



УДК 543.544.943.3:547.466:544.122.3

Разделение D- и L- изомеров аминокислот методом тонкослойной хроматографии в водной подвижной фазе на основе 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина

Сорокина О.Н.

ФГОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», Саратов

Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Атаян В.З.

ГОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», Саратов

Барышева С.В.

Энгельский технологический институт (филиал) Саратовского государственного технического университета, Энгельс

Поступила в редакцию 24.11.2009 г.

Аннотация

Изучено хроматографическое разделение DL-изомеров тирозина, лейцина, триптофана на Сорбфиле в водной подвижной фазе, модифицированной 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином. Установлено, что введение модификатора приводит к разделению энантиомеров. Подвижность L-изомеров аминокислот возрастает с увеличением концентрации циклодекстрина в подвижной фазе, а D не изменяется. Проанализированы фармацевтические препараты «Нефрамин» и «Гидролизин», в которых идентифицированы L- изомеры исследуемых аминокислот. Правильность идентификации доказана сравнением с индивидуальными препаратами аминокислот.

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, DL-изомеры аминокислот, разделение, подвижная фаза, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин.

The chromatographic separation of DL-isomers of tyrosine, leucine, tryptophan at Sorbfil TLC plates in aqueous mobile phase modified by 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin has been performed. It has been established that the modifier enhances the separation of enantiomers. A mobility of L-isomers of amino acids increases with increasing a concentration of the cyclodextrin in the mobile phase, whereas d-isomers – is unaffected. D- and L-isomers of the studied amino acids in Epy pharmaceutical preparations "Neframin" and "Gidrolizin" have been analysed and L-isomers of aminoacids investigated was identified. The identification was proved by comparison with individual aminoacids

Key words: thin layer chromatography, D-,L- amino acids isomers, separation, mobile phase 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin

Введение

В связи с высокой биологической активностью и широким применением производство аминокислот постоянно растет. Основными их потребителями являются пищевая, микробиологическая, фармацевтическая промышленность,

медицина и животноводство [1]. Это связано с тем, что аминокислоты, как составные части пептидов, пептидных гормонов и белков, являются важнейшими биорегуляторами, участвуют во всех жизненных процессах наряду с нуклеиновыми кислотами, углеводами и липидами.

Важной особенностью белковых аминокислот является их оптическая активность. За исключением глицина, все они имеют один или два асимметричных атома и, следовательно, могут существовать в двух (D- и L-) оптически-активных (энантиомерных) формах, которые обладают разной физиологической и биологической активностью. L-аминокислоты, в основном, оказывают положительное действие на организм, а D-аминокислоты, могут влиять негативно. Поэтому важно контролировать их оптическую чистоту [2].

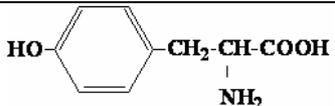
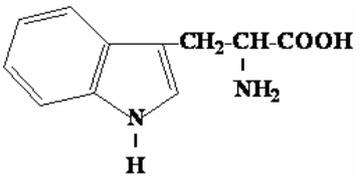
Для количественного разделения энантиомеров используют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), а для диагностики энантиомерной чистоты – тонкослойную хроматографию (ТСХ) [3]. В обоих методах разделение основано на использовании либо хиральных неподвижных фаз, либо хиральных элюентов [2]. Последний вариант более прост и экономичен, особенно при использовании различных модификаций α - и β -циклодекстринов [2].

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение возможности разделения D- и L- изомеров некоторых аминокислот методом тонкослойной хроматографии в водной подвижной фазе, модифицированной 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином (2-ГП- β -ЦД).

Экспериментальная часть

В работе использованы коммерческие препараты D,L-аминокислот фирмы “Sigma” (США), название и формулы которых приведены в табл. 1. Содержание основного вещества 2-ГП-ЦД (фирма “Cyclolab”) составляло 97%.

Таблица 1. Характеристики исследуемых аминокислот

Название вещества	Структурная формула	М. м., г/моль	Содержание основного вещества, %
DL-тирозин		181,2	99
DL-триптофан		204,2	99
DL-лейцин	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \qquad \qquad \\ \text{H}_3\text{C} \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$	131,2	99

В качестве неподвижной фазы (НФ) использовали пластины ТСХ Сорбфил с закрепленным слоем сорбента (АО “Сорбполимер”, г. Краснодар, Россия). Хроматографирование проводили методом восходящей ТСХ. Объем хроматографируемой пробы составлял 1-2мкл. При использовании в качестве элюента водного раствора 2-ГП- β -ЦД хроматографирование проводили без

предварительного насыщения камеры, концентрацию модификатора в водной подвижной фазе (ПФ) варьировали от $4 \cdot 10^{-5} \text{M}$ до $1 \cdot 10^{-1} \text{M}$. Хроматографические зоны аминокислот идентифицировали опрыскиванием пластин 0,5%-ным раствором нингидрина в 3-метилбутаноле-1 с последующим нагреванием при 105°C в течение 3-5 минут до проявления пятен различной окраски.

Результаты и обсуждение

Типичные хроматограммы исследуемых аминокислот представлены на рис. 1. Концентрационные зависимости подвижности аминокислот от содержания 2-ГП-β-ЦД в водной подвижной фазе представлены на рис. 2. Из приведенных данных видно, что в диапазоне концентраций 2-ГП-β-ЦД от $4 \cdot 10^{-5} \text{M}$ до $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ подвижность L-аминокислот линейно возрастает, а далее практически не меняется. Независимо от концентрации 2-ГП-β-ЦД D-аминокислоты остаются на стартовой линии, т.е. происходит полное разделение энантиомеров.

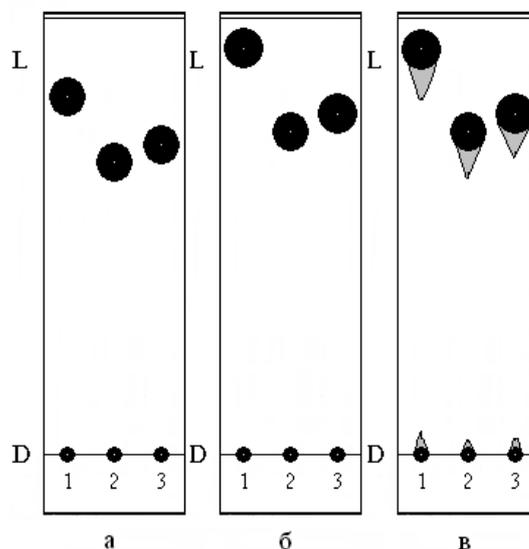
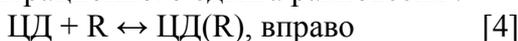


Рис. 1. Хроматограммы D,L-амино-кислот при различной концентрации 2-ГП-β-ЦД в подвижной фазе: $4 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (а), $6 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (б), $1 \cdot 10^{-1} \text{M}$ (в). НФ: Сорбфил, ПФ: вода - 2-ГП-β-ЦД. 1 - DL-тирозин, 2 - DL-лейцин, 3 - DL-триптофан.
 $C_{\text{аминок-т}} = 5 \cdot 10^{-2} \text{M}$

Причиной движения L-аминокислот может быть усиление связывания данного энантиомера полостью ЦД, которое увеличивается вследствие концентрационного сдвига равновесия :



где ЦД – циклодекстрин, ЦД(R) – комплекс включения аминокислоты в полость ЦД.

Согласно [5,6] связывание сорбатов с ЦД обусловлено как включением молекул аминокислот или их фрагментов в гидрофобную полость циклодекстрина, так и образованием водородных связей между их полярными группами (-ОН, -СООН, -NH, -NH₂) и ОН-группами циклодекстрина.

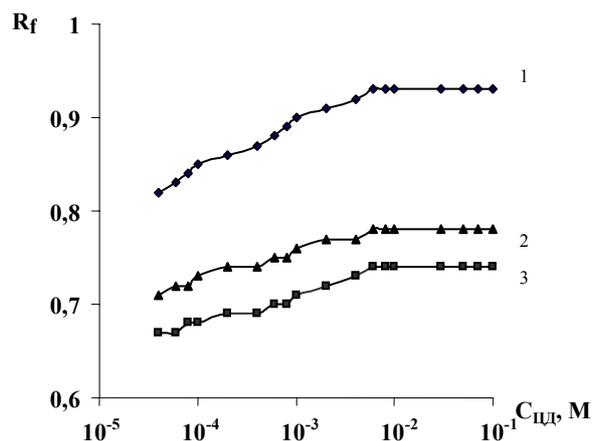


Рис. 2. Влияние концентрации 2-ГП-β-ЦД на подвижность L-аминокислот. НФ: Сорбфил. ПФ: вода-2-ГП-β-ЦД. 1 - L-тирозин, 2 - L-триптофан, 3 - L-лейцин. $C_{аминок-т} = 5 \cdot 10^{-2}$ М

Установлено, что в интервале концентраций 2-ГП-β-ЦД от $4 \cdot 10^{-5}$ М до $1 \cdot 10^{-2}$ М зоны L-изомеров исследуемых аминокислот хорошо разрешены и не имеют диффузных краёв, а при концентрациях равных или больше $1 \cdot 10^{-2}$ М они размываются. Поэтому рекомендуемый для практических целей концентрационный интервал 2-ГП-β-ЦД равен $1 \cdot 10^{-4}$ - $6 \cdot 10^{-3}$ М. Результаты расчёта параметров эффективности и селективности разделения аминокислот на D- и L-изомеры представлены в таблице 2.

Таблица 2. Параметры эффективности разделения и разрешение хроматограмм D- и L- аминокислот в подвижной фазе вода-2-гидроксипропил-β-циклодекстрин¹ (n=3)

Хроматограмма	Аминокислоты	$R_{f\text{cp}}$	$N_{\text{cp}} \cdot 10^{-1}$	ВЭТТ _{cp} , мм	R_s
а	D-тирозин	0	0	0	-
	L-тирозин	0,82	57,6	0,090	21
	D-лейцин	0	0	0	-
	L-лейцин	0,67	37,4	0,12	15
	D-триптофан	0	0	0	-
	L-триптофан	0,71	42,7	0,11	17
б	D-тирозин	0	0	0	-
	L-тирозин	0,93	99,2	0,063	30
	D-лейцин	0	0	0	-
	L-лейцин	0,74	80,0	0,062	24
	D-триптофан	0	0	0	-
	L-триптофан	0,78	67,6	0,077	23
в	D-тирозин	0	0	0	-
	L-тирозин	0,93	29,4	0,20	16
	D-лейцин	0	0	0	-
	L-лейцин	0,74	20,9	0,22	12
	D-триптофан	0	0	0	-
	L-триптофан	0,78	27,8	0,18	14

¹⁾ Обработанные хроматограммы представлены на рисунке 1.

Как следует из приведенных данных наиболее эффективное и селективное разделение аминокислот на D- и L-изомеры наблюдается при концентрации 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина в подвижной фазе равной $6 \cdot 10^{-3} \text{M}$.

В выбранных оптимальных условиях проведено определение аминокислот в фармацевтических препаратах «Нефрамин» и «Гидролизин». Лекарственные препараты «Нефрамин» и «Гидролизин» представляют собой жидкости, которые кроме смеси DL-аминокислот, содержат ионы калия, фосфора, магния («Нефрамин») и 0,1M глюкозу («Гидролизин»).

Предварительно было изучено влияние сопутствующих компонентов на хроматографическое разделение DL-аминокислот в исследуемых препаратах. Для этой цели использовали следующие электролиты: хлорид калия, дигидроортофосфат калия, гептагидрат сульфата магния и глюкозу. Результаты исследований представлены на рисунке 3.

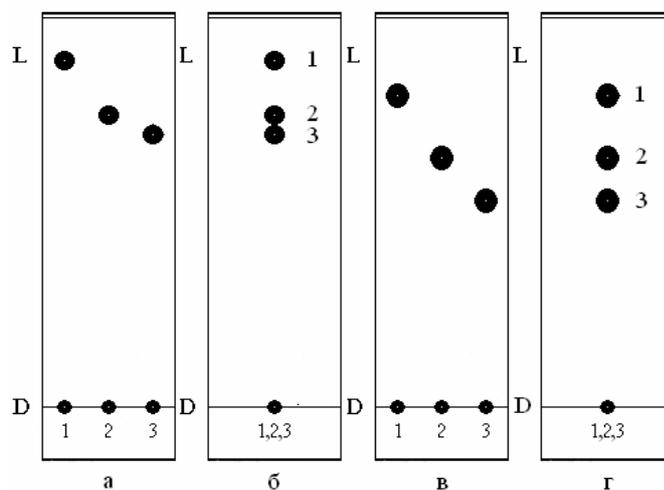


Рис. 3. Хроматограммы индивидуальных DL-аминокислот (а) и смеси DL-аминокислот (б) в отсутствие электролитов в циклодекстриновой подвижной фазе; индивидуальных DL-аминокислот (в) и смеси DL-аминокислот (г) в присутствии электролитов в циклодекстриновой подвижной фазе. НФ: Сорбфил. $C_{\text{ЦД}} = 8 \cdot 10^{-4} \text{M}$. $C_{\text{KCl}} = C_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = C_{\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} = 0,5 \text{M}$. 1 - DL-тирозин, 2 - DL-лейцин, 3 - DL-триптофан. $C_{\text{аминок-г}} = 5 \cdot 10^{-2} \text{M}$

Как видно из представленных данных при введении электролита в циклодекстриновую подвижную фазу подвижность L-аминокислот уменьшается (рис. 3 в,г) и разделение существенно улучшается. Это может быть связано с конкурентной реакцией включения солей в полость циклодекстрина. Значения подвижности индивидуальных соединений и компонентов, входящих в их смеси совпадают (рис. 3 в,г). Это свидетельствует о правильной идентификации исследуемых DL-аминокислот.

Аналогичным образом изучено влияние глюкозы на хроматографическое поведение аминокислот. Результаты исследований представлены на рисунке 4.

Установлено, что как в отсутствие (рис. 4 а, б), так и в присутствии (рис. 4 в, г), глюкозы в циклодекстриновой подвижной фазе подвижность анализируемых D- и L-изомеров аминокислот практически не меняется. Подвижности индивидуальных аминокислот (рис. 4 в) и компонентов в анализируемой смеси (рис. 4 г) практически совпадают.

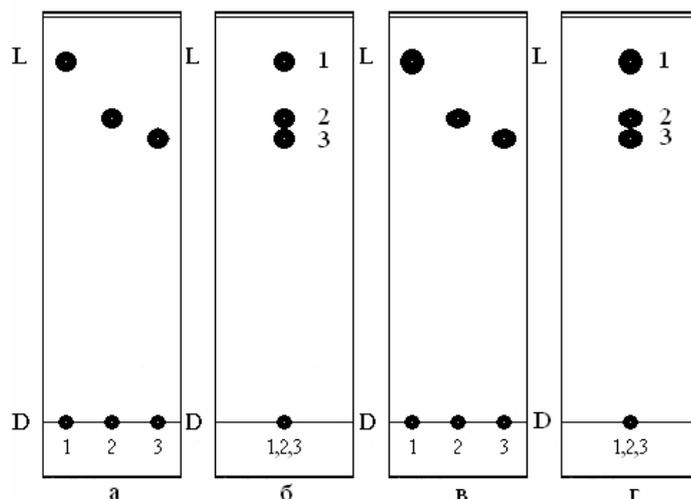


Рис. 4. Хроматограммы индивидуальных DL-аминокислот (а) и смеси DL-аминокислот (б) в отсутствие глюкозы в циклодекстриновой подвижной фазе; индивидуальных DL-аминокислот (в) и смеси DL-аминокислот (г) в присутствии глюкозы в циклодекстриновой подвижной фазе. НФ: Сорбфил. $C_{ЦД} = 8 \cdot 10^{-4} \text{M}$. $C_{C_6H_{12}O_6} = 0,1 \text{M}$. 1 - DL-тирозин, 2 - DL-лейцин, 3 - DL-триптофан. $C_{\text{аминок-т}} = 5 \cdot 10^{-2} \text{M}$

На основании полученных результатов были проанализированы исследуемые лекарственные препараты. Результаты анализа представлены на рис. 5.

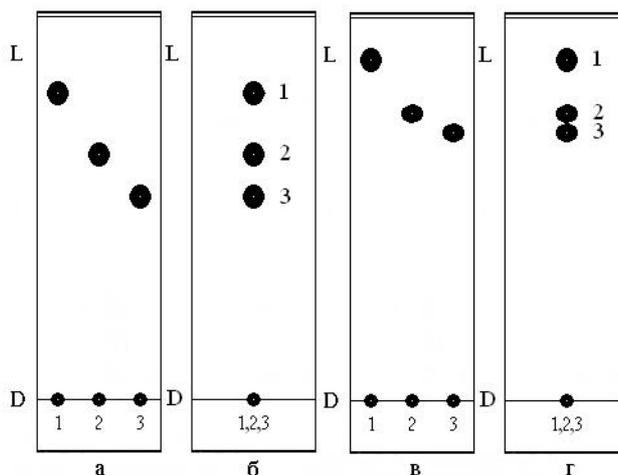


Рис. 5. Хроматограммы разделения D- и L-изомеров аминокислот в препаратах «Нефрамин» (а, б) и «Гидролизин» (в, г); а, в – хроматограммы свидетелей: 1 - тирозин, 2 - лейцин, 3 – триптофан; б, г – хроматограммы лекарственных препаратов. НФ: Сорбфил, ПФ: вода-2-ГП-β-ЦД, $C_{ЦД} = 8 \cdot 10^{-4} \text{M}$.

Как видно из приведенных данных зоны D- и L-изомеров аминокислот в растворах свидетелей и в лекарственных препаратах соответствуют друг другу.

Таким образом, разработанный подход может быть использован в аналитической практике для оценки оптической чистоты фармацевтических препаратов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ
(грант № 08-03-00725а).*

Список литературы

1. Садовникова М.С., Беликов В.М. Пути применения аминокислот в промышленности // Журн. аналит. химии. 1978. Т.47; №2. С.357-379.
2. Чернобровкин М.Г., Ананьева И.А., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А. Определение энантиомеров аминокислот в фармацевтических препаратах методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. аналит. химии. 2004. Т. 59; №1. С.64-72.
3. Шершунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. М: Мир, 1980, Т.2. 482с.
4. Штейнман А.А. Циклодекстрины // ЖВХО. 1985. Т.30; №5. С.514-518.
5. Huang M.B., Li H.K., Li G.L., Yan C.T., Wang L.P. Planar chromatographic direct separation of some aromatic amino acids and aromatic amino alcohols into enantiomers using cyclodextrin mobile phase additives // J. Chromatogr. A. 1996. Vol.742. P.289-294.
6. Hao A.Y., Tong L.H., Zhang F.S. Direct thin-layer chromatography separation of enantiomers of six selected amino acids using 2-O-[(R)-2-hydroxypropyl]-beta-CD as a mobile phase additive // Anal. Lett. 1995. Vol.28. P.2041-2048.

Сорокина Ольга Николаевна – ассистент кафедры биотехнологии и общей химии Саратовского государственного аграрного университета имени Н.И. Вавилова; Саратов

Сумина Елена Германовна – д.х.н., профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского; Саратов

Штыков Сергей Николаевич - д.х.н., профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского; Саратов

Атаян Варсения Загидовна – к.х.н., доцент, физический факультет Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского; Саратов

Барышева Светлана Владимировна - к.х.н., доцент кафедры физической и органической химии Энгельского технологического института (филиал) Саратовского государственного технического университета; Саратов

Sorokina Olga N.– Assistant Professor, Division of Biotechnology and General Chemistry, Saratov State Agricultural University named after N.I. Vavilov; Saratov, E-mail: Sorokina-ON@yandex.ru

Sumina Elena G. – Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Division of Analytical Chemistry and Chemical Ecology, N.G. Chernyshevskii Saratov State University, Saratov; E-mail: SuminaEG@yandex.ru

Shtykov Sergei N. - Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Division of Analytical Chemistry and Chemical Ecology, N.G. Chernyshevskii Saratov State University, Saratov; E-mail: ShtykovSN@mail.ru

Atayan Varseniya Z. – Cand. Sci., (Chemistry), Associate Professor, Department of Physics, N.G. Chernyshevskii Saratov State University, Saratov

Barysheva Svetlana V.- Cand. Sci., (Chemistry), Associate Professor, Division of Physical and Organic Chemistry Engels Technological Institute (Branch) of the Saratov State Technical University, Saratov