

## ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

УДК 543.544:544.77

### **АЛИФАТИЧЕСКИЕ КАРБОНОВЫЕ КИСЛОТЫ КАК НОВЫЕ МОДИФИКАТОРЫ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ 2,4-ДИНИТРОФЕНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ МИЦЕЛЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

© 2006 А. П. Бойченко, А. Ю. Куликов, Л. П. Логинова

Исследованы возможности разделения 2,4-динитрофенильных производных аминокислот методом мицеллярной жидкостной хроматографии. Впервые как модификаторы мицеллярных подвижных фаз на основе додецилсульфата натрия использованы уксусная, пропионовая, масляная, валериановая, гексановая кислоты. Показаны преимущества алифатических карбоновых кислот как модификаторов мицеллярных элюентов для разделения веществ кислотной природы.

#### **1. Введение**

Несмотря на существующие специализированные аминокислотные анализаторы, первый из которых появился еще в 1958 году [1], не прекращаются поиски быстрых, чувствительных и простых методик аминокислотного анализа с использованием стандартного хроматографического оборудования [2-5]. Использование высокоэффективной или ион-парной жидкостной хроматографии наиболее уместно, когда аминокислотный анализ выполняется в лаборатории эпизодически или необходимо определить только некоторые из аминокислот [6]. Основными проблемами при аминокислотном анализе являются: (i) большие различия в полярности аминокислот, так как боковые группы некоторых из них заряжены в широком диапазоне значений pH; (ii) низкие коэффициенты поглощения света в УФ-области для большинства свободных аминокислот [7]. Во избежание этих трудностей проводят пред- или послеколоночную дериватизацию аминокислот, получая производные, пригодные для спектрофотометрического или флуоресцентного детектирования, более гидрофобные, чем исходные аминокислоты. Послеколоночная дериватизация неудобна тем, что требует дополнительного нестандартного оборудования, вызывающего уширение хроматографических пиков. В настоящее время для разделения смесей аминокислот обычно используют обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ОФ-ВЭЖХ) с градиентным элюированием и предколоночной дериватизацией аминокислот.

Альтернативой ОФ-ВЭЖХ является мицеллярная жидкостная хроматография (МЖХ) [8], в которой используется стандартная аппаратура для ОФ-ВЭЖХ, а подвижной фазой являются растворы поверхностно-активного вещества (ПАВ) с концентрацией выше критической концентрации мицеллообразования, содержащие небольшие добавки органических растворителей-модификаторов [9]. Еще в начале развития МЖХ ряд свободных аминокислот и пептидов, поглощающих в УФ-области, использовались в качестве тестовых компонентов для изучения элюирующей силы и селективности разделения [10-12]. Было показано, что для оптимизации разделения в МЖХ необходимо одновременное изменение как концентрации поверхностно-активного вещества, так и содержания органического модификатора [10-12].

Известны попытки аналитического применения МЖХ для разделения аминокислот в виде: (i) дансильных производных (детектор по флуоресценции) [13,14]; (ii) изоиндольных производных с пред- или послеколоночной дериватизацией *o*-фталальдегидом и *N*-ацетил-*L*-цистеином (УФ-детектирование) [15]; (iii) фенилтиогидантоиновых производных (УФ-детектирование) [16]. Кроме того, с применением мицеллярных элюентов изучена зависимость удерживания изоиндольных производных аминокислот от их гидрофобности [17].

С использованием мицеллярных элюентов на основе додецилсульфата натрия и алифатических спиртов в качестве модификаторов достигнуто разделение 11 дансильных производных [13,14] (с существенным перекрытием между пиками аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, транс-4-гидроксипролина; общее время разделения больше 60 мин). Разделение изоиндольных производных аминокислот с предколоночной дериватизацией оказалось неудовлетворительным [15]. Недавно путем планирования эксперимента для выбора концентрации до-

децилсульфата натрия, природы и содержания модификатора и pH удалось разделить лишь 9 фенилтиогидантоиновых производных аминокислот с близкими характеристиками гидрофобности [16].

Насколько нам известно, ни в одной из работ, посвященных разделению аминокислот методом МЖХ, в качестве дериватизирующего реагента не применялся 2,4-динитрофторбензол (ДНФБ). При этом ДНФБ был первым реагентом, предложенным для определения N-концевых аминогрупп в протеинах [18,19], и до сих пор успешно применяется для получения производных аминокислот [20,21].

Настоящая работа посвящена поиску возможностей разделения 2,4-динитрофенильных производных аминокислот (ДНФ-аминокислот) методом МЖХ.

## 2. Экспериментальная часть

### 2.1 Аппаратура

В работе использовался жидкостный хроматограф Hewlett Packard 1050 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), с автосамплером, спектрофотометрическим детектором с возможностью регулировать длину волны и интегратором HP 3395. Хроматографические колонки: Kromasil C18 (5 мкм, 200 мм × 4.6 мм, Merck KgaA, Darmstadt, Germany), LiChrospher 100 RP18e (5 мкм, 150 мм × 4.6 мм), Hypersil ODS (5 мкм, 125 мм × 4.6 мм). Для измерения pH применялся pH-метр Beckman Instruments (Fullerton, USA) со стеклянным электродом, предварительно градуированным по стандартным буферным растворам с pH 1.68; 3.56; 4.01 и 6.86 при 25 °С. Для интенсификации процесса растворения ДНФ-аминокислот использовали ультразвуковую баню Super RK100H (Bandelin, Germany).

### 2.2 Реагенты и условия хроматографирования

Для приготовления подвижных фаз использовался додецилсульфат натрия (ДДС) с содержанием основного вещества не менее 98 %. Алифатические карбоновые кислоты: масляная, валериановая, гексановая квалификации «ч»; пропионовая «для синтеза» (Merck, Germany). Нормальные спирты: этанол и 1-пентанол квалификации «ч»; 1-пропанол с содержанием основного вещества не менее 99.5 % (Acros); 1-бутанол с содержанием основного вещества не менее 99 % (LAB-SCAN, Ireland). После приготовления все подвижные фазы фильтровали через стеклянный фильтр ПОР16. Во всех экспериментах использовалась бидистиллированная вода.

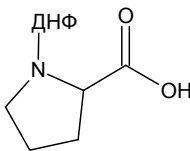
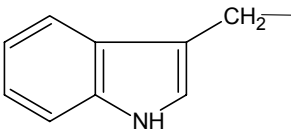
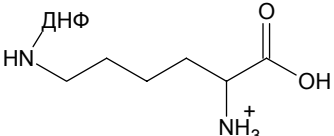
Изократическое разделение проводили при скорости подвижной фазы 1.0 мл/мин. Динитрофенильные производные аминокислот детектировали при 360 нм. Температура колонки  $40.0 \pm 0.1$  °С. Объем вводимой пробы при помощи автосамплера составлял 20 мкл.

Для приготовления стандартных растворов ДНФ-аминокислот использовали реагенты из «Набора 2,4-динитрофенильных производных аминокислот» (Химреактивкомплект). Перечень производных, а также рассчитанные для ДНФ-аминокислот и ДНФБ значения констант распределения в системе октанол-вода ( $\lg P_{o/w}$ ) и рассчитанные значения  $pK_a$  (расч.) для ДНФ-аминокислот в воде представлены в Таблице 1. Стандартный раствор смеси ДНФ-аминокислот готовили растворением навесок производных аминокислот (от 25 мг для наименее гидрофобных и ДНФБ до 50 мг для наиболее гидрофобных (Таблица 1)) в 100 мл метилового спирта с последующим 25-кратным разбавлением в растворе 0.05 М ДДС. Готовый раствор хранили в защищенном от прямых солнечных лучей месте.

### 2.4 Программное обеспечение и базы данных

Для всех расчетов в работе использовались Statistica 6.0, data analysis software system (2004, <http://www.statsoft.com>) и Microsoft Excel (2002, Microsoft Corporation, <http://office.microsoft.com>). Для получения расчетных значений  $\lg P_{o/w}$ ,  $pK_a$  (расч.) в воде использовались программы ACD/Log P и ACD/pK<sub>a</sub> (Advanced Chemistry Development, <http://www.acdlabs.com>). Поиск экспериментально определенных значений  $\lg P_{o/w}$ ,  $pK_a$  проводился в базах данных ACD/Log P DB 4.03 и ACD/pK<sub>a</sub> DB 4.0.

Таблица 1. Графические структуры и расчетные характеристики 2,4-динитрофенильных производных аминокислот и 2,4-динитрофторбензола

№	2,4-динитрофенильные производные аминокислот		pK <sub>a</sub> (COOH) (расч.)	lg P <sub>o/w</sub>
	Название	R		
1	2,4-ДНФ-DL-α-аспарагиновая кислота (ДНФ-Asp)	-CH <sub>2</sub> -COOH	3.53±0.23 (4.79±0.19)	1.6±0.4
2	2,4-ДНФ-L-глутаминовая кислота (ДНФ-Glu)	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	3.53±0.10 (4.79±0.10)	1.0±0.4
3	2,4-ДНФ-DL-треонин (ДНФ-Thr)	-CH(CH <sub>3</sub> )-OH	3.35±0.10	1.1±0.4
4	2,4-ДНФ-глицин (ДНФ-Gly)	-H	3.75±0.10	1.6±0.3
5	1-фтор-2,4-динитробензол (ДНФБ)			1.2±0.3
6	2,4-ДНФ-DL-пролин (ДНФ-Pro)		3.84±0.40	2.6±0.4
7	2,4-ДНФ-DL-метионин (ДНФ-Met)	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SCH <sub>3</sub>	3.59±0.10	2.8±0.4
8	2,4-ДНФ-D-валин (ДНФ-Val)	-CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub>	3.77±0.10	2.8±0.3
9	2,4-ДНФ-D-триптофан (ДНФ-Trp)		3.76±0.10	3.6±0.4
10	2,4-ДНФ-лейцин (ДНФ-Leu)	-CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub>	3.78±0.21	3.3±0.3
11	(2,4-ДНФ) <sub>2</sub> -DL-тирозин (ДНФ <sub>2</sub> -Tyr)	-CH <sub>2</sub> -Ph-O-ДНФ	3.61±0.10	5.9±0.5
12	2,4-ДНФ-L-аргинин (ДНФ-Arg)	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-C(NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )=NH	3.71±0.21 (pK <sub>a</sub> (NH <sub>3</sub> ) = 13.60±0.36)	0.7±0.6
13	ε-2,4-ДНФ-DL-лизин (ДНФ-Lys)		2.53±0.24 (pK <sub>a</sub> (NH <sub>3</sub> ) = 9.90±0.13)	2.2±0.4

### 3. Результаты и обсуждение

Значения логарифмов констант распределения ДНФ-аминокислот в системе октанол-вода изменяются в широких пределах: от 1.0 для ДНФ-Glu до 5.9 для ДНФ<sub>2</sub>-Tyr. Кроме того, ДНФ-Arg и ДНФ-Lys существуют в виде катионных форм практически во всем диапазоне pH, доступном при использовании обращенно-фазовых колонок на основе силикагеля. Такое разнообразие свойств разделяемых веществ в случае ОФ-ВЭЖХ требует применения градиентного

режима, который уступает изократическому разделению по простоте методик, чувствительности и воспроизводимости [23]. Дополнительные проблемы возникают в случае аминокислотных производных, которые в исследуемом диапазоне pH представлены несколькими сосуществующими протолитическими формами. Тогда градиентное элюирование может осложняться сдвигом равновесия между этими формами. МЖХ обладает по сравнению с ОФ-ВЭЖХ большими возможностями при разделении веществ с различной гидрофобностью в изократическом режиме, который и использован в данной работе.

### 3.1 Оптимизация разделения ДНФ-аминокислот методом МЖХ

В ходе предварительных экспериментов в качестве подвижных фаз для разделения ДНФ-аминокислот применялись растворы додецилсульфата натрия, модифицированные различными добавками этанола, 1-пропанола и 1-бутанола. Из них наиболее подходящим для достижения приемлемой элюирующей силы оказался 1-пропанол, широко используемый как модификатор мицеллярных подвижных фаз на основе ДДС при разделении смеси веществ с разной гидрофобностью [9,24].

Оптимальный состав подвижной фазы искали с помощью симплекс-алгоритма, часто применяемого в аналитической химии [25-29]. В ходе оптимизации варьировали три параметра, наиболее существенно влияющих на удерживание и селективность в МЖХ: а) концентрацию ДДС; б) концентрацию модификатора (1-пропанол); в) pH подвижной фазы. Качество разделения на каждой хроматограмме оценивали по значению функции  $CRF$  (critical response function), предложенной Берриджем [29] в 1982 г., и эффективно используемой до настоящего времени в МЖХ [30-32]:

$$CRF = \sum_{i=1}^L R_i + L^x - a(t_L - t_M) - b(t_0 - t_1) \quad (1)$$

где  $R_i$  — разделение соседних пиков, рассчитанное как  $(t_i - t_{i-1})/(t_i + t_{i-1})$ ;  $L$  — общее количество зафиксированных пиков;  $t_M$  — желаемое время анализа,  $t_L$  — время выхода последнего пика;  $t_0$  — минимальное время анализа;  $t_1$  — время выхода первого пика;  $a$ ,  $b$ ,  $x$  — весовые (положительные) коэффициенты.

Параметры  $a$ ,  $b$ ,  $x$  были выбраны таким образом ( $x=1$ ,  $a=0.1$ ,  $b=0.5$ ,  $t_M=40$  мин,  $t_0=2$  мин), чтобы основной вклад в значение  $CRF$  вносило количество разделенных пиков.

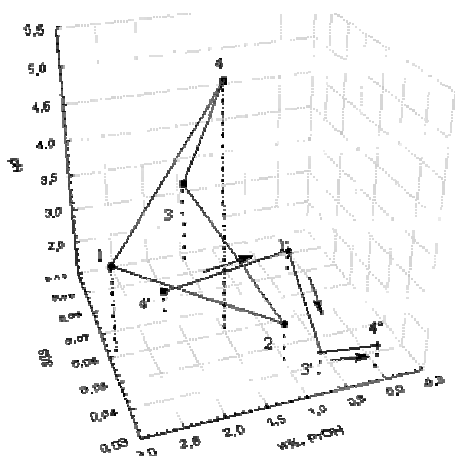
Из четырех подвижных фаз, образующих исходный многогранник, наихудшей оказалась подвижная фаза состава 0.06 М ДДС, 1.5 % 1-пропанола, pH 5.3. Как видно из рисунка 1, движение симплекса к оптимуму соответствует уменьшению pH подвижной фазы (диапазон возможных значений pH для используемых колонок составляет от 2.5 до 9.0). Такое направление оптимизации объяснимо с точки зрения подавления диссоциации карбоксильных групп производных аминокислот, что увеличивает удерживание и часто улучшает разделение. Аналогичный прием — снижение pH — использовался в других работах по разделению аминокислот [15,16]. С другой стороны, движение к оптимуму требует симбатного уменьшения содержания ДДС и 1-пропанола в элюенте (при перемещении в направлении 4' — 4'' концентрация ДДС уменьшается от 0.074 до 0.035 М, содержание 1-пропанола от 2.10 % до 0 %), что не может привести к значительному изменению селективности разделения (Рисунок 2). Полученный результат подтверждает наличие значительных трудностей при разделении производных аминокислот методом МЖХ, с которыми сталкивались другие авторы, использующие мицеллярные элюенты на основе ДДС и спиртов-модификаторов [13-16].

### 3.2 Алифатические карбоновые кислоты как альтернатива алифатическим спиртам для модификации мицеллярных элюентов

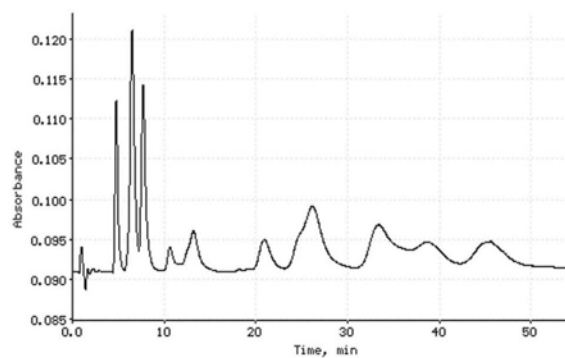
Распределение ДНФ-аминокислот между стационарной фазой C18, динамически модифицированной компонентами мицеллярного элюента, и мицеллярной подвижной фазой регулируется в основном двумя типами взаимодействий: гидрофобными и электростатическими. Электростатическое отталкивание диссоциированных по карбоксильной группе ДНФ-аминокислот от анионных микроагрегатов ДДС в подвижной фазе и на поверхности модифицированной ста-

ционной фазы приводит к тому, что ДНФ-производные заметно удерживаются лишь при значениях pH подвижной фазы ниже  $pK_a$  диссоциации ДНФ-аминокислот по карбоксильной группе. При этом удерживание регулируется гидрофобностью ДНФ-аминокислоты и наличием ионизируемых групп в боковой цепи аминокислоты (Таблица 1).

Рассчитанные значения  $pK_a$  карбоксильной группы ДНФ-аминокислот в водных растворах приблизительно на 1.5 единицы выше, чем для соответствующих свободных аминокислот [22]. Кроме того, при переходе от воды к мицеллярным растворам анионных ПАВ значения  $pK_a$  кислот обычно увеличиваются. Так, для аминокислот в мицеллярных растворах ДДС ранее наблюдалось увеличение  $pK_a$  приблизительно на единицу [10-12,17], можно предположить, что для их более гидрофобных производных сдвиг  $pK_a$  будет, по крайней мере, таким же. Отсюда вытекает дополнительное преимущество использования мицеллярных растворов анионных ПАВ в качестве элюентов для разделения аминокислот: область преобладания молекулярных и катионных форм ДНФ-аминокислот сдвигается в сторону значений, заметно превышающих нижнюю границу диапазона pH для хроматографических колонок с алкилпривитыми силикагелями. Это положительно сказывается на воспроизводимости результатов хроматографического разделения.



**Рисунок 1.** Схема движения симплекса к области оптимума (точки 1,2,3,4 — исходный многогранник, направление  $4' - 1' - 3' - 4''$  — движение симплекса).



**Рисунок 2.** Хроматограмма разделения 12 ДНФ-аминокислот и ДНФБ. Колонка: Hypersil ODS. Подвижная фаза: 0.05 М ДДС, pH 2.5 (HCl).

### 3.2.1 Алифатические карбоновые кислоты как модификаторы мицелл ДДС

При использовании традиционных модификаторов-спиртов для поддержания нужного уровня pH в мицеллярные элюенты необходимо вводить дополнительные реактивы, что, естественно, усложняет подготовку подвижной фазы и вызывает необходимость исследовать влияние этих компонентов на селективность разделения в МЖХ. Однако функции pH-поддерживающего компонента подвижной фазы и модификатора мицеллярной псевдофазы можно совместить, используя алифатические карбоновые кислоты.

Модифицирующее влияние карбоновых кислот на мицеллярные характеристики поверхностно-активных веществ исследовано в значительно меньшей степени, чем действие спиртов. В единственной обнаруженной нами работе обсуждается влияние лишь малых добавок уксусной, пропионовой и масляной кислот на критическую концентрацию мицеллообразования ДДС [33]. Установлено, что алифатические карбоновые кислоты, также как и соответствующие спирты, снижают критическую концентрацию мицеллообразования и стабилизируют мицеллы ДДС, уменьшая свободную энергию переноса углеводородной цепи ПАВ из водной среды в мицеллу ДДС.

Гидрофобные свойства алифатических карбоновых кислот и спиртов с одинаковым количеством углеродных атомов весьма близки между собой (Таблица 2). Интересно также, что отношения плотности соединения к его молекулярной массе, которые напрямую связаны с молярным объемом, имеют одинаковые значения для карбоновой кислоты и соответствующего спирта (Таблица 2). Это позволяет предположить, что для кислоты и спирта с одинаковым чис-

лом углеродных атомов близкими будут и характеристики распределения в системе вода-мицеллярная псевдофаза, а также их свойства как ко-ПАВ. Однако различия в свойствах карбоксильной и спиртовой групп, играющих роль головок в смешанных мицеллах, могут сказываться на состоянии как поверхности микроагрегата ДДС в подвижной фазе, так и поверхности модифицированной стационарной фазы. Следовательно, можно ожидать изменения селективности разделения при замене в мицеллярном элюенте спиртов-модификаторов на соответствующие кислоты.

До настоящего времени алифатические карбоновые кислоты применялись как компоненты мицеллярных подвижных фаз лишь однажды — для хирального разделения нескольких энантиомеров фармацевтических препаратов [39], где подвижной фазой были растворы неионогенного поверхностно-активного вещества Tween 20. Выбор карбоновых кислот был обусловлен их ионогенными свойствами, поскольку повышение концентрации неионогенных веществ в мицеллярном элюенте приводит к уменьшению степени разделения энантиомеров при использовании хиральных хроматографических колонок CHIRAL-AGP.

**Таблица 2.** Физико-химические характеристики алифатических карбоновых кислот и спиртов [34]

Спирт	$\lg P_{o/w}$	$pK_a$ в воде	Молярная масса, М, $\text{г}\cdot\text{моль}^{-1}$	Плотность, $d, \text{г}\cdot\text{см}^{-3},$ 25 °С	$\frac{d}{M},$ $\text{моль}\cdot\text{см}^{-3}$	Молярный объем, $\text{л}\cdot\text{моль}^{-1}$
Этанол	-0.30		46.07	0.789	0.0171	0.0585
1-пропанол	0.25		60.10	0.804	0.0134	0.0746
1-бутанол	0.88		74.12	0.811	0.0109	0.0917
1-пентанол	1.56		88.15	0.818	0.00928	0.108
1-гексанол	2.03		102.18	0.814	0.00797	0.126
<b>Карбоновая кислота</b>						
Уксусная	-0.17	4.76	60.05	1.049	0.0175	0.0571
Пропионовая	0.33	4.87	74.08	0.993	0.0134	0.0746
Бутановая (масляная)	0.79	4.81	88.11	0.964	0.0109	0.0917
Пентановая (валериановая)	1.39	4.86	102.13	0.939	0.00919	0.109
Гексановая (капроновая)	1.92	4.85	116.16	0.927	0.00798	0.125

### 3.2.2 Влияние алифатических карбоновых кислот на разделение ДНФ-аминокислот в МЖХ

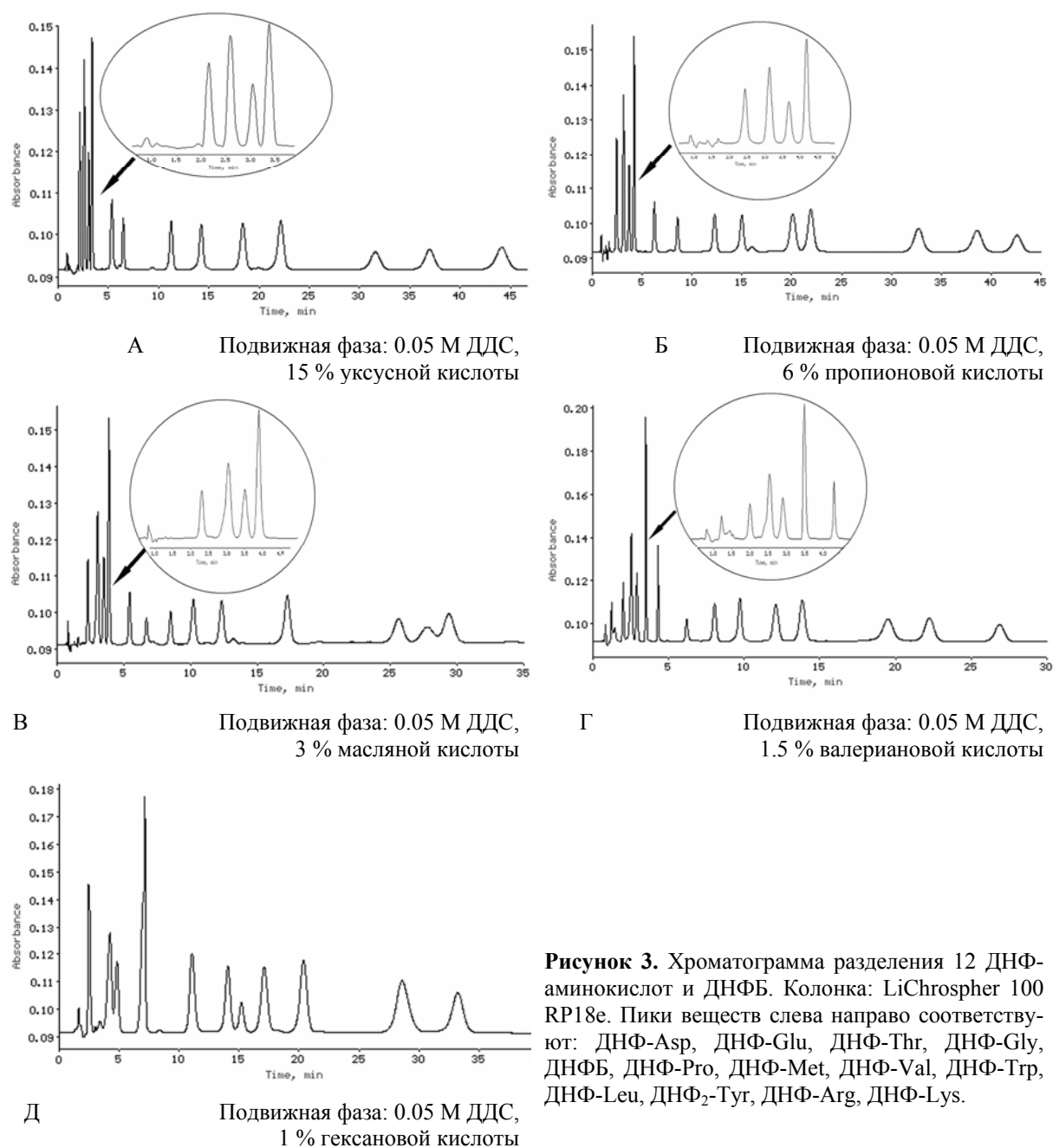
Обычно содержание ПАВ в подвижной фазе выражают в единицах молярной концентрации, а добавки модификатора, по аналогии с ОФ-ВЭЖХ — значениями объемной доли [9,35] и лишь иногда в единицах молярной концентрации [36,37]. Действительно, поскольку в химических реакциях и процессах распределения принимают участие частицы реагентов (молекулы, ионы и т.д.), их активное действие корректнее характеризовать количеством вещества, и при описании реакций в растворах молярная концентрация предпочтительнее других способов выражения концентраций (объемные, массовые доли и т.д.) [38]. В случае спирта и кислоты с одинаковым числом атомов углерода равенство молярных концентраций  $c(R)$  соответствует равенству значений объемной доли  $\varphi\%$ , поскольку в соотношении:

$$c(R) = 10 \frac{d(R)}{M(R)} \varphi\% \quad (2)$$

отношение плотности к молярной массе одинаково для кислоты и спирта (Таблица 2).

В качестве модификаторов исследованы алифатические карбоновые кислоты с числом углеродных атомов от 2 до 6. Концентрацию каждой кислоты выбирали, руководствуясь известными данными о влиянии спиртов с соответствующим числом углеродных атомов на элюирующую силу мицеллярных элюентов [40]. На рисунке 3 показаны хроматограммы, полученные при разделения 12 ДНФ-аминокислот и ДНФБ с использованием в качестве подвижной фазы раствора 0.05 М ДДС, содержащего алифатические карбоновые кислоты со значениями объемной доли: (i) 15 % уксусной кислоты (Рисунок 3А); (ii) 6 % пропионовой кислоты (Рисунок 3Б);

(iii) 3 % масляной кислоты (Рисунок 3В); (iv) 1.5 % валериановой кислоты (Рисунок 3Г); (v) 1 % гексановой кислоты (Рисунок 3Д). Сопоставление хроматограмм на рисунках 2 и 3 свидетельствует о пригодности алифатических карбоновых кислоты как модификаторов мицеллярного элюента на основе ДДС, поскольку их введение увеличивает эффективность разделения по сравнению с мицеллярными элюентами без модификаторов (Рисунок 2). Модифицирующее действие кислот аналогично действию спиртов: как и в случае спиртов [41], на элюирующую силу мицеллярного элюента влияет длина углеводородного радикала карбоновой кислоты. При увеличении длины углеводородного радикала на одну  $\text{CH}_2$ -группу добавка кислоты, необходимая для достижения той же элюирующей силы, уменьшается в 1.5-2 раза. Эта закономерность соблюдается для всех изученных кислот, за исключением уксусной кислоты. Менее выраженное влияние уксусной кислоты на элюирующую силу можно объяснить ее низкой гидрофобностью (Таблица 2) и, следовательно, меньшей возможностью выступать в качестве ко-ПАВ.

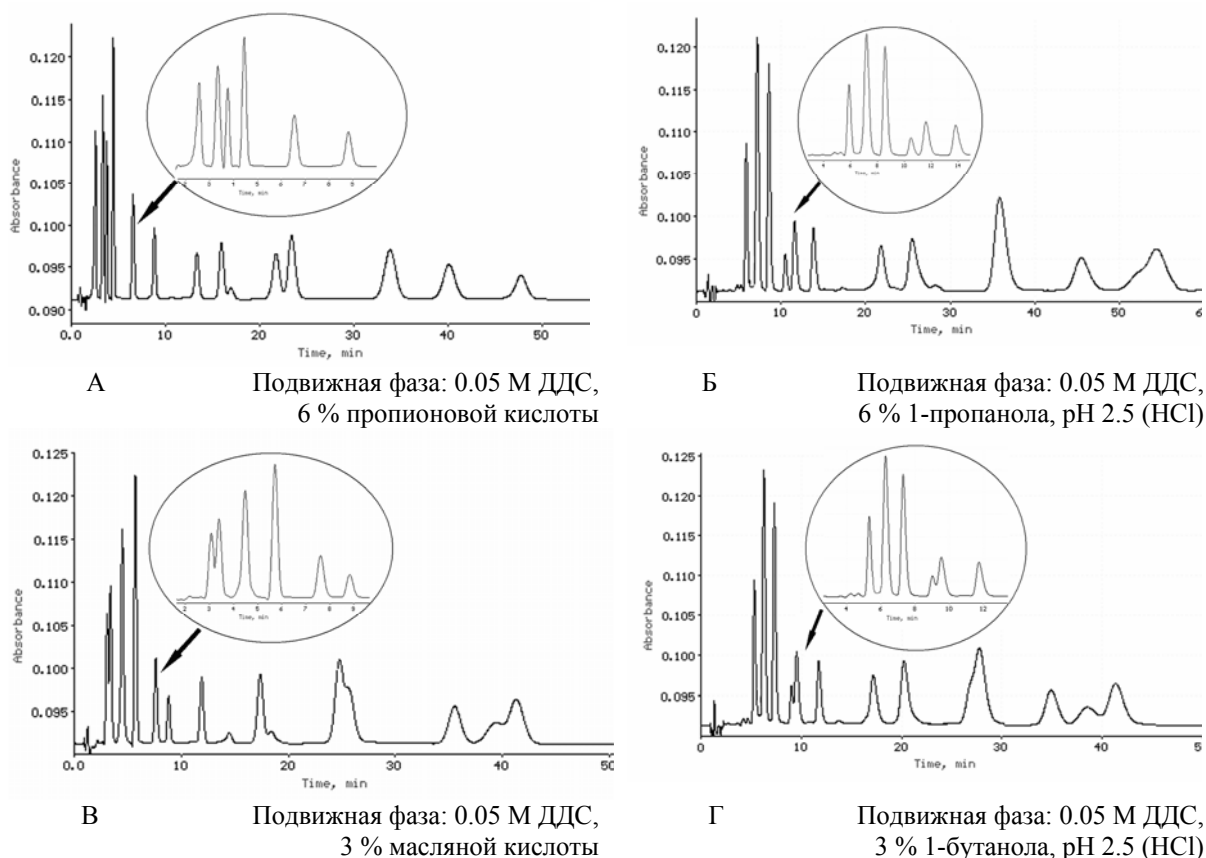


**Рисунок 3.** Хроматограмма разделения 12 ДНФ-аминокислот и ДНФБ. Колонка: LiChrospher 100 RP18e. Пики веществ слева направо соответствуют: ДНФ-Asp, ДНФ-Glu, ДНФ-Thr, ДНФ-Gly, ДНФБ, ДНФ-Pro, ДНФ-Met, ДНФ-Val, ДНФ-Trp, ДНФ-Leu, ДНФ<sub>2</sub>-Tyr, ДНФ-Arg, ДНФ-Lys.

Природа карбоновых кислот влияет также и на селективность разделения ДНФ-аминокислот, о чем свидетельствуют изменения в разрешении пиков. Например, при использо-

вании масляной кислоты не разделяются пики ДНФ-Trp и ДНФ-Leu, а также наблюдается перекрывание пиков ДНФ-Arg и ДНФ-Lys. В присутствии гексановой кислоты селективность разделения значительно отличается от результатов, полученных в присутствии уксусной, пропионовой, масляной и валериановой (Рисунок 3).

В работе [15] наблюдалось раздвоение пиков для изоиндолных производных триптофана, изолейцина и валина при pH 3 подвижной фазы, что объяснено сосуществованием молекулярной и ионной форм производных аминокислот. В нашей работе раздвоения пиков не наблюдалось даже при использовании гексановой кислоты с объемной долей 1 %, что соответствует наиболее высокому значению pH подвижной фазы. По-видимому, во всех подвижных фазах, содержащих добавки карбоновых кислот, доминируют формы ДНФ-аминокислот с недиссоциированной карбоксильной группой. Действительно, при введении в эти подвижные фазы добавок HCl, снижающих pH до предельно возможного значения 2.5, времена удерживания ДНФ-аминокислот практически не менялись.



**Рисунок 4.** Хроматограмма разделения 12 ДНФ-аминокислот и ДНФБ. Колонка: Kromasil C18. (Пик 4 на хроматограммах Б и Г соответствует пику динитрофенола, образовавшемуся в ходе хранения стандартного раствора).

На рисунке 4 сопоставлены хроматограммы, полученные с использованием алифатических карбоновых кислот и спиртов в качестве модификаторов (колонка Kromasil C18). Очевидно, что при введении алифатической карбоновой кислоты вместо спирта-модификатора и подкисляющего реагента (HCl) значительно улучшается селективность разделения большинства пар пиков ДНФ-аминокислот. Это создает новые перспективы для расширения области применения МЖХ в анализе веществ кислотной природы.

#### 4. Выводы

Алифатические карбоновые кислоты с числом углеродных атомов от 2 до 6 могут служить модификаторами мицеллярных элюентов, содержащих ДДС. При разделении веществ кислотного характера число компонентов мицеллярных подвижных фаз может быть уменьшено



за счет двойной функции карбоновых кислот: рН-поддерживающей и модифицирующей мицеллы ПАВ. Элюирующая сила гибридных мицеллярных элюентов на основе ДДС и алифатических карбоновых кислот увеличивается в ряду: уксусная < пропионовая < масляная < валириановая < гексановая. Применение мицеллярных подвижных фаз, содержащих ДДС и алифатические карбоновые кислоты, позволило достичь лучшего, по сравнению с известными работами, результата разделения производных аминокислот методом МЖХ: 12 ДНФ-аминокислот в присутствии дериватизирующего реагента ДНФБ. По нашему мнению, интересным представляется исследование возможностей применения алифатических карбоновых кислот как модификаторов мицеллярных элюентов для разделения методом МЖХ других классов кислотных веществ.

### Литература

1. Spackman D.H., Stein W.H., Stanford M. Automatic Recording Apparatus for use in the chromatography of Amino Acids // *Anal. Chem.* — 1958. — Vol. 30. — P. 1191-1206.
2. Molnar-Perl I. Role of chromatography in the analysis of sugars, carboxyl acids and amino acids in food (Review) // *J. Chromatogr. A* — 2000. — Vol. 891. — P. 1-32.
3. Fountoulakis M., Lahm H. Hydrolysis of amino acid composition analysis of proteins (Review) // *J. Chromatogr. A* — 1998. — Vol. 826. — P. 109-134.
4. Molnar-Perl I. Tryptophan analysis in peptides and proteins, mainly by liquid chromatography (Review) // *J. Chromatogr. A* — 1997. — Vol. 763. — P.1-10.
5. Molnar-Perl I. Quantitation of amino acids and amines in the same matrix by high-performance liquid chromatography, either simultaneously or separately // *J. Chromatogr. A* — 2003. — Vol. 987. — P. 291-309.
6. Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А., Зельвенский В.Ю., Ганкина Э.С., Шатц В.Д. Аналитическая хроматография. — М.: Химия, 1993. — 464 с.
7. Хеншен А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. — М.: Мир, 1988. — 688 с.
8. Kulikov A.U., Verushkin A.G., Loginova L.P. Comparison of Micellar and Reversed-Phase Liquid Chromatography for Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim // *Chromatographia* — Vol. 61. — 2005. — P. 455-463.
9. Berthod A., Garcia-Alvarez-Coque M.C. *Micellar Liquid Chromatography*. — New York: Marcel Dekker, 2000. — 632 p.
10. Kord A., Khaledi M.G. Controlling solvent strength and selectivity in micellar liquid chromatography: role of organic modifiers and micelles // *Anal. Chem.* — 1992. — Vol. 64. — P. 1894-1900.
11. Kord A.S., Khaledi M.G. Selectivity of organic solvents in micellar liquid chromatography of amino acids and peptides // *J. Chromatogr.* — 1993. — Vol. 631. — P. 125-132.
12. Rodjers A.H., Khaledi M.G. Influence of pH on retention and selectivity in micellar liquid chromatography: consequence of micellar-induced shifts of ionization constants // *Anal. Chem.* — 1994. — Vol. 66. — P. 327-334.
13. Takeuchi T., Miwa T. Selectivity of dansyl amino acids in micellar liquid chromatography with an ion-exchange-induced stationary phase // *Chromatographia* — 1996. — Vol. 43. — P. 143-148.
14. Takeuchi T. Micelles for signal enhancement and novel selectivity of dansyl amino acids // *J. Chromatogr. A* — 1997. — Vol. 780. — P. 219-228.
15. Lopez-Grijo S., Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J., Garcia-Alvarez-Coque M.C. Micellar liquid chromatography of amino acids using pre- and post-column o-phthalaldehyde/N-acetylcysteine derivatization // *Anal. Chim. Acta* — 2000. — Vol. 418. — P. 153-165.
16. Safa F., Hadjmohammadi M.R. Simultaneous optimization of the resolution and analysis time in micellar liquid chromatography of phenyl thiohydantoin amino acids using Derringer's desirability function // *J. Chromatogr. A* — 2005. — Vol. 1078 — P. 42-50.
17. Medina-Hernandez M.J., Catala-Icardo M., Garcia-Alvarez-Coque M.C. Correlation between hydrophobicity of amino acids and retention data in reversed-phase liquid chromatography with micellar eluents // *Chromatographia* — 1995. — Vol. 41. — P. 455-461.

18. Sanger F. The free amino groups in insulin // *Biochem. J.* — 1945. — Vol. 39. — P. 507-515.
19. Sanger F., Thompson E.O.P. The amino-acids sequence in the glycyll chain of insulin // *Biochem. J.* — 1953. — Vol. 53. — P. 353-366.
20. Ryu J.W., Kim D.W., Lee K.P., Pyo D., Park J.H. Chiral separation of 2,4-dinitrophenyl amino acids using 3-*O*-methyl- $\beta$ -cyclodextrin-bonded stationary phase in reversed phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A* — 1998. — Vol. 814. — 247-252.
21. Wang F., Chen X., Chen Q., Qin X., Li Z. Determination of neurotoxin 3-N-oxalyl-2,3-diaminopropionic acid and non-protein amino acids in *Lathyrus sativus* by precolumn derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene // *J. Chromatogr. A* — 2000. — Vol. 883. — 113-118.
22. The protein handbook. Reference data for biochemists — USA: Neither ISCO inc., 1997. — 82 p.
23. Tcherkas Y.V., Kartsova L.A., Krasnova I.N. Analysis of amino acids by isocratic reversed phase high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A* — 2001. — Vol. 913. — 303-308.
24. Estevo-Romero J., Carda-Broch S., Gil-Agusti M., Capella-Peiro M.-E., Bose D. Micellar liquid chromatography for the determination of drug materials in pharmaceutical preparations and biological samples (Review) // *Trends Anal. Chem.* — Vol. 24. — 2005. — P. 75-91.
25. Пирогов А.В., Обрезков О.Н., Шпигун О.А. Симплекс-алгоритм — инструмент поиска оптимальных условий анализа. Применение в жидкостной хроматографии // *Журн. аналит. химии* — 1997. — Т. 52. — С. 1014-1021.
26. Berridge J.C. Simplex optimization of high-performance liquid chromatography separations // *J. Chromatogr. A* — 1989. — Vol. 485. — P. 3-14.
27. Morgan S.L., Deming S.N. Simplex optimization of analytical chemical methods // *Anal. Chem.* — 1974. — Vol. 46. — P. 1170-1181.
28. Ryan P.B., Barr R.L., Todd H.D. Simplex techniques for nonlinear optimization // *Anal. Chem.* — 1980. — Vol. 52. — P. 1460-1467.
29. Berridge J.C. Unattended optimization of reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations using the modified simplex algorithm // *J. Chromatogr.* — 1982. — Vol. 244. — P. 1-14.
30. Ghorbani A.R., Momenbeik F., Khorasani J.H., Amini M.K. Simultaneous micellar liquid chromatographic analysis of water-soluble vitamins: optimization using super-modified simplex // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2004. — Vol. 379. — P. 439-444.
31. Srijaranai S., Burakham R., Khammeng T., Deming R.L. Use of the simplex method to optimize the mobile phase for the micellar chromatographic separation of inorganic ions // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2002. — Vol. 374. — P. 145-147.
32. Momenbeik F., Momeni Z., Khorasani J.H. Separation and determination of vitamins E and A in multivitamin syrup using micellar liquid chromatography and simplex optimization // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 2005. — Vol. 37. — P. 383-387.
33. Bakshi M.S. Micelle formation by sodium dodecylsulphate in water additive systems // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* — 1996. — Vol. 69. — P. 2723-2729.
34. <http://www.sigmaaldrich.com>
35. Garcia-Alvarez-Coque M.C., Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J. Description of the partitioning behavior of solutes and data treatment in micellar liquid chromatography with modifiers // *Anal. Chim. Acta* — 1996. — Vol. 324. — P. 163-173.
36. Loginova L.P., Samokhina L.V., Boichenko A.P., Kulikov A.U. Micellar liquid chromatography retention model based on mass-action concept of micelle formation // *J. Chromatogr. A* — 2006. — Vol. 1104. — P. 190-197.
37. Boichenko A.P., Iwashchenko A.L., Loginova L.P., Kulikov A.U. Heteroscedasticity of retention factor and adequate modeling in micellar liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta* — 2006. — Vol. 576. — P. 229-238.
38. Dobbs A.J. Concentration units in water chemistry // *Pure Appl. Chem.* — 1999. — Vol. 61. — P. 1511-1515.

39. Haupt D., Pettersson C., Westerlund D. Enantiomeric Separations of Remoxipride, Propranolol, and Trimipramine on CHIRAL-AGP using micellar liquid chromatography // *Chirality* — 1993. — Vol. 5. — P. 224-228.
40. Kulikov A.U., Loginova L.P., Samokhina L.V. Influence of Various Factors on the Chromatographic Behavior of Cytostatic Antibiotics of Rubomicin Derivatives in Micellar Liquid Chromatography // *Chromatographia* — Vol. 57. — 2003. — P. 463-469.
41. Dorsey J.G., DeEchegaray M.T. Efficiency enhancement in micellar liquid chromatography // *Anal. Chem.* — 1983. — Vol. 55. — P. 922-928.

*Поступила в редакцию 19 апреля 2006 г.*

Kharkov University Bulletin. 2006. №731. Chemical Series. Issue 14(37). A. P. Boichenko, A. Yu. Kulikov, L. P. Loginova. Aliphatic carboxylic acids as new modifiers for separation of 2,4-dinitrophenyl derivatives of amino acids by micellar liquid chromatography.

The possibilities of separation of 2,4-dinitrophenyl derivatives of amino acids by micellar liquid chromatography were investigated. For the first time acetic, propionic, butyric, pentanoic and hexanoic acids were studied as modifiers of micellar mobile phases contained sodium dodecylsulfate. The advantages of aliphatic carboxylic acids as modifiers of micellar eluent for separation of acidic compounds were demonstrated.