



УДК 577.112.3:543.544

**ЭНАНТИОМЕРНЫЙ АНАЛИЗ ПРОЛИНА, ВАЛИНА,
ФЕНИЛАЛАНИНА, ТИРОЗИНА, ТРИПТОФАНА И ИХ ЭФИРОВ
ЛИГАНДОБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ****Широков В. А., Цырянкин В. А., Недоспасова Л. В.,
Курганов А. А., Даванков В. А.***Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова
Академии наук СССР, Москва*

Энантиомерный анализ пролина, валина, фенилаланина, тирозина, триптофана и их эфиров методом жидкостной лигандообменной хроматографии с использованием полистирольной макросетчатой смолы с группировками *L*-оксипролина позволяет проводить быстрое количественное определение энантиомерного состава аминокислот в сложных смесях с ошибкой не более 5% за 10–30 мин (время анализа триптофана 2 ч).

Расщепление рацематов методом ЛОХ на диссимметрических комплексообразующих сорбентах было предложено в 1968 г. [1, 2] и до последнего времени использовалось главным образом для препаративного разделения энантиомеров аминокислот [3].

Целью настоящей работы явилось использование метода ЛОХ для определения энантиомерного состава ряда аминокислот в трудных для анализа образцах, содержащих соли и другие аминокислоты, а также оценка воспроизводимости хроматографических параметров колонок при проведении большого числа анализов.

Энантиомерный анализ аминокислот проводили на колонках длиной 10–20 мм, наполненных полистирольной макросетчатой смолой с химически фиксированными *L*-оксипролиновыми лигандами, в аммиачном буфере, содержащем Cu^{2+} или Zn^{2+} . Типичная хроматограмма приведена на рис. 1. Первый пик (*A*) на хроматограмме может быть объяснен наличием в образце примесей, в частности солей. Следующие два пика (*B* и *C*) соответствуют разделенным *L*- и *D*-энантиомерам аминокислот. Далее наблюдается снижение поглощения (область *D*) с последующим возвращением его на прежний уровень базовой линии.

Появление пика *A* на хроматограмме связано с изменением межфазового равновесия и вымывания части Cu^{2+} с колонки под действием солей, содержащихся в образце. При анализе образцов, содержащих значительные количества солей, пик *A* оказывается очень большим и частично накладывается на пик, соответствующий *L*-энантиомеру аминокислоты, мешая его количественному определению. Мы нашли, что чувствительность к солям резко падает, если используемый для ЛОХ элюент содержит KCl . Так, введение KCl до 0,5 М в аммиачный буфер приводит к тому, что интенсивность пика *A* падает в 100 раз.

Появление области *D* (изменение базовой линии) на хроматограмме связано с восстановлением равновесного количества Cu^{2+} в колонке за счет поглощения Cu^{2+} из элюента в последующий период анализа. Область *D* мешает анализу по двум причинам. Во-первых, если энантиомеры на хроматограмме попадают в область *D*, то искажается форма пика, что затрудняет идентификацию и обсчет. Во-вторых, проявление отрицательной области *D* между двумя энантиомерами приводит к ошибочному выводу о лучшем их разделении. Мы нашли, что время возвращения колонки в

* ЛОХ — лигандообменная хроматография.

Рис. 1. Разделение энантиомеров пролина на смоле с *L*-оксипролиновым лигандом в буфере, содержащем 0,5 М NH_4OH и 1 мМ CuSO_4 : *a* – без KCl , *б* – с добавлением 0,5 М KCl . Колонка 10×4 мм, 20°C , скорость элюирования 20 мл/ч. Пики: *B* – *L*-Pro, *C* – *D*-Pro, *A* и *D* – см. в тексте

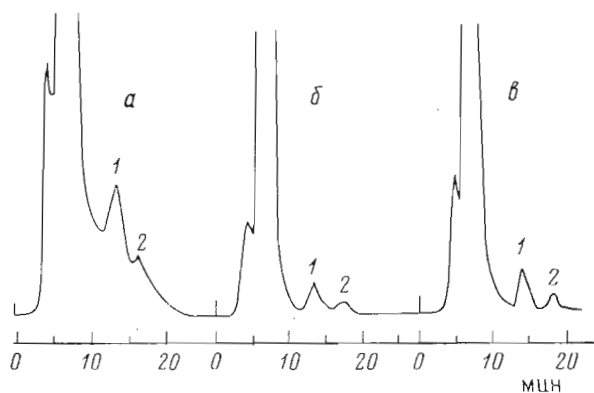
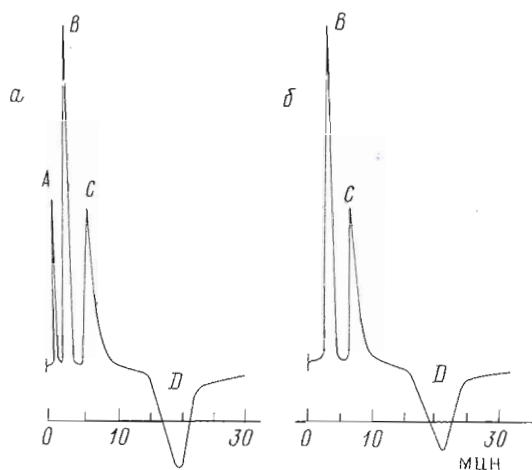


Рис. 2. Анализ энантиомеров фенилаланина (1 – *L*-, 2 – *D*-) в гидролизате Туг- β -Ala-Phe-Leu; на *L*-оксипролиновом лигандообменнике. Колонка 20×4 мм, буфер 0,4 М NH_4OH с 1 мМ $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, скорость элюирования 4 мл/ч, 40°C . Введено 0,045 (*a*), 0,015 (*б*), 0,024 мг гидролизата (*в*)

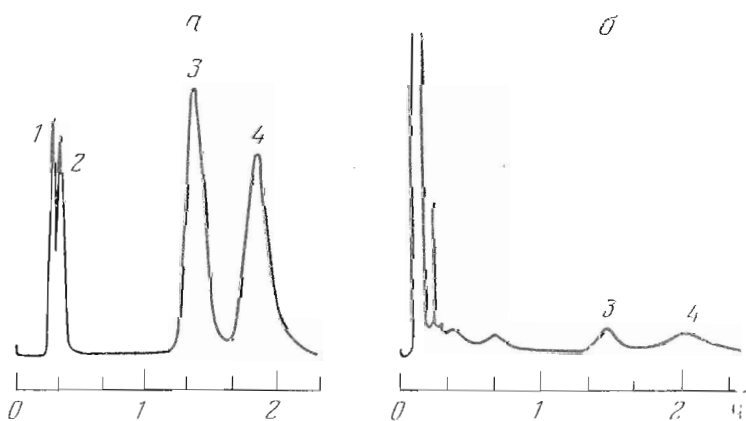


Рис. 3. Определение энантиомерного состава триптофана на колонке с *L*-оксипролиновым лигандообменником в буфере 0,8 М NH_4OH , с 30 мМ $\text{Zn}(\text{OAc})_2$. Колонка 20×4 мм, 40°C , скорость элюирования 3 мл/ч. *a* – 0,02 мг триптофана в присутствии фенилаланина; *б* – в серозном фильтрате тонкой кишки крысы. Пики 1, 2 – *L*- и *D*-фенилаланин, 3, 4 – *L*- и *D*-триптофан

равновесное состояние постоянно в одних и тех же условиях и не зависит от вида, числа и времени удерживания вводимых в колонку аминокислот.

Изучение влияния концентрации Cu^{2+} и гидроксида аммония на положение области *D* показало, что увеличение концентрации Cu^{2+} в бу-

Влияние температуры на параметры разделения энантиомеров валина
Колонка 20×4 мм, L-оксипролин на полистироле, элюент — 0,1 М NH₄OH
с 1 мМ CuSO₄

Температура, °С	Время удерживания, мин		Коэффициент селективности α	Разрешение R_s	Число теоретических тарелок	
	I пик	II пик			I пик	II пик
6	16	26	1,6	0,6	68	26
20	10	16	1,6	1,0	87	57
30	8	13	1,6	0,9	84	57
40	6,7	10,5	1,6	0,9	70	52

фере приводит к сдвигу в области *D* к меньшим временам удерживания, мало влияя на времена удерживания энантиомеров аминокислот. Изменение концентрации гидроокиси аммония, наоборот, мало влияет на положение области *D*, сильно влияя на времена удерживания аминокислот. Поэтому для успешного анализа возможно и необходимо, варьируя концентрации Cu²⁺ и гидроокиси аммония, так выбирать условия, чтобы область *D* не накладывалась на пики энантиомеров аминокислоты.

Замена Cu²⁺ на Zn²⁺ в элюенте приводит к тому, что изменения базовой линии (пик *A* и область *D*) на хроматограмме отсутствуют. Следует отметить, что при замене Cu²⁺ на Zn²⁺ не происходит падения селективности разделения и эффективность колонок также заметно не меняется. Детектор с λ 254 нм регистрирует только ароматические аминокислоты, такие, как фенилаланин, тирозин и триптофан. Так как эти аминокислоты легко разделяются на энантиомеры методом ЛОХ в присутствии Zn²⁺, а другие аминокислоты в этих условиях не регистрируются детектором, можно проводить энантиомерный анализ ароматических аминокислот в общей смеси аминокислот (рис. 2, 3).

Далее была изучена зависимость параметров ЛОХ энантиомеров от температуры (табл. 1). Разрешение (R_s) с увеличением температуры сначала резко повышается (в интервале от 6 до 20°С почти вдвое), а при дальнейшем повышении температуры несколько понижается. Коэффициент селективности (α) не зависит от температуры. Времена удерживания с повышением температуры значительно падают, а скорость анализа соответственно растет. При температуре выше 45°С в колонке начинает выпадать закись меди. Мы установили, что оптимальная температура анализа составляет 40°С.

Изменение концентрации гидроокиси аммония в буфере влияет на селективность разделения энантиомеров, эффективность колонки и параметры удерживания. Так, уменьшение концентрации гидроокиси аммония в 2 раза привело к тому, что селективность разделения энантиомеров фенилаланина возросла от 1,4 до 2; эффективность колонки длиной 20 мм упала с 400 теоретических тарелок до 80; времена удерживания энантиомеров фенилаланина возросли с 10 и 14 мин до 13 и 25 мин соответственно. Зависимость селективности и эффективности от концентрации гидроокиси аммония серьезно ограничивает выбор условий анализа.

Необходимым условием использования ЛОХ для проведения энантиомерного анализа является неизменность времен удерживания хроматографических пиков в течение всей серии анализов образцов и линейная зависимость площадей пиков от концентрации энантиомеров. Хроматографическое разделение энантиомеров пролина мы повторили 34 раза при одинаковых условиях и нашли, что времена удерживания энантиомеров воспроизводятся с доверительной вероятностью 95% с коэффициентом вариации 5% [4]. Линейная зависимость площади пика от количества энантиомера аминокислоты, нанесенного на колонку, также соблюдается в изученном интервале от 0,001 до 0,1 мг. Следует особо отметить, что селективность и эффективность колонки не изменились после года непре-

Анализ тирозина, содержащего различные соотношения *D*- и *L*-изомеров

Колонка 20×4 мм, *L*-оксипролин на полистироле, температура 40° С, элюент – 0,6 М NH₄OH с 15 мМ Zn(OAc)₂

Взято, %		Найдено, %	
<i>D</i> -	<i>L</i> -	<i>D</i> -	<i>L</i> -
10	90	10,2	89,8
20	80	20,2	79,8
30	70	31,5	68,5
40	60	41,4	58,6

рывной работы. Аналогичные результаты были получены и для валина, фенилаланина, тирозина (см. табл. 2) и триптофана. Из табл. 2 видно, что результаты анализа совпадают с составом образцов.

Мы нашли, что в изученных условиях (содержание гидроксида аммония в буфере 0,1 М и выше) можно проводить анализ эфиров энантиомеров аминокислот, причем условия анализа эфиров аминокислот совпадают с условиями анализа самих аминокислот. Вероятно, в щелочной среде в присутствии ионов переходных металлов эфиры аминокислот подвергаются быстрому гидролизу.

Экспериментальная часть

В работе использовали отечественные реактивы: CuSO₄ (ч.д.а.), Zn(OAc)₂ (ч.д.а.) и NH₄OH (ч.д.а.).

Асимметрический сорбент с группировками *L*-оксипролина получали ампированием хлорметилированных макросетчатых полистирольных носителей метиловым эфиром *L*-оксипролина по методике [1]. Емкость сорбента 3,86 моль/г, степень сшивки 6%.

Смолу со средним диаметром частиц 10–15 мкм суспендировали в растворе 0,5% ZnCl₂ в воде (20% суспензия) и упаковывали в хроматографические колонки размером 10×4 и 20×4 мм под давлением 40–70 атм. Колонки промывали концентрированным раствором аммиака меди(II) или цинка(II) и уравнивали рабочим элюентом.

Раствор, содержащий 0,001–0,1 мг аминокислоты в объеме от 1 до 3 мкл, вводили в колонку микрошприцем и элюировали 0,1–4 М раствором NH₄OH, содержащим Cu²⁺ или Zn²⁺. Скорость элюирования изменяли в пределах 1–20 мл/ч (оптимальный интервал 2–4 мл/ч). Давление у входа в колонку до 18 атм, при более высоком давлении смола деформировалась.

Для детектирования использовали дифференциальный УФ-фотометр (λ 254 нм), объем кюветы 10 мкл, модель UV analyzer 254 nm ND CSAV (ЧССР).

Анализ пролина проводили на колонке (10×4 мм) в 0,5 М NH₄OH с 1 мМ CuSO₄ при 40° С, объем удерживания (*V*_R) 2 и 4,1 мл для *L*- и *D*-пролина соответственно. Анализ валина проводили в 0,1 М NH₄OH с 1 мМ CuSO₄, *V*_R 1,6 мл для *L*-валина и 2,3 мл для *D*-валина.

Для анализа валина, фенилаланина, тирозина и триптофана использовали колонку размером 20×4 мм (40° С).

Анализ фенилаланина проводили в 0,4 М NH₄OH с 1 мМ CuSO₄, *V*_R 1,7 и 2,3 мл для *L*- и *D*-фенилаланина соответственно. В присутствии 1 мМ Zn(OAc)₂ в 0,4 М NH₄OH *V*_R для *L*-фенилаланина 2,3 мл, для *D*-фенилаланина 3,0 мл.

Тирозин анализировали в 0,6 М NH₄OH с 15 мМ Zn(OAc)₂, *V*_R 1,3 мл для *L*- и 1,5 мл для *D*-тирозина.

Триптофан анализировали в 0,8 М NH₄OH с 30 мМ Zn(OAc)₂, *V*_R 4 мл для *L*- и 5,7 мл для *D*-триптофана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rogozhin S. V., Davankov V. A. Патент ФРГ Ger. Offen, 1932190 (С 1.13.01d). Chem. Abstr., 1970, v. 72, 90875c.
2. Davankov V. A. In: Adv. in Chromatogr., v. 18 / Ed. Giddings I. C., Grushka E., Cazes J., Brown P. R. N. Y.: Marcel Dekker, 1980, p. 139-195.
3. Zolotarev Yu. A., Myasoedov N. F., Penkina V. I., Dostovalova I. N., Peterenik O. V., Davankov V. A. J. Chromatogr., 1981, v. 207, p. 231-236.
4. Доерфель К. Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1969, с. 93-130.

Поступила в редакцию
26.XII.1982

ENANTIOMERIC ANALYSIS OF PROLINE, VALINE, PHENYLALANINE, TYROSINE, TRYPTOPHAN AND THEIR ESTERS BY LIGAND EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

SHIROKOV V. A., TSYRYAPKIN V. A., NEDOSPASOVA L. V.,
KURGANOV A. A., DAVANKOV V. A.

Institute of Organo Element Compounds, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Enantiomeric analysis of proline, valine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan and their esters by ligand exchange liquid chromatography on the polystyrene macro-net resin containing *L*-hydroxyproline groups has been performed. Of the amino acid enantiomeric composition of the complex mixtures is accomplished in 10-30 minutes with the error not exceeding 5%; for tryptophan the analysis time is 2 hours.