

УДК 543.545

РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ *N*-ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИХ АНТИБИОТИКОВ

А.Ф. Прохорова, М.А. Кузнецов, Е.Н. Шаповалова, С.М. Староверов, О.А. Шпигун

(кафедра аналитической химии и кафедра химической энзимологии;
e-mail: shapovalova@analyt.chem.msu.ru)

Оценены возможности использования макроциклического антибиотика эремомицина как хирального селектора для разделения энантиомеров *N*-производных аминокислот в капиллярном электрофорезе. Для выбора условий разделения изучено влияние основных факторов (состав и pH фонового электролита, концентрация хирального селектора, геометрия капилляра, величина приложенного напряжения) на миграцию производных аминокислот и энантиоселективность в присутствии эремомицина. На примере дансильных производных аминокислот проведено сравнение энантиоселективности ванкомицина и эремомицина в капиллярном электрофорезе.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, макроциклические антибиотики, энантиораспознавание, производные аминокислот.

Введение

Энантиоразделение аминокислот – важная задача, решение которой представляет интерес для медицинской, пищевой и фармацевтической промышленности. Разделение оптически активных аминокислот проводят главным образом с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или капиллярным электрофорезом (КЭ) в виде производных. Наиболее важным фактором, определяющим успех разделения, является природа хирального селектора. В качестве хиральных селекторов (ХС) в КЭ используют циклодекстрины и их производные, ациклические олигосахариды и полисахариды, макроциклические антибио-

тики (МА) [1]. Наличие нескольких хиральных центров позволяет МА разделять широкий круг разнообразных по структуре соединений, однако известно, что наибольшую энантиоселективность они проявляют по отношению к соединениям, содержащим кислотный или анионный остаток (например, карбоксильную группу). В литературе описан новый макроциклический антибиотик – эремомицин (рис. 1), он является структурным аналогом уже хорошо зарекомендовавшего себя ванкомицина. Из данных ВЭЖХ известно, что эремомицин проявляет селективность по отношению к энантиомерам немодифицированных α -аминокислот [2], потому представляется интересным оценить возможность его использования также и в КЭ. Энантиоселективные свойства эремомицина по отношению к производным аминокислот в литературе не описаны. Данная работа посвящена оценке энантиораспознавательной способности эремомицина к *N*-производным аминокислот методом КЭ и оптимизации условий разделения энантиомеров.

Экспериментальная часть

Реагенты и аппаратура. В работе использовали дансильные производные фенилаланина (дансил-DL-Phe), лейцина (дансил-DL-Leu) и треонина (дансил-DL-Thr), а также карбоксибензильные производные аспарагиновой кислоты (КБЗ-DL-Asp) и аланина

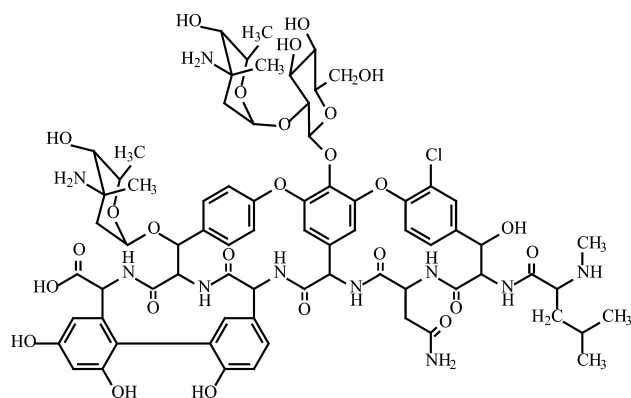


Рис. 1. Структура эремомицина

(КБЗ-DL-Ala) («Sigma», США), натрия гидроксид, уксусную кислоту, натрия ацетат, калия дигидрофосфат, натрия гидрофосфат дигидрат, натрия тетраборат декагидрат, калия гидроксид, фосфорную кислоту, соляную кислоту квалификации «х.ч.» («Реахим», Россия), Tris («Fluka», Швейцария), ацетон «для хроматографии» («Криохром», Россия). В качестве хиральных селекторов использовали ванкомицина гидрохлорид и эремомицина сульфат, предоставленные ЗАО «БиохимМак СТ» (Россия).

Работу выполняли на системе капиллярного электрофореза «Капель-105» (НПФ АП «Люмэкс», Россия) со спектрофотометрическим детектором (190–380 нм). Использовали кварцевые капилляры 58,5 см (эффективная длина 50 см) и 35 см (эффективная длина 27 см) с внутренним и внешним диаметрами 75 и 375 мкм соответственно («Polymicro Technologies», США). Детектирование проводили при длинах волн 240 и 254 нм. Температура термостатирования капилляра 20°C. Для получения и обработки данных использовали программное обеспечение «Мультихром» 1.52h (ЗАО «Амперсенд», Россия). pH растворов контролировали на иономере ЭВ-74. Подготовку растворов проводили в УЗ-ванне «Сапфир» (НПФ «Сапфир», Москва).

Техника эксперимента. Стандартные растворы производных аминокислот (1 мг/мл) готовили растворением в дистиллированной воде точных навесок соединений. Для приготовления растворов фонового электролита (ФЭ) использовали 50 и 100 мМ фосфатные буферные растворы (pH в диапазоне 6,2–7,1), 50 мМ боратный буферный раствор (pH 9,2), 50 мМ раствор TRIS (pH 8,0). ФЭ получали растворением точной навески хирального селектора в буферном растворе. ФЭ фильтровали через фильтрующую насадку на шприц «Millex® GV», мембрана «Durapore® PVDF» («Millipore», Ирландия), размер пор 0,22 мкм. Все растворы дегазировали в УЗ-ванне.

Для подготовки нового капилляра к работе его последовательно промывали 0,1 М раствором соляной кислоты, водой, 0,1 М раствором гидроксида натрия, водой, раствором фонового электролита, не содержащего хиральный селектор (по 30 мин каждым раствором). Ежедневно перед началом работы для приведения в состояние равновесия поверхности капилляра проводили промывку 0,1 М раствором гидроксида натрия, водой, ФЭ (по 5 мин каждым раствором). Между анализами капилляр промывали ФЭ (2–3 мин). Пробу вводили гидродинамическим способом (125 мбар·с) с входного конца капилляра. Маркер ЭОП – 3 об.% раствор ацетона в ФЭ. Из получен-

ных электрофореграмм находили время миграции, далее рассчитывали электрофоретическую подвижность, коэффициент селективности, число теоретических тарелок (N) и разрешение пиков (R_s) по известным формулам [3].

Результаты и обсуждение

Методом ВЭЖХ показано, что эремомицин энантиоселективен по отношению к профенам, иминокислотам и немодифицированным α -аминокислотам, особенно ароматическим [2, 4]. Для выбора условий разделения энантиомеров тестовых N-производных аминокислот варьировали природу и pH фонового электролита, длину капилляра, величину приложенного напряжения и концентрацию хирального селектора.

Влияние состава и pH фонового электролита. Значение изоэлектрической точки эремомицина составляет 7,6 (100 мМ фосфатный буферный раствор). В области pH < 7,6 эремомицин имеет положительный заряд и обладает собственной электрофоретической подвижностью в направлении катода. Как известно, миграция хирального селектора в направлении, противоположном миграции вещества (в нашем случае это отрицательно заряженные производные аминокислот, которые мигрируют к аноду), представляет дополнительное условие для разделения энантиомеров, поскольку увеличивает разницу в электрофоретической подвижности свободного и связанного энантиомеров. Таким образом, фосфатные буферные растворы с pH 6,2–7,1 перспективны как фоновые электролиты при использовании хирального селектора – эремомицина. Однако при введении МА в фоновый электролит с pH < 7,2 серьезной проблемой является адсорбция ХС на стенках капилляра из-за отрицательного заряда его поверхности. Для подавления адсорбции используют достаточно концентрированные (50–100 мМ) буферные растворы. При столь высокой концентрации фонового электролита с увеличением приложенного напряжения растет сила тока (до 140 мкА), что приводит к большому выделению джоулева тепла и повышению температуры внутри капилляра, а следовательно, к ухудшению условий разделения энантиомеров. Поэтому максимальная концентрация буферного раствора в фоновом электролите зависит от природы электролита: она достигает 100 и 50 мМ для фосфатных и боратных растворов соответственно.

При использовании фосфатного буферного раствора с pH 7,1 исследуемые вещества имеют низкую подвижность, поэтому для получения пиков на электрофореграмме необходимо прикладывать внешнее

давление 10–15 мбар. Время миграции производных аминокислот при этом составляет 17–26 мин. Повышение приложенного напряжения уменьшает время миграции, но при этом растет сила тока. В процессе исследования использовали напряжение 10 кВ, при этом сила тока не превышала 90 мкА. Использование в качестве ФЭ фосфатного буферного раствора с рН 7,1 позволило разделить все исследованные производные аминокислот (табл. 1). Селективность разделения энантиомеров возрастает в ряду дансил-DL-Phe < дансил-DL-Leu < дансил-DL-Thr. При использовании буферного раствора с рН 6,2 время миграции несколько уменьшается, однако ухудшаются эффективность и селективность разделения энантиомеров. Таким образом, данный ФЭ менее удобен для работы.

Для снижения времени анализа применяли более короткий капилляр общей длиной 35 см. Разделить энантиомеры дансил-аминокислот удалось при использовании 50 мМ фосфатного буферного раствора (рН 7,1), при напряжении 7 кВ и внешнем давлении 10 мбар. В этих условиях происходит разделение энантиомеров всех исследованных дансил-аминокислот с хорошей воспроизводимостью времени миграции и базовой линии, но разрешение уменьшается в 2–4 раза по сравнению с длинным капилляром (см. табл. 1).

Использование 50 мМ боратного буфера (рН 9,2) позволяет увеличить подвижность аналитов. В этом случае возможно определение без дополнительного внешнего давления, хотя продолжительность анализа довольно велика. Например, разделение энантиомеров дансил-DL-Leu достигается за 40 мин. Селективность разделения при этом незначительно уменьшается, а эффективность повышается до 60 000 ТТ/м. Данный эффект связан с отрицательным зарядом эремомидина

на при рН > 7,6 и уменьшением адсорбции ХС на одноименно заряженных стенках капилляра. К сожалению, щелочные растворы эремомидина неустойчивы, поэтому следует ежедневно готовить свежий раствор ФЭ и менять его через 2–3 ч работы. Использование 50 мМ боратного буфера (рН 9,2) позволило разделить энантиомеры всех дансил-аминокислот без использования внешнего давления в коротком капилляре. Разрешение пиков энантиомеров составило: 2,64 (дансил-DL-Phe); 1,59 (дансил-DL-Leu) и 1,80 (дансил-DL-Thr).

В последнее время в литературе все чаще рекомендуют использовать ФЭ на основе органических буферных растворов [5]. Использование 50 мМ раствора Tris (рН 8,0) в качестве ФЭ позволяет значительно уменьшить величину тока во время анализа за счет небольшой электропроводности, что, безусловно, способствует повышению стабильности системы, однако при этом уменьшаются энантиоселективность и эффективность капилляра. Разрешение пиков энантиомеров дансил-аминокислот составляет 1,6–1,9 (наибольшее значение получено для дансил-DL-Thr).

Для разделения производных аминокислот по совокупности факторов (время анализа, селективность и эффективность) оптимальным оказался буферный раствор с рН 7,1. На рис. 2 показано разделение энантиомеров дансил-DL-Leu для исследованных буферных растворов с использованием короткого капилляра. Сопоставление данных, приведенных в табл. 1, позволяет сделать вывод о том, что использование короткого капилляра полезно для уменьшения времени анализа, но при разделении веществ с близкими значениями электрофоретической подвижности следует отдать предпочтение более универсальному длинному капилляру, чтобы успели сформироваться зоны этих веществ.

Таблица 1

Влияние длины капилляра на разделение дансил-производных аминокислот

Капилляр $L_{общ}/L_{эф}$, см	58,5/50				35/27			
	$t_{мигр}$, мин	α	R_s	ЧТТ/м	$t_{мигр}$, мин	α	R_s	ЧТТ/м
Соединение								
Дансил-DL-Thr	21,47	1,6	4,2	15200 17000	5,57*	1,4	1,0	4800 5800
Дансил-DL-Leu	17,93	1,7	1,4	10400 15000	7,10	1,4	1,2	4100 5600
Дансил-DL-Phe	17,17	2,4	1,5	12100 14900	7,06	1,5	0,8	6800 9420

Примечания. ФЭ – 100 мМ фосфатный буфер (рН 7,1), 2,5 мМ эремомидин. Длинный капилляр – 10 кВ, 15 мбар; короткий капилляр – 7 кВ, 10 мбар (*15 мбар).

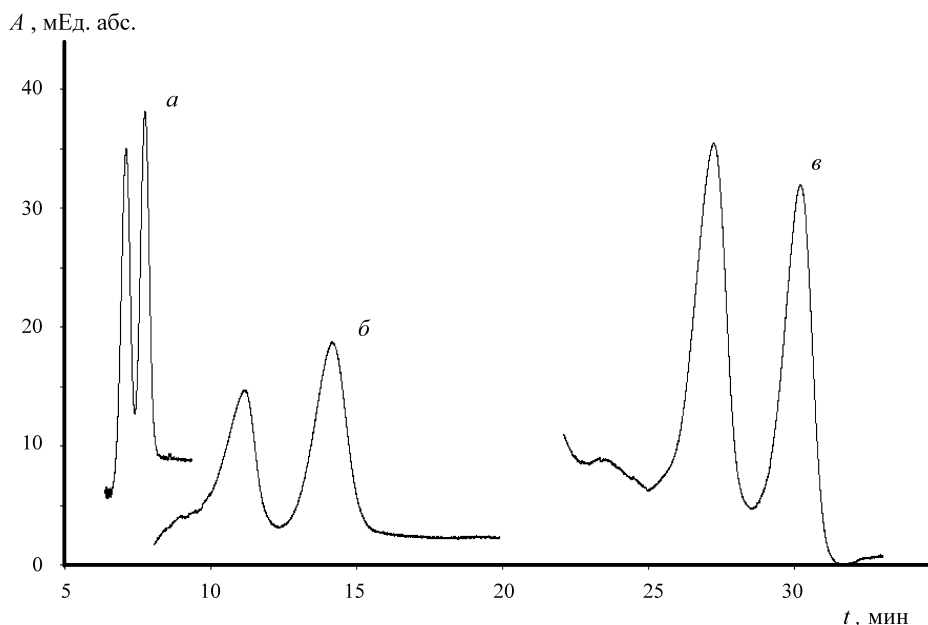


Рис. 2. Разделение энантимеров дансил-DL-Leu: *a* – 100 мМ фосфатный буфер (pH 7,1), внешнее давление 10 мбар, +7 кВ; *б* – 50 мМ TRIS (pH 8,0), внешнее давление 10 мбар, +10 кВ; *в* – 50 мМ боратный буфер (pH 9,2), внешнее давление 0 мбар, +10 кВ. Фоновый электролит содержит 2,5 мМ эремомицина. Ввод пробы 125 мбар·с, кварцевый капилляр 35/27 см, 75 мкм

Влияние концентрации хирального селектора на разделение энантиомеров. Разрешение пиков энантиомеров зависит от концентрации селектора, которую изменяли в интервале 1–5 мМ. Полученные данные приведены в табл. 2. Видно, что время миграции производных аминокислот и ацетона (маркера ЭОП) возрастает с увеличением концентрации эремомицина, что указывает на образование диастереомерных комплексов аналитов с хиральным селектором. Заметное влияние на ЭОП и значение времени миграции аналитов с изменением содержания ХС в ФЭ оказывают вязкость раствора, температура и ζ -потенциал двойного электрического слоя.

Селективность разделения и разрешение энантиомеров дансил-DL-Leu и дансил-DL-Thr увеличиваются с ростом содержания эремомицина. Такое поведение аналитов согласуется с литературными данными [6, 7]. Разрешение и селективность разделения дансил-DL-Phe несколько уменьшаются при увеличении концентрации ХС от 2,5 до 5 мМ. Таким образом, лучшее значение разрешения энантиомеров получено при концентрации селектора 2,5 мМ.

Сравнение характеристик энантиоразознавания ванкомицина и эремомицина. Ванкомицин успешно используется для разделения широкого круга оптически активных соединений в течение уже более

десятилетия лет [6]. По сравнению с другими антибиотиками ванкомицин недорог, хорошо зарекомендовал себя в ЖХ и КЭ. Свойства ванкомицина и эремомицина близки, поэтому решено было сравнить их энантиоселективные свойства. Предварительно установлено, что лучшее разделение производных аминокислот достигается в длинном капилляре при использовании фосфатного ФЭ (pH 7,1; концентрация ХС 5 мМ). Разделение энантиомеров занимает около 20 мин и разрешение пиков составляет 1,4 для дансил-DL-Thr и дансил-DL-Phe, а для дансил-DL-Leu – 1,8. Сопоставление параметров разделения энантиомеров производных аминокислот с эремомицином (табл. 1, 2) и ванкомицином свидетельствует, что при использовании эремомицина получены большие значения коэффициента селективности разделения энантиомеров, при этом концентрация хирального селектора меньше в два раза. В присутствии эремомицина возможно успешное разделение КБЗ-DL-Asp и КБЗ-DL-Ala (см. табл. 2), ванкомицин в выбранных условиях не позволяет разделить данные энантиомеры.

Таким образом, эремомицин является хиральным селектором с высокой энантиоселективностью по отношению к N-производным аминокислот и может быть рекомендован для разделения оптических изомеров аминокислот.

Т а б л и ц а 2

Влияние концентрации эремомicina на разделение энантиомеров дансил-аминокислот*

Концентрация эремомicina, мМ	1			2,5			5		
	$t_{\text{мигр}}$, МИН	α	R_s	$t_{\text{мигр}}$, МИН	α	R_s	$t_{\text{мигр}}$, МИН	α	R_s
Ацетон	11,5	–	–	16,3	–	–	17,0	–	–
Дансил--DL-Phe	13,8	1,3	1,5	17,2	2,0	1,5	19,5	2,4	1,1
Дансил-DL-Leu	13,5	1,3	1,4	17,9	1,7	2,4	18,9	1,9	2,3
Дансил-DL-Thr	14,7	1,3	1,5	21,5	1,6	4,3	21,9	2,0	4,8
КБЗ-аспарагиновая кислота	21,37	1,1	2,3	–	–	–	–	–	–
КБЗ-аланин	14,96	1,4	3,2	–	–	–	–	–	–

*Условия представлены в табл.1.

Авторы благодарят фирму «Люмэкс» за предоставленное оборудование и канд. хим. наук А.В. Шпака за консультацию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gubitz G., Schmid M.G. // J. Chromatogr. A. 2008. **1204**. P. 140.
2. Кузнецов М.А., Нестеренко П.Н., Васиаров Г.Г., Староверов С.М. // ЖАХ. 2008. **63**. С. 64.
3. Weinberger R. Practical Capillary Electrophoresis. N.Y., 2000.
4. Petrusevska K., Kuznetsov M.A. Gedicke K., Meshko V., Staroverov S.M., Seidel-Morgenstern A. // J. Sep. Sci. 2006. **29**. P. 1447.
5. Bednar P., Aturki Z., Stransky Z., Fanali F. // Electrophoresis. 2001. **22**. P. 2129.
6. Armstrong D.W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill C., Chen J.-R. // Anal. Chem. 1994. **66**. P. 1473.
7. Risley D.S., Trelli-Seifert L., McKenzie Q.J. // Electrophoresis. 1999. **20**. P. 2749.

Поступила в редакцию 23.04.09

ENANTIOSEPARATIONS OF N-BLOCKED AMINO ACIDS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS USING MACROCYCLIC ANTIBIOTICS

A.F. Prokhorova, M.A. Kuznetsov, Ye.N. Shapovalova, S.M. Staroverov, O.A. Shpigun

(Division of Analytical Chemistry; Division of Chemical Enzymology)

The macrocyclic antibiotic eremomycin has been evaluated as a chiral selector for the separation of the some N-blocked amino acids. To obtain efficient separation, the effect of varying buffer parameters, chiral selector concentration, capillary length, and applied voltage has been investigated. The comparison of the vancomycin- and eremomycin-based enantioseparations of dansylated amino acids has been made.

Key words: capillary electrophoresis; macrocyclic antibiotics; enantio-recognition; amino acids derivatives.

Сведения об авторах: Прохорова Александра Федоровна - аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (alexapro@gmail.com); Кузнецов Михаил Александрович – сотр. ЗАО “Биохиммак СТ”, канд. хим. наук (kuznetsov@bcmst.ru); Шаповалова Елена Николаевна – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (shapovalova@analyt.chem.msu.ru); Староверов Сергей Михайлович – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (staroverov@bcmst.ru); Шпигун Олег Алексеевич – профессор химического факультета МГУ, чл.-корр. РАН, докт. хим. наук (shpigun@analyt.chem.msu.ru).