



УДК 543.544

Разделение энантиомеров производных аминокислот на силикагеле, модифицированном макроциклическим антибиотиком эремомисином

Федорова И.А.¹, Шаповалова Е.Н.¹, Староверов С.М.², Шпигун О.А.¹¹ Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва² ЗАО БиоХимМак СТ, Москва

Поступила в редакцию 05.11.2015 г.

Исследовано разделение энантиомеров производных аминокислот на хиральном сорбенте с макроциклическим антибиотиком эремомисином методом ВЭЖХ. Установлены зависимости хроматографических параметров энантиомеров производных аминокислот от состава подвижной фазы (рН буферного раствора, его концентрация, объемная доля органического модификатора, его природа). Установлено влияние структуры самой аминокислоты и структуры радикала производного на энантиоразделение.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, хиральная хроматография, макроциклический антибиотик, эремомисин, производные аминокислот

Enantioseparation of derivatives of amino acids on silica modified by macrocyclic antibiotic eremomycin

Fedorova I.A.¹, Shapovalova E.N.¹, Staroverov S.M.², Shpigun O.A.¹¹ Moscow State University, Moscow² Joint Stock Company BioChemMack ST

Macrocyclic antibiotic eremomycin is using as chiral selector in chiral HPLC. Sorbents with this antibiotic permit to enantioseparate optical isomers of amino acids and their derivatives. The main purpose of this paper was the investigation of enantioseparation of benzyloxycarbonyl- (CBZ), benzoyl-, t-butylloxycarbonyl- (BOC) derivatives of amino acids on sorbent with eremomycin. Retention time and efficiency of enantioseparation depend on structure of amino acid and radical of derivatives. Ceteris paribus, retentions time of derivatives of amino acids on eremomycin increase in the row BOC < benzoyl < CBZ. More complicated structure, the presence of aromatic rings improve the enantioseparation. Comparison of the results on vancomycin-sorbent shows the most successful enantioseparation on the eremomycin.

In summary, sorbent with antibiotic eremomycin can be used in chiral chromatography for enantioseparation of CBZ-, BOC-, benzoyl-derivatives of amino acids.

Keywords: high performance liquid chromatography, chiral chromatography, macrocyclic antibiotic, eremomycin, derivatives of amino acids

Введение

Одним из наиболее удобных методов разделения энантиомеров веществ является ВЭЖХ с использованием неподвижных фаз с привитым хиральным селектором. В качестве хиральных селекторов наиболее часто используют такие классы соединений, как белки, циклодекстрины, антибиотики, аминокислоты и их

производные [1]. Разделение энантиомеров методом ВЭЖХ используют при решении различных задач в областях медицины, химии, биологии. Одной из таких задач является разделение энантиомеров аминокислот и их производных, поскольку D- и L-изомеры этих веществ обладают различной активностью и имеют отличный друг от друга характер воздействия на организм человека. В связи с этим становится актуальной задача определения не только количественного содержания данных веществ в различных объектах, но и определения соотношения энантиомеров в них [2].

Достаточно недавно в качестве хирального селектора для ВЭЖХ стали использовать отечественный гликопептидный антибиотик эремомицин [3]. Эремомицин хорошо зарекомендовал себя как хиральный селектор для разделения энантиомеров аминокислот [4,5].

Однако разделение производных аминокислот на этом хиральном селекторе изучено мало. Целью данной работы являлось исследование закономерностей и выбор условий разделения энантиомеров бензоксикарбонил- (КБЗ), бензоил-, третбутокси- (БОК) производных аминокислот.

Эксперимент

Работу выполняли на жидкостном хроматографе «Shimadzu» LC-20 Prominence (Япония) с диодно-матричным детектором SPD-M20A. Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения LC Solution фирмы «Shimadzu». Использовали хиральную хроматографическую колонку с эремомицином Nautilus-E (БиоХимМак, Россия) размером (100*4,6) мм.

Для приготовления буферных растворов использовали гидрофосфат калия тригидрат, дигидрофосфат калия (Panreac, Испания). Для приготовления подвижной фазы применяли изопропанол, метанол 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-фенилаланин, КБЗ-DL-триптофан, КБЗ-DL-аспарагин, КБЗ-DL-аспарагиновая кислота, бензоил-DL-валин, бензоил-DL-фенилаланин, бензоил-DL-аланин, бензоил-DL-метионин, бензоил-DL-аргинин, БОК-DL-валин, БОК-DL-аланин.

Обсуждение результатов

Как известно из литературных данных [4,5], эремомицин проявляет высокую хиральную активность в обращенно-фазовом режиме жидкостной хроматографии. В работе изучены закономерности удерживания производных аминокислот на хиральной неподвижной фазе с эремомицином в варианте обращенно-фазовой хроматографии. В качестве производных аминокислот использовали бензоил-, БОК-, КБЗ- производные, структуры данных радикалов представлены на рис.1.

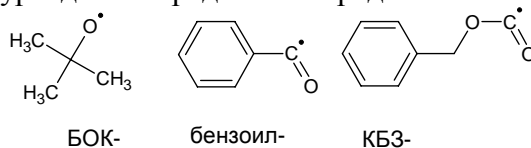


Рис. 1. Структуры радикалов производных аминокислот

Изучены закономерности удерживания производных на силикагеле, модифицированном эремомицином при элюировании смесями метанола или изопропанола и буферного раствора. Удерживание сорбатов и селективность разделения оптических изомеров определяются содержанием органического модификатора в подвижной фазе, значением pH буферного раствора и его концентрацией. Для элюирования производных аминокислот использовали фосфатный буферный раствор с pH 7.0 и 8.0. Содержание метанола, изопропанола варьировали в интервале от 1 до 30%. В результате исследований установлено, что для всех производных аминокислот L-изомер элюируется первым. В табл. 1 представлены хроматографические параметры производных аминокислот, полученные при различном составе подвижной фазы.

Таблица 1. Хроматографические параметры разделения энантиоселективных производных аминокислот на силикагеле, модифицированном эремомицином.

Вещество	k^1	R_s	α	Подвижная фаза
<i>1</i>	2	3	4	5
КБЗ- DL-валин	1.55	2.62	3.91	iPrOH-ФБ* (50мМ, pH 8) 10%-90%
КБЗ- DL-аланин	1.67	3.81	4.17	
КБЗ- DL-метионин	1.90	2.31	3.15	
КБЗ- DL-лейцин	2.36	2.81	4.32	
КБЗ- DL-норлейцин	2.46	3.01	3.99	
КБЗ- DL-аспарагиновая кислота	1.18	0.39	1.25	
КБЗ- DL-аспарагин	1.58	2.63	2.69	
бензоил- DL-аланин	1.13	3.63	2.98	
бензоил- DL-валин	1.10	2.54	2.44	
бензоил- DL-фенилаланин	3.80	4.54	4.82	
бензоил- DL-метионин	1.46	2.69	2.57	
бензоил- DL-аргинин	1.62	1.31	1.39	
БОК- DL-триптофан	7.15	2.02	2.88	
БОК- DL-серин	1.32	1.34	1.75	
КБЗ- DL-валин	1.31	2.40	4.11	iPrOH-ФБ (50мМ, pH 7) 30%-70%
КБЗ- DL-аланин	1.60	4.78	4.27	
КБЗ- DL-метионин	1.14	1.90	3.69	
КБЗ- DL-лейцин	1.55	3.57	4.89	
КБЗ- DL-норлейцин	1.30	3.55	4.61	
КБЗ- DL-аспарагиновая кислота	3.41	0.68	1.29	
КБЗ- DL-аспарагин	1.76	3.66	2.90	
КБЗ- DL-фенилаланин	2.75	4.80	8.44	
КБЗ- DL-триптофан	5.02	2.29	4.03	
бензоил- DL-аланин	2.41	4.80	3.21	iPrOH-ФБ (50мМ, pH 7) 10%-90%
бензоил- DL-валин	2.47	2.97	2.47	
бензоил- DL-фенилаланин	8.55	6.58	5.28	
бензоил- DL-метионин	3.30	3.20	2.51	
бензоил- DL-аргинин	1.83	1.53	1.41	
БОК- DL-серин	0.92	4.01	6.51	
БОК- DL-валин	0.93	1.75	2.42	
КБЗ- DL-валин	0.94	2.27	3.74	MeOH-ФБ (50мМ, pH 8) 30%-70%
КБЗ- DL-аланин	0.92	3.90	4.12	
КБЗ- DL-лейцин	1.23	2.36	4.23	
КБЗ- DL-норлейцин	1.21	2.59	4.58	
КБЗ- DL-аспарагин	1.16	3.04	2.69	
КБЗ- DL-триптофан	6.33	2.33	4.72	

1	2	3	4	5
бензоил- DL-аланин	1.19	3.57	2.75	MeOH-ФБ (50мМ, рН 8) 10%-90%
бензоил- DL-валин	1.32	2.26	2.10	
бензоил- DL-метионин	1.85	2.24	2.25	
бензоил- DL-аргинин	2.05	1.13	1.30	
БОК- DL-триптофан	8.71	2.20	2.97	
БОК- DL-серин	1.73	1.00	1.74	

1-коэффициент емкости для первого элюируемого компонента; * - ФБ = фосфатный буферный раствор

Анализ полученных данных (табл.1.) показал, что для одной и той же аминокислоты при усложнении структуры производного (в ряду БОК>бензоил->КБЗ) происходит увеличение ее удерживания, а также увеличение разрешения и селективности пиков. При этом, увеличение удерживания и разрешения пиков при переходе от бензоил- к КБЗ- производным незначительно по сравнению с увеличением тех же параметров при переходе от БОК-производных к бензоил-, что связано с более резким изменением структуры производного во втором случае при появлении ароматического кольца.

Среди всех исследованных производных аминокислот наиболее удерживаемыми в идентичных условиях являются КБЗ-производные, что связано с наличием в их структуре бензольного кольца и карбонильной группы, позволяющих реализовывать наиболее сильное взаимодействие сорбата с эремомицином. Ароматическая часть молекулы производных позволяет образовывать π - π -комплексы между сорбатом и неподвижной фазой, а наличие группы $>C=O$, содержащей π -электроны и системы двойных связей, создает возможность дополнительных π - π , дипольных взаимодействий и образования водородных связей.

На примере КБЗ-производных было изучено влияние природы аминокислоты (табл.2) на разделение энантиомеров. Установлено, что удерживание КБЗ-производных увеличивается в ряду (в скобках указаны значения коэффициентов емкости для первого энантиомера, подвижная фаза: iPrOH/ФБ (50 мМ, рН 8) 10/90): аспарагиновая кислота (1.18)<валин (1.55)<аспарагин (1.58) < аланин (1.67)<метионин (1.90) < лейцин (2.36) < норлейцин (2.46) < фенилаланин (4.91). На Рис. 2, 3 показаны примеры разделения КБЗ-производных аминокислот. Анализ полученных данных (табл. 2) показывает, что внутри одного класса производных аминокислот увеличение удерживания энантиомеров на сорбенте происходит по мере усложнения структуры и увеличения молекулы самой аминокислоты, при этом разрешение пиков энантиомеров увеличивается по мере увеличения гидрофобности производных аминокислот. Сравнительно небольшое удерживание КБЗ-DL-метионина свидетельствует о том, что наличие дополнительного атома серы уменьшает удерживание сорбата.

Установлено также, что замена изопропанола в подвижной фазе на метанол приводит к увеличению удерживания производных аминокислот, улучшению хроматографических параметров, однако при этом резко увеличивается время анализа. Из данных табл. 2 видно, что для всех изученных КБЗ-производных аминокислот увеличение органического модификатора в подвижной фазе приводит к уменьшению удерживания веществ, а также уменьшению разрешения и селективности. Полученные закономерности соответствуют режиму ОФ хроматографии, следовательно, в удерживание сорбатов на макроциклических антибиотиках вносят вклад и гидрофобные взаимодействия.

Таблица 2. Хроматографические параметры разделения энантиомеров КБЗ-производных аминокислот на эремомицине, полученные при различном содержании органического модификатора в подвижной фазе.

Вещество	Подвижная фаза	iPrOH-ФБ (50мМ, рН 8), 0.5 мл/мин		
	Объемная доля изопропанола, %	k^1	R_s	α
КБЗ-DL-валин	10	1.55	2.62	3.91
	20	1.13	1.91	3.92
	30	0.58	1.91	3.60
КБЗ- DL-аланин	10	1.67	3.81	4.17
	20	1.22	3.42	4.01
	30	0.52	1.16	3.29
КБЗ- DL-метионин	10	1.90	2.31	3.15
	20	1.22	1.57	3.30
	30	0.52	1.16	3.29
КБЗ- DL-лейцин	10	2.36	2.81	4.32
	20	1.60	3.11	4.46
	30	0.71	2.51	4.33
КБЗ- DL-норлейцин	10	2.46	3.01	3.99
	20	1.57	2.85	4.30
	30	0.60	2.55	4.22
КБЗ- DL-аспарагиновая кислота	10	1.18	0.39	1.25
	20	1.07	0.10	1.15
	30	0.80	-	-
КБЗ- DL-аспарагин	10	1.58	2.63	2.69
	20	1.29	3.02	2.71
	30	0.83	2.51	2.69
КБЗ- DL-фенилаланин	10	4.91	7.31	7.26
	20	3.78	5.60	7.48
	30	1.46	3.20	7.46

1- коэффициент емкости для первого элюируемого компонента

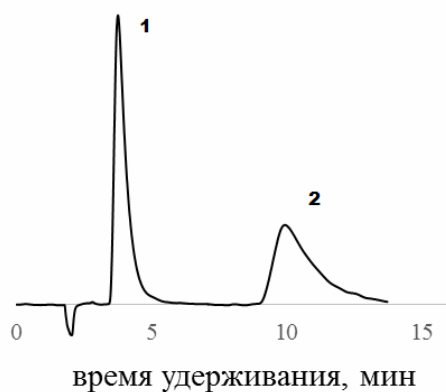


Рис. 2. Хроматограмма КБЗ-DL-аланина: 1- L-изомер, 2 – D-изомер (подвижная фаза: iPrOH/ФБ (50мМ, рН 8) 20/80, скорость потока 0.5 мл/мин; $\lambda=210$ нм)

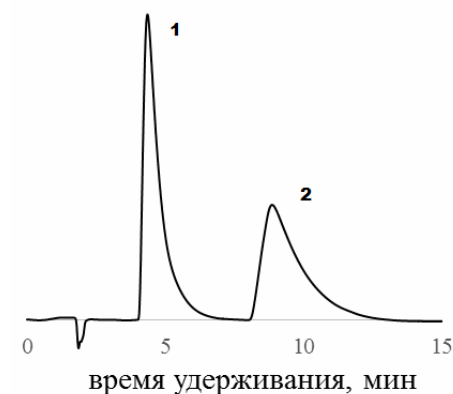


Рис. 3. Хроматограмма КБЗ-DL-аспарагина: 1- L-изомер, 2 – D-изомер (подвижная фаза: iPrOH/ФБ (50мМ, рН 8) 10/90, скорость потока 0.5 мл/мин; $\lambda=210$ нм)

Сравнение полученных данных по разделению энантиомеров производных аминокислот на сорбенте с эремомицином с данными, полученными на сорбенте с антибиотиком ванкомицином, позволяет сделать вывод о возможности получения более полного разделения энантиомеров на эремомицине [6]. Разделение изомеров исследованных производных на ванкомициновой неподвижной фазе в большинстве случаев неполное. При высокой эффективности колонки тем не менее максимальные значения селективности получены только для бензоил-DL-аланина и КБЗ-DL-аланина (1.27 и 1.24, разрешение пиков энантиомеров 1.20 и 1.34), тогда как на неподвижной фазе с эремомицином максимальные значения селективности для этих же производных аланина составили 3.21 и 4.27 соответственно (разрешение пиков 4.80 и 4.78). Более полное разделение энантиомеров производных аминокислот на эремомициновой неподвижной фазе по сравнению с ванкомициновой можно объяснить наличием в структуре эремомицина дополнительного гидрофобного кольца, которое обеспечивает образование дополнительных гидрофобных связей с сорбатами, вносящих основной вклад в энантиораспознавание.

Заключение

Проведенное исследование показало, что использование хиральной неподвижной фазы с антибиотиком эремомицином возможно для разделения энантиомеров таких производных аминокислот, как БОК-, бензоил-, КБЗ-. Высокие селективность и эффективность, особенно при разделении КБЗ-производных аминокислот, показывают, что данный сорбент перспективен для их препаративного разделения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-03-05979 А

Список литературы

1. Tang M., Zhang J., Zhuang Sh., Liu W. // *Trends Anal. Chem.* 2012. Vol. 39. pp. 180-194.
2. Berthod A., Liu Y., Bagwill C., Armstrong D.W. // *J. Chromatogr.* 1991. Vol. 731. pp. 123-137.
3. Staroverov S.M. et al. // *J. of Chromatogr. A.* 2006. Vol. 1108. pp. 263-267.
4. Petrusevska K. et al. // *J. Sep. Sci.* 2006. Vol. 29. pp. 1447-1457.
5. Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiarov G.G, Staroverov S.M. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006. Vol. 42. No 6. pp. 536-544.
6. Ананьева И.А. Дисс. канд. хим. наук. Москва, 2000. С. 90-92.

References

1. Tang M., Zhang J., Zhuang Sh., Liu W., *Trends Anal. Chem.*, 2012, Vol. 39, pp. 180-194. DOI:10.1016/j.trac.2012.07.006.
2. Berthod A., Liu Y., Bagwill C., Armstrong D.W., *J. Chromatogr.*, 1991, Vol. 731, pp. 123-137. DOI:10.1016/0021-9673(95)01198-6.
3. Staroverov S.M et al., *J. of Chromatogr. A.*, 2006, Vol. 1108, pp. 263-267. DOI:10.1016/j.chroma.2006.01.073.
4. Petrusevska K. et al., *J. Sep. Sci.*, 2006, Vol. 29, pp. 1447-1457. DOI: 10.1002/jssc.200600036.
5. Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiarov G.G, Staroverov S.M., *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2006, Vol. 42, 6, pp. 536-544. DOI: 10.1134/S0003683806060020.
6. Anan'eva I.A. Diss. cand. chem. nauk. Moscow, 2000, pp. 90-92.

Федорова Ирина Александровна – аспирант кафедры аналитической химии, Московский государственный университет, Москва

Шаповалова Елена Николаевна - доцент кафедры аналитической химии, Московский государственный университет, Москва

Староверов Сергей Михайлович – д.х.н., Генеральный директор ЗАО «БиоХимМак СТ», Москва

Шпигун Олег Алексеевич – чл.-корр. РАН, профессор кафедры аналитической химии, д.х.н., Московский государственный университет, Москва

Fedorova Irina A. – the post graduate student, department of analytical chemistry, Moscow State University, Moscow, e-mail: irinafedorova89@gmail.com

Shapovalova Elena N. - associate prof., department of analytical chemistry, Moscow State University, Moscow, e-mail: shapovalova_e_n@mail.ru

Staroverov Sergej M. - grand Ph.D (chemistry), CEO Joint Stock Company BioChemMack ST, Moscow

Shpigun Oleg A. – prof., grand Ph.D (chemistry), department of analytical chemistry, Moscow State University, Moscow.