

УДК 543.544

РАЗДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ И ИЗОМЕРОВ ИХ ПРОИЗВОДНЫХ НА МАКРОЦИКЛИЧЕСКОМ АНТИБИОТИКЕ «ТИКОПЛАНИН»

И. А. Ананьева, Е. Н. Шаповалова, О. А. Шпигун, Д. В. Армстронг

(кафедра аналитической химии)

Изучено хроматографическое поведение аминокислот и изомеров их производных на силикагеле, модифицированном макроциклическим антибиотиком «Тикопланин». Установлено, что на удерживание и селективность разделения производных аминокислот влияет, главным образом, гидрофобность модификатора. Показана возможность разделения рацемических смесей большого числа аминокислот без их предварительной дериватизации.

В настоящее время известно большое количество хиральных неподвижных фаз для жидкостной хроматографии. Наиболее часто для этого используются – аминокислоты и производные аминокислот, белки, циклодекстрины и производные циклодекстринов, полисахариды и их производные [1].

Важным достижением в создании новых хиральных селекторов было создание Армстронгом и сотрудниками [2] неподвижных фаз на основании макроциклических антибиотиков, что открыло широкие возможности для разделения различных классов энантиомеров благодаря сложному механизму распознавания на хиральной поверхности, включающему образование водородных связей, π - π -комплексов, комплексов включения, дипольных, ионных и стерических взаимодействий.

Проблема разделения оптических изомеров аминокислот и производных аминокислот очень актуальна, так как эти соединения присутствуют в биологических жидкостях живых организмов, причем D- и L-изомеры выполняют различные функции. Для решения проблем фармакологии, синтеза и анализа белков, геохимического анализа, анализа пищевых продуктов необходимо определять в различных объектах не только содержание аминокислот, но и соотношение их энантиомеров [3].

В качестве новой неподвижной хиральной фазы для разделения оптических изомеров аминокислот и производных аминокислот нами изучен макроциклический антибиотик «Тикопланин». Новый хиральный селектор проявляет широкие возможности для разделения энантиомеров и его использование представляется перспективным для разделения аминокислот и производных аминокислот с различными модификаторами: 5-диметиламинонафтален-1-сульфонил (дансил), N-9-флуоренилметоксикарбонил (ФМОК), 2,4-динитрофенил (ДНФ), фталил (Фталил), бензоксикарбонил (КБЗ), о-фталевым альдегидом (ОФА), бензоилом (Бензоил).

Экспериментальная часть

Работу выполняли на жидкостном хроматографе «Shimadzu» LC-6A со спектрофотометрическим детектором ($\lambda = 254$ нм), ($\lambda = 220$ нм – для аминокислот) и интегратором «Shimadzu» CR601. Использовали стальные

колонки размером (4,6×250) мм «Тикопланин» («Chirobiotic T», Адванс Сепарейшн Текнолоджи, США). Работу выполняли при комнатной температуре.

Для приготовления буферных растворов использовали триэтиламин и уксусную кислоту квалификации «для хроматографии». Для приготовления подвижной фазы применяли метанол и этанол квалификации «для хроматографии».

В работе использовали растворы производных аминокислот (Aldrich, Sigma) 10 мг/мл, приготовленные по точной навеске: КБЗ-DL-аланин, КБЗ-DL-метионин, КБЗ-DL-норлейцин, КБЗ-DL-лейцин, КБЗ-DL-валин, КБЗ-DL-лизин, КБЗ-DL-фенилаланин, КБЗ-DL-тирозин, КБЗ-DL-триптофан, Бензоил-DL-валин, Бензоил-DL-аланин, Бензоил-DL-фенилаланин, Бензоил-DL-аргинин, Дансил-DL-норлейцин, Дансил-DL-лейцин, Дансил-DL-норвалин, Дансил-DL-валин, Дансил-DL-серин, Дансил-DL-фенилаланин, Дансил-DL-триптофан, Дансил-DL- α -аминомасляная кислота, ФМОК-DL-валин, ФМОК-DL-лейцин, ФМОК-DL-норлейцин, ФМОК-DL-метионин, ОФА-DL-лейцин, ОФА-DL-норлейцин, ОФА-DL-тирозин, ОФА-DL-фенилаланин, ОФА-метил-DL-триптофан, ОФА-DL-глутамин, ОФА-DL-аргинин, ОФА-DL-аспарагин, ОФА-DL-гистидин, Фталил-DL-валин, Фталил-DL-метионин, ДНФ-DL-норвалин, ДНФ-DL-метионин, ДНФ-DL-этионин, ДНФ-DL-норлейцин и растворы аминокислот (Aldrich, Sigma) 20 мг/мл, приготовленные по точной навеске: лейцин, изолейцин, норлейцин, валин, норвалин, аланин, метионин, треонин, серин, изосерин, лизин, гистидин, аспарагин, аргинин, глутамин, ДОФА, тирозин, фенилаланин.

Результаты и их обсуждение

Как известно из литературных данных [2,4], макроциклические антибиотики проявляют высокую хиральную активность как в обращенно-фазовом и нормально-фазовом режимах жидкостной хроматографии, так и при элюировании полярными органическими растворителями. Выбор режима работы определяется природой разделяемых веществ.

В работе изучены закономерности удерживания производных аминокислот на хиральной неподвижной фазе «Тикопланин» в варианте обращенно-фазовой хроматографии.

Таблица 1

Хроматографические параметры разделения энантиоселективных производных аминокислот на макроциклическом антибиотике «Тикопланин»

Вещество	k' ¹	α	R _s	N ²	Подвижная фаза
Дансил-DL-валин	4,15	1,19	1,42	5320	MeOH/TEAA*
Дансил-DL-норвалин	4,32	1,40	2,43	5252	20/80
Дансил-DL-лейцин	4,32	1,27	1,50	5611	
Дансил-DL-норлейцин	5,67	1,45	2,52	5400	
Дансил-DL-серин	2,36	1,21	1,45	5754	
Дансил-DL-α-амино-масляная кислота	3,58	1,20	1,50	5635	
Дансил-DL-фенилаланин	5,83	1,16	1,62	5341	
Дансил-DL-триптофан	7,12	1,14	1,20	4985	
КБЗ-DL-лейцин	1,48	2,67	3,36	6580	
КБЗ-DL-норлейцин	1,72	3,16	5,03	6782	
КБЗ-DL-аланин	0,87	4,53	3,86	7105	
КБЗ-DL-валин	1,06	1,98	2,83	7004	
КБЗ-DL-метионин	1,68	3,02	4,61	6528	
КБЗ-DL-лизин	1,02	2,84	4,28	7059	
КБЗ-DL-тирозин	2,26	2,14	5,03	5257	
КБЗ-DL-фенилаланин	2,84	2,12	3,95	4852	
КБЗ-DL-триптофан	4,44	1,95	3,38	4958	
Бензоил-DL-валин	1,01	3,20	3,79	6520	
Бензоил-DL-аланин	0,79	2,80	3,51	6743	
Бензоил-DL-фенилаланин	2,08	1,97	1,62	5834	
Бензоил-DL-аргинин	1,78	1,41	0,72	4538	
ФМОК-DL-валин	5,62	2,25	5,32	7541	
ФМОК-DL-лейцин	8,03	3,17	7,40	8250	
ФМОК-DL-норлейцин	9,71	3,36	7,56	8432	
ФМОК-DL-метионин	9,49	3,12	6,82	8186	
Фталил-DL-валин	0,87	1,65	1,54	5841	
Фталил-DL-метионин	2,06	1,43	2,01	5963	
ДНФ-DL-норвалин	7,53	3,38	6,42	8698	
ДНФ-DL-норлейцин	5,01	2,11	5,40	8887	
ДНФ-DL-метионин	10,59	3,46	6,51	8957	
ДНФ-DL-этионин	12,54	3,12	6,23	8752	
ОФА-DL-лейцин	3,51	1,09	0,50	4562	MeOH/TEAA**
ОФА-DL-фенилаланин	4,32	1,22	1,20	4845	10/90
ОФА-DL-тирозин	3,73	1,20	1,20	5101	
ОФА-метил-DL-триптофан	5,32	1,40	2,05	5687	
ОФА-DL-глутамин	1,86	1,21	1,21	5420	
ОФА-DL-аргинин	3,49	1,36	1,41	5525	
ОФА-DL-аспарагин	1,29	1,42	1,41	5874	
ОФА-DL-гистидин	3,09	1,08	0,40	4236	

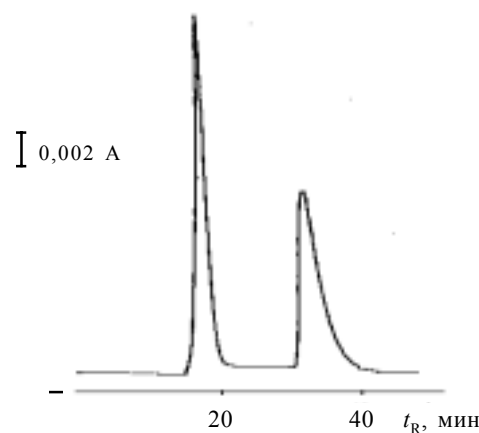


Рис. 1. Хроматограмма КБЗ-DL-триптофана (подвижная фаза: метанол – буфер 1%-й ацетат триэтиламония pH 4,1 (20/80); скорость потока 1,0 мл/мин; λ = 254 нм)

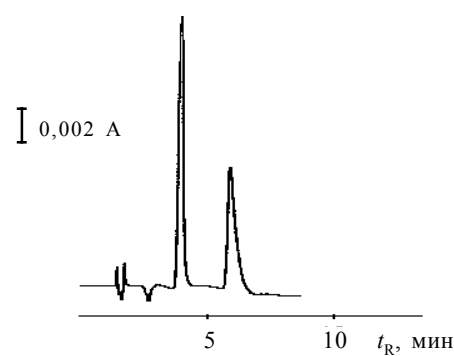


Рис. 2. Хроматограмма DL-метионина (подвижная фаза: этанол – вода (50/50); Скорость потока 1,0 мл/мин; λ = 220 нм)

Сорбаты элюировали смесями метанола и буферного раствора ацетата триэтиламина с pH 4,1, за исключением производных аминокислот с *o*-фталевым альдегидом, которые неустойчивы при pH < 7,0. Установлено, что для всех производных аминокислот L-изомер элюируется первым.

В табл. 1 представлены хроматографические параметры производных аминокислот, к которым «Тикопланин» проявил хиральную селективность.

Анализ полученных данных (табл. 1) показывает, что удерживание сорбатов растет с увеличением числа циклов и при наличии акцепторных заместителей в структуре модификатора аминокислоты в ряду:



Таким образом, структура модификатора аминокислоты играет важную роль в удерживании и хиральном распознавании изомеров. Полученные закономерности хорошо согласуются с тем, что при удерживании сорбатов на макроциклических антибиотиках одним из определяющих является возникновение на поверхности неподвижной фазы сильных гидрофобных взаимодействий. Высокое удерживает ДНФ-производных говорит о заметном вкладе образования π-π-комплексов между сорбатами и неподвижной фазой.

Т а б л и ц а 2

Хроматографические параметры разделения изомеров аминокислот на макроциклическом антибиотике «Тикопланин»

Вещество	k' ¹	α	R _s	N ²	Подвижная фаза
Лейцин	1,55	1,81	1,65	27548	EtOH/H ₂ O 50/50
Изолейцин	1,53	1,66	1,53	28657	
Норлейцин	1,59	2,12	2,35	28359	
Валин	1,48	1,40	1,62	29635	
Норвалин	1,56	2,33	2,28	28103	
Аланин	1,54	1,57	1,54	29876	
Метионин	1,69	1,80	1,58	28687	
Треонин	0,81	1,49	1,27	30199	
Серин	0,87	1,52	1,32	30297	
Изосерин	0,91	1,23	1,40	31257	
Лизин	1,05	1,42	1,61	31080	
Аспарагин	1,69	1,37	1,49	29352	
Аргинин	2,52	1,31	1,37	27863	
Глутамин	1,64	1,32	1,46	28547	
Тирозин	1,67	1,48	1,38	29870	
Фенилаланин	2,01	1,40	1,48	29658	
ДОФА	1,73	1,74	2,11	31100	
Гистидин	11,27	1,28	1,35	28505	

¹ – Коэффициент емкости для первого элюируемого энантиомера; ² – число теоретических тарелок на метр; * – 1%-й буфер ацетат триэтиламина (pH 4,1); ** – 1%-й буфер ацетат триэтиламина (pH 7,0)

Среди изученных соединений наиболее высокая селективность разделения была достигнута для КБЗ-, ДНФ- и ФМОК-производных аминокислот и составила от 1,95 для КБЗ-DL-триптофана до 4,53 для КБЗ-DL-аланина, от 2,11 для ДНФ-DL-норлейцина до 3,46 для ДНФ-DL-метионина, от 2,25 для ФМОК-DL-валина до 3,36 для ФМОК-DL-норлейцина. Высокая селективность разделения производных аминокислот со столь разными структурами еще раз доказывает сложность механизма взаимодействия сорбатов с хиральной поверхностью.

На примере КБЗ-производных было изучено влияние природы аминокислоты. Установлено, что удерживание КБЗ-производных увеличивается в ряду (в скобках указаны значения коэффициентов емкости): аланин (0,87) < лизин (1,02) < валин (1,06) < лейцин (1,48) < метионин (1,68) < норлейцин (1,72) < тирозин (2,26) < фенилаланин (2,84) < триптофан (4,44).

Как видно из приведенных данных, удерживание растет с увеличением гидрофобности молекулы аминокислоты. Сравнительно небольшое удерживание КБЗ-DL-лизина свидетельствует о том, что наличие дополнительных полярных групп, в данном случае аминогруппы, уменьшает удерживание сорбата.

Достоинством макроциклических антибиотиков является возможность разделения аминокислот без предварительной дериватизации.

Выбор подвижной фазы проводили на основании литературных данных. При сравнении водно-органических элюентов с метанолом, этанолом и изопропанолом, пред-

почтение отдается метанолу или этанолу, причем, как отмечается, при использовании последнего удается получить более высокую селективность разделения энантиомеров [3].

Как подчеркнуто авторами [3], различия в энергиях взаимодействия между D- и L-формами аминокислот и хиральной поверхностью неподвижной фазы «Тикопланин» настолько велики, что изменение ионной силы, pH и концентрации органического растворителя в подвижной фазе практически не влияют на хиральную селективность сорбента.

Изучено удерживание и разделение оптических изомеров аминокислот на хиральной неподвижной фазе «Тикопланин» при использовании в качестве подвижной фазы водно-этанольных смесей. Установлено, что L-изомер для всех аминокислот элюируется первым.

Анализ экспериментальных данных (табл. 2) показывает, что на удерживание сорбатов влияет наличие полярных групп в структуре заместителя у хирального атома углерода аминокислоты. Для треонина, серина, изосерина и лизина коэффициенты удерживания меньше, чем для других аминокислот и составляют 0,81; 0,87; 0,91; 1,05 соответственно, что может быть связано с наличием гидрокси- и вторых аминогрупп в структуре аминокислоты. Увеличение удерживания для глутамина и аспарагина обусловлено появлением карбонильной группы.

Установлено, что коэффициенты удерживания лейцина (1,55), изолейцина (1,53), норлейцина (1,59), валина (1,48), норвалина (1,56), аланина (1,54), метионина (1,69), ДОФА (1,73), тирозина (1,67) и фенилаланина (2,01) соизмеримы.

Увеличение удерживания аргинина, и еще в большей степени гистидина, вполне оправдано структурой этих соединений, поскольку наличие группы >C=N-, содержащей π-электроны и системы двойных связей, создает возможность дополнительных π-π- и дипольных взаимодействий.

Максимальное значение разделительной способности данного сорбента было достигнуто для норлейцина (2,35), норвалина (2,28) и ДОФА (2,11). Эффективность изучаемой колонки достигала 31 100 теоретических тарелок на 1 м.

Проведенное исследование показало, что хиральная неподвижная фаза «Тикопланин» проявляет широкие возможности в качестве хирального селектора для разделения производных аминокислот и самих аминокислот. Высокая селективность и эффективность, особенно при разделении аминокислот, показывают, что данный сорбент перспективен для их препаративного разделения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Armstrong D.W.* // LC-GC Current Issues in HPLC Technology. 1997. №5. P. 20.
2. *Armstrong D.W., Tang Y., Chen S., Zhou Y.* // Anal. Chem. 1994. 66. №9. P. 1473.
3. *Berthod A., Liu Y., Bagwill C., Armstrong D.W.* // J. Chromatogr. 1991. 731. P. 123.
4. *Armstrong D.W., Liu Y., Ekborgott K.* // Chirality. 1995. 7. P. 474.