:0,26) факторы разделения смесей метионин – пролин и гистидин – пролин составляют 51,7 и 38,3 соответственно. Близкими к этим значениям являются и факторы разделения аминокислот в системе ВК-ВФ состава 0,87:0,13.

При дополнительном введении в экстракционную систему хлорид-ионов факторы разделения смесей аминокислот увеличиваются за счет резкого уменьшения степени извлечения метионина из-за блокирования ее комплексообразующей аминогруппы [8]. Отметим, что при соотношении фаз 10:4 для обеих бинарных систем сополимеров получены факторы разделения метионина и пролина, превышающие 100; для системы ВК-ВФ состава 0,87:0,13 в присутствии хлорид-иона величина β составляет 293. Для смеси гистидин – пролин также при введении в систему хлорид-ионов существенно возрастает фактор разделения аминокислот в случае экстракции ВК-ВФ.

ГЛАВА 5 АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК, СОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТЫ

5.1 Исследованные объекты

В настоящее время фармацевтический рынок является одним из самых быстроразвивающихся секторов экономики и производства. Фармацевтические препараты отличаются от любых других средств потребления тем, что покупатель не способен самостоятельно определить качество лекарственного средства, БАД, препарата для функционального питания. Актуальность контроля качества и стандартизации лекарственных средств, содержащих аминокислоты в качестве основных компонентов, возрастает в связи с общим увеличением числа зарегистрированных в России фармацевтических препаратов отечественных и зарубежных производителей. В медицинскую практику все больше внедряются препараты на основе аминокислот, а также веществ, принадлежащих к новым классам природных и синтетических соединений [153]. Широкое применение аминокислоты находят также в производстве косметических средств: для поддержания и нормализации функций кожных покровов, шампуни и кремы обогащают аминокислотами.

Ежегодно расширяется перечень лекарственных форм, содержащих аминокислоты в свободной и связанной форме. Направленное эффективное воздействие препаратов на основе смесей аминокислот основано на анаболическом и антиоксидантом эффекте, стимуляции энергообеспечения и регенерации. Поступление в организм свободных форм аминокислот не сопровождается повышенными энергетическими затратами на расщепление при всасывании, в отличие от белка.

Поступление на фармацевтический рынок фальсифицированных (контрафактных) лекарственных средств является актуальной проблемой, поскольку объемы лекарственных субстанций, качество которых не удовлетворяет действующим на территории России требованиям

нормативной документации, неуклонно растет. Запрос на исследования, связанные с оценкой эффективности и безопасности лекарственных препаратов, расширяет средства и методы фармацевтического анализа.

Синтез высокоэффективных и безопасных аминокислотных фармацевтических препаратов требует комплексного решения проблем на этапах поиска оптимальных методов синтеза фармакологически активных веществ, исследования их токсичности, разработки технологии и организации производства готовой продукции. На всех этих этапах необходимо проведение аналитического контроля с применением надежных методов исследования и анализа [154].

Для селективного количественного анализа аминокислот наиболее часто применяются хроматографические методы: ионообменная, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная, газовая хроматографии [155-157]. Для осуществления хроматографического анализа необходима химическая модификация аминокислоты, что связано с трудностями при детектировании аналитов в свободном виде [107, 158]. Для аналитического контроля на опытно-промышленном этапе производства аминокислотных препаратов целесообразно использовать простые, но надежные и экспрессные методики анализа. При этом титриметрические и прямые фотометрические методы не всегда можно использовать, так как в реакционных массах присутствуют примеси.

Аминокислотный дисбаланс, а также дефицит аминокислот в организме являются причинами патологических процессов и способны вызывать заболевания желудочно-кишечного тракта и нервной системы [159]. Аминокислотный дефицит способствует развитию дисфункции обменных процессов в организме человека, поэтому недостаток гистидина, метионина, пролина и треонина необходимо восполнять дополнительным включением аминокислот в рацион питания. Задачи, связанные с разработкой способов определения аминокислот в фармацевтических препаратах и БАД,

могут быть решены с применением экстракции целевых компонентов водорастворимыми полимерами.

В работе применяли лекарственные препараты (ЛП) и биологически активные добавки к пище (БАД) различных производителей и заявленном ими количестве аминокислот в препаратах (табл. 36). Одна из задач исследования – разработка экспрессного способа извлечения и определения аминокислот в таблетированных формах без разрушения многокомпонентной матрицы объекта, исключающего применение токсичных органических растворителей.

Таблица 36 – Исследованные лекарственные препараты (ЛП) и БАД

Препарат	Фирма-производитель	Дозировка, мг
L-Proline	NaturalSupp	1000
L-Proline	NowFoods	500
L-пролин	Lekolike	1000
L-пролин	Nutricost	1000
L-Гистидин	Квадрат-С	500
L- Гистидин	Витамир	500
L-Histidine	Twinlab	500
Метионин (ЛП)	АВВА Рус	250
Метионин (ЛП)	Марбиофарм	250
Метионин (ЛП)	Фармстандарт	250
L-Methionine	Solgar	500
L-Methionine	Now Foods	500
L- Threonine	Vitamatic	500
L-Треонин	aTech Nutrition	500
L-Треонин	GLS Pharmaceuticals	500

Помимо действующего вещества (аминокислоты), вспомогательными компонентами ядра препаратов являются: крахмал картофельный, стеариновая кислота, метилцеллюлоза («Метионин»), микрокристаллическая целлюлоза, магниевая соль стеариновой кислоты «Гистидин»), целлюлоза микрокристаллическая, диоксид кремния аморфный, кальциевая (или магниевая) соль стеариновой кислоты («Пролин»), кальциевая соль стеариновой кислоты, диоксид кремния, гидроксипропилметилцеллюлоза («Треонин»). Эти компоненты не оказывают влияния на результаты анализа

фармпрепаратов, УФ-спектры модельных растворов аминокислот и водных растворов фармацевтических препаратов «Метионин» (Фармстандарт) и «Гистидин» (Twinlab) практически идентичны (рис. 21).

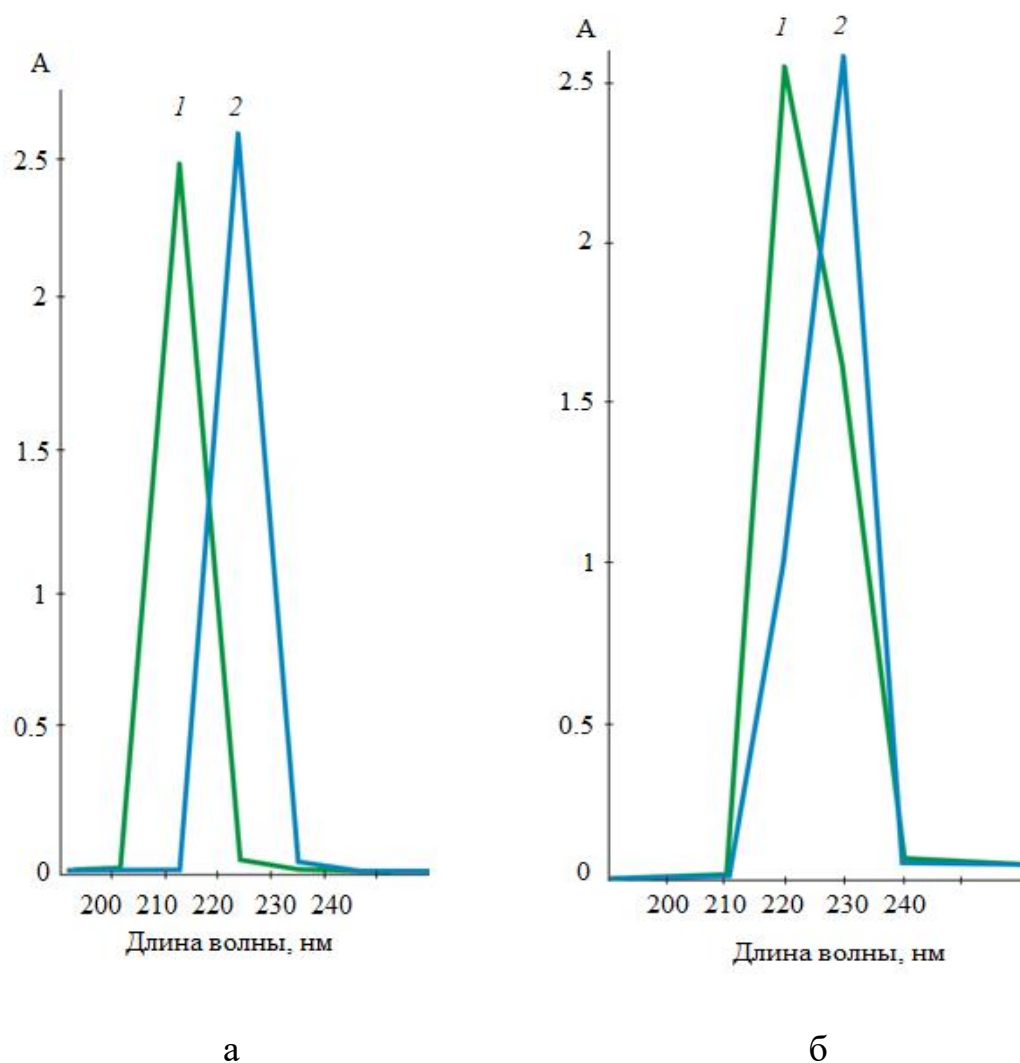
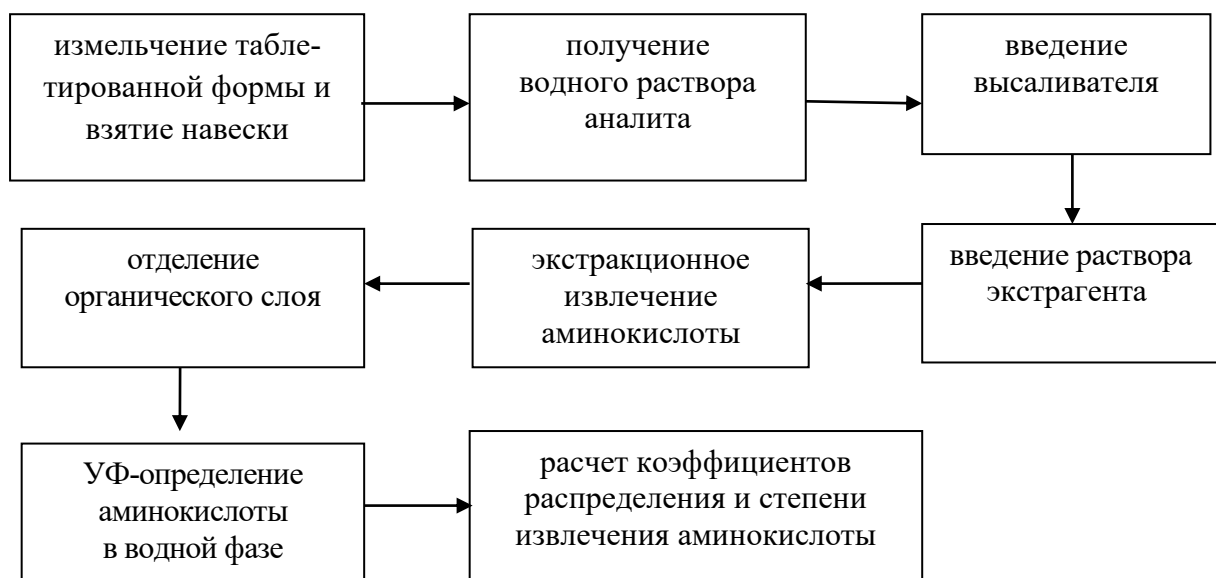


Рисунок 21 – Спектры поглощения модельных растворов (а) и водных растворов фармпрепаратов (б) гистидина (1) и метионина (2)

Определяемая концентрация аминокислот в лекарственных препаратах и БАД методом УФ-спектрофотометрии составляет $2,2 \cdot 10^{-4}$ – $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³, время анализа – 35-40 мин.

5.2 Экстракция и определение аминокислот в лекарственных препаратах и биологически активных добавках

Общую последовательность операций для определения целевых компонентов фармацевтических препаратов можно представить следующей схемой:



Степень извлечения аминокислот из водных растворов таблетированных форм достигает 97-98 % от исходного содержания в препарате. Результаты экстракционно-спектрофотометрического определения аминокислот в лекарственных препаратах и БАД показали (табл. 37), что содержание гистидина, пролина и треонина практически полностью (96-99 %) соответствует заявленному производителем; содержание метионина у одного из производителей оказалось заниженным (90 %).

Установленные закономерности экстракции аминокислот и доказанная эффективность сополимеров *N*-винилкапролактама как экстрагентов позволили применить сополимеры ВК-ВИ и ВК-ВФ для определения содержания аминокислот в некоторых лекарственных препаратах и БАД [160]. Для экстракции аминокислот из таблетированных форм применяли сополимеры наиболее эффективного состава: 0,18:0,82 для ВК-ВИ и 0,87:0,13 (или 0,78:0,22) для ВК-ВФ (табл. 38).

Таблица 37 – Содержание аминокислот в лекарственных препаратах и БАД

Экстрагент	M _n · 10 ⁻³	Метионин (ЛП)		
		Фармстандарт	АВВА Рус	Марбиофарм
ПВП	10	236±3	231±2	247±3
ПВК	12	238±4	227±3	246±3
ПВИ	14	237±4	234±2	245±3
ПВТ	17	240±4	230±3	246±2
ПВФ	25	239±3	225±3	246±4
ПАА	20	238±3	226±2	247±3
Гистидин				
		Twinlab	Витамир	Квадрат-С
ПВП	10	482±6	495±7	475±9
ПВК	12	486±7	493±6	481±8
ПВИ	14	485±6	497±7	477±8
ПВТ	17	488±7	496±6	472±10
ПВФ	25	487±6	496±8	475±10
ПАА	20	486±8	497±7	471±9
Пролин				
		NaturalSupp	Lekolike	Nutricost
ПВП	10	988 ± 10	984 ±14	981±14
ПВК	12	992 ± 8	984 ±14	984±12
ПВИ	14	988± 11	981±15	981±13
ПВТ	17	992 ± 7	988 ± 10	988±10
ПВФ	25	984 ±14	981 ±16	988±10
ПАА	20	984 ± 14	984 ±12	992 ± 7
Треонин				
		GLS Pharmaceuticals	Vitamatic	aTech Nutrition
ПВП	10	488±7	492±7	482±6
ПВК	12	489±6	493±7	481±6
ПВИ	14	489±6	490±6	484±7
ПВТ	17	490±7	492±6	482±7
ПВФ	25	489±6	490±6	480±8
ПАА	20	487±6	489±7	481±6

Таблица 38 – Определение аминокислот в лекарственных препаратах и БАД

Сополимер	Состав сополимера	Метионин (ЛП)		
		Фармстандарт	АВВА Рус	Марбиофарм
ВК-ВФ	0,78:0,22	242±3	230±2	248±3
ВК-ВИ	0,18:0,82	240±4	228±2	247±4
		Гистидин		
		Twinlab	Витамир	Квадрат-С
ВК-ВФ	0,87:0,13	487±6	498±7	480±7
ВК-ВИ	0,18:0,82	486±7	496±8	482±7
		Пролин		
		NaturalSupp	Lekolike	Nutricost
ВК-ВФ	0,87:0,13	992±7	988±8	988±9

Сополимер	Состав сополимера	Метионин (ЛП)		
		Фармстандарт	АВВА Рус	Марбиофарм
ВК-ВИ	0,18:0,82	996±9	988±9	984±7
		Треонин		
		GLS Pharmaceuticals	Vitamatic	aTech Nutrition
ВК-ВФ	0,87:0,13	489±5	492±7	486±6
ВК-ВИ	0,18:0,82	488±6	490±7	483±5

Гомо- и сополимеры показали практически одинаковый результат в качестве экстрагентов и могут быть рекомендованы для извлечения и определения аминокислот в лабораторных и производственных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлены закономерности экстракции гистидина, метионина, пролина и треонина из водных растворов в системах на основе поли-*N*-винилпирролидона (ПВП), поли-*N*-винилкапролактама (ПВК), поли-*N*-винилимидазола (ПВИ), поли-*N*-винилформамида (ПВФ), полиакриламида (ПАА), поли-1-винил-1,2,4-триазола (ПВТ). Определены условия (высаливатель, pH среды, температура, средневязкостная молекулярная масса экстрагентов, концентрации растворов аналитов и полимеров) для наиболее полного извлечения аминокислот. Методами ИК-спектроскопии и квантово-химического моделирования исследованы взаимодействия в системах, содержащих аминокислоты и водорастворимые полимеры, предложены схемы образующихся комплексов.

2. Рассчитаны количественные характеристики межфазного распределения аминокислот и установлено, что максимальная степень извлечения аналитов (до 98 %) достигается при использовании сульфата аммония в качестве высаливателя и при соотношении водно-солевой и органической фаз 10:4. Экстрагирующая и комплексообразующая способность полимеров возрастает в ряду ПАА→ПВП→ПВТ→ПВФ→ПВК→ПВИ для всех исследованных аминокислот, что связано с особенностями их строения и доступностью активных центров. Степень извлечения обратно пропорциональна гидродинамическому радиусу молекул полимера, что указывает на взаимодействие аминокислот с активными центрами на поверхности макромолекулярного клубка. Показана возможность проведения бессолевой экстракции с применением ПВК, а также прогнозирования коэффициентов распределения аминокислот в изученных системах.

3. Проведено исследование экстракции аминокислот сополимерами ВК – ВФ, ВК – ВИ, ВФ – ВИ. Использование сополимеров приводит к более высоким коэффициентам распределения и степени извлечения аналитов, что связано с появлением новых стерически доступных функциональных групп в макромолекулах экстрагентов.

4. Разработана методика экстракционного разделения бинарных смесей метионин – пролин, гистидин – пролин и метионин – треонин с применением гомо- и сополимеров. На разделение аминокислот оказывают существенное влияние структура и молекулярная масса полимеров, соотношение объемов водно-солевой и органической фазы, состав сополимеров. Максимальные факторы разделения (от 97 до 120) достигнуты в системах на основе поли-*N*-винилкапролактама (метионин – пролин), поли-*N*-винилпирролидона (гистидин – пролин), поли-*N*-винилформамида (метионин – треонин). При дополнительном введении в экстракционную систему хлорид-ионов факторы разделения смесей аминокислот увеличиваются за счет резкого уменьшения степени извлечения метионина.

5. Разработана методика экстракционно-спектрофотометрического определения гистидина, метионина, пролина и треонина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках к пище без разрушения многокомпонентной матрицы объекта. Степень извлечения аминокислот из водных растворов таблетированных форм достигает 97-98 % от исходного содержания аналитов. Определяемая концентрация аминокислот в анализируемых объектах методом УФ-спектрофотометрии составляет 2.5×10^{-4} моль/дм³, время анализа – 35-40 мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition [Текст] / G. Wu // *Amino Acids*. – 2009. – Vol. 37. P. 1 – 17.
2. Tilborg A. Pharmaceutical salts and cocrystals involving amino acids: a brief structural overview of the state-of-art [Текст] / A. Tilborg, B. Norberg, J. Wouters // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol.74. – P. 411 – 426.
3. Mei H., J. Han, K.D. Klika, K. Izawa, T. Sato, N.A. Meanwell, et al. Applications of fluorine-containing amino acids for drug design [Текст] / H. Mei, J. Han, K.D. Klika, K. Izawa, T. Sato, N.A. Meanwell // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 186. – Article 111826.
4. Klebeko J. Cations of amino acid alkylesters conjugated with an anion from the group of NSAIDs – As tunable pharmaceutical active ionic liquids [Текст] / J. Klebeko, P. Ossowicz-Rupniewska, A. Nowak, E. Kucharska, Ł. Kucharski, W. Duchnik, Ł. Struk, A. Klimowicz, E. Janus // *Journal of Molecular Liquids*. – 2023. – Vol. 384. – Article 122200.
5. Bongioanni A. Amino acids and its pharmaceutical applications: A mini review [Текст] / A. Bongioanni, M.S. Bueno, B.A. Mezzano, M.R. Longhi, C. Garnero // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 613. – Article 121375.
6. Liu A. New pharmaceuticals approved by FDA in 2020: Small-molecule drugs derived from amino acids and related compounds [Текст] / A. Liu, J. Han, A. Nakano // *Chirality*. – 2022. – Vol. 34. – P. 86 – 103.
7. Liu J. Cyclic tailor-made amino acids in the design of modern pharmaceuticals [Текст] / J. Liu, J. Han, K. Izawa, T. Sato, S. White, N. A. Meanwell, V.A. Soloshonok // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 208. – Article 112736.
8. Mokshina N.Y. Separation of binary mixtures of histidine, proline, and methionine in extraction systems based on water-soluble polymers of vinyl series

[Текст] / N.Y. Mokshina, D.V. Bykovskii, G.V. Shatalov, O.A. Pakhomova // Journal of Analytical Chemistry. – 2016. – Т. 71, № 2. – Р. 201 – 204.

9. Головки Е.Н. Доступность аминокислот в белковом питании моногастричных животных [Текст] / Е.Н. Головки, В.Г. Рядчиков, Н.Н. Забашта. – Краснодар.: ФГБНУ СКНИИЖ, 2014. – 300 с.

10. Селеменев В.Ф. Пигменты пищевых производств (меланоидины) [Текст] / В.Ф., Селеменев, О.Б., Рудаков Г.В., Славинская, Н.В. Дроздова. – М.: ДеЛи принт, 2008. – 246 с.

11. Селифонова Е.И. Селективное электрофоретическое разделение ионных форм α -аминокислот [Текст] / Е.И., Селифонова Р.К. Чернова // Известия Саратовского университета. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2012. – Т. 12, вып. 3. – С. 26 – 32.

12. Колобова Е.А. Применение ионных жидкостей на основе имидазола при электрофоретическом определении аминокислот в моче [Текст] / Е.А. Колобова, Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова // Журнал аналитической химии. – 2015. – Т. 70, № 11. – С. 1179 – 1185.

13. Liu L. Chiral ligand exchange capillary electrophoresis with L-dipeptides as chiral ligands for separation of Dns-DL-amino acids [Текст] / L. Liu, P. Bao, J. Qiao, H. Zhang, L. Qi // Talanta. – 2020. – Vol. 217. – Article 121069.

14. Duong H.A. Determination of 10-hydroxy-2-decenoic acid and free amino acids in royal jelly supplements with purpose-made capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection [Текст] / H.A. Duong, M.T. Vu, T.D. Nguyen, M.H. Nguyen, T.D. Mai // Journal of Food Composition and Analysis. – 2020. – Vol. 87. – Article 103422.

15. Tůma P. Monitoring of circulating amino acids in patients with pancreatic cancer and cancer cachexia using capillary electrophoresis and contactless conductivity detection [Текст] / P. Tůma, T. Hložek, J. Kamišová, J. Gojda // Electrophoresis. – 2021. – Vol. 19. – P.1885 – 1891.

16. Tůma P. Plasma levels of creatine, 2-aminobutyric acid, acetyl-carnitine and amino acids during fasting measured by counter-current electrophoresis

in PAMAPTAC capillary [Текст] / P. Tůma, B. Sommerová, D. Koval, M. Šiklová, M. Koc // Microchemical Journal. – 2023. – Vol. 187. – Article 108426.

17. Makeeva D. Determination of native amino acids and lactic acid in *Lactobacillus helveticus* culture media by capillary electrophoresis using Cu^{2+} and β -cyclodextrins as additives [Текст] / D. Makeeva, D. Polikarpova, E. Demyanova, E. Roshchina, T. Vakhitov, L. Kartsova // Journal of Chromatography B. – 2020. Vol. 1156. – Article 122304.

18. Aredes R. S. Evaluation of craft beers through the direct determination of amino acids by capillary electrophoresis and principal component analysis [Текст] / R.S. Aredes, F.C. Peixoto, L.A. Sphaier, F.Ferreira de Carvalho Marques // Food Chemistry. – 2021. – Vol. 344. – Article 128572.

19. Ya-Ling Y. Rapid stacking of amino acids in soybean and *Dendrobium officinale* by on-capillary sandwich derivatization in capillary electrophoresis [Текст] / Y. Ya-Ling, S. Min-Zhen, Z. Si-Chen, J. Cao // Food Research International. – 2022. – Vol. 162. Part B. – Article 112071.

20. Dong M.W. Modern HPLC for Practicing Scientists. [Текст] / M.W. Dong. – John Wiley & Sons, New Jersey. – 2006. – 304 p.

21. Kazan R.M. Determination of amino acids content in tea species using liquid chromatography via pre-column fluorescence derivatization [Текст] / R.M. Kazan, H.A. Seddik, Z.M. Marstani, M.M. Elsutohy, N.G. Yasri // Microchemical Journal. – 2019. – Vol.150. – Article 104103.

22. Teo M. A simplified small-scale workflow for determination of complete protein-bound amino acids using pre-column derivatization HPLC method [Текст] / M. Teo, L.W. Khoo, W. Chew // Journal of Food Composition and Analysis. – 2024. – Vol.135. – Article 106571.

23. Zhu B. A simultaneously quantitative profiling method for 40 endogenous amino acids and derivatives in cell lines using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [Текст] / B. Zhu, L. Li, H. Wei, W. Zhou, W. Zhou, F. Li, P. Lin, J. Sheng, Q. Wang, C. Yan, Y. Cheng // Talanta. – 2020. – Vol.207. – Article 120256.

24. Zhang F. Analysis of plasma free amino acids in diabetic rat and the intervention of Ginkgo biloba leaves extract using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass-spectrometry [Текст] / F. Zhang, D. Li, D. Lu, Y. Lu, R. Zhang, L. Zhao, S. Ji, M. Guo, Y. Du, D. Tang // Journal of Chromatography B. – 2022. – Vol. 1196. – Article 123230.

25. Li F. Automated sample preparation with 6-Aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate and iodoacetamide derivatization reagents for enantioselective liquid chromatography tandem mass spectrometry amino acid analysis [Текст] / F. Li, R. Karongo, D. Mavridou, J. Horak, A. Sievers-Engler, M. Lämmerhofer // Journal of Chromatography A. – 2023. – Vol. 1708. – Article 464349.

26. Silva Maciel L. Derivatization-targeted analysis of amino compounds in plant extracts in neutral loss acquisition mode by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [Текст] / L. Silva Maciel, A. Marengo, P. Rubiolo, I. Leito, K. Herodes // Journal of Chromatography A. – 2021. – Vol. 1656. – Article 462555.

27. Silva Maciel L. Detection and quantification of free amino compounds in selected agricultural by-products with derivatization followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis [Текст] / L. Silva Maciel, D. Malenica, K. Herodes, M. Kass, R. Bhat // Food Chemistry Advances. – 2024. – Vol 4. – Article 100629.

28. Zhou P. Determination of 21 free amino acids in 5 types of tea by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) using a modified 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method [Текст] / P. Zhou, F. Zhao, M. Chen, N. Ye, Q. Lin, L. Ouyang, X. Cai, P. Meng, X. Gong, Y. Wang // Journal of Food Composition and Analysis. – 2019. – Vol. 81. – P. 46 – 54.

29. Ortega A.F. Determination of 27 bovine plasma amino acids and metabolites using zwitterionic-hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with isotope dilution electrospray ionization triple quadrupole liquid chromatography-mass spectrometry and the effect of deproteinization timing

[Текст] / A.F. Ortega, M. E. Van Amburgh // JDS Communications. – 2024. Vol. 5, № 2. – P. 118 – 123.

30. Kuhn D. Determination of free amino acids in dairy whey and its hydrolysates using gas chromatography coupled with mass spectrometry [Текст] / D. Kuhn, C. Schlabit, M. Girolodi, D. Neutzling Lehn, L. Hoehne, C. Fernanda Volken de Souza // International Dairy Journal. – 2023. – Vol. 141. – Article 105626.

31. Turner C. Determination of underivatized amino acids in human plasma using ion pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry [Текст] / C. Turner, H. Refsum, N. E. Bastani // Journal of Chromatography B. – 2023. – Vol.1229. – Article 123893.

32. Qiu X. Determination of free amino acids in five commercial sweetpotato cultivars by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry [Текст] / X. Qiu, R. Reynolds, S. Johanningsmeier, V.D. Truong // Journal of Food Composition and Analysis. – 2020. – Vol. 92. – Article 103522.

33. Öztürk Er E. Determination of seventeen free amino acids in human urine and plasma samples using quadruple isotope dilution mass spectrometry combined with hydrophilic interaction liquid chromatography –Tandem mass spectrometry [Текст] / E. Öztürk Er, B. Özbek, S. Bakırdere // Journal of Chromatography A – 2021. – Vol. 1641. – Article 461970.

34. Barbas-Bernardos C. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the absolute analysis of 17 α D -amino acids in cooked meals [Текст] / C. Barbas-Bernardos, I. Garcia-Perez, M.P. Lorenzo, V. Alonso-Herranz, J. Nicholson, A. Garcia // Journal of Chromatography A. – 2020. – Vol. 1611. – Article 460598.

35. Gargano E.M. Development and validation of a method for simultaneous analysis of hair underivatized amino acids and damage biomarkers, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [Текст] / E.M. Gargano, S. Sell, S. Langhoff, C.-U. Schmidt, S. Wierlacher // Talanta. – 2021. – Vol. 233. – Article 122584.

36. Cunningham G. Development of a robust 30-minute reverse-phase high pressure liquid chromatography method to measure amino acids using widely available equipment and its comparison to current clinical ion-exchange chromatography measurement [Текст] / G. Cunningham, Y. Zhou, M. Summar // Molecular Genetics and Metabolism Reports. – 2022. – Vol. 31. – Article 100868.

37. Han C.Y. Diazo probe-based chemical isotope labeling assisted liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis for sensitive determination of amino acids in biofluids [Текст] / C.Y. Han, L. Ge, C. Zhang, L.N. Ding, P. Wang, F. Yu, S. Wang, L. Zhu, Q. Zhang, Q. Liu, F.L. Liu // Journal of Chromatography B. – 2023. – Vol. 1223. – Article 123724.

38. Desmons A. Direct liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of amino acids in human plasma Direct liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of amino acids in human plasma [Текст] / A. Desmons, E. Thioulouse, J.Y. Hautem, A. Saintier, B. Baudin, A. Lamaziere, C. Netter, F. Moussa // Journal of Chromatography A. – 2020. – Vol. 1622. – Article 461135.

39. Furusho A. Enantioselective three-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of amino acids in the Hayabusa 2 returned samples from the asteroid Ryugu [Текст] / A. Furusho et al // Journal of Chromatography Open. – 2024. – Vol. 5. – Article 100134.

40. Karongo R. Enantioselective multiple heart cutting online two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry of all proteinogenic amino acids with second dimension chiral separations in one-minute time scales on a chiral tandem column [Текст] / R. Karongo, M. Ge, C. Geibel, J. Horak, M. Lammerhofer // Analytica Chimica Acta. – 2021. – Vol. 1180. – Article 338858.

41. Tanács D. Enantioseparation of β^2 -amino acids by liquid chromatography using core-shell chiral stationary phases based on teicoplanin and teicoplanin aglycone [Текст] / D. Tanács, R. Berkecz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, D.W. Armstrong, I. Ilisz, A. Péter // Journal of Chromatography A. – 2021. – Vol. 1653. – Article 462383.

42. Yoshikawa K. Fast enantiomeric separation of amino acids using liquid chromatography/mass spectrometry on a chiral crown ether stationary phase [Текст] / K. Yoshikawa, M. Furuno, N. Tanaka, E. Fukusaki // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2020. – Vol. 130, № 4. – P. 437 – 442.

43. Yuan B. Free amino acids in African indigenous vegetables: Analysis with improved hydrophilic interaction ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and interactive machine learning [Текст] / B. Yuan, W. Lyu, F.F. Dinssa, J.E. Simon, Q. Wu. // Journal of Chromatography A – 2021. – Vol. 1637. – Article 461733.

44. Garcia A. Gas chromatography coupled-to Fourier transform orbitrap mass spectrometer for enantioselective amino acid analyses: Application to pre-cometary organic analog [Текст] / A. Garcia, C. Serra, Q. Blancart Remaury, A.D. Garcia, M. Righezza, C. Meinert, P. Poinot, G. Danger // Journal of Chromatography A. – 2023. – Vol. 1704. – Article 464118.

45. Bheemanapally K. High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric (LC-ESI-MS) methodology for analysis of amino acid energy substrates in microwave-fixed microdissected brain tissue [Текст] / K. Bheemanapally, M.M.H. Ibrahim, K.P. Briski // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2020. – Vol. 184. – Article 113123.

46. Nakano Y. High-sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based chiral metabolic profiling focusing on amino acids and related metabolites [Текст] / Y. Nakano, M. Taniguchi, E. Fukusaki // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2019. – Vol. 127, № 4. – P. 520 – 527.

47. Kumar Kuril A. High-throughput method for Peptide mapping and Amino acid sequencing for Calcitonin Salmon in Calcitonin Salmon injection using Ultra High Performance Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry (UHPLC-HRMS) with the application of Bioinformatic tools [Текст] / A. Kumar Kuril, K. Saravanan // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2024. – Vol. 243. – Article 116094.

48. Piovesana S. Investigation of free seleno-amino acids in extra-virgin olive oil by mixed mode solid phase extraction cleanup and enantioselective hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry [Текст] / S. Piovesana, C.M. Montone, M. Antonelli, C. Cavaliere, G. La Barbera, S. Canepari, R. Samperi, A. Laganà, A.L. Capriotti // Food Chemistry. – 2019. – Vol. 278. – P. 17–25.

49. Emmons R.V. Leveraging multi-mode microextraction and liquid chromatography stationary phases for quantitative analysis of neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine and other non-proteinogenic amino acids [Текст] / R.V. Emmons, E. Karaj, E. Cudjoe, D.S. Bell, L.M. Viranga Tillekeratne, E. Gionfriddo // Journal of Chromatography A. – 2022. – Vol. 1685. – Article 463636.

50. Heininen J. Multiplexed analysis of amino acids in mice brain microdialysis samples using isobaric labeling and liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry [Текст] / J. Heininen, U. Julku, T. Myöhänen, T. Kotiaho, R. Kostainen // Journal of Chromatography A. – 2021. – Vol. 1656. – Article 462537.

51. Wang X. Optimization of Microwave-Ultrasound-assisted Enzymatic Hydrolysis extraction of iodine amino acids in laminaria by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector [Текст] / X. Wang, J. Xu, L. Wang, X.Gao, X. Fu, Y. Zhao // Algal Research. – 2019. – Vol. 39. – Article 101452.

52. Pawellek R. Performance of ion pairing chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to charged aerosol detection for the analysis of underivatized amino acids [Текст] / R. Pawellek, U. Holzgrabe // Journal of Chromatography A. – 2021. – Vol. 1659. – Article 462613.

53. Temerdashev A. Phthalylglycyl chloride as a derivatization reagent for determination of urinary amino acids using ultra high-performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry [Текст] / A. Temerdashev, P.N. Nesterenko, S.N. Atapattu, Y.Q. Feng, M. Zorina, K. Zhurkina, E. Gashimova, M.O. Steshin, V.V. Dotsenko // Journal of Chromatography Open. – 2024. – Vol. 6. – Article 100162.

54. Guo L. Quality control of pollen products in the market by quantitative analysis of total amino acids with liquid chromatography [Текст] / L. Guo, Q. Shen, J. Dai // Heliyon. – 2024. –Vol. 10 (16). –Article 35833.

55. Tsunoda M. Quantification of amino acids in small volumes of palm sweat samples [Текст] / M. Tsunoda, T. Tsuda // Heliyon. – 2024. –Vol. 10 (17). –Article 36286.

56. Xu J. Quantification of underivatized amino acids in solid beverages using high-performance liquid chromatography and a potentiometric detector [Текст] / J. Xu, Y. Wang, J. Jiang, X. Li, Y. Xu, W. Song // Journal of Chromatography A. – 2023. –Vol. 1696. –Article 463986.

57. DeArmond P.D. Quantitation of non-derivatized free amino acids for detecting inborn errors of metabolism by incorporating mixed-mode chromatography with tandem mass spectrometry [Текст] / P.D. DeArmond, D.R. Bunch // Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab. – 2022. –Vol. 25. – P. 1 – 11.

58. Wu Q. Quantitative mass spectrometry imaging of amino acids with isomer differentiation in brain tissue via exhaustive liquid microjunction surface sampling–tandem mass tags labeling–ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry [Текст] / Q. Wu, Y. Li, Y. Wang, H. Lu. // Journal of Chromatography A. – 2020. –Vol. 1621. –Article 461086.

59. Custodio-Mendoza J.A. Rapid and efficient high-performance liquid chromatography-ultraviolet determination of total amino acids in protein isolates by ultrasound-assisted acid hydrolysis [Текст] / J.A. Custodio-Mendoza, P. Pokorski, H. Aktas, M.A. Kurek // Ultrasonics Sonochemistry. – 2024. –Vol. 111. –Article 107082.

60. Li X.M. RSM optimization of fermentation technology of yellow wine produced from Millets rice (containing Daylily and Agaricus blazei Murr) and analysis of volatile aroma constituents and amino acid contents by GC–MS and HPLC [Текст] / X.M. Li, Y. Zhang, S. Guo, R.F. Dai // Food Chemistry: X. – 2024. –Vol. 23. –Article 101567.

61. Moldovan R.C. Selectivity evaluation of phenyl based stationary phases for the analysis of amino acid diastereomers by liquid chromatography coupled with mass spectrometry [Текст] / R.C. Moldovan, E. Bodoki, A.C. Servais, J. Crommen, R. Oprean, M. Fillet // *Journal of Chromatography A.* – 2019. – Vol. 1590. – P. 80 – 87.

62. Öztepe T. Separation of the enantiomers of underivatized amino acids by using serially connected dual column high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [Текст] / T. Öztepe, N.B. Kale, T. Reçber, I. Baysal, S. Yabanoglu-Çiftçi, M. Gumustas, S. Kır, B. Chankvetadze, E. Nemutlu // *Journal of Chromatography A.* – 2022. – Vol. 1683. – Article 463529.

63. Ozaki M. Simultaneous analysis of DL-Amino acids in foods and beverages using a highly sensitive chiral resolution labeling reagent [Текст] / M. Ozaki, T. Nakade, M. Shimotsuma, A. Ikeda, T. Kuranaga, H. Takeya, T. Hirose // *Journal of Chromatography B.* – 2024. – Vol. 1244. – Article 124239.

64. Wang T. Simultaneous detection of 10 cancer-associated amino acids and polyamines by high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry in pleural effusion cells obtained from lung adenocarcinoma patients [Текст] / T. Wang, Y. Pan, X. Hu, W. Ren, L. Li, J. Huang // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2024. – Vol. 251. – Article 116418.

65. Wang J. Simultaneous determination of human plasma 5 amino acid neurotransmitters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Establishment of reference intervals in Chinese adult population and application to patients with schizophrenia [Текст] / J. Wang, L. Cui, G. Pan, Y. Li, X. Sun, Y. Zhang, F. Zhao, Y. Cao // *Clinica Chimica Acta.* – 2024. – Vol. 552. – Article 117650.

66. Peng M.Z. Simultaneous quantification of 48 plasma amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry to investigate urea cycle disorders [Текст] / M.Z. Peng, Y.N. Cai, Y.X. Shao, L. Zhao, M.Y. Jiang, Y.T. Lin, X. Yin, H.Y. Sheng, L. Liu // *Clinica Chimica Acta.* – 2019. – Vol. 495. – P. 406 – 416.

67. Li J. Simultaneous determination of 24 free amino acids in MGC803 cells by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry [Текст] / J. Li, Q.L. Wang, Y. Liu, Y. Ke, Q.Q. Fan, P. Zhou, M.C. An, H.M. Liu // Journal of Chromatography B. – 2019. – Vol. 1132. – Article 121792.

68. Zhao L. Simultaneous determination of 49 amino acids, B vitamins, flavonoids, and phenolic acids in commonly consumed vegetables by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry [Текст] / L. Zhao, X. Zhao, Y. Xu, X. Liu, J. Zhang, Z. He // Food Chemistry – 2021. – Vol. 344. – Article 128712.

69. Chen B. Simultaneous quantification of multiple amino acid adducts from sulfur mustard-modified human serum albumin in plasma at trace exposure levels by ultra-high performance liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry after propionyl derivatization [Текст] / B. Chen, Z. Ren, T. Zhang, H. Yu, Z.B. Shu, C. Liu, Y. Yang, P. Xu, S. Liu // Journal of Chromatography A. – 2022. – Vol. 1678. – Article 463354.

70. Horak J. Stereoselective separation of underivatized and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate derivatized amino acids using zwitterionic quinine and quinidine type stationaryphases by liquid chromatography–High resolution mass spectrometry [Текст] / J. Horak, M. Lammerhofer // Journal of Chromatography A. – 2019. – Vol. 1596.– P. 69 – 78.

71. Salido-Fortuna S. Synthesis and characterization of carnitine-based ionic liquids and their evaluation as additives in cyclodextrin-electrokinetic chromatography for the chiral separation of thiol amino acids [Текст] / S. Salido-Fortuna, M.I. Fernández-Bachiller, M.L. Marina, M. Castro-Puyana // Journal of Chromatography A. – 2022. – Vol. 1670. – Article 462955.

72. Konya Y. Ultrafast simultaneous chiral analysis of native amino acid enantiomers using supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry [Текст] / Y. Konya, Y. Izumi, K. Hamase, T. Bamba // Journal of Chromatography A. – 2022. – Vol. 1677. – Article 463305.

73. Soares T.F. A micro-extraction/derivatization method for RP-HPLC-FLD analysis of amino acids in wild boar meat [Текст] / T.F. Soares, S. Machado, J.D. Palmeira, R.T. Torres, M. Beatriz P.P., Oliveira, R.C. Alves // Journal of Food Composition and Analysis. – 2024. – Vol. 131. – Article 106264.

74. Lee S.Y. Recent Advances in Protein Extraction Using Ionic Liquid-based Aqueous Two-phase Systems [Текст] / S.Y. Lee, I. Khoiroh, C.W. Ooi, T. Chuan Ling & Pau Loke Show // Separation & Purification Reviews. – 2017. – Vol. 46, № 4. – P. 291-304.

75. Korchak P.A. Amino acid ionic liquids as components of aqueous biphasic systems for L-tryptophan extraction: Experiment and thermodynamic modeling with ePC-SAFT equation of state [Текст] / P.A. Korchak, E.A. Safonova, A.I. Victorov // Journal of Molecular Liquids. – 2022. – Vol. 366. – Article 120185.

76. Li Z. Analysis of amino acids in blood by combining zeolitic imidazolate framework-8-based solid phase extraction and capillary electrophoresis [Текст] / Z. Li, Jia Wu, L. Jia // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2019. – Vol. 168. – P. 30 – 37.

77. Cai C. Aqueous two-phase system based on pH-responsive polymeric deep eutectic solvent for efficient extraction of aromatic amino acids [Текст] / C. Cai, S. Ma, F. Li, Z. Tan // Food Chemistry. – 2024. – Vol. 430. – Article 137029.

78. Wang P.Y. A rapid and efficient method of microwave-assisted extraction and hydrolysis and automatic amino acid analyzer determination of 17 amino acids from mulberry leaves [Текст] / P.Y. Wang, F.F. Shuang, J.X. Yang, Y.X. Jv, R.Z. Hu, T. Chen, X.H. Yao, W.G. Zhao, L. Liu, D.Y. Zhang // Industrial Crops and Products. – 2022. – Vol. 186. – Article 115271.

79. Chen J. Determining of 18 amino acids in plasma of pregnant women with sleep disorders by UHPLC-MS/MS [Текст] / J. Chen, Y. Qiu, J. Guo, L. Shan, G. Chen, F. Wang, W. Wang // Journal of Chromatography B. – 2024. – Vol. 1241. – Article 124163.

80. Söğütlü İ. Extraction of some essential amino acids using aqueous two-phase systems made by sugar-based deep eutectic solvents [Текст] / İ. Söğütlü, S.M. Saeed, M. Adil, A. Yadav, E.A. Mahmood, M.J. Saadh // RSC Adv. – 2023. – Vol. 13. – P. 19674 – 19681.

81. Yan Y. Enhancing the recovery of complex amino acids from excess sludge via low-intensity ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis [Текст] / Y. Yan, Z. Fu, J. Wan, Y. Zhang, J. Gao, J.W. Wang // Chemical Engineering Journal. – 2024. – Vol. 489. – Article 151179.

82. Szopa D. Evaluation of the feasibility of using inorganic and organic acids for the extraction of amino acids from high-protein material (mealworm larvae) by chemical hydrolysis [Текст] / D. Szopa, G. Izydorczyk, K. Chojnacka, A. Witek-Krowiak // Journal of Environmental Management. – 2024. – Vol. 349. – Article 119479.

83. Tanja C.W. Extraction and analysis of free amino acids and 5'-nucleotides, the key contributors to the umami taste of seaweed [Текст] / C.W. Tanja Moerdijk-Poortvliet, D.L.C. de Jong, R. Fremouw, S. de Reu, J.M. de Winter, K. Timmermans, G. Mol, N. Reuter, G.C.H. Derksen // Food Chemistry. – 2022. – Vol. 370. – Article 131352.

84. Nath S.K. Extraction of amino acid (L-aspartic acid) from aqueous stream using trioctylamine [Текст] / S.K. Nath, A. Kumar, F.M. Antony, D.Z. Shende, K.L. Wasewar // Journal of the Indian Chemical Society. – 2023. – Vol. 100, № 4. – Article 100956.

85. Park J.S. Extraction of edible oils and amino acids from eel by-products using clean compressed solvents: An approach of complete valorization [Текст] / J.S. Park, V.C. Roy, S.Y. Kim, S.C. Lee, B.S. Chun // Food Chemistry. 15 September. – 2022. – Vol. 388. – Article 132949.

86. López R. Green and simple extraction of free seleno-amino acids from powdered and lyophilized milk samples with natural deep eutectic solvents [Текст] / R. López, R. D'Amato, M. Trabalza-Marinucci, L. Regni, P. Proietti, A. Maratta, S. Cerutti, P. Pacheco // Food Chemistry. – 2020. – Vol. 326. – Article 126965.

87. Yu Y.L. In situ extraction and enrichment of multiple amino acids by integrated mechanochemical extraction and aqueous two-phase system [Текст] / Y.L. Yu, H.F. Jin, Y. Shi, F.M. Liu, J. Cao, L.H. Ye // *Microchemical Journal*. – 2024. – Vol. 200. – Article 110392.

88. Qiu J. Integration of solid phase extraction with HILIC-MS/MS for analysis of free amino acids in source water [Текст] / J. Qiu, C. Craven, N. Wawryk, K. Carroll, X.F. Li // *Journal of Environmental Sciences*. – 2022. – Vol. 117. – P. 190 – 196.

89. Omar K.A. Novel ninhydrin-based deep eutectic solvents for amino acid detection [Текст] / K.A. Omar, R. Sadeghi // *Journal of Molecular Liquids*. – 2020. – Vol. 303. – Article 112644.

90. Omar K.A. Novel Nonanol-Based deep eutectic solvents: Thermophysical properties and their applications in Liquid-Liquid extraction and amino acid detection [Текст] / K.A. Omar, R. Sadeghi // *Journal of Molecular Liquids*. – 2021. – Vol. 336. – Article 116359.

91. Soares T.F. A micro-extraction/derivatization method for RP-HPLC-FLD analysis of amino acids in wild boar meat [Текст] / T.F. Soares, S. Machado, J.D. Palmeira, R.T. Torresb, M. Beatriz, P.P. Oliveira, R.C. Alves // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2024. – Vol. 131. – Article 106264.

92. Das P.R. Profiling of volatile and non-phenolic metabolites-Amino acids, organic acids, and sugars of green tea extracts obtained by different extraction techniques [Текст] / P.R. Das, Y. Kim, S.J. Hong, J.B. Eun // *Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 296. – P. 69 – 77.

93. Yao T. Selective separation and simultaneous recoveries of amino acids by temperature-sensitive magnetic ionic liquid aqueous biphasic system [Текст] / T. Yao, C. Feng, W. Chen, S. Chen // *Journal of Molecular Liquids*. – 2023. – Vol. 371. – Article 121099.

94. Poddar S. Recovery of l-tryptophan from dilute aqueous feed by extractive solvent sublation and solvent extraction methods and optimization

[Текст] / S. Poddar, J. Khanam // Journal of Molecular Liquids. – 2022. – Vol. 351. – Article 118627.

95. Luo F. Ionic liquid as regenerable media for simultaneous recovery of melanin and amino acid from waste human hair: An elaborate and efficient biorefining approach [Текст] / F. Luo, Z. Liu, Z. Chen // Sustainable Chemistry and Pharmacy. – 2023. – Vol. 35. – Article number 101219.

96. Bernal J.L. Use of supercritical fluid extraction and gas chromatography–mass spectrometry to obtain amino acid profiles from several genetically modified varieties of maize and soybean, [Текст] / J.L. Bernal, M.J. Nozal, L. Toribio, C. Diego, R. Mayo, R. Maestre // Chromatographia A. – 2008. – V. 1192, № 2. – P. 266 – 272.

97. Varae M. Supercritical fluid extraction of free amino acids from sugar beet and sugar cane molasses [Текст] / M. Varae, M. Honarvar, M.H. Eikani, M.R. Omidkhah, N. Moraki // The Journal of Supercritical Fluids. – 2019. – Vol. 144. – P. 48 – 55.

98. Timoumi R. Ultrasound assisted extraction of amino acids and nucleobases from clay minerals and astrobiological samples [Текст] / R. Timoumi, P. Amaniampong, A.L. Postollec, M. Obrijevic, G. Rioland, B. Gregoire, P. Poinot, C.G. Rodier // Ultrasonics Sonochemistry. – 2024. – Vol. 103. – Article 106775.

99. Kowalska S. Simple extraction procedure for free amino acids determination in selected gluten-free flour samples [Текст] / S. Kowalska, E. Szlyk, A. Jastrzębska // European Food Research and Technology. – 2022. – Vol. 248. – P. 507 – 517.

100. Shrimant N. Quantification of Amino Acids in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC–MS/MS) [Текст] / N. Shrimant, K. Panaskar, K. Susheel, Singh // Chromatographia. – 2023. – Vol. 86. – P. 567 – 572.

101. Chikurova N. Y. Novel Adsorbents for the Determination of Amino Acids in Soil Extracts by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with

Mass Spectrometric Detection [Текст] / N.Y. Chikurova, A.V. Gorbovskaia, A.N. Stavrianidi, E.S. Fedorova, A.O. Shemyakina, A.K. Buryak, A.S. Uzhel, A.V. Chernobrovkina, O.A. Shpigun // Journal of Analytical Chemistry. – 2023. – Vol. 78. – P. 922 – 932.

102. Bessonova E. A. Metabolic Profiling of Carboxylic Acids and Amino Acids in the Biological Fluids of Patients Diagnosed with Endometriosis Using Liquid (HPLC-UV) and Gas (GC-MS) Chromatography [Текст] / E.A. Bessonova, A.T. Araslanova, A.I. Lazaretova, I.E. Govorov, S.I. Sitkin, L.A. Kartsova // Journal of Analytical Chemistry. – 2023. – Vol. 78. – P. 1469 – 1479.

103. Ikeda A. Novel cavity design using calix[n]arene skeletons: toward molecular recognition and metal binding. [Текст] / A. Ikeda, S. Shinkai / Chem. Rev. – 1997. – Vol. 97, № 5. – P. 1713 – 1734.

104. Ummat V. Green extraction of proteins, umami and other free amino acids from brown macroalgae *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus* [Текст] / V. Ummat, Marco Garcia-Vaquero, Mahesha M. Poojary, Marianne N. Lund, Colm O'Donnell, Z. Zhang, B.K. Tiwari // Journal of Applied Phycology. – 2021. – Vol. 33. – P. 4083 – 4091.

105. Oshima T. Development of aromatic ethers as solvents for a calix[6]arene derivative and extraction of amino acids and proteins [Текст] / T. Oshima, T. Asano, A. Inada, K. Ohto, K. Jumina // Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2022. – Vol. 102. – P. 507 – 514.

106. Toklu S. Tissue and plasma free amino acid detection by LC-MS/MS method in high grade glioma patients [Текст] / S. Toklu, R. Kemerdere, T. Kacira, M.S. Gurses, F.B. Aksungar, T. Tanriverdi // Journal of Neuro-Oncology. – 2023. – Vol. 163. – P. 293 – 300.

107. Рунова О.Б. Разработка условий прямого количественного определения аминокислот в биологических лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия [Текст] / О.Б. Рунова, М.Г. Коротков, О.Б. Устинникова // Химико-фармацевтический журнал. – 2021. – Т. 55, № 6. – С. 53 – 58.

108. Li Y. Trace determination of fifteen free amino acids in drinking source water via solid-phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry [Текст] / Y. Li, Z. Liu, S. Chen, Y. Wu, J. Liang, Z. Dang & Yun Liu // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2023. – Vol. 30. – P. 594 – 605.

109. Kim D.B. Quantification of 21 free amino acids in traditional and nontraditional soybean pastes [Текст] / D.B. Kim, T.G. Nam, S. Lee, S. Kim, D.W. Seo, M. Yoo // *Journal of Food Measurement and Characterization*. – 2021. – Vol. 15. – P. 3569 – 3579.

110. Armion A., Experimental free amino acids selective extraction by supercritical carbon dioxide: modelling and optimization [Текст] / A. Armion, A. Vaziri, B. Honarvar, R. Fazaeli, N. Esfandiari // *Journal of Food Measurement and Characterization*. – 2023. – Vol. 17. – P. 5081 – 5092.

111. Kutlu N. An optimization study for amino acid extraction from bee bread using choline chloride-acetic acid deep eutectic solvent and determination of individual phenolic profile [Текст] / N. Kutlu, Y.C. Gerçek, S. Çelik, S. Bayram, N.E. Bayram // *Journal of Food Measurement and Characterization*. – 2024. – Vol. 18. – P. 1026 – 1037.

112. Temtrirath K. A UHPLC-PDA method for the quantitative analysis of total amino acids in infant formula with microwave-assisted acid hydrolysis [Текст] / K. Temtrirath // *Chemical Papers*. – 2022. – Vol. 76. – P. 3065 – 3076.

113. Alterman M. A. (Ed.) Amino acid analysis: methods and protocols (Second edition) [Текст] / M. A. Alterman. – Springer New York: Humana Press. – 2019. – P. 455.

114. Florez N. Microwave assisted water extraction of plant compounds. [Текст] / N. Florez, E. Conde, H. Domínguez // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 90, № 4. – P. 590 – 607.

115. Kamaraj S. Recent Review on the Extraction and Qualitative Assay of Cysteine and Other Amino Acids from Vellore Feather Waste and Molecular Docking Studies of Cysteine for Pharmacological Applications [Текст] / S. Kamaraj, S. Vuppu // *Molecular Biotechnology*. – 2025. – Vol. 67. – P. 2902–2930.

116. Ares A.M. Determination of Free Amino Acids in Bee Pollen by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection [Текст] / A.M. Ares, M.T. Martín, L. Toribio, J. Bernal // Food Analytical Methods. – 2022. – Vol. 15. – P. 2172 – 2180.
117. Nassiri M. Modified vortex-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled to high-performance liquid chromatography for determination of amino acids in human plasma and seawater specimens [Текст] / M. Nassiri, S.H. Hashemi, A. Chabari // Journal of the Iranian Chemical Society. – 2021. – Vol. 18. – P. 3007 – 3016.
118. Ranjbari E. Optimization of magnetic stirring assisted dispersive liquid–liquid microextraction of rhodamine B and rhodamine 6G by response surface methodology: Application in water samples, soft drink, and cosmetic products [Текст] / E. Ranjbari, M.R. Hadjmohammadi // Talanta. – 2015. – Vol. 139. – P. 216 – 225.
119. Zhao J. High-throughput and high-sensitivity capillary electrophoresis–mass spectrometry method for sulfur-containing amino acids [Текст] / J. Zhao, B. Dong, Y. Zhao, J. Yang, P. Pei, X. Ji & Yulian Quan // Journal of Analytical Science and Technology. – 2021. – Vol. 12. – Article number 43.
120. Huang H. Enantioselective extraction of unprotected amino acids coupled with racemization [Текст] / H. Huang, Y. Jin, M.E. Shirbhate et al. // Nature Communications. – 2021. – Vol.12, № 1. – Article number 125.
121. Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера в 3 т. Т.1 Основы биохимии, строение и катализ [Текст] / Д. Нельсон, М. Кокс. – М.: Лаборатория знаний, 2020. – 749 с.
122. Комов В.П., Биохимия [Текст] / В.П., Комов, В.Н. Шведова. – М.: Дрофа, 2004. – 638 с.
123. Шелковникова В.В. Определение метионина в лекарственных препаратах методом инверсионной вольтамперометрии [Текст] / В.В. Шелковникова, А.М. Алтыева, М.Е. Виноградов // Журнал аналитической химии. – 2019. – Т. 74, № 12. – С. 934 – 940.

124. Тюнина Е.Ю. Молекулярные взаимодействия l-гистидина в водном буферном растворе в интервале температур 288–313 К [Текст] / Е.Ю. Тюнина, В.Г. Баделин, А.А. Курицына // Журнал физической химии. – 2020. – Т. 94, № 4. – С. 557 – 563.

125. Давыдова Е.Г. Спектрофотометрическое определение пролина в водном растворе [Текст] / Е.Г. Давыдова, Д.Л. Котова, Т.А. Крысанова, В.Ф. Селеменев // Журнал аналитической химии. – 2005. – Т.60, № 8. – С. 802–805.

126. Yi J. Simultaneous determination of plasma total homocysteine and methionine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [Текст] / J. Yi., Ch.-L. Sun, H.-H. Lee // Clin. Chim. Acta. – 2017. – Vol. 464. – P. 93.

127. Тюнина Е Ю. Термодинамические свойства l-метионина и никотиновой кислоты в водном буферном растворе [Текст] / Е.Ю. Тюнина, В.И. Смирнов, Г.Н. Тарасова // Журнал физической химии. – 2020. – Т. 94, № 11. – С. 1629 – 1635.

128. Чернова Р.К. Избирательное определение гистидина в смешанных растворах α -аминокислот [Текст] / Р.К. Чернова, О.В. Варыгина, Н.С. Березкина // Известия Саратовского университета. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2015. – Т. 15, № 4. – С. 15 – 21.

129. Markert Y.J. Proline versus charge concept for protein stabilization against proteolytic attack [Текст] / Y.J. Markert, Köditz, R. Ulbrich-Hofmann, U. Arnold // Protein Engineering, Design and Selection.– 2003. – Vol. 16, № 12. – P. 1041 – 1046.

130. Тарчевский И.А. Участие пролина в адаптации растений к действию стресс-факторов и его использование в агробιοтехнологии (обзор) [Текст] / И.А. Тарчевский, А.М. Егорова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58, № 4. – С. 315 – 329.

131. Ткачева Н. Треонин - описание, польза, влияние на организм и лучшие источники [Текст] / Н. Ткачева, Т. Елисеева // Журнал здорового питания и диетологии Т. 7, № 1 [Электронный ресурс]. – 2019.

132. Kuznetsov V.A. Synthesis of N-vinylformamide and 1-vinyl-(1-methacryloyl)-3,5-dimethylpyrazole copolymers and their extraction ability in relation to histidine in water-salt media [Текст] / V.A. Kuznetsov, M.S. Lavlinskaya, I.V. Ostankova, G.V. Shatalov, Kh.S. Shikhaliev, E.A. Ryzhkova. // Polymer bulletin. – 2018. – Vol.75. No. 3. – P. 1237 – 1251.

133. Мокшина Н.Я. Синтез и характеристика экологически безопасных водорастворимых полимеров на основе *N*-виниламида [Текст] / Н.Я. Мокшина, О.А. Пахомова, А.В. Соколова, В.П. Закусилов, И.Е. Кузнецов // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. – 2021. – Т.7 (73), № 3. – С. 306 – 315.

134. Шаталов Г.В. Сополимеры *N*-винилкапролактама с 1-винил- и 1-метакрилоил-3,5-диметилпиразолом в качестве сорбентов незаменимых α -аминокислот в жидко- и твердофазной экстракции [Текст] / Г.В. Шаталов, М.С. Лавлинская, О.А. Пахомова, Н.Я. Мокшина, В.А. Кузнецов // Журнал прикладной химии. – Т. 89, № 1. – 2016. – С. 112 – 118.

135. Успенская М.В. Руководство к практическим и лабораторным работам по технологиям переработки полимеров. [Текст] / М.В. Успенская, М.И. Фокина. – СПб.: Университет ИТМО. – 2022. – 66 с.

136. Марченко Л.А. Исследование закономерностей экстракции пролина из водных растворов с применением поли-*N*-винилпирролидона [Текст] / Л.А. Марченко, Н.Я. Мокшина, О.А. Пахомова, П.В. Иванчура, С.В. Канныкин, В.Н. Ниживенко // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2023. – Т. 393, № 4. – С.15 – 19.

137. Мокшина Н. Я. Экстракция аминокислот и витаминов. [Текст] / Н.Я. Мокшина. – Воронеж: ВГТА. – 2007. – 246 с.

138. Мокшина Н.Я. Исследование экстракции метионина из водных растворов с применением азотсодержащих карбоцепных полимеров [Текст] / Н.Я. Мокшина, П.В. Иванчура, О.А. Пахомова, А.С. Шестаков // Бутлеровские сообщения. – 2024. – Т.77, № 2. – С.88 – 94.

139. Родинков О.В. Основы метрологии физико-химических измерений и химического анализа [Текст] / О.В. Родинков, Н.А. Бокач, А.В. Булатов. – СПб.: ВВМ. – 2010. – 136 с.

140. Якимова Н.М. Аналитическая химия. I. Расчеты в химическом анализе. [Текст] / Н.М. Якимова, И.Д. Кучумова, О.В. Родинков, А.В. Булатов, А.Е. Зеймаль. – СПб.: ВВМ. – 2022. – 53 с.

141. Кузнецов В. А. Влияние строения бокового азольного заместителя на экстракционные способности сополимеров на основе N-виниламидов [Текст] / В.А. Кузнецов, Д.В. Быковский, А.В. Сорокин, М.С. Лавлинская // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2017. – Т. 17, № 5. – С.804–811.

142. Кузнецов В.А. Водорастворимые сополимеры алифатических и циклических N-виниламидов с N-винилимидазолом как эффективные экстрагенты гистидина [Текст] / В.А. Кузнецов, М.С. Лавлинская, Д.В. Быковский, Г.В. Шаталов // Конденсированные среды и межфазные границы. – 2017. – Т.19, №1. – С. 80 – 86.

143. Adamo C. Physically motivated density functionals with improved performances: The modified Perdew–Burke–Ernzerhof model [Текст] / C. Adamo // J. Chem. Phys. – 2002. – Vol. 116. – P. 5933.

144. Dyall K.G. An exact separation of the spin-free and spin-dependent terms of the Dirac–Coulomb–Breit Hamiltonian [Текст] / K.G. Dyall // J. Chem. Phys. – 1994. – Vol. 100. – P. 2118.

145. Laikov D.N. A new class of atomic basis functions for accurate electronic structure calculations of molecules [Текст] / D.N. Laikov // Chem. Phys. Lett. – 2005. – Vol. 416. – P. 116.

146. Laikov D.N. Fast evaluation of density functional exchange-correlation terms using the expansion of the electron density in auxiliary basis sets [Текст] / D.N. Laikov // Chem. Phys. Lett. – 1997. – Vol. 281. – P. 151.

147. Волкова Т.Г. Квантово-химическое моделирование водородных связей в гидроксилсодержащих аминокислотах. [Текст] / Т.Г. Волкова, И.О.

Таланова, И.М. Аликулова // Бутлеровские сообщения. – 2023. – Т.74, № 6. – С.129 – 135.

148. Быковский Д.В. Экстракция метионина в двухфазных водно-солевых системах с циклическими поли-N-виниламидами. [Текст] / Д.В. Быковский, Н.Я. Мокшина, В.А. Кузнецов, Т.Н. Пояркова, Г.В. Шаталов // Известия вузов. Химия и химическая технология. – 2014. –Т.57, №7 – С.73–77.

149. Окатова О.В. Гидродинамические, молекулярные и конформационные характеристики макромолекул статистического сополимера N-метил-N-винилацетамида и N-метил-N-виниламина гидрохлорида [Текст] / О.В. Окатова, И.И. Гаврилова, Н.Н. Ульянова, Е.Ф. Панарин, Г.М. Павлов // Журнал прикладной химии. – 2012. – Т. 85, № 8. – С.1303 – 1310.

150. Мокшина Н.Я. Исследование экстракции треонина сополимерами на основе N-винилформамида [Текст] / Н.Я. Мокшина, О.А. Пахомова, П.В. Иванчура // Известия вузов. Химия и химическая технология. – 2025. – Т. 68, Вып. 10. – С. 58 – 63.

151. Мокшина Н.Я. Экстракционные системы на основе N-винилформамида для извлечения и разделения циклических аминокислот [Текст] / Н.Я. Мокшина, В.М. Шкинев, О.А. Пахомова, Г.В. Шаталов, Б.Я. Спиваков // Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах. – 2020. – Т.492-493, № 1. – С. 13 – 17.

152. Мокшина Н.Я. Межфазное распределение некоторых аминокислот в экстракционных системах на основе сополимеров N-винилформамида [Текст] / Н.Я. Мокшина, О.А. Пахомова, Г.В. Шаталов, И.И. Косинова // Известия вузов. Химия и химическая технология. – 2019. –Т.62. № 1.– С.4–10.

153. Сломинский П.А. Пептидные лекарственные средства: возможности, перспективы и ограничения [Текст] / П.А. Сломинский, М.И. Шадрина // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2018. Т. 36, № 1. – С. 8 – 14.

154. Xu W. Analytical methods for amino acid determination in organisms [Текст] / W. Xu, C. Zhong, C. Zou, B. Wang, N. Zhang // Amino Acids. – 2020. – Vol. 52, № 8. – P.1071.

155. Pretorius C.J. Rapid amino acid quantitation with pre-column derivatization; ultra-performance reverse phase liquid chromatography and single quadrupole mass spectrometry [Текст] / C.J. Pretorius, B.C. McWhinney, B. Sipinkoski, A. Wilce, D. Cox, A. McWhinney, J.P.J. Ungere // Clin. Chim. Acta. – 2018. – Vol. 478. – P. 132.

156. Аскретков А.Д. Определение двадцати протеиногенных аминокислот и добавок в культуральной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [Текст] / А.Д. Аскретков, А.А. Клишин, Д.И. Зыбин, Н.В. Орлова, А.В. Холодова, Н.В. Лобанова, Ю.А. Серегин // Журнал аналитическая химия. – 2020. –Т. 75, № 8. – С. 721 – 729.

157. Vancompernelle B. Optimization of a gas chromatography–mass spectrometry method with methyl chloroformate derivatization for quantification of amino acids in plant tissue [Текст] / B. Vancompernelle, K. Croes, G. Angenon // J. of Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2016. – Vol. 1017-1018. – P. 241 – 249.

158. Калмыков П.А. One-pot определение аминокислот в лекарственных препаратах методом предколоночной дериватизации с фенилизотиоцианатом [Текст] / П.А. Калмыков, Т.П. Кустова, С.О. Кустов, П.С. Шестаковская, Т.Р. Азметов, А.А. Калмыкова // Тонкие химические технологии. – 2024. –Т. 19, № 2. – С. 127 – 138.

159. Bongioanni A. Amino acids and its pharmaceutical applications [Текст] / A. Bongioanni, MS. Bueno, BA. Mezzano, MR. Longhi, C. Garnerio // International Journal of Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 613. – P.121375

160. Mokshina N.Ya. Extraction and determination of histidine, methionine, proline in aqueous solutions and pharmaceutical preparations using N-vinyl-caprolactam copolymers [Текст] / N.Ya. Mokshina, O.A. Pakhomova, P.V. Ivanchura // Journal of Analytical Chemistry. – 2026. – Vol. 81, № 5. – P. 797–802.

ПРИЛОЖЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) RU (11) 2 852 962⁽¹³⁾ C1

(51) МПК
G01N 27/26 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(52) СПК
G01N 27/26 (2025.08); G01N 1/28 (2025.08); G01N 2001/4061 (2025.08)

(21)(22) Заявка: 2025107695, 27.03.2025 (24) Дата начала отсчета срока действия патента: 27.03.2025 Дата регистрации: 16.12.2025 Приоритет(ы): (22) Дата подачи заявки: 27.03.2025 (45) Опубликовано: 16.12.2025 Бюл. № 35 Адрес для переписки: 399770, Липецкая обл., г. Елец, ул. Коммунаров, 28, ФГБОУ ВО "Елецкий государственный университет им. И.А. Бунина"	(72) Автор(ы): Мокшина Надежда Яковлевна (RU), Пахомова Оксана Анатольевна (RU), Моргачева Наталья Викторовна (RU), Иванчура Павел Владимирович (RU) (73) Патентообладатель(и): Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Елецкий государственный университет им. И.А. Бунина" (RU) (56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: MOKSHINA N.Y. et al. Application of water-soluble polymers for extraction separation of amino acids of various structures / / American Journal of Applied Sciences, 2015, v.12(12), pp.1032-1041. RU 2811552 C1, 15.01.2024. RU 2768763 C1, 24.03.2022. МОКШИНА Н.Я. и др. Экстракционные системы на основе N- винилформамида для извлечения и разделения (см. прод.)
---	--

RU 2 852 962 C1

RU 2 852 962 C1

(54) СПОСОБ РАЗДЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРЕОНИНА И ПРОЛИНА

(57) Формула изобретения

Способ раздельного определения треонина и пролина в водной фазе после экстракции водно-солевого раствора треонина и пролина раствором поли-N-винилимидазола в воде, включающий приготовление водно-солевого раствора треонина и пролина, экстракцию и анализ равновесной водной фазы, отличающийся тем, что готовят водно-солевой раствор треонина и пролина с концентрациями 0,015 г/см³ и 0,025 г/см³ соответственно, с содержанием высаливателя сульфата аммония в растворе 20-25% масс., экстрагируют в течение 20-25 мин при температуре 25±1 °С с применением раствора поли-N-винилимидазола с концентрацией 0,15 г/см³, при соотношении объемов водно-солевого раствора треонина и пролина и раствора полимера 10:3, отделяют водную фазу от органической и центрифугируют ее в течение 10 мин при 5000 об/мин, определяют содержание треонина и пролина в водной фазе после экстракции электрофоретическим методом с УФ-детектированием, рассчитывают коэффициенты распределения D и степени извлечения треонина и пролина R, %.

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по научной и инновационной деятельности
ИГУ им. И.А. Бунина
Моргаткина С.Н.
2026 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Авторы внедрения:

1. Мокшина Надежда Яковлевна (ЕГУ им. И.А.Бунина, д.х.н., профессор кафедры химико-биологических дисциплин и фармакологии; ВУНЦ ВВС «ВВА», профессор кафедры физики и химии)
2. Пахомова Оксана Анатольевна (ЕГУ им. И.А.Бунина, к.х.н., доцент кафедры химико-биологических дисциплин и фармакологии)
3. Моргаткина Наталья Викторовна (ЕГУ им. И.А.Бунина, к.п.н., заведующий кафедры химико-биологических дисциплин и фармакологии)
4. Иванчура Павел Владимирович (ЕГУ им. И.А.Бунина, аспирант кафедры химико-биологических дисциплин и фармакологии)

Источник предложения: материалы патента № 2852962 «Способ отдельного определения треонина и пролина».

Объект внедрения: методика отдельного определения треонина и пролина, включающая экстракцию их смеси раствором поли-N-винилимидазола, электрофоретический анализ водной фазы и селективное определение каждой аминокислоты.

Внедрено: на кафедре химико-биологических дисциплин и фармакологии ЕГУ им. И.А.Бунина при проведении учебных занятий у студентов по направлениям подготовки 33.05.01 Фармация и 04.03.01 Химия.

Заключение: использование предложения позволило извлекать треонин и пролин из водного раствора с 98%-ой степенью извлечения без применения органических растворителей, а также отдельно определять аминокислоты методом электрофоретического анализа водной фазы с УФ-детектированием.

Зав. кафедрой химико-биологических дисциплин
и фармакологии ЕГУ им. И.А. Бунина,
к.п.н., доцент

Н.В. Моргаткина

Заместитель декана
по образовательной деятельности

О.Б. Гладких