



УДК 543.544.5.068.7

Изучение влияния природы нуклеофильного модификатора на хроматографические свойства производных аминокислот с *о*-фталевым альдегидом

Натыкан А.А., Шпигун О.А.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Чернобровкин М.Г.

ООО «Технология лекарств», Москва

Поступила в редакцию 19.05.2011 г.

Аннотация

В работе изучено хроматографическое поведение важнейших аминокислот в виде *о*-фталевых производных с различными нуклеофильными агентами на сорбенте «Zorbax Eclipse AAA». Установлено, что наилучшее разделение достигается при использовании *N*-изобутирил-цистеина. Использование этого реагента позволяет преодолеть постепенное ухудшение разделения при использовании методики от производителя. Получены корреляции фактора удерживания производных аминокислот от показателя гидрофобности, позволяющие прогнозировать порядок выхода сорбатов.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, аминокислоты, *о*-фталевый альдегид, нуклеофильные агенты

Abstract: The chromatographic separation of major amino acids on the «Zorbax Eclipse AAA» column after derivatization with *o*-phthalaldehyde and various thiol compounds was studied. The advantage of using *N*-isobutiryl-L-cysteine was established. Using this reagent allows one to avoid the decrease of separation selectivity while following the technique suggested by column producer. The correlations between the capacity factor and hydrophobicity coefficient providing the ability to predict the order of sorbates elution were obtained.

Keywords: high performance liquid chromatography, amino acids, *o*-phthalic aldehyde, nucleophilic agents

Введение

Определение аминокислот в различных объектах является важной аналитической задачей, поэтому неудивительно, что данное направление остаётся популярным для исследователя, невзирая на значительные достижения в этой области.

Аминокислоты обычно определяют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В сложных образцах, к которым безусловно относятся продукты питания и лекарства, аминокислоты определяют методом ионообменной

хроматографии, либо используют обращенно-фазовую ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией.

В качестве модифицирующего реагента часто применяется *o*-фталевый альдегид (ОФА) совместно с различными нуклеофильными агентами (рис.1). Дериватизация с этим модификатором происходит за 3-5 минут, образующиеся производные легко определяются методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с флуориметрическим детектором.

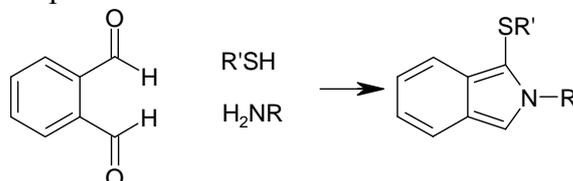


Рис. 1. Схема реакции аминокислоты с *o*-фталевым альдегидом.

В настоящее время существует ряд колонок, разработанных специально для определения *o*-фталевых производных аминокислот. К ним относятся, например, такие колонки как «Zorbax Eclipse AAA» фирмы «Agilent Technologies» (США), «Acclaim Polar Advantage» фирмы «Dionex Corporation» (США), Grom Sil OPA-1 (Alltech GROM GmbH, Германия). В большинстве случаев производители скрывают информацию о составе сорбента.

o-Фталевый реагент применяют для определения аминокислотного состава пищевых продуктов [1], лекарственных препаратов [2], биологических жидкостей [3, 4]. Хотя этот вариант достаточно давно применяется в аминокислотном анализе, существуют некоторые моменты, требующие детального изучения.

Интересным представляется увеличение срока службы специализированных колонок при анализе проб сложного состава, изучение влияния нуклеофильного реагента на селективность разделения производных аминокислот.

Известно, что в обращенно-фазовой ВЭЖХ удерживание и селективность разделения определяют в основном гидрофобные взаимодействия сорбат-сорбент. Рассчитав модель «удерживание-свойство» для производных аминокислот, можно было бы предсказывать порядок выхода и селективность разделения аналитов. Это особенно важно для *o*-фталевых производных аминокислот, время хроматографирования которых может достигать 1,5 часа.

В работе изучено влияние состава подвижной фазы и дериватирующего реагента на селективность и эффективность разделения *o*-фталевых производных аминокислот на специализированной колонке «Zorbax Eclipse AAA». Предложен подход, позволяющий существенно продлить срок службы колонки.

Показана применимость расчетной модели «удерживание-строение» для *o*-фталевых производных аминокислот, теоретические значения удерживания достоверно совпадали с экспериментально полученными для всех нуклеофильных модификаторов.

Эксперимент

Аппаратура. Работу выполняли на хроматографе Agilent 1200 Series фирмы «Agilent Technologies» с автоматическим инжектором, диодно-матричным ($\lambda=340$ нм) и флуориметрическим детекторами ($\lambda_{\text{возб.}}=340$ нм, $\lambda_{\text{регистр.}}=450$ нм). Использовали стальную колонку (150x4.6 мм), заполненную сорбентом «Zorbax

Eclipse AAA» (5 мкм) фирмы «Agilent Technologies» (США), стальную предколонку (12.5x4.6). Разделение проводили в градиентном режиме при расходе элюента 1мл/мин и температуре термостата колонки 30 °С. Компонент А: смесь MeOH/AcN/H₂O в соотношении 225/255/5, компонент В: 0,01М раствор Na₂HPO₄, pH 6.0.

Реагенты. В работе использовали гидроксид натрия х.ч. (Химмед, Россия), уксусную кислоту «для хроматографии» (Fisher Scientific, USA), тетраборат натрия о.с.ч., гидрофосфат натрия (Na₂HPO₄*12H₂O) х.ч., фосфорную кислоту х.ч., 3-меркаптопропионовую кислоту «для хроматографии» (Aldrich, USA), *o*-фталевый альдегид «для хроматографии» (Aldrich, USA), ацетонитрил сорт «0 о.с.ч.» (Криохром, Россия), метанол «для хроматографии» (Fisher Scientific, USA).

Использовали оптически чистые N-ацетил- цистеин (НАЦ, Merck, USA), N-изобутирил- цистеин (ИБЛЦ, Fluka, USA). Хиральный селектор N-(R)-манделил-(S)-цистеин (НМЦ) был синтезирован Д.Т. Гуранда и В.К. Швядасом, Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Приготовление растворов. Для приготовления исходных растворов аминокислот использовали D- и L- изомеры аспарагиновой кислоты (Asp), глутаминовой кислоты (Glu), серина (Ser), гистидина (His), треонина (Thr), аргинина (Arg), аланина (Ala), тирозина (Tyr), валина (Val), метионина (Met), триптофана (Trp), фенилаланина (Phe), изолейцина (Ile), лизина (Lys), лейцина (Leu), а также глицин (Gly) из стандартного набора аминокислот (Sigma-Aldrich, USA). Исходные растворы с концентрацией аминокислот 5 мг/мл готовили растворением точных навесок в деионизованной воде. Для растворения малорастворимых в воде аминокислот добавляли 0.1 М гидроксид натрия. Растворы хранили в течение 2 недель в холодильнике при +4°C. Рабочие растворы готовили разбавлением стандартных, непосредственно перед анализом.

Техника эксперимента. Дериватизацию проводили в автоматическом режиме в игле хроматографа. Реагент для определения аминокислот получали, растворяя 3 мг ОФА и 4.5 мг хирального SH-реагента (НАЦ, НМЦ, ИБЛЦ) в 0.5 мл метанола, или, растворяя 3 мг ОФА в 0.5 мл метанола и добавляя 10 мкл 3-МПК, использовали свежеприготовленный раствор.

Минимальное мольное соотношение ОФА и суммы аминокислот поддерживали равным 3.5:1.

Обсуждение результатов

Оптимизация разделения *o*-фталевых производных аминокислот на неподвижной фазе «Zorbax Eclipse AAA». Колонка «Zorbax Eclipse AAA» разработана специально для селективного разделения аминокислот в виде *o*-фталевых производных с 3-меркаптопропионовой кислотой. В этом случае дериватизацию аминокислот проводят, используя *o*-фталевый альдегид совместно с 3-меркаптопропионовой кислотой и флуоренилметоксикарбонил хлоридом (ФМОК). Таким образом, за 20 минут удается разделить смесь 23 аминокислот [6]. Однако ресурс колонки весьма ограничен. После анализа 50-60 проб детского питания и аминокислотных препаратов значительно ухудшается селективность разделения. Это явление наблюдалось для трех колонок данной марки. Как видно из хроматограммы со временем элюируются одним пиком пары гистидин/глицин, аргинин/аланин и ухудшается разделение валина и метионина (рис.2).

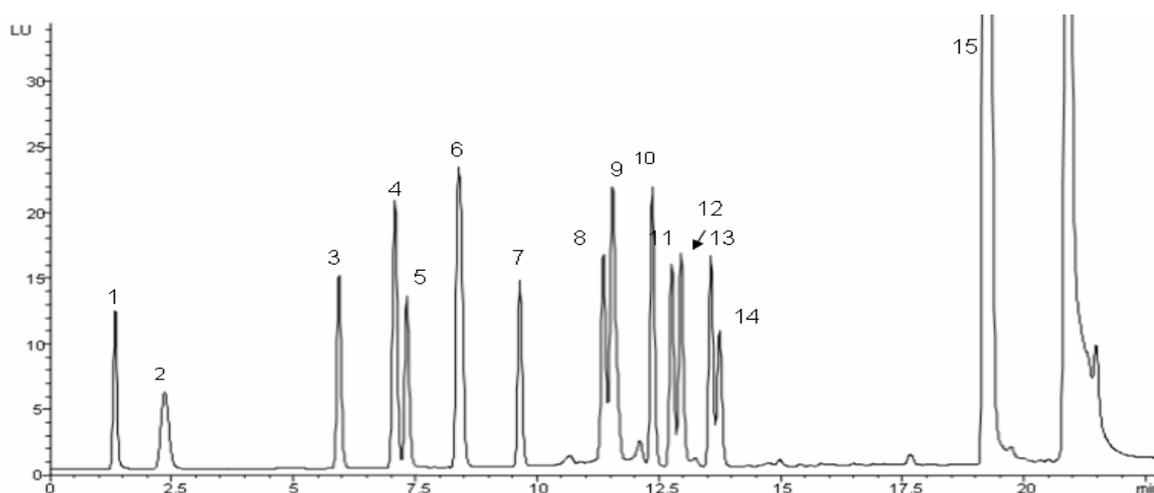


Рис. 2. Хроматограмма смеси ОФА/3-МРА производных аминокислот после анализа 60 проб. Колонка «Zorbax Eclipse AAA» (4.6x150 мм) с предколонкой.

Градиентное элюирование. Скорость потока 1.5 мл/мин. $T = 45^{\circ}\text{C}$.

Детектор – флуориметрический ($\lambda_{\text{возб.}}=340 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{регистр.}}=450 \text{ нм}$).

Градиентное элюирование: 0 мин, 0%А, 100%B; 2 мин, 0%А, 100%B; 20 мин, 57%А, 43%B; 22 мин, 75%А, 25%B; 25 мин, 75%А, 25%B; 28 мин, 0%А, 100%B; 33 мин, 0%А, 100%B, где А-метанол/ацетонитрил/вода (225мл/225мл/5мл), В-0.01 М Na_2HPO_4 , рН 7.8. 1=Asp, 2=Glu, 3=Ser, 4=His+Gly, 5= Thr, 6=Arg+ Ala, 7=Тур, 8=Val, 9=Met, 10=Trp, 11=Phe, 12=Ile, 13=Leu, 14=Lys, 15=реагент

Таблица 1. Нуклеофильные реагенты для дериватизации аминокислот

Название	Структурная формула
N-ацетил- цистеин (НАЦ)	
N-(R)-манделил-(S)-цистеин (НМЦ)	
N-изобутирил- цистеин (ИБЛЦ)	

В работе была сделана попытка улучшить селективность колонки. Изменение градиентной программы и рН буферного раствора не дали удовлетворительных результатов, поэтому было предложено изучить влияние других нуклеофильных реагентов. Ранее было показано, что структура нуклеофила может сильно поменять хроматографические параметры разделения производных аминокислот [5]. Нами было исследовано влияние следующих нуклеофилов: N-ацетил- цистеин, N-изобутирил- цистеин и N-(R)-манделил-(S)-цистеин. Эти модификаторы

коммерчески доступны, образующиеся производные стабильны и демонстрируют разную селективность за счет различных групп, введенных в молекулу цистеина.

Состав подвижной фазы и температура хроматографирования были взяты из литературных данных [6].

Использование ОФА-НАЦ позволяет улучшить разделение аргинина и аланина, однако, остаются неразделенными пики треонина и глицина, реагента и метионина (табл.2).

Применение ОФА-НМЦ позволяет удовлетворительно разрешить пики треонина и глицина, аргинина и аланина, однако не полностью разрешены глицин и гистидин ($R_s=0.41$), также невозможно разделить валин и метионин, реагент и лейцин (рис. 3, табл.2).

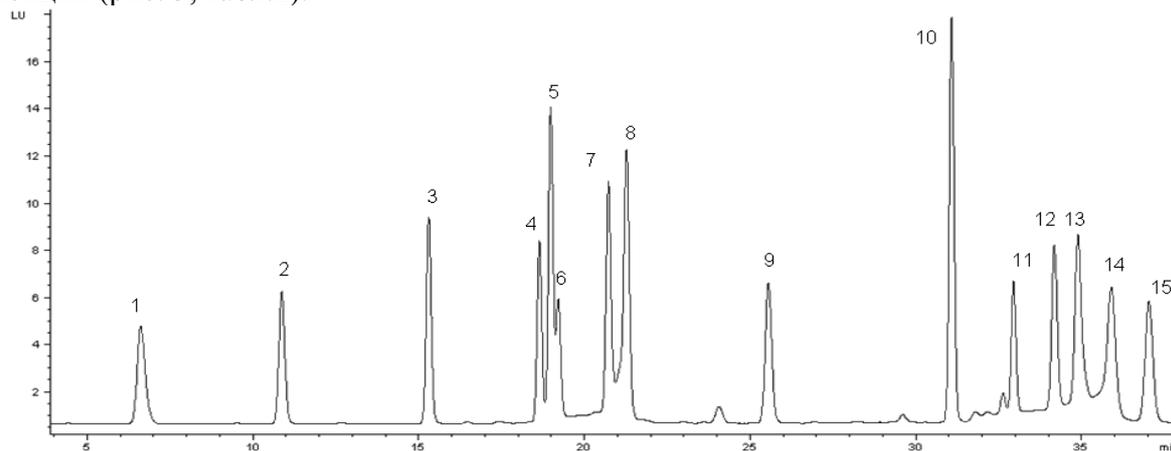


Рис. 3. Хроматограмма смеси ОФА/НМЦ производных аминокислот. Колонка «Zorbax Eclipse AAA» (4.6x150 мм) с предколонкой. Градиентное элюирование. Скорость потока 1 мл/мин. $T = 30^{\circ}\text{C}$. Детектор – флуориметрический ($\lambda_{\text{возб.}}=340 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{регистр.}}=450 \text{ нм}$). Градиентное элюирование: 0 мин, 10%A, 90%B; 5 мин, 10%A, 90%B; 18 мин, 24%A, 76%B; 22 мин, 24%A, 76%B; 30 мин, 40%A, 60%B; 35 мин, 40%A, 60%B; 37 мин, 90%A, 10%B; 47 мин, 90%A, 10%B, 50 мин 10%A, 90%B, 57 мин 10%A, 90%B, где А-метанол/ацетонитрил/вода (225мл/225мл/5мл), В-0.01 М Na_2HPO_4 , pH 6.0. 1=Asp, 2=Glu, 3=Ser, 4=Thr, 5=Gly, 6=His, 7=Arg, 8=Ala, 9=Tyr, 10=Val+ Met, 11=Trp, 12=Phe, 13=Ile, 14=реагент+ Leu, 15=Lys.

На примере этого модификатора нами установлено, что более плавное повышение содержания органического растворителя в элюенте увеличивает время хроматографирования, однако не улучшает разделение компонентов.

Суммируя результаты исследований 3-МПК, НМЦ и НАЦ, можно сделать вывод, что каждый из реагентов имеет свои преимущества. При определении аминокислот в реальных объектах целесообразно применять последовательно несколько реагентов, что повышает надежность получаемых результатов, но значительно увеличивает время анализа. Однако, даже при последовательном использовании нескольких реагентов невозможно определение глицина.

Использование N-изобутирил-L-цистеина в качестве нуклеофильного агента позволило добиться наилучших результатов. После оптимизации градиентной программы были полностью разделены производные всех исследуемых аминокислот (рис.4, табл.2). Лучшая селективность ИБЛЦ связана, по-видимому, с более удачным соотношением гидрофобности и размера образующихся соединений.

Таблица 2. Значения хроматографических параметров разделения ОФА производных

НАЦ			НМЦ			ИБЛЦ		
	k'	Rs		k'	Rs		k'	Rs
Asp	0.33	-	Asp	3.99	-	Asp	2.65	-
Glu	0.94	3.87	Glu	7.24	10.38	Glu	5.98	9.80
Ser	2.20	7.54	Ser	10.59	13.94	Ser	8.89	9.55
His	4.37	9.78	Thr	13.12	12.11	Thr	11.35	9.91
Thr+Gly	5.19	2.91	Gly	13.38	0.87	His	11.53	0.87
Arg	7.22	7.87	His	13.55	0.41	Gly	11.88	0.95
Ala	8.93	7.87	Arg	14.70	4.65	Arg	13.38	6.41
Tyr	12.13	15.60	Ala	15.12	1.79	Ala	13.85	2.02
Val	14.62	12.75	Tyr	18.32	12.77	Tyr	16.99	11.19
Met + реагент	15.84	3.88	Val + Met	21.60	15.30	Val	20.63	12.53
Ile	18.66	7.40	Trp	22.57	5.85	Met	21.48	3.43
Trp	19.20	1.85	Phe	23.12	3.50	Trp	23.40	8.34
Phe	20.19	4.68	Ile	23.40	1.74	Ile	23.60	0.87
Lys	20.82	3.66	Leu + реагент	23.97	2.51	Phe	24.25	2.71
Leu	21.16	2.00	Lys	25.00	3.82	Leu	25.57	4.99
						Lys	29.49	9.57

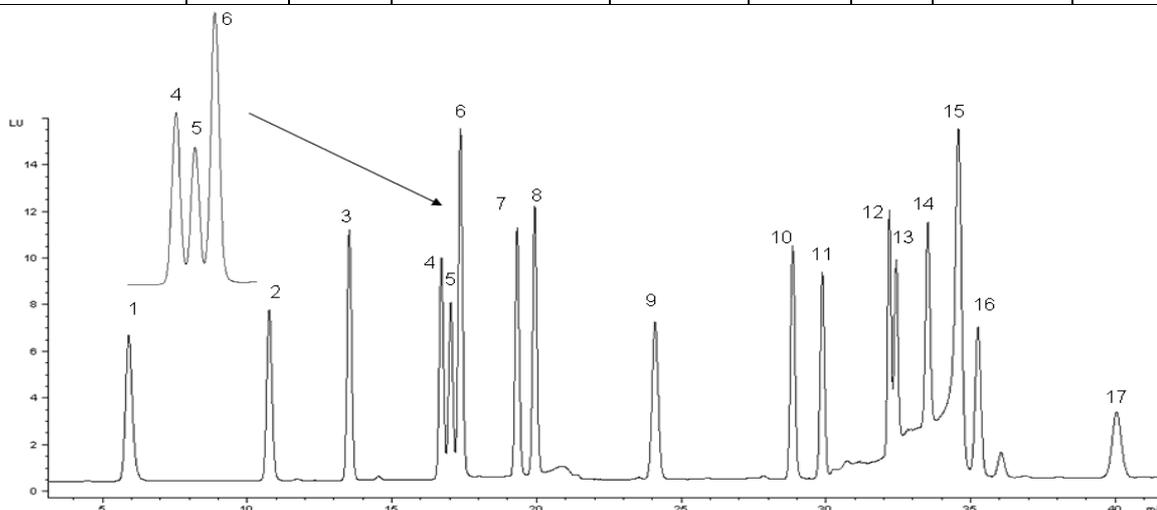


Рис. 4. Хроматограмма смеси ОФА/ИБЛЦ производных аминокислот.

Колонка «Zorbax Eclipse AAA» (4.6x150 мм) с предколонкой. Градиентное элюирование. Скорость потока 1 мл/мин. Т = 30°C. Детектор – флуориметрический ($\lambda_{\text{возб.}}=340$ нм, $\lambda_{\text{регистр.}}=450$ нм). Градиентное элюирование: 0 мин, 10%A, 90%B; 5 мин, 10%A, 90%B; 18 мин, 24%A, 76%B; 22 мин, 24%A, 76%B; 30 мин, 35%A, 65%B; 40 мин, 35%A, 65%B; 42 мин, 90%A, 10%B; 52 мин, 90%A, 10%B; 55 мин, 10%A, 90%B; 62 мин, 10%A, 90%B, где А-метанол/ацетонитрил/вода (225мл/225мл/5мл), В-0.01 М Na_2HPO_4 , pH 6.0

1=Asp, 2=Glu, 3=Ser, 4=Thr, 5=His, 6=Gly, 7=Arg, 8=Ala, 9=Tyr, 10=Val, 11=Met, 12=Trp, 13=Ile, 14=Phe, 15=реагент, 16=Leu, 17=Lys.

Как было отмечено ранее, для данного типа сорбента, после анализа 50-60 проб, дериватизированных ОФА и 3-меркаптопропионовой кислотой, значительно ухудшается селективность разделения. Причину падения селективности трудно объяснить, так как производитель скрывает информацию по составу сорбента. Нам удалось дать вторую жизнь колонке «Zorbax Eclipse AAA», подобрав нуклеофильный реагент ИБЛЦ, с помощью которого делятся все аминокислоты, и селективность разделения не изменяется даже после 80 вколов.

Построение модели «удерживание-свойство» для *o*-фталевых производных аминокислот. В варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ удерживание и селективность разделения определяют в основном гидрофобные взаимодействия сорбат-сорбент. Существующий теоретический аппарат ещё не позволяет сделать однозначное предсказание исходя только из структуры определяемых веществ, состава элюента и марки сорбента. Однако, для веществ сходных по структуре можно построить эмпирическую модель «удерживание-свойство», которая будет работать при одних и тех же условиях эксперимента[7].

В настоящей работе была изучена зависимость удерживания производных аминокислот от их гидрофобности. Для оценки гидрофобности использовали значения коэффициентов распределения изучаемых молекул между водой и октанолом ($\log D$), рассчитанные для pH 6.0 по компьютерной программе ACDLabs (©Advanced Chemistry Development Inc., 2001 г.)

Для производных со всеми тремя нуклеофильными агентами были получены линейные ($R^2 = 0,92-0,95$) зависимости логарифма удерживания от логарифма коэффициента распределения. Из этой зависимости выделяются аспарагиновая кислота, гистидин и лизин (рис. 5, 6, 7). В молекулах производных аспарагиновой кислоты и гистидина находятся две близко расположенные заряженные группы, за счет этого доля гидрофобных взаимодействий уменьшается. В молекуле производного лизина возможно образование внутримолекулярных водородных связей, таким образом, заряд молекулы оказывается скомпенсированным, и молекула оказывается более гидрофобной.

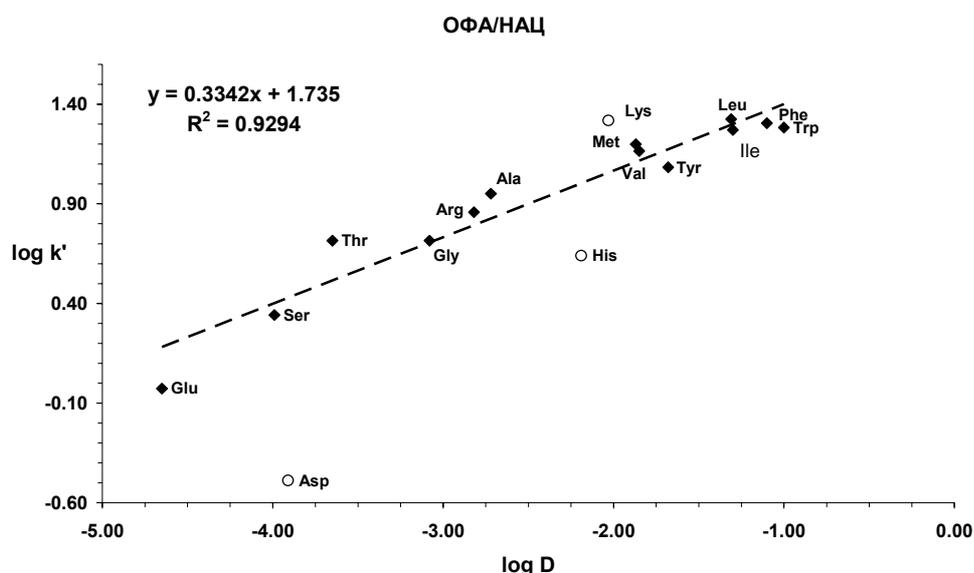


Рис. 5. Зависимость логарифма фактора удерживания от логарифма коэффициента распределения для производных аминокислот с ОФА/НАЦ

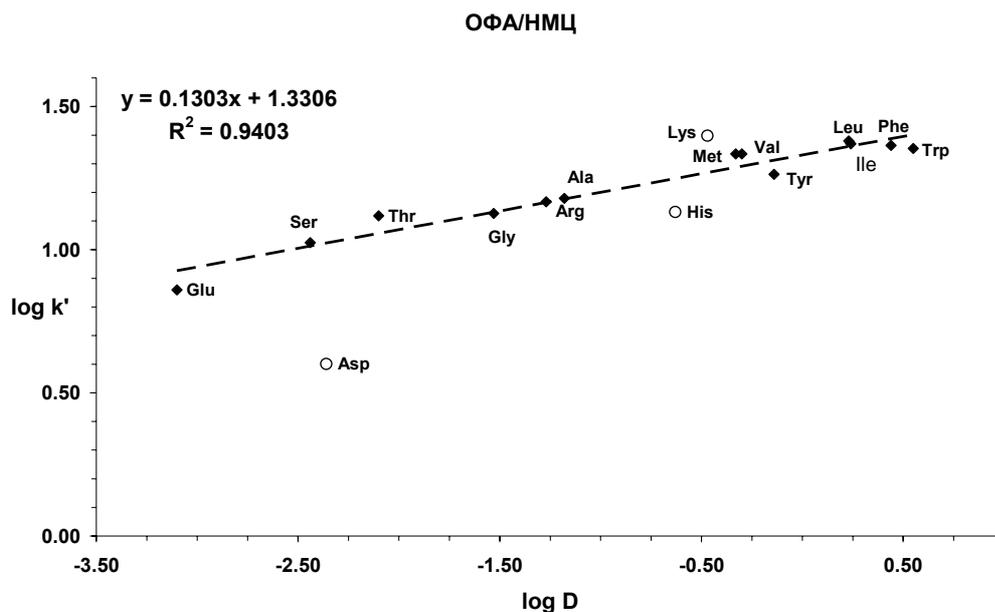


Рис. 6. Зависимость логарифма фактора удерживания от логарифма коэффициента распределения для производных аминокислот с ОФА/НМЦ

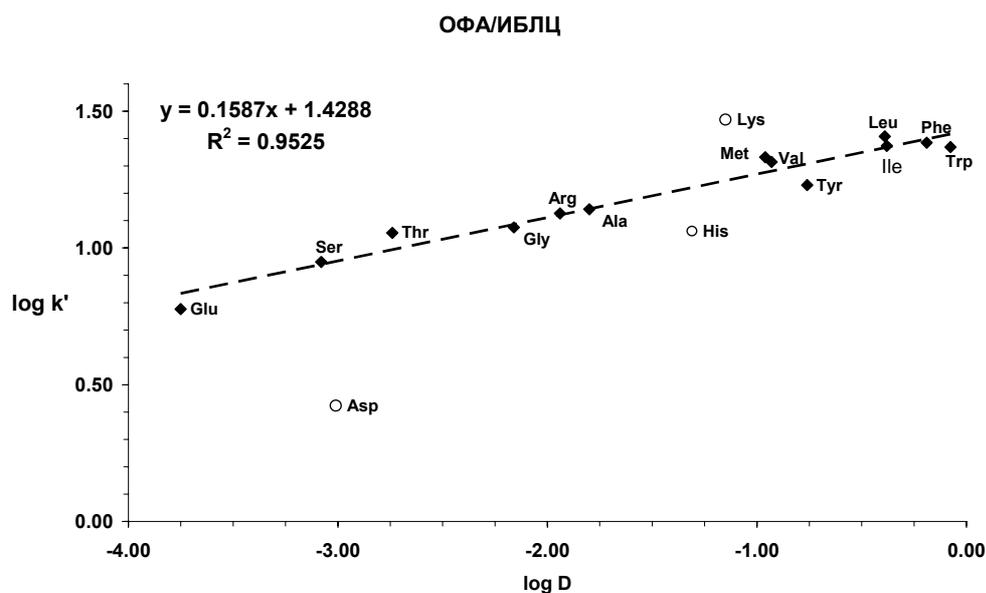


Рис. 7. Зависимость логарифма фактора удерживания от логарифма коэффициента распределения для производных аминокислот с ОФА/ИБЛЦ

Для производного гистидина, которое содержит две заряженные аминогруппы, вероятно, частичное удерживание происходит за счет ионных взаимодействий. Вероятно, из-за этого ОФА/ИБЛЦ–гистидин хорошо разделится с соседними пиками (рис. 4).

Для проверки полученных уравнений хроматографировали дериватизированный норлейцин. Как видно из таблицы 3, наиболее точным оказался прогноз в случае предсказания удерживания ОФА-НМЦ и ОФА-ИБЛЦ производных. Вероятно, это связано с большей гидрофобностью полученных соединений, по сравнению с ОФА-НАЦ производными. Таким образом, полученные

зависимости могут быть применены для оценки селективности колонок в отношении производных аминокислот и полезны при расширении списка разделяемых аминокислот.

Таблица 3. Теоретические и экспериментально полученные значения удерживания производных с норлейцином (n=3, P=0,95)

Нуклеофильный агент	lg k' теор.	lg k' эксп.
НАЦ	1.4±0.1	1.30±0.01
НМЦ	1.39±0.02	1.37±0.01
ИБЛЦ	1.40±0.02	1.41±0.01

Список литературы

1. H. Bruckner, M. Langer, M. Lupke, T. Westhauser, H. Godel. Liquid chromatographic determination of amino acid enantiomers by derivatization with o-phthalaldehyde and chiral thiols. Applications with reference to food science // Journal of Chromatography A. 1995. V 697. P 229-245.
2. Чернобровкин М.Г., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А., Ананьева И.А. Определение энантиомеров аминокислот в фармацевтических препаратах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ // Журн. аналит. химии. 2004. Т.59. №1. С. 64-73.
3. S. L. Grant, Y. Shulmanb, P. Tibbo, D. R. Hampson, G. B. Bakera, Determination of d-serine and related neuroactive amino acids in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection // J. Chromatogr B. 2006. V. 844. P. 278-282.
4. I. Pérez-Neria, E. Castrob, S. Montesa, M.-C. Bolla, J. Barges-Coll, José Luis Soto-Hernándezd, Camilo Ríos. Arginine, citrulline and nitrate concentrations in the cerebrospinal fluid from patients with acute hydrocephalus. // J. Chromatogr B. 2007. V. 851. P. 250-256.
5. Buck R.H., Krummen K. High-performance liquid chromatographic determination of enantiomeric amino acids and amino alcohols after derivatization with o-phthalaldehyde and various chiral mercaptans. // J. Chromatogr. 1987. V. 387. P. 255-265
6. Agilent Zorbax Eclipse AAA instruction for use. Pub. 5980-3088 EN. Agilent Technologies, 2000
7. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига. Зинатне. 1988.

Натыкан Алексей Андреевич – аспирант кафедры аналитической химии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, тел. +7-903-898-98-44

Чернобровкин Михаил Геннадьевич – к.х.н., руководитель группы лаборатории фармацевтического анализа ООО «Технология лекарств», Москва

Шпигун Олег Алексеевич – член-корр РАН, д.х.н., зав. лаборатории хроматографии кафедры аналитической химии химического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, тел. +7-495-939-1382

Natykan Alexei A. – the post-graduate student of analytic chemistry department of chemical faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, e-mail: natykan@rambler.ru

Chernobrovkin Mikhail G. – Ph.D, head of R&D group, «Drugs Technology», Moscow, e-mail: mikeoch@mail.ru

Shpigun Oleg A. – Dr.Sc.Chem, corresponding member of Russian Academy of Science, professor, M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, e-mail: shpigun@analyt.chem.msu.ru