

УДК 543. 544

РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ЭНАНТИОМЕРОВ АМИНОКИСЛОТ НА АМИНИРОВАННОМ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

И. А. Ананьева, Е. Н. Шаповалова, С. А. Лопатин, О. А. Шпигун, В. П. Варламов,
В. А. Даванков

(кафедра аналитической химии)

Изучено хроматографическое поведение оптически активных производных аминокислот с различными по структуре модификаторами на силикагеле, модифицированном аминированным β -циклодекстрином. Показано, что на распознавательную способность колонки влияет структура модифицирующего агента и наличие полярных групп в аминокислоте. Изучено влияние соотношения органического растворителя и буфера в подвижной фазе на коэффициент удерживания и разрешение. Проведена оценка эффективности и селективности сорбента в обращенно-фазовом и полярно-органическом режимах для бензоксикарбонил-аминокислот и рассмотрено различие в механизмах удерживания.

Разделение изомеров оптически активных аминокислот – одна из важных задач во многих областях химии, биологии, медицины, фармакологии.

Как известно, L-производные аминокислот широко распространены в природе и живых организмах. Присутствие D-формы аминокислоты может говорить о наличии микроорганизмов, например бактерий, и в этом случае аминокислоты могут быть использованы в качестве хирального маркера для детектирования образования таких микроорганизмов.

Систематическое изучение β -циклодекстринов для разделения энантиомеров методом жидкостной хроматографии началось более 15 лет назад. Специфический механизм взаимодействия сорбата с хиральной неподвижной фазой заслуживает особого внимания.

В водных растворах циклодекстрины имеют конформацию усеченного конуса с гидрофобной внутренней поверхностью. Гидрофобные молекулы, способные входить и выходить из полости, обратимо сорбируются такой поверхностью. Степень удерживания гидрофобных сорбатов во многом зависит от эффективности контакта с внутренней поверхностью полости. Энантиоселективность связывают с хиральной структурой при входе в полость, образованной расположенными здесь гидроксильными группами глюкозидных остатков [1]. Кроме того, необходимо учитывать образование водородных связей, которые также вносят вклад в удерживание сорбатов на поверхности неподвижной фазы.

Помимо β -циклодекстрина для хирального разделения используют модифицированные β -циклодекстрины, чаще всего это нафтил- и фенилкарбаматные производные, а также гидроксипропил- и ацилированный β -циклодекстрин [2]. Возникновение дополнительных взаимодействий, в основном стерических препятствий, отмеченных для ряда

соединений, увеличивает хиральное распознавание на поверхности β -циклодекстрина [3].

В качестве новой неподвижной хиральной фазы для разделения оптических изомеров нами изучен аминированный β -циклодекстрин. Можно предположить, что аминогруппы, расположенные на поверхности β -циклодекстрина, внесут свой вклад в удерживание и селективность разделения хиральных соединений. Представляется перспективным изучение удерживания и разделения оптически активных производных аминокислот с различными модифицирующими агентами на новом сорбенте (табл. 1).

Экспериментальная часть

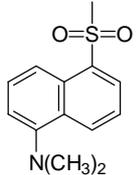
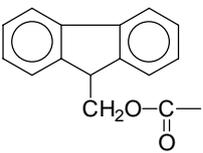
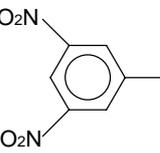
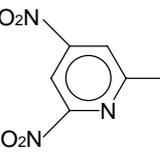
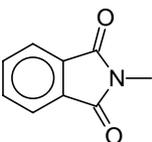
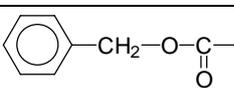
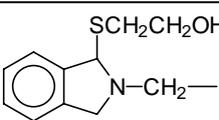
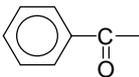
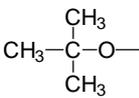
Работу выполняли при комнатной температуре на жидкостном хроматографе «Shimadzu LC-6A» со спектрофотометрическим детектором ($\lambda = 254$ нм или $\lambda = 230$ нм для БОК-производных аминокислот) и интегратором «Shimadzu CR601». Использовали стальные колонки размером (4,6×250) мм, заполненные *LiChrosorb Si 100* (10 μ m), фирмы *Merck* (Германия), химически модифицированным аминированным β -циклодекстрином.

Для приготовления буферных растворов использовали триэтиламин и уксусную кислоту квалификации «для хроматографии». Для приготовления подвижной фазы применяли 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-тирозин, КБЗ-DL-триптофан, бензоил-DL-валин, бензоил-DL-фенилаланин, дансил-DL-норлейцин, дансил-DL-лейцин, дансил-DL-норвалин, дансил-DL-валин, дансил-DL-фенилаланин, ФМОК-DL-валин, ФМОК-DL-лейцин, ОФА-DL-лейцин, ОФА-DL-изолейцин, ОФА-DL-норлейцин, ОФА-DL-треонин, ОФА-DL-аспараги-

Таблица 1

Радикалы модифицирующих агентов аминокислот

Структурная формула	Обозначение
	дансил
	ФМОК
	ДНФ
	ДНП
	фталил
	КБЗ
	ОФА
	бензоил
	БОК

новая кислота, ОФА-DL-глутаминовая кислота, ОФА-DL-тирозин, ОФА-DL-фенилаланин, фталил-DL-валин, ДНФ-DL-норвалин, ДНФ-DL-метионин, ДНФ-DL-этионин, ДНФ-DL-норлейцин, ДНФ-DL-цитрулин, ДНП-DL-лейцин, БОК-DL-триптофан, БОК-DL-фенилаланин, БОК-метил-DL-фенилаланин, БОК-DL-валин, БОК-DL-аланин, БОК-метил-DL-аланин, БОК-фенил-DL-аланин.

Результаты и их обсуждение

Известно, что оптические изомеры аминокислот не могут быть разделены на β -циклодекстрине, так как размер молекулы аминокислоты слишком мал, чтобы образовывать комплекс включения на поверхности неподвижной фазы, разделение проводят в виде производных. Полости β -циклодекстрина имеют определенный размер, и в качестве модифицирующего агента используют широкий круг соединений, содержащих в молекуле от одного до трех циклов или разветвленную углеродную цепь [4]. В работе изучены производные с различными по структуре модифицирующими группами, которые приведены в табл. 1.

Изучены закономерности удерживания производных на аминированном β -циклодекстрине при элюировании смесями метанола и буферного раствора. Удерживание сорбатов и селективность разделения оптических изомеров определяются содержанием метанола в подвижной фазе и значением ее pH. Известно, что на циклодекстриновых хиральных фазах удерживание производных аминокислот уменьшается при увеличении pH, оптимальная область pH 4–5 [5]. Для элюирования производных аминокислот использовали буферный раствор ацетата триэтиламония с pH 4,1, за исключением *o*-фталевых производных, для которых использовали буфер с pH 7,0 из-за их неустойчивости при pH < 7,0. Содержание метанола варьировали в интервале от 2 до 98%.

В результате исследований для разделения производных аминокислот с каждым из изученных модифицирующих агентов была выбрана оптимальная подвижная фаза. Установлено, что для всех производных аминокислот L-изомер элюируется первым.

В табл. 2 представлены хроматографические параметры для тех из изученных производных аминокислот, оптические изомеры которых удалось разделить.

Как известно из литературных данных [4, 6], при использовании водно-органических подвижных фаз на циклодекстриновых хиральных сорбентах реализуется обращенно-фазовый механизм удерживания сорбатов, причем определяющим является образование комплексов включения. Таким образом, структура модификатора аминокислоты играет важную роль в хиральном распознавании изомеров.

Анализ полученных данных (табл. 2) показывает, что удерживание сорбатов растет с увеличением числа циклов и при наличии нитро- и амино-групп в структуре модификатора аминокислоты в ряду: Дансил > ФМОК > ДНФ(ДНП) > Фталил > КБЗ > ОФА > Бензоил > БОК.

Т а б л и ц а 2

Хроматографические параметры разделения энантиоселективных производных аминокислот на аминированном β -циклодекстрине

Вещество	k' ¹	α	R_s	N^2	Подвижная фаза
КБЗ-DL-аланин	16,83	1,09	0,93	5424	MeOH/TEAA* 95/5
КБЗ-DL-метионин	20,76	1,10	0,95	4666	
КБЗ-DL-норлейцин	10,62	1,10	0,92	5320	
КБЗ-DL-лейцин	9,72	1,14	0,89	4523	
КБЗ-DL-валин	16,89	1,14	1,01	4699	
КБЗ-DL-фенилаланин	16,87	1,12	1,00	4917	
КБЗ-DL-тирозин	20,22	1,11	0,90	5279	
КБЗ-DL-триптофан	27,11	1,20	1,25	5120	MeOH/TEAA* 90/10
КБЗ-DL-аланин	5,67	1,13	1,01	4571	MeOH/TEAA* 10/90
КБЗ-DL-метионин	8,38	1,16	0,90	2258	
КБЗ-DL-норлейцин	6,88	1,16	0,98	2405	
КБЗ-DL-лейцин	9,25	1,22	1,03	2697	
КБЗ-DL-валин	6,23	1,17	1,08	4552	
КБЗ-DL-фенилаланин	6,22	1,12	1,01	3022	MeOH/TEAA* 20/80
КБЗ-DL-тирозин	7,46	1,10	0,84	2875	
КБЗ-DL-триптофан	10,0	1,17	1,15	3243	MeOH/TEAA* 10/90
Бензоил-DL-валин	3,90	1,13	0,80	4714	
Бензоил-DL-фенилаланин	7,42	1,07	0,60	4312	
Дансил-DL-норлейцин	12,77	1,25	0,97	1402	MeOH/TEAA* 30/70
Дансил-DL-лейцин	12,18	1,65	1,2	1000	
Дансил-DL-норвалин	6,29	1,12	0,7	2003	
Дансил-DL-валин	8,78	1,27	1,25	1820	
Дансил-DL-фенилаланин	14,89	1,09	0,4	1523	
ФМОК-DL-валин	5,15	1,18	1,25	2660	
ФМОК-DL-лейцин	5,4	1,09	0,40	1784	
ОФА-DL-лейцин	5,78	1,16	0,95	2687	MeOH/TEAA** 10/90
ОФА-DL-изолейцин	8,11	1,32	1,50	2006	
ОФА-DL-норлейцин	4,87	1,08	0,60	4536	
ОФА-DL-треонин	1,91	1,19	1,30	4462	
ОФА-DL-аспарагиновая кислота	7,63	1,20	0,70	2447	
ОФА-DL-глутаминовая кислота	8,38	1,18	0,62	4163	
ОФА-DL-фенилаланин	4,21	1,37	1,57	2324	MeOH/TEAA** 20/80
ОФА-DL-тирозин	6,99	1,50	2,41	3102	
Фталил-DL-валин	5,85	1,13	0,60	715	MeOH/TEAA* 20/80
ДНФ-DL-норвалин	8,97	1,08	0,71	2796	
ДНФ-DL-метионин	10,17	1,07	0,69	2713	
ДНФ-DL-этионин	12,12	1,08	0,67	2815	
ДНФ-DL-норлейцин	9,63	1,08	0,82	3341	
ДНФ-DL-цитрулин	6,86	1,08	0,79	1826	
ДНП-DL-лейцин	4,74	1,16	1,31	3120	
БЭК-DL-триптофан	9,47	1,12	0,50	780	
БЭК-DL-фенилаланин	6,18	1,24	0,95	1188	
БЭК-метил-DL-фенилаланин	4,65	1,18	0,60	1516	
БЭК-DL-валин	3,69	1,19	0,75	1404	
БЭК-DL-аланин	4,22	1,14	0,6	1284	
БЭК-метил-DL-аланин	3,01	1,37	0,92	1308	
БЭК-фенил-DL-аланин	5,99	1,22	0,9	1388	

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

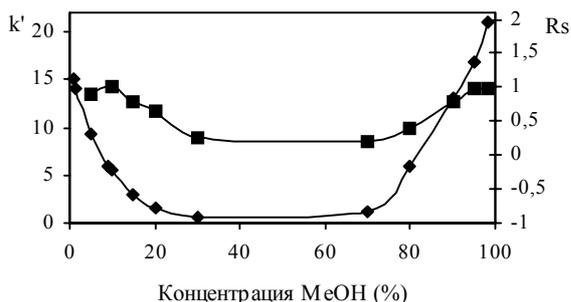


Рис. 1. Влияние процентного содержания метанола в подвижной фазе на удерживание (k') (□) и разрешение (R_s) (○) КБЗ-DL-аланина; колонка аминированный β -циклодекстрин, 25 см; подвижная фаза содержала определенный процент метанола и буфера; буфер 1%-й ацетат триметиламмония (ТЕАА) рН 4,1 (скорость потока 1 мл/мин, $l = 254$ нм)

Наличие циклов обуславливает гидрофобные взаимодействия с полостью β -циклодекстрина, а присутствие полярных групп ($-\text{NO}_2$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{SO}_2$) — образование водородных связей с гидроксильными и амино-группами аминированного β -циклодекстрина, которые определяют удерживание. Среди изученных производных наибольшее сродство к неподвижной фазе имеют Дансил- и ФМОК-производные аминокислот, для их элюирования с колонки подвижная фаза содержала 30% метанола.

Для Дансил-производных получена наиболее высокая селективность разделения, высокие значения коэффициентов селективности получены также при разделении ОФА-, КБЗ- и БОК- производных аминокислот. Важной особенностью изученной неподвижной фазы является возможность разделения БОК- производных аминокислот, ранее это было достигнуто только для гидроксипропильных производных β -циклодекстрина [7].

Удерживание производных и селективность разделения оптических изомеров зависит не только от модифицирующего агента, но и от структуры самой аминокислоты. Влияние природы аминокислоты изучали на примере КБЗ- и ОФА- производных, поскольку они более полно исследованы, и для них получено разделение изомеров наибольшего числа аминокислот.

Установлено, что удерживание КБЗ-производных увеличивается в ряду (в скобках указаны значения коэффициентов емкости): серин (4,01) < аланин (5,67) < валин (6,23) < норлейцин (6,88) < лизин (7,21) < метионин (8,38) < лейцин (9,25) < треонин (10,84) < фенилаланин (16,87) < тирозин (20,22) < триптофан (27,11) < аспарагин < аспарагиновая кислота, что в основном коррелирует с изменением гидрофобности заместителя у хирального атома углерода аминокислоты.

Удерживание ОФА-производных увеличивается в ряду: изосерин (0,88) < треонин (1,91) < аргинин (1,93) < аспарагин (2,20) < серин (2,40) < глутамин (3,34) < гистидин (3,76) < норвалин (4,35) < аланин (4,57) < норлейцин (4,87) < метионин (5,17) < лизин (5,75) < лейцин (5,78) < валин (6,84) < аспарагиновая кислота (7,63) < изолейцин

(8,11) < глутаминовая кислота (8,38) < тирозин (9,21) < фенилаланин (12,99) < триптофан (20,55). Видно, что ряд удерживания заметно изменился по сравнению с КБЗ-производными: увеличилось относительное удерживание валина, лейцина, норлейцина, аланина, лизина и уменьшилось — треонина, аспаргина, аспаргиновой кислоты. Мало удерживание и производных аргинина, глутамина и гистидина. Это свидетельствует о том, что наличие дополнительных полярных групп в структуре заместителя у хирального атома углерода аминокислоты уменьшает удерживание производных с *o*-фталевым альдегидом. Присутствие дополнительных амино- и гидроксигрупп уменьшает и селективность разделения данных производных, в то же время селективность разделения ОФА-производных аспаргиновой и глутаминовой кислот достаточно велика (коэффициент селективности 1,2). Вероятно, это зависит от возможности образования водородных связей между сорбатами и аминированным β -циклодекстрином.

Анализ данных, полученных для других производных (табл. 2), подтверждает, что данная хиральная неподвижная фаза более селективна к тем аминокислотам, в структуре которых содержится одна амино- и одна кислотная группа. При наличии дополнительных гидроксигрупп (серин), амино- (аспарагин, аргинин, глутамин) и кислотной (глутаминовая кислота) групп, разделения не наблюдается, за исключением тирозина и, как отмечалось выше, некоторых производных с *o*-фталевым альдегидом.

Известно, что зависимость коэффициентов емкости производных аминокислот от содержания органического растворителя в подвижной фазе на немодифицированном β -циклодекстрине имеет вид кривой с минимумом. Было исследовано влияние соотношения метанола и буферного раствора (1% ацетат триметиламмония рН 4,1) в подвижной фазе на коэффициент удерживания и разрешение для бензоксикарбонил производных аминокислот. Полученная зависимость для КБЗ-DL-аланина показана на рис. 1. Аналогичное поведение проявляли и другие изученные КБЗ-производные. Минимум удерживания достигается при содержании метанола в подвижной фазе между 30 и 65%.

Такой характер зависимости связан с изменением механизма удерживания сорбатов при высоком содержании

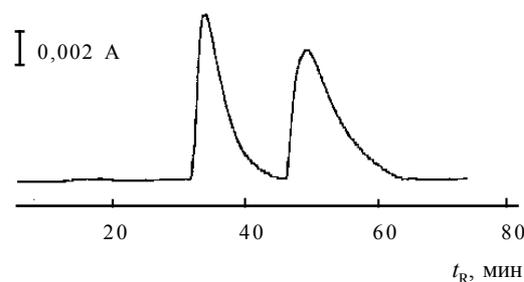


Рис. 2. Хроматограмма искусственной смеси ОФА-D-тирозина и ОФА-L-тирозина. Подвижная фаза: метанол — буфер 1% ацетат триметиламмония рН 7,1 (20/80)

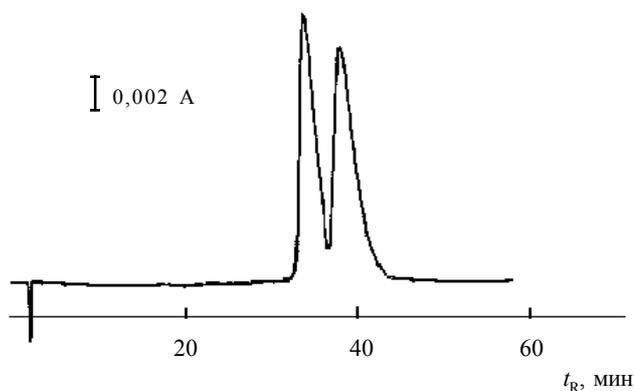


Рис. 3. Хроматограмма КБЗ-DL-триптофана. Подвижная фаза: метанол – буфер 1% ацетат триэтиламина pH 4,0 (90/10)

полярных органических растворителей в подвижной фазе. При работе с подвижными фазами, содержащими от 90 до 100% ацетонитрила или метанола, реализуется так называемый полярно-органический вариант жидкостной хроматографии [6]. При высокой концентрации органического компонента в подвижной фазе он занимает полость β -циклодекстрина, делая их недоступными для образования комплекса включения с хиральным соединением. Разделение происходит за счет образования водородных связей, дипольных и стерических взаимодействий. Использование таких подвижных фаз стало широко распространено на β -циклодекстринах, так как в ряде случаев это позволяет повысить селективность разделения оптических изомеров. Было установлено, что удерживание КБЗ-производных увеличивается в ряду лейцин > норлейцин > аланин > валин > метионин > фенилаланин > тирозин > триптофан. Мы видим, что произошло изменение порядка элюирования по сравнению с обращенно-фазовым вариантом. Заметно выросло удерживание аланина, валина и метионина и уменьшилось удерживание лейцина. Это

можно объяснить уменьшением вклада гидрофобных взаимодействий в удерживание, так как в полярно-органическом варианте комплекс включения на поверхности β -циклодекстрина не образуется.

Необходимо отметить, что использование полярно-органического варианта позволяет повысить эффективность хроматографической колонки. Проведена оценка эффективности и селективности для производных аминокислот с бензоксикарбонилем при элюировании водно-органическими смесями и смесями полярных растворителей. Из экспериментальных данных (табл. 2), видно, что переход к подвижным фазам с высоким содержанием метанола позволяет увеличить эффективность колонки в 1,2–2,2 раза, максимальное повышение эффективности получено для КБЗ-DL-норлейцина и КБЗ-DL-метионина. Для исследованного сорбента в обращенно-фазовом варианте число теоретических тарелок достигает порядка 4550 на 1 м, в полярно-органическом варианте число теоретических тарелок достигает порядка 5420 на 1 м.

Селективность разделения изученных производных практически не изменяется. Из табл. 2 видно, что на аминированном β -циклодекстрине в обращенно-фазовом варианте α изменяется от 1,10 до 1,22, в полярно-органическом варианте – от 1,09 до 1,20, максимальное значение R_s достигается в обоих случаях для КБЗ-триптофана и составляет 1,22 и 1,25 соответственно.

Проведенное исследование показало, что распознавательная способность аминированного β -циклодекстрина повышается для производных аминокислот при использовании гидрофобных модифицирующих агентов, содержащих одно ароматическое кольцо. Наличие полярных групп в структуре заместителя у хирального атома углерода аминокислоты уменьшает эту способность. Таким образом, изученная новая хиральная фаза наиболее эффективна для разделения аминокислот в виде ОФА- и КБЗ-производных. На рис. 2, 3 показаны примеры разделения этих производных.

Работа поддержана грантом РФФИ № 99-03-32756.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алленмарк С. Хроматографическое разделение энантиомеров. М., 1991.
2. Lee S.H., Berthod A., Armstrong D.W. // J.Chromatogr. 1992. **603**. P. 83.
3. Stulcup A.M., Chang S.C., Armstrong D.W. // J. Chromatogr. 1991. **540**. P. 113.
4. Armstrong D.W., Chang L.W., Chang S.C. etc. // J. Liq. Chrom. Rel. Technol. 1997. **20**. P. 3279.
5. Li S., Purdy W.C. // J. Chromatogr. 1991. **543**. P. 105.
6. Chang S.C., Reid G.L., Chen S., Chang C.D., Armstrong D.W. // Trend in analytical chemistry. 1993. **12**. P. 143.
7. Chang S.C., Wang L.R., Armstrong D.W. // J. Liq. Chrom. 1992. **15**. P. 1411.

Поступила в редакцию 15.02.01