

УДК: 535.37:543.632.6:544.536.2

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ И ФОТОХИМИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОДУКТОВ ИХ РЕАКЦИИ С ОРТОФТАЛЕВЫМ АЛЬДЕГИДОМ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ МОЩНОГО ИМПУЛЬСНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

В.И. Бекетов, Р.Д. Воронина, Н.Б. Зоров

(кафедра лазерной химии; e-mail: beketov@laser.chem.msu.ru)

На примере глицина изучена возможность высокочувствительного определения аминокислот по флуоресценции их производных, образующихся в результате реакции с водными растворами *орто*-фталевого альдегида и нуклеофильных агентов - цианида калия, сульфита натрия и N-ацетил-L-цистеина. Показано, что химическая устойчивость образующихся флуоресцирующих соединений (замещенные изоиндолы) и их фотохимическая устойчивость под воздействием мощного импульсного лазерного излучения выше, а аналитические характеристики реагентов не уступают стандартно используемому реагенту для определения аминокислот – смеси *орто*-фталевого альдегида с 2-меркаптоэтанолом.

Ключевые слова: аминокислоты, флуориметрическое определение, замещенные изоиндолы, лазерное возбуждение, фотохимическая устойчивость.

Методы количественного определения аминокислот вызывают постоянный интерес из-за важности биологических процессов, в которых эти соединения принимают участие. Суть этих методов обычно состоит в разделении смеси и детектировании индивидуальных аминокислот. Эффективными оказались методы разделения и детектирования, основанные на высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [1]. При их разработке основные усилия направлены на увеличение концентрационной чувствительности определения и уменьшение анализируемой пробы. Поскольку растворы природных аминокислот, как правило, слабо поглощают УФ и видимый свет, не обладают сильной собственной флуоресценцией, и их молекулы не имеют электроактивных групп, чувствительность их определения соответственно спектрофотометрическими, флуориметрическими и электрохимическими методами невысока. Для повышения чувствительности определения аминокислот проводят их химическое превращение (derivatization) [2] в том числе и в целях получения сильно флуоресцирующих производных [3]. Особое значение придается разработке методов определения аминокислот в биологических пробах, медицинских препаратах и пищевых продуктах [4–9]. Наиболее распространенным способом derivatization аминокислот является реакция с *орто*-фталевым альдегидом (ОФА) в при-

сутствии нуклеофильного агента (2-меркаптоэтанол (2МЕ)) [10], в результате которой образуются сильно флуоресцирующие продукты – замещенные изоиндолы. Общая схема реакции приведена на рис. 1, где X – какой-либо нуклеофильный агент (2МЕ в стандартно используемой смеси реагентов). Такой метод derivatization с различными нуклеофильными агентами успешно используют для определения:

- нейроактивных аминокислот в плазме человеческой крови [4];
- оптических изомеров [5] и индивидуальных аминокислот [6] в фармацевтических препаратах;
- гомоцистеина и разветвленных аминокислот в биологических жидкостях [7, 8];
- аминокислот и аминов в сыре [9].

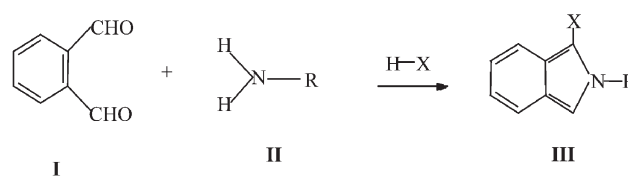


Рис. 1. Принятая схема образования флуоресцирующих (III) продуктов реакции аминокислот (II) с *орто*-фталевым альдегидом (I) в присутствии различных нуклеофильных реагентов. III – (1-X-замещенный)-2-алкил-изоиндол, где алкил – остаток аминокислоты; X – нуклеофильный агент (HSCH₂CH₂OH – 2-меркаптоэтанол), стандартно используемый для флуориметрического определения аминокислот

ВЭЖХ в сочетании с лазерно-индуцированной флуориметрией (ЛИФ) – один из наиболее чувствительных методов определения флуоресцирующих веществ [11]. Принципиальной особенностью ВЭЖХ является малый объем (0,001–10 мкл), в котором происходит детектирование определяемых соединений. Применение ЛИФ как метода детектирования в ВЭЖХ позволяет использовать высокую плотность мощности светового потока возбуждающего излучения. Однако такие возможности в полной мере могут быть реализованы только для достаточно фотоустойчивых систем. Производные аминокислот, образующиеся по стандартной реакции с ОФА и 2МЕ, обладают невысокой химической устойчивостью [10] и под воздействием мощного лазерного излучения быстро разлагаются [12].

Цель настоящей работы – исследование возможности высокочувствительного флуориметрического определения аминокислот по реакции с ОФА в присутствии вновь предложенных нуклеофильных реагентов – цианида калия (KCN), и сульфита натрия (Na_2SO_3); сравнение аналитических характеристик вновь предложенного метода со стандартным; изучение фотохимической устойчивости флуоресцирую-

щих продуктов при облучении мощными импульсами УФ-лазерного излучения.

Экспериментальная часть

В качестве модельного соединения мы взяли аминокислоту – глицин, продукты реакции которой с реагентом ОФА-2МЕ обладают небольшой химической и фотохимической устойчивостью [12] по сравнению с другими аминокислотами. Методика приготовления растворов в боратном буферном растворе (рН 9,18) аналогична описанной ранее [13].

Спектры поглощения соединений регистрировали на спектрофотометре «*Specord UV-Vis*» («*Karl Zeiss-Jena*», Германия), в качестве раствора сравнения использовали деионизованную воду. Спектры флуоресценции продуктов реакции регистрировали на спектрофлуориметре «*Hitachi MPF-2A*» (Япония). Сравнение чувствительности аналитических методик проводили на флуориметре «*Флюорат-02М*» (ООО «Люмекс», Россия) с ксеноновой лампой в качестве источника света. Для возбуждения и регистрации флуоресценции использовали подобранный набор светофильтров. Для изучения фотоустойчивости получаемых продуктов в условиях облучения мощным

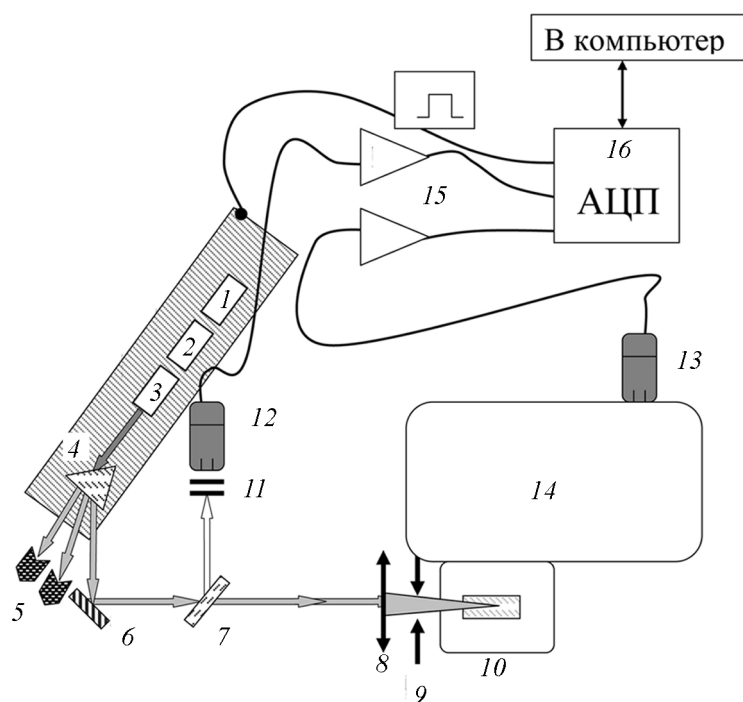


Рис. 2. Схема экспериментальной установки для исследования фотохимической устойчивости продуктов модификации глицина. 1 – излучатель твердотельного лазера ИЛТИ 407, Nd-YAlO; 2 – удвоитель основной гармоники; 3 – смеситель частот для третьей гармоники или удвоитель на четвертую гармонику; 4 – призма; 5 – поглотители излучения первой (ИК) и второй (видимая) гармоник излучения лазера; 6 – алюминиевое зеркало; 7 – делительная кварцевая пластина; 8 – цилиндрическая линза; 9 – диафрагма; 10 – кювета с облучаемым раствором; 11 – ослабляющие светофильтры; 12 – ФЭУ для нормирования люминесценции с учетом значений энергии импульсов лазера; 13 – ФЭУ для измерения флуоресценции; 14 – монохроматор «МУМ-2»; 15 – усилители сигналов «ФЭУ»; 16 – многоканальное устройство АЦП

импульсным УФ-светом была собрана экспериментальная установка, представленная на рис. 2. Излучение четвертой гармоники импульсного лазера на алюминате иттрия (длина волны возбуждения 270 нм, энергия импульса 0,8 мДж, длительность на полувысоте $1,5 \times 10^{-8}$ с, частота следования импульсов 3 Гц) фокусировалась цилиндрической кварцевой линзой в центр кварцевой кюветы сечением 1×10 мм, в которую помещался водный раствор исследуемого производного аминокислоты. Площадь засвечиваемой зоны в фокусе $0,2 \times 5$ мм. Часть излучения лазера отводилась кварцевой пластиной и измерялась фотоэлектронным умножителем «ФЭУ-86» для нормирования спектров с учетом изменяющейся мощности лазерного излучения. Излучение флуоресценции фокусировалось кварцевой линзой на входную щель монохроматора «МУМ-2», настроенного на максимум спектра флуоресценции и измерялось фотоэлектронным умножителем «Hamamatsu R128». Импульсы напряжения, амплитуда которых пропорциональна интенсивности флуоресценции, после усиления подавались на вход «АЦП ADS12-3М» (ЗАО «Инструментальные системы», Россия). У оцифрованных усиленных импульсов напряжения записывалась амплитуда, ее значения усреднялись, нормировались с учетом значения энер-

гии импульсов лазера и в дальнейшем обрабатывались с помощью программы разработанной в лаборатории лазерной диагностики кафедры лазерной химии химического факультета МГУ.

Результаты и обсуждение

Ранее мы показали ряд преимуществ использования новых нуклеофильных агентов (сульфит натрия, цианид калия) для флуориметрического и спектрофотометрического определения аминокислот по реакции с ОФА [13]. Условия проведения реакции (большой избыток ОФА и нуклеофильного агента относительно глицина, рН боратного буфера и комнатная температура (297 ± 2 К)) были подобраны так, чтобы обеспечить быстрое протекание реакции образования флуоресцирующего продукта, малую скорость его разложения и достижение наилучшего предела обнаружения глицина. Схожесть полученных УФ-спектров поглощения и флуоресценции образующихся соединений (рис. 3) и соответствие с литературными данными [3, 14] дает основания утверждать, что при взаимодействии всех изученных смесей реагентов образуются замещенные изоиндолы. Основные условия для флуориметрического и спектрофотометрического определения глицина приведены в табл. 1 и на рис. 3, концентрация ОФА

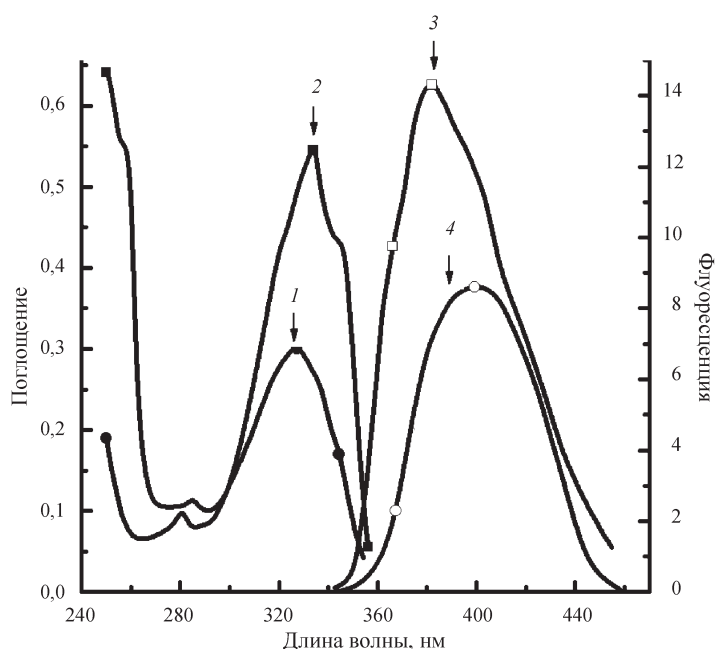


Рис. 3. Спектры поглощения и флуоресценции продуктов взаимодействия глицина (Gly) (5×10^{-5} М) и ОФА (2×10^{-4} М): 1 – поглощение продуктов реакции ОФА–Gly в присутствии 2×10^{-2} М сульфита натрия через 60 мин после смешения растворов реагентов; 2 – поглощение продуктов реакции ОФА–GLY в присутствии 1×10^{-3} М цианида калия через 15 мин после смешения растворов реагентов; 3 – флуоресценция продуктов реакции ОФА–Gly– Na_2SO_3 ; 4 – флуоресценция продуктов реакции ОФА–Gly–KCN

Т а б л и ц а 1

Оптимальные условия (концентрация нуклеофильных агентов и время перед измерением) для определения аминокислотной кислоты по реакции с ОРА при комнатной температуре (298±2К)

Нуклеофильный агент	Оптимальная концентрация, моль/л		Оптимальное время реакции, мин	
	спектрофотометрическое определение	флуориметрическое определение	спектрофотометрическое определение	флуориметрическое определение
KCN	$(1-10) \times 10^{-4}$	$(1-10) \times 10^{-4}$	15	15
Na ₂ SO ₃	1×10^{-3}	1×10^{-2}	15	60
2МЕ*	4×10^{-4}	6×10^{-4}	2	2
NAC**	$1,5 \times 10^{-3}$ ***	2×10^{-4}	10***	5

*2-меркаптоэтанол; **NAC - N-ацетил-L-цистеин HOOCCH(CH₂SH)NHCOCH₃; ***данные из работы [2].

Т а б л и ц а 2

Сравнение аналитических характеристик методов определения глицина по реакции с ОФА в присутствии различных нуклеофильных агентов

Нуклеофильный агент	Длина волны максимума поглощения/ флуоресценции (нм)	Пределы обнаружения (моль/л)	
		флуориметрический метод	спектрофотометрический метод*
2-Меркаптоэтанол	340/450	$1,4 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-6}$ (4200)
KCN	333/385	$4,0 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-7}$ (12500)
Na ₂ SO ₃	328/400	$4,8 \times 10^{-8}$	$2,2 \times 10^{-6}$ (3600)
NAC	337/435	$1,2 \times 10^{-7}$	$5,4 \times 10^{-7}$ (4400)

*В скобках указан расчетный коэффициент молярного поглощения.

во всех экспериментах была 2×10^{-4} М. Результаты сравнения аналитических характеристик приведены в табл. 2. Поскольку аммиак образует флуоресцирующие изоиндолы аналогично схеме, приведенной на рис. 1, то его содержание в используемых реагентах даже в малых концентрациях может существенно влиять на результаты контрольного опыта. Влияние примесей аммиака на рассчитанные аналитические характеристики было особенно заметно при использовании в качестве нуклеофильного агента сульфата натрия.

Линейная зависимость люминесценции от мощности падающего излучения наблюдается только при очень малом количестве возбужденных молекул. При использовании в качестве источников возбуждения достаточно мощных импульсных лазеров число возбужденных молекул в момент действия лазерного импульса может не быть пренебрежимо малым. В таком случае наблюдается отклонение зависимости от линейной в сторону насыщения; в идеальном случае кривая зависимости должна выходить на плато. Используя жидкостные светофильтры из водного

раствора сульфата Cr(III) мы ослабляли энергию импульса возбуждения флуоресценции в диапазоне от 5 до 100%, соответствующий световой поток изменялся от $0,4 \times 10^{24}$ до 7×10^{24} фотон/(см²·с). Зависимость интенсивности флуоресценции продукта дериватизации лейцина от энергии импульсов лазерного излучения представлена на рис. 4. Мы использовали производное лейцина, поскольку это соединение, обладая весьма близкими с аналогичным производным глицина спектральными характеристиками, является более фотоустойчивым [12]. При использованных значениях энергии лазерного импульса и достаточно жесткой фокусировке возбуждающего излучения происходит существенное отклонение от линейной зависимости, однако выхода на плато не наблюдается. Такой вид кривой для флуоресценции жидких растворов не является необычным, а отклонение от идеальной модели с выходом на плато можно объяснить в первую очередь увеличением рассеяния сфокусированного лазерного излучения растворителем (водой) и сбором возбуждаемой рассеянным излучением флуоресценции из периферийных областей кюветы с анализируемым

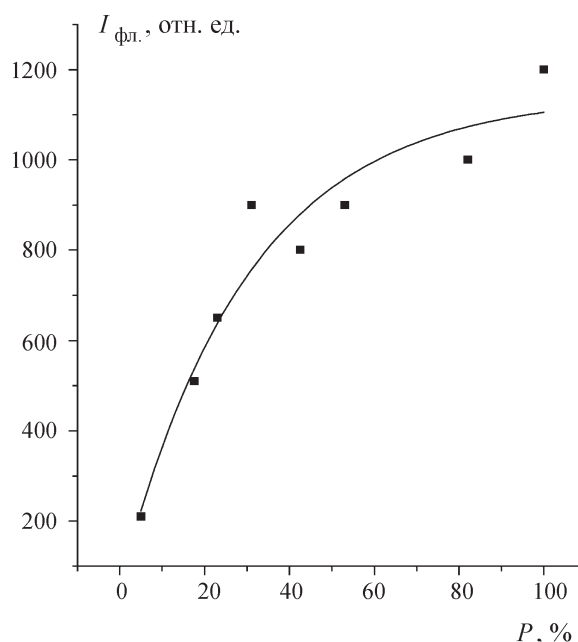


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции продукта дериватизации лейцина, полученного по реакции с ОФА– Na_2SO_3 , от энергии лазерного импульса возбуждения флуоресценции (270 нм, длительность на полувысоте $1,5 \times 10^{-8}$ с) 100% – энергия импульса 0,8 мДж

раствором. Интенсивность флуоресценции из периферийных областей линейно зависит от энергии лазерного импульса, в то время как в фокусе лазерного пучка происходит насыщение возбуждения молекул. Этот эффект можно также объяснить самофокусировкой лазерного пучка [15] (см. также цитированную в [15] литературу).

Зависимость интенсивности флуоресценции от числа прошедших через кювету импульсов лазерного излучения (рис. 5) может характеризовать фотоустойчивость каждого из исследуемых соединений. Она хорошо описывается экспоненциальной функцией на достаточно большом отрезке значений числа импульсов. В качестве числовой характеристики фоторазложения образовавшихся изоиндолов было использовано относительное уменьшение флуоресцен-

ции одного и того же раствора, помещенного в кювету при последовательном прохождении через него десяти первых лазерных импульсов – $(\Delta I)/(\Delta N)$, для $N = 10$. Эта безразмерная величина пропорциональна доле разложившихся молекул индола после прохождения лазерного импульса. В табл. 3 представлены рассчитанные кажущиеся константы фоторазложения исследованных продуктов дериватизации аминокислоты (2-Меркапто-этанол, KCN, Na_2SO_3 , N-ацетил-L-цистеин) в предположении, что продукты фоторазложения не флуоресцируют сами и не

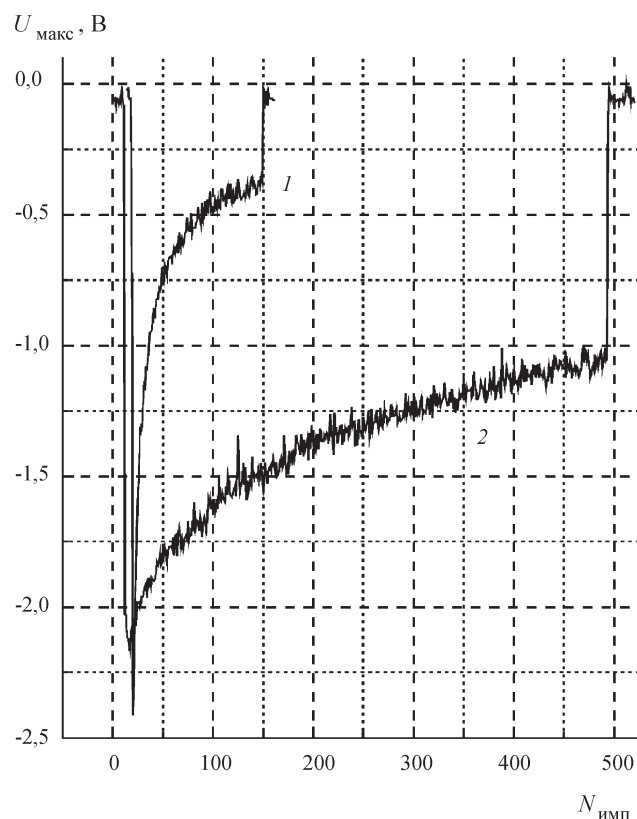


Рис. 5. Кривые фоторазложения флуоресцирующих производных изоиндолов при прохождении импульсного лазерного излучения (270 нм; 0,8 мДж/имп; частота следования импульсов 3 Гц) через кювету с растворами. $U_{\text{макс}}$ – амплитуда импульсов тока «ФЭУ» флуоресценции, N – число импульсов, прошедших через кювету (1 – глицин–ОФА–2МЕ, 2 – глицин–ОФА–KCN)

Т а б л и ц а 3

Кажущиеся константы фоторазложения замещенных изоиндолов – продуктов химического превращения глицина по реакции с ОФА и различными нуклеофильными агентами в описанных экспериментальных условиях

Нуклеофильный агент	2-Меркапто-этанол	KCN	Na_2SO_3	N-ацетил-L-цистеин
Кажущаяся константа фоторазложения	$0,13 \pm 0,02$	$0,007 \pm 0,001$	$0,03 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,05$

вливают на флуоресценцию оставшегося изоиндола. Показано, что использование предложенных новых нуклеофильных агентов расширяет возможности метода (предел обнаружения ниже, а фотостойчивость соединений, образуемых с участием цианида калия и сульфита натрия существенно выше, чем

с 2МЕ). На основании проведенных исследований можно сделать вывод о перспективности использования предлагаемых фотостойчивых продуктов дериватизации аминокислот для их высокочувствительного определения методом ВЭЖХ в сочетании с ЛИФ-детектированием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amino Acid Analysis Protocols. / Ed. C. Cooper, N. Packer, K. Williams. Methods in Molecular Biology. Vol. 159. Totowa, 2001.
2. Гуренцова О.И., Савченко М.В., Сумбатян Н.В., Коршунова Г.А., Швядас В.К. // Биоорг. хим. 1997. **23**. № 11. С. 878.
3. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии / Под ред. А. Хеншен и др. М., 1988. С. 154.
4. Поздеев В.К., Поздеев Н.В. // Биомедицинская химия. 2010. **56**. № 6. С. 726.
5. Натъкан А.А., Чернобровкин М.Г., Шпигун О.А. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2011. **11**. № 6. С. 895.
6. Dousa M., Brichac J., Gibala P., Lehnert P. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2011. **54**. N 5. P. 972.
7. Glowacki R, Borowczyk K, Bald E, Jakubowski H. // Anal. Bioanal. Chem. 2010. **396**. N 6. P. 2363.
8. Kand'ar R., Zakova, P., Jirosova J., Sladka M. // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2009. **47**. N 5. P. 565.
9. Koros A., Varga Zs, Molnar-Perl I. // J. Chromatography, A. 2008. **1203**. № 2. P. 146.
10. Zuman P. // Chem. Rev. 2004. **104**. N 7. P. 3217.
11. Демтредер В. Лазерная спектроскопия. Основные принципы и техника эксперимента. М., 1985. С. 329.
12. Orwar O., Sandberg. H., Jacobson I. et al. // Anal. Chem. 1994. **66**. N 24. P. 4471.
13. Бекетов В.И., Воронина Р.Д., Филатова Д.Г., Зоров Н.Б. // Ж. аналит. химии. 2000. **55**. № 12. С. 1277.
14. Zuman P., Salem N., Kulla E. // Electroanalysis. 2009. **21**. N 3–5. P. 645.
15. Voigtman, E., Winefordner, J.D. // Spectrosc. Lett. 1983. **16**. N 4. P. 287.

Поступила в редакцию 20.12.2011

FLUORIMETRIC DETERMINATION OF AMINO ACIDS AND PHOTOCHEMICAL STABILITY OF THE PRODUCTS OF THEIR REACTION WITH *ortho*-PHTHALIC ALDEHYDE UNDER IRRADIATION OF A HIGH-POWER PULSED LASER.

V.I. Beketov, R.D. Voronina, N.B. Zorov

(Division of Laser Chemistry)

The possibility of high-sensitive determination of amino acids was investigated with the use of fluorescence of their derivatives obtained by reaction of aqueous solution of *ortho*-phthalic dialdehyde and nucleophilic additives: potassium cyanide, sodium sulfite and N-acetyl-L-cysteine. With glycine as an example, it was shown that chemical stability of yielded highly fluorescent compounds (substituted isoindoles) and their photochemical stability under irradiation of a powerful pulsed laser is substantially higher than the ones of widely used reagent for determination of amino acids - the basic aqueous solution of *ortho*-phthalic dialdehyde and 2-mercaptoethanol. The analytical characteristics of the newly developed reagents are the same or better than of the standard one.

Key words: amino acids, fluorimetric determination, substituted isoindoles, pulsed laser excitation, photochemical stability.

Сведения об авторах: Бекетов Владимир Игоревич – науч. сотр. кафедры лазерной химии химического факультета МГУ (beketov@laser.chem.msu.ru); Воронина Раиса Дмитриевна – науч. сотр. кафедры лазерной химии химического факультета МГУ; Зоров Никита Борисович – глав. науч. сотр. кафедры лазерной химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук, профессор (zorov@laser.chem.msu.ru).