

Н.Я. Мокшина, Р.В. Савушкин, О.В. Ерина

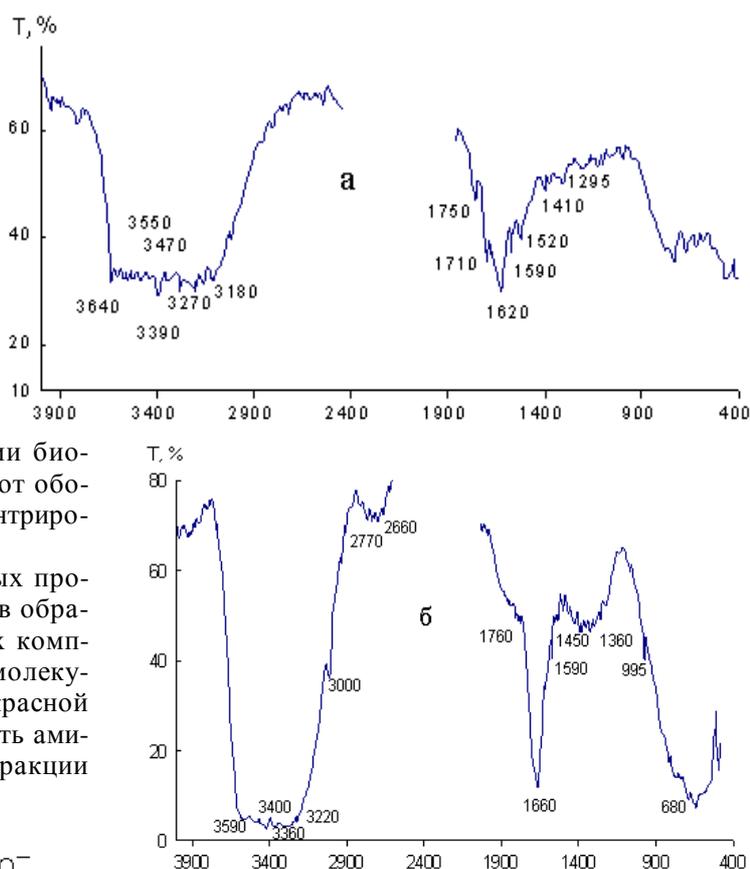
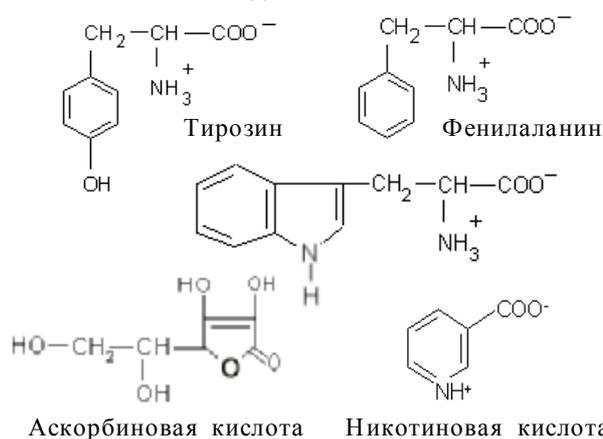
ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ В АНАЛИЗЕ ВОДНОЙ ФАЗЫ ПРИ ЭКСТРАКЦИОННОМ РАЗДЕЛЕНИИ АМИНОКИСЛОТ И ВИТАМИНОВ

Методом ИК-спектроскопии изучен механизм взаимодействия ароматических аминокислот и витаминов (аскорбиновая и никотиновая кислоты) в водной фазе при экстракции их смесей из водных растворов гидрофильными растворителями (бутиловый спирт, этилацетат). Предложены схемы образования ассоциатов аминокислота—витамина в водной фазе. Рассчитаны параметры водородных связей в системах аминокислота—витамина до и после экстракции.

Составной частью многих пищевых продуктов и фармацевтических препаратов являются аминокислоты и витамины. Актуальная задача состоит в разработке новых, совершенствования и развития известных способов извлечения, разделения и определения аминокислот и витаминов в водных средах (ферментационные растворы, белковые гидролизаты, сточные воды). Среди основных методов разделения сложных смесей для последующего химического анализа ведущее место занимают хроматография, экстракция, капиллярный электрофорез [1—3]. Изученные нами закономерности экстракции биологически активных соединений способствуют обоснованию условий их извлечения, концентрирования, разделения и определения [4—6].

Для изучения химизма экстракционных процессов необходимо знать строение и состав образующихся в водной и органической фазах комплексов, характер их взаимодействия с молекулами воды и экстрагента. Метод инфракрасной спектроскопии позволяет идентифицировать аминокислоты и витамины, например, при экстракции их смесей из водных сред [7].

Объекты исследования:



ИК-спектр смеси аскорбиновая кислота—тирозин в водной фазе до (а) и после (б) экстракции.

ИК-спектры водной и органической фаз при экстракции смесей аминокислот и витаминов снимали на ИК-Фурье-спектрометре ИнфраЛЮМ в диапазоне частот 400—4000 см⁻¹, образцы готовили в виде тонкой пленки жидкости. В качестве экстрагентов применяли заметно растворимые в воде бутиловый спирт и этилацетат [8, 9].

Вид ИК-спектров водной фазы смесей витаминов и аминокислот до и после экстракции разли-

Т а б л и ц а 1

Отнесение основных полос поглощения в ИК-спектре смеси аскорбиновая кислота—тирозин в водной фазе после экстракции

Волновое число ν , см^{-1}	Отнесение полос	Волновое число ν , см^{-1}	Отнесение полос
3590	Колебания ОН-группы при межмолекулярной водородной связи	1780–1840	Валентные колебания группы С=О лактонного кольца
3400	Колебания молекул воды с NH_3^+ -группой тирозина	1660	Валентные колебания группы С=C и деформационные колебания молекулы воды
3220	Колебания молекул воды вблизи COO^- -группы	1570	Колебания ароматического кольца
3000	ν группы СН в ароматическом цикле тирозина	1450	Симметрические колебания протонированной NH_3^+ -группы
2770	Колебания связи НОН...лактонное кольцо; ν_s CH_2 - и СН-групп, присоединенных к ароматическому кольцу	1360	Валентные колебания ОН-группы фенольного радикала молекулы тирозина
2660	Связи $\text{H}_2\text{O} \dots \text{OH}$ молекулы аскорбиновой кислоты	995	Колебания лактонного кольца

чен (рисунок, а). Пик при 1750 см^{-1} в спектре смеси аскорбиновая кислота—тирозин характеризует валентные колебания группы С=О лактонного кольца. Тирозин в растворе находится в основном в виде цвиттер-иона, это подтверждают максимумы поглощения при 1590 и 1410 см^{-1} (асимметричные и симметричные колебания диссоциированной карбоксильной группы). Полоса при 1590 см^{-1} также соответствует колебаниям лактонного кольца аскорбиновой кислоты [10]. Максимум при 1620 см^{-1} характерен для асимметричных колебаний ν_{as} группы NH_3^+ .

В водной фазе до экстракции возможно образование ассоциатов аскорбиновая кислота—тирозин. Об этом свидетельствует пик при 1710 см^{-1} , характерный для водородных связей между COO^- -группой тирозина и ОН-группами аскорбиновой кислоты. Поглощение при 3390 см^{-1} относится к колебаниям воды, связанной с ОН-группами аскорбиновой кислоты. Учитывая количество молекул аскорбиновой кислоты и тирозина, находящихся в водной фазе, образование ассоциатов между витамином и аминокислотой можно представить схемой 1.

После экстракции в ИК-спектре водной фазы возрастает содержание аквакомплексов (табл. 1,

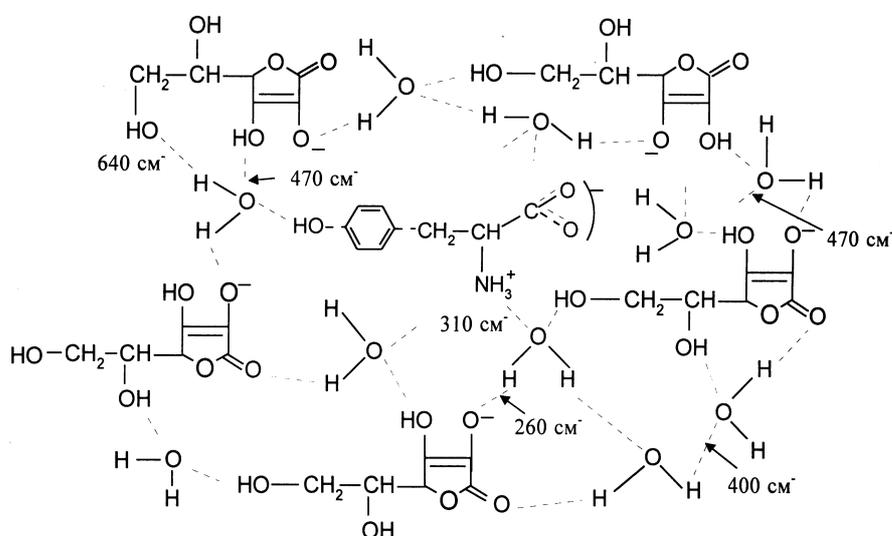


Схема 1.

рисунок, б). Поглощение при 3220 см^{-1} относится к связи вода— COO^- -группа тирозина, максимум в области 3400 см^{-1} соответствует водородной связи с NH_3^+ -группой тирозина. Поскольку в водной фазе после экстракции молекулы аскорбиновой кислоты и тирозина находятся в соотношении 5:1 [11], можно заключить, что ассоциаты образуются в соответствии со схемой 2.

С применением эмпирической корреляции между частотой колебания и энергией водородной связи рассчитаны некоторые параметры водородного “мостика” в системе аскорбиновая кислота—аминокислота (табл. 2 и 3) [12].

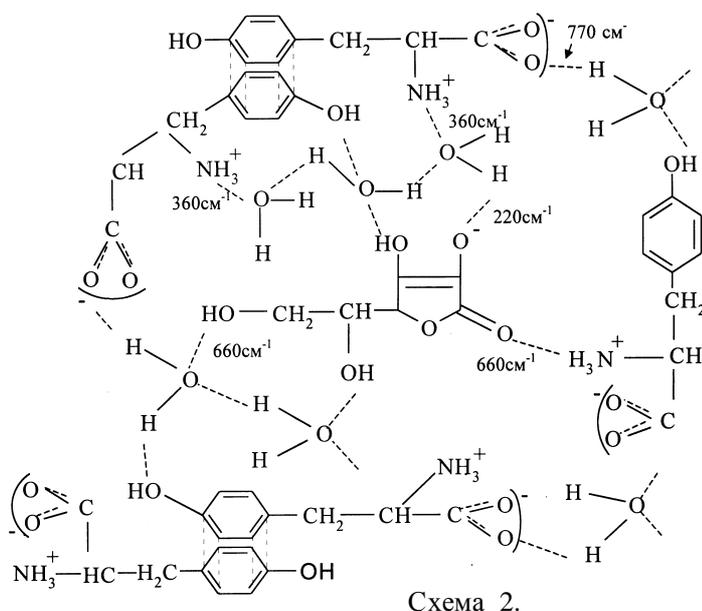


Схема 2.

После экстракции смеси колебания смещаются в сторону меньших волновых чисел и, соответственно, возрастает энергия связи (E_H), в то время как длина связи (R) уменьшается. Очевидно, водородные связи между функциональными группами тирозина и воды упрочняются. Это связано с тем, что в смеси содержится большое количество полярных групп цвиттерлита, способных образовывать устойчивый гидратный комплекс тирозин—вода, в результате тирозин в основном остается после экстракции в водной фазе.

При экстракционном разделении никотиновой кислоты и триптофана присутствие аминокислоты в органической фазе подтверждает спектральная полоса 1570 см^{-1} , что соответствует асимметричным валентным колебаниям в диссоциированной кар-

Т а б л и ц а 2

Формулы расчета параметров водородного “мостика” по величине смещения в ИК-спектрах анализируемых образцов [12]

Параметр	Символ	Единица измерения	Формула для расчета
Энергия водородной связи	E_H	кДж/моль	$\Delta\nu/\nu_{OH}^0 = E_H \cdot 1.6 \cdot 10^{-2}$
Энтальпия	ΔH	кДж/моль	$\Delta H = 2.9 \Delta A^{1/2}, \Delta\nu = [\Delta A^{1/2}]^2 \cdot 80$
Силовая постоянная водородной связи	K_H	см^{-2}	$K_H = (5.5 \pm 1.2) \cdot 10^4 \cdot E_H$
Силовая постоянная ковалентной ОН-связи	K_{OH}	см^{-2}	$K_{OH} = 8.63(5.5 \pm 1.2) \cdot 10^4 \cdot E_H - 12.879 \cdot 10^6$
Длина водородного “мостика”	$R_{OH...O}$	Å	$\Delta\nu = 4.43 \cdot 10^3 \cdot (2.84 - R_{OH...O})$
	$R_{NH...O}$	Å	$\Delta\nu = 5.48 \cdot 10^2 \cdot (3.21 - R_{NH...O})$
Удлинение водородной связи	Δr_{OH}	—	$\Delta r_{OH} = 5.3 \cdot 10^{-5} \Delta\nu_{OH}$
	Δr_{NH}	—	$\Delta r_{NH} = 6.8 \cdot 10^{-5} \Delta\nu_{NH}$

Т а б л и ц а 3

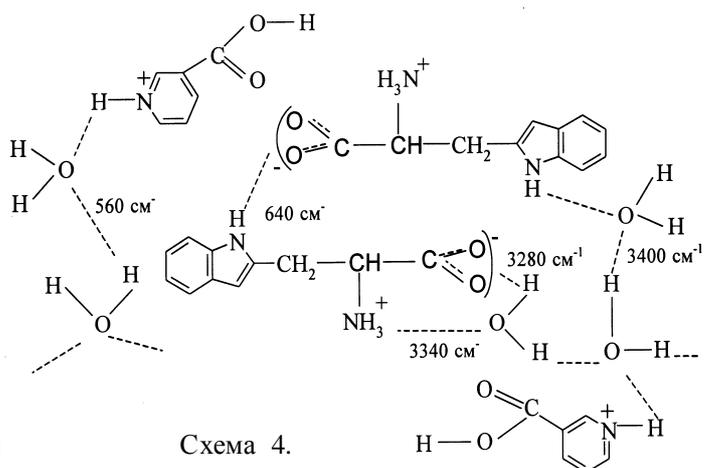
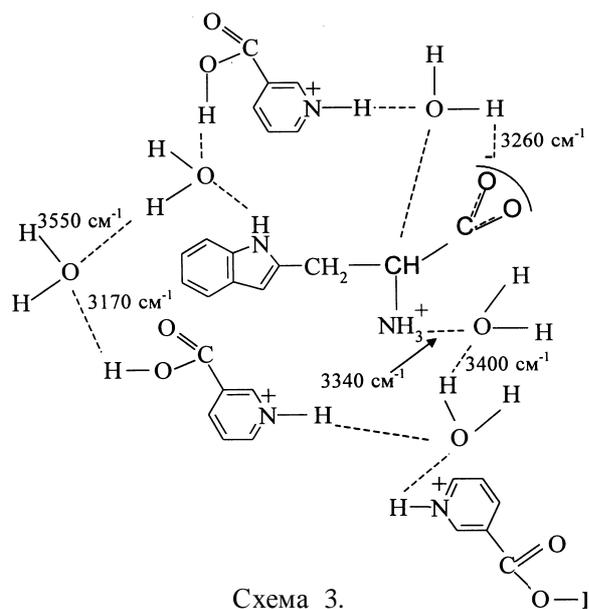
Некоторые параметры водородных связей до (над чертой) и после (под чертой) экстракции бутиловым спиртом в системе аскорбиновая кислота—тирозин в водной фазе

ν_{OH}	$\Delta\nu_{OH}$	E_H	ΔH	$K_H \cdot 10^5$	$K_{OH} \cdot 10^6$	$R_{OH...O}$	$R_{NH...O}$	$\Delta r_{OH} \cdot 10^{-2}$
см^{-1}		кДж/моль		см^{-2}		Å		
<u>3620</u>	<u>55</u>	<u>3.8</u>	<u>9.8</u>	<u>0.468</u>	<u>12.476</u>	<u>2.827</u>	—	<u>0.29</u>
<u>3590</u>	<u>80</u>	<u>5.7</u>	<u>12.2</u>	<u>0.723</u>	<u>12.272</u>	<u>2.822</u>	—	<u>0.41</u>
<u>3400</u>	<u>275</u>	<u>19.5</u>	<u>22.5</u>	<u>1.368</u>	<u>10.972</u>	<u>2.783</u>	—	<u>1.46</u>
<u>3400</u>	<u>275</u>	<u>19.5</u>	<u>22.5</u>	<u>1.368</u>	<u>10.972</u>	<u>2.783</u>	—	<u>1.46</u>
<u>3310</u>	<u>240</u>	<u>17.8</u>	<u>21.4</u>	<u>2.301</u>	<u>11.156</u>	—	<u>2.873</u>	<u>1.36</u>
<u>3360</u>	<u>190</u>	<u>21.9</u>	<u>23.7</u>	<u>2.892</u>	<u>11.247</u>	—	<u>2.773</u>	<u>1.63</u>
<u>3260</u>	<u>415</u>	<u>29.2</u>	<u>27.3</u>	<u>3.955</u>	<u>9.552</u>	<u>2.746</u>	—	<u>2.18</u>
<u>3220</u>	<u>455</u>	<u>31.9</u>	<u>27.8</u>	<u>4.112</u>	<u>9.274</u>	<u>2.721</u>	—	<u>2.36</u>
—	—	—	—	—	—	—	—	—
<u>2770</u>	<u>905</u>	<u>74.1</u>	<u>43.2</u>	<u>9.743</u>	<u>4.432</u>	<u>2.578</u>	—	<u>5.44</u>
—	—	—	—	—	—	—	—	—
<u>2660</u>	<u>890</u>	<u>73.2</u>	<u>42.6</u>	<u>9.451</u>	<u>4.235</u>	—	<u>2.347</u>	<u>5.24</u>

Т а б л и ц а 4

Отнесение основных полос поглощения в ИК-спектрах смеси никотиновая кислота—триптофан в водной фазе до (1) и после (2) экстракции

Волновое число ν , см^{-1}		Отнесение полос
1	2	
3550	3560	Колебания $\text{H}_2\text{O} \dots \text{H}_2\text{O}$ с нарушенной структурой
3400	3400	Колебания $\text{H}_2\text{O} \dots \text{H}_2\text{O}$ с ненарушенной структурой
3340	3340	Колебания H_2O , связанной с NH_3^+ -группой триптофана
3260	3280	Колебания молекул воды с COO^- -группами
3090	3090	Колебания H_2O , связанной с NH^+ -группой никотиновой кислоты
2910	2925	Колебания метильных
2850	2850	и метиленовых групп
—	2640	Колебания COO^- -группы одной молекулы триптофана с NH -группой индольного кольца другой молекулы
1750	1750	Колебания $\text{C}=\text{O}$ в недиссоциированных COOH -группах
1620	1640	Колебания $\text{C}=\text{C}$ -групп в индольном кольце
1580	1605	Колебания ароматического кольца
1520	1500	Колебания индольного кольца
1415	1370	ν_s валентные колебания NH_3^+ -группы
1240	1250	Колебания δ CO -группы триптофана



боксильной группе (табл. 4). В спектре проявляется пик 1460 см^{-1} , характерный для симметричных деформационных колебаний NH_3^+ -группы.

Колебания в области 1570 см^{-1} также характерны для связи $\text{C}=\text{C}$ ароматического кольца ни-

котиновой кислоты. Максимумы поглощения при 3450 , 3220 и 1740 см^{-1} обусловлены образованием прочных связей между эфирным кислородом этилацетата и функциональными группами никотиновой кислоты. Из сопоставления ИК-спектров водной фазы анализируемой смеси до и после экстракции следует, что они различаются незначительно.

В водной фазе никотиновая кислота находится преимущественно в виде катиона, о чем свидетельствует поглощение при 1750 см^{-1} , соответствующее валентным колебаниям $\text{C}=\text{O}$ -групп в недиссоциированных карбоксильных группах. Триптофан в растворе находится в виде цвиттериона, на спектре проявляются полосы при 1415 и 1560 см^{-1} , соответствующие симметричным и асимметричным валентным колебаниям диссоциированной карбоксильной группы. Поглощение при 1620 см^{-1} характерно для асимметричных колебаний $\nu_{as} \text{ NH}_3^+$ -группы [11].

В водной фазе до экстракции образуются ассоциаты никотиновая кислота—триптофан (схема 3). Максимумы 3400 и 3220 см^{-1} характеризуют связи $\text{H}_2\text{O} \dots \text{NH}_3^+$ и $\text{H}_2\text{O} \dots \text{COO}^-$ триптофана соответственно. Пик 3550 см^{-1} отно-

сится к колебаниям $\text{H}_2\text{O} \dots \text{H}_2\text{O}$ (табл. 3). В водной фазе после экстракции этилацетатом содержание никотиновой кислоты и триптофана уменьшается, соотношение числа молекул приближается к 2:1 соответственно (схема 4). Для системы

Т а б л и ц а 5

Некоторые параметры водородных связей до (над чертой) и после (под чертой) экстракции этилацетатом в системе никотиновая кислота—триптофан в водной фазе

ν_{OH}	$\Delta\nu_{\text{OH}}$	E_{H}	ΔH	$K_{\text{H}} \cdot 10^5$	$K_{\text{OH}} \cdot 10^6$	$R_{\text{OH} \dots \text{O}}$	$R_{\text{NH} \dots \text{O}}$	$\Delta r_{\text{OH}} \cdot 10^{-2}$
см^{-1}		кДж/моль		см^{-2}		Å		
<u>3550</u>	<u>125</u>	<u>8.6</u>	<u>15.1</u>	<u>1.155</u>	<u>11.882</u>	<u>2.811</u>	—	0.66
<u>3560</u>	<u>115</u>	<u>6.7</u>	<u>14.8</u>	<u>1.096</u>	<u>11.965</u>	<u>2.817</u>	—	0.62
<u>3400</u>	<u>275</u>	<u>19.5</u>	<u>22.5</u>	<u>1.368</u>	<u>10.972</u>	<u>2.783</u>	—	<u>1.46</u>
<u>3400</u>	<u>275</u>	<u>19.5</u>	<u>22.5</u>	<u>1.368</u>	<u>10.972</u>	<u>2.783</u>	—	<u>1.46</u>
<u>3340</u>	<u>220</u>	<u>14.8</u>	<u>20.1</u>	<u>2.105</u>	<u>11.147</u>	—	<u>2.768</u>	<u>1.16</u>
<u>3340</u>	<u>220</u>	<u>14.8</u>	<u>20.1</u>	<u>2.105</u>	<u>11.147</u>	—	<u>2.768</u>	<u>1.16</u>
<u>3260</u>	<u>405</u>	<u>28.8</u>	<u>27.4</u>	<u>3.795</u>	<u>9.604</u>	<u>2.676</u>	—	<u>2.18</u>
<u>3280</u>	<u>395</u>	<u>27.9</u>	<u>26.8</u>	<u>3.526</u>	<u>9.328</u>	<u>2.726</u>	—	<u>2.09</u>
—	—	—	—	—	—	—	—	—
<u>2640</u>	<u>1035</u>	<u>74.1</u>	<u>43.9</u>	<u>9.773</u>	<u>4.473</u>	<u>2.604</u>	—	<u>5.42</u>

никотиновая кислота—аминокислота рассчитаны параметры водородного “мостика” (табл. 5).

Анализ водной фазы до и после экстракции смесей аминокислота—витамин позволяет установить механизм распределения компонентов и разработать оптимальные условия (концентрации веществ, pH, количество экстрагента) для экстракционного разделения сложных смесей биологически активных веществ.

РЕЗЮМЕ. Методом ІЧ-спектроскопії вивчено механізм взаємодії ароматичних амінокислот та вітамінів (аскорбінова і нікотинова кислоти) у водній фазі при екстракції їх суміші з водних розчинів гідрофільними розчинниками (бутиловий спирт, етилацетат). Запропоновано схеми утворення асоціатів амінокислота—вітамін у водній фазі. Розраховано параметри водневих зв'язків у системах амінокислота—вітамін до і після екстракції.

SUMMARY. The mechanism of interaction between aromatic aminoacid and vitamins (ascorbic and nicotinic acids) in an aqueous phase in the case of extraction of their mixtures from aqueous solutions with hydrophilic solvents (butyl alcohol, ethyl acetate) has been studied by IR spectroscopy. Schemes of formation of aminoacid—vitamin associates in an aqueous phase are proposed. Parameters of hydrogen bonds in aminoacid—vitamin systems before and after extraction have been calculated.

Государственная технологическая академия, Воронеж
Воронежский государственный университет, Россия

Поступила 30.08.2007

1. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. -Пятигорск: Пятигорск. гос. фарм. акад., 2003.
2. Золотов Ю.А. // Рос. хим. журн. -2005. -**XLIX**, № 2. -С. 6—10.
3. Москвин Л.Н., Царицына Л.Г. Методы разделения и концентрирования в аналитической химии. -Л.: Химия, 1991.
4. Мокишина Н.Я., Селеменев В.Ф., Матвеева М.В., Крестникова Ю.В. // Журн. аналит. химии. -1994. -**49**, № 11. -С. 1193—1196.
5. Мокишина Н.Я., Савушкин Р.В., Орос Г.Ю., Ерина О.В. // Сорбц. и хроматогр. процессы. -2006. -**6**, № 2. -С. 332—336.
6. Мокишина Н.Я., Нифталиев С.И., Пахомова О.А. // Там же. -2006. -**6**, № 4. -С. 642—647.
7. Орос Г.Ю., Мокишина Н.Я., Селеменев В.Ф. // Там же. -2003. -**3**, № 5. -С. 545—548.
8. Мокишина Н.Я., Нифталиев С.И., Пахомова О.А. // Изв. вузов. Химия и хим. технология. -2005. -**48**, № 1. -С. 109—112.
9. Мокишина Н.Я., Нифталиев С.И., Пахомова О.А. // Хим. технология. -2005. -№ 5. -С. 44—46.
10. Девис М., Остин Дж., Патридж Д. Витамин С: Химия и биохимия. -М.: Мир, 1999.
11. Савушкин Р.В. Дисс. ... канд. хим. наук. -Воронеж, 2006.
12. Углянская В.А., Селеменев В.Ф., Чикин Г.А., Завьялова Т.А. Инфракрасная спектроскопия ионообменных материалов. -Воронеж: ВГУ, 1989.