

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 543.544.5.068.7

ХИРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ 1,2,4-ТРИАЗОЛСОДЕРЖАЩИХ β-ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИ ЗАМЕЩЕННЫХ α-АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ

А. О. ЦАТУРЯН, В. Т. КОЧИКЯН, З. З. МАРДИЯН и А. С. САГИЯН

Научно-производственный центр "Армбиотехнология"

НАН Республики Армения

Армения, 0056, Ереван, ул. Гюрджяна, 14

Факс: (374-10) 654183

E-mail: avetis-tsaturyan@yandex.ru

Поступило 10 IX 2015

Разработан эффективный метод хирального ВЭЖХ анализа β-гетероциклически замещенных небелковых аминокислот, содержащих 3,4-дизамещенные-5-тиоксо-1,2,4-триазольные группы в боковом радикале, с УФ-детектированием без предварительной предколоночной дериватизации. В качестве хиральной фазы использована хроматографическая колонка "Nautilus-E 5μ" компании "БиоХимМак СТ".

Рис. 4, библиографических ссылок 12.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) представляет собой универсальный метод количественного анализа органических молекул, широко применяемый в биохимии, молекулярной биологии, органической и биоорганической химии, а также в химической, нефтехимической, пищевой и фармацевтической промышленности [1]. К числу таких молекул относятся также белковые и небелковые α-аминокислоты.

Оптически активные небелковые α-аминокислоты в энантиомерно чистом виде являются важными компонентами многих физиологически и фармакологически активных препаратов [2,3]. В ряду таких соединений особый интерес представляют β-гетероциклически замещенные

производные 2-аминопропионовой кислоты, содержащие триазольное кольцо в боковом радикале. В частности, известно, что (S)-β-[4-(фуран-2-илметил)-3-бутил- и (S)-β-[4-аллил-3-(2'-метоксифенил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланины подавляют рост устойчивых и чувствительных к антибиотикам штаммов *C. glutamicum* и *E.coli* [4], а (S)-β-[4-аллил-3-бутил- и (S)-β-[4-пропил-3-изобутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланины обладают антимуtagenными свойствами и т.д. [5].

Следует отметить, что физиологически и фармакологически активными являются, в основном, отдельные энантиомеры хиральной аминокислоты, и, как правило, примесь оптического антипода активного фармпрепарата оказывает негативное фармакологическое действие [6]. В связи с этим энантиомерный анализ является одним из важных инструментов для оценки биологической активности хиральных молекул.

Особенно актуален хиральный анализ для определения энантиомерного избытка промежуточных и конечных продуктов асимметрического синтеза и оценки стереоселективности синтеза.

Для определения энантиомерной чистоты аминокислот и их производных обычно используют метод ВЭЖХ на хиральной неподвижной фазе с использованием дериватизированных аминокислот. В качестве реагента для модификации аминокислот часто используется *o*-фталевый альдегид (ОФА) совместно с различными нуклеофильными реагентами. Так, Д.Т. Гуранда и соавторы проводили энантиомерный анализ *N*-ацильного производного (S)-цистеина методом ВЭЖХ с предколоночной модификацией *o*-фталевым альдегидом. В качестве неподвижной фазы использовали хроматографическую колонку "Nucleosil C 18" (Chrompack Varian, 250×4 мм, 5 мкм) [7].

Г. Шокан и соавторы провели энантиомерный анализ защищенных аминокислот, применяемых в пептидном синтезе. В качестве дериватирующего реагента был использован амид 1-флюоро-2,4-динитрофенил-5-*L*-аланина (Marfey's reagent), а детектирование проводилось при длине волны 340 нм в градиентном режиме элюирования [8].

Т. Миязава и соавторы для хирального анализа небелковых аминокислот, в частности, 2-метил-3,3-диметилмасляной, 2-аминогептановой, 2-амино-5-метилгексановой кислот, 3-циколгексилаланина, эритро- и трео-3-гидроксилейцина, 2-амино-4-фенилмасляной кислоты и эритро- и трео-3-метилфенилаланина, использовали лигандообменные колонки. Поглощение измеряли с использованием УФ-детектора при длине волны 254 нм. Преимущество данного метода заключается в том, что аминокислоты были использованы в недериватизационной форме [9].

Для энантиомерного анализа аминокислот известны также методы хиральной газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ). В этом случае аминокислоты используются в виде *n*-бутильных эфиров *n*-трифторацетилзамещенных аналогов [10].

Экспериментальная часть

Аппаратура. Использовали жидкостной хроматограф "Waters 2695 Separations Module" (США) с ультрафиолетовым детектором "Waters 2487", колонку для разделения энантиомеров небелковых аминокислот "Nautilus-E" 4.0×250 мм, 5 мкм. Разделение энантиомеров небелковых аминокислот осуществлялось в изократическом режиме элюирования, в качестве подвижной фазы был использован 0.1 М водный раствор $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и CH_3CN (80:20 об/об), скорость потока составляла 0.5 мл/мин, детектирование проводилось при длине волны 200 нм, температура колонки – 30°C, объем инъекции – 10 мкл. Использовались химические реактивы и элюенты фирмы "Sigma-Aldrich" со степенью чистоты > 99,9% (gradient grade, for HPLC).

Все небелковые аминокислоты были синтезированы в лаборатории асимметрического синтеза НПЦ "Армбиотехнология" НАН РА [11,12].

Описание методики. 1 мг исследуемого образца растворяли в 1 мл метанола в специальных пробирках для анализа. С целью освобождения от механических и нерастворившихся мелких частиц раствор фильтровали с помощью фильтра с размером пор 0.45 мкм, затем раствор образца вставляли в специальный отсек хроматографа, предназначенный для анализируемых образцов, и проводили анализ по разработанному методу. Для каждого анализа объем инъекции составил 10 мл. Результаты анализа отображались на экране компьютера в виде хроматограммы, а программное обеспечение позволяло автоматически интегрировать полученные пики.

Результаты и их обсуждение

Описанные в литературе методы хирального анализа аминокислот основаны на предколоночной дериватизации аминокислот с использованием разных модифицирующих реагентов [7,8] или на лигандообменной хроматографии [9]. Эти методы являются сложными с точки зрения пробоподготовки (предколоночная дериватизация), если не учитывать продолжительность «жизни» таких дериватов. Хроматографический анализ включает разделение аналитов за приемлемое (минимальное) время. На качество и скорость разделения энантиомеров методом ВЭЖХ влияют многочисленные параметры, в частности, свойства адсорбента, размеры колонки, состав элюента, параметры детектора и т. д. Это, с одной стороны, создает неограниченные возможности для разработки методик анализа, а с другой — требует проведения длительных исследований со значительными затратами на расходные материалы и амортизацию оборудования.

Разработанный нами метод обращённо-фазовой ВЭЖХ для хирального анализа небелковых аминокислот включает использование неполярной стационарной фазы и полярных (водных) растворителей.

В целях оптимизации условий хирального анализа нами было изучено влияние pH подвижной фазы, температуры колонки и скорости элюирования на эффективность разделения энантиомеров. Для этого в процессе разработки метода были использованы подвижные фазы с разными значениями pH (6.5; 6.0; 5.5; 4.5; 4.0). Путем изменения значения pH можно варьировать удерживание аналитов в значительных пределах и, тем самым, оптимизировать методику анализа. Исследования проводили при температурном режиме колонки в диапазоне 25-40°C. Скорость потока подвижной фазы также является важным параметром в жидкостной хроматографии. С одной стороны, она непосредственно определяет продолжительность анализа, а с другой – влияет на эффективность работы колонки, т. е. на разрешение пиков.

На рис. 1 приведены хроматограммы разделения (S)- и (R)- энантиомеров гетероциклически замещенной аминокислоты β -[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланина до (I) и после (II) корректировки параметров методики.

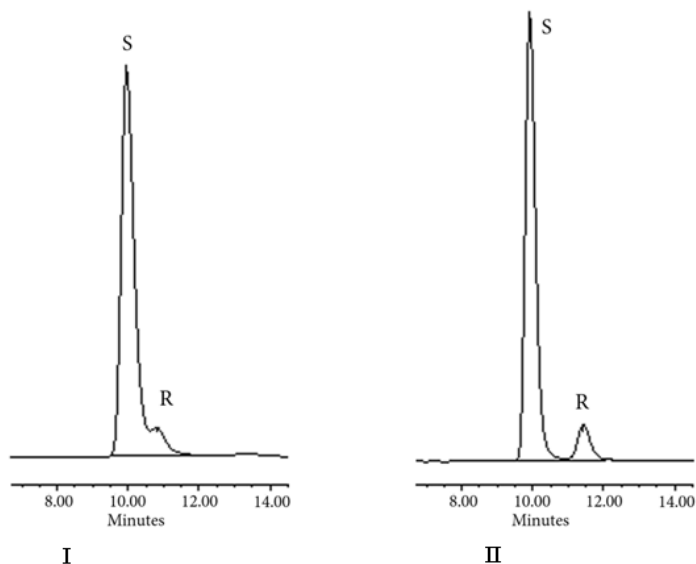


Рис. 1. Хроматограммы разделения энантиомеров β -[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланина до (I) и после (II) корректировки параметров методики.

На рис. 2 приведена хроматограмма энантиомерного избытка (S)- β -[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланина в реакционной смеси, соотношение энантиомеров составляет (S)/(R) = 75.6/24.4%.

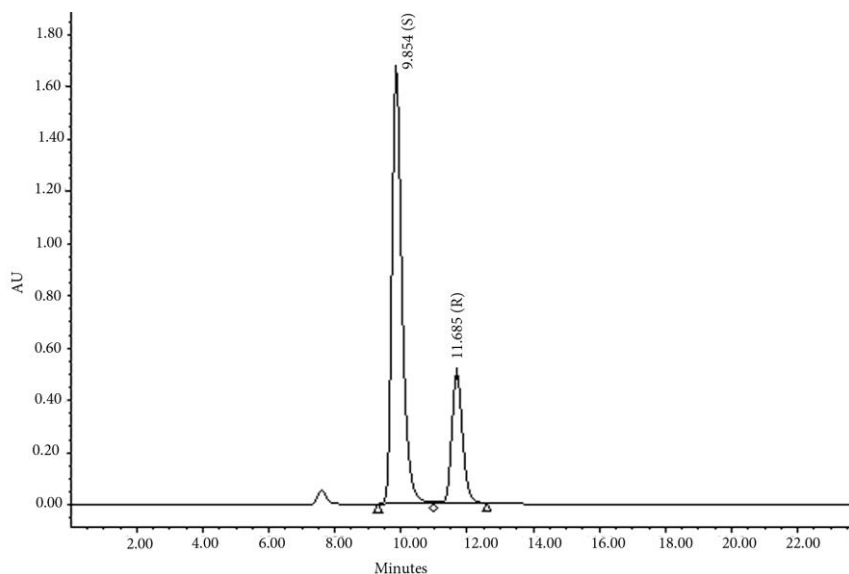


Рис. 2. Хроматограмма энантиомерного анализа образца (S)- β -[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланина.

Как видно из рис. 2, получено хорошее разделение (S)- и (R)-энантиомеров гетероциклически замещенной аминокислоты; идентификацию отдельных энантиомеров проводили по времени их удерживания (рис. 3).

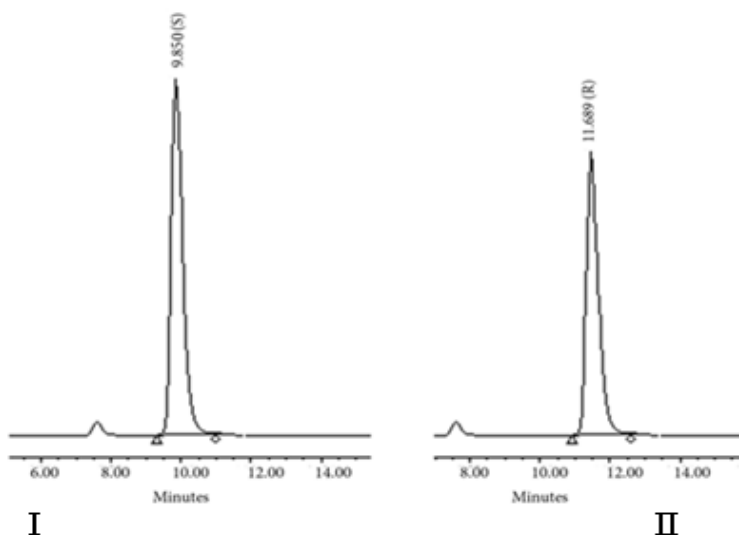
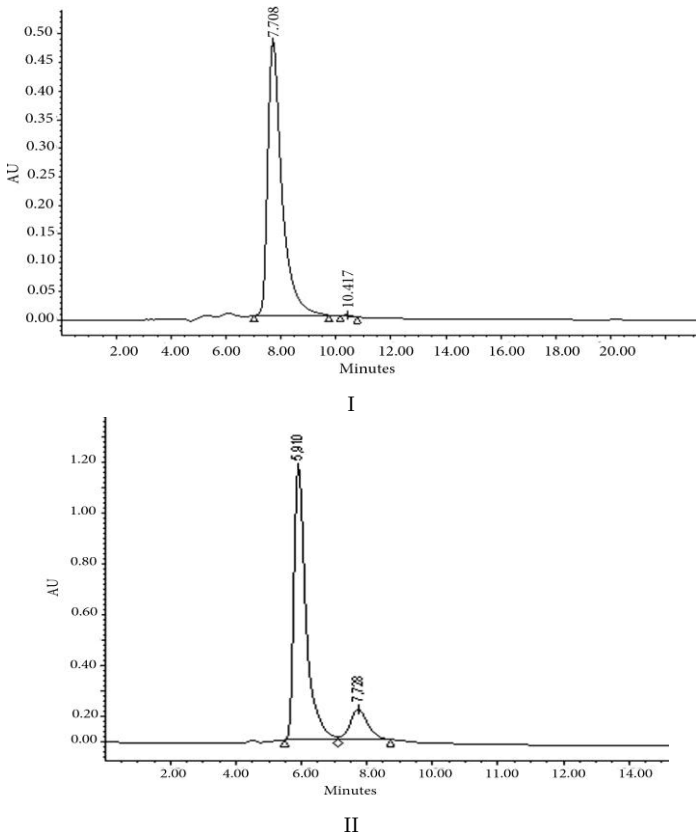


Рис. 3. Время удерживания отдельных энантиомеров β -[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланина. I-(S), II-(R).

Разработанный метод обращенно-фазовой ВЭЖХ можно использовать также для хирального анализа других 1,2,4-триазолсодержащих β -гетероциклически замещенных α -аминокислот с различными заместителями в положениях 3 и 4 триазольного цикла. В частности, были анали-

зированы и определены энантиомерные избытки синтезированных в НПЦ «Армбиотехнология» следующих β -гетероциклически замещенных аминокислот: (S)- β -[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-, (S)- β -[4-пропил-3-бутил-, (S)- β -[4-(фуран-2-илметил)-3-бутил-, (S)- β -[4-метилаллил-3-бутил-, (S)- β -[4-аллил-3-бутил-, (S)- β -[4-аллил-3-(3'-гидроксипропил)-, (S)- β -[4-фенил-3-(3'-гидроксипропил)-, (S)- β -[4-аллил-3-бензил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланинов и др.

Хроматограммы некоторых аминокислот приведены на рис. 4.



N	Название	Энан-тиомер	Время удержи-вания	Площадь	Пло-щадь, %	Высо-та
1	β -[4-пропил-3-(тиофен-2-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин (I)	(S)	7.708	17165843	99.79	479638
		(R)	10.417	35368	0.21	1760
2	β -[4-аллил-3-изобутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин (II)	(S)	5.910	13778612	85.95	534157
		(R)	7.728	2251504	14.05	59970

Рис. 4. Хроматограммы энантиомерного избытка (S)- β -[4-пропил-3-(тиофен-2-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланина (I) и (S)- β -[4-аллил-3-изобутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланина (II).

Таким образом, разработан эффективный метод хирального анализа β -гетероциклически замещенных небелковых α -аминокислот, содержащих в боковом радикале замещенные в позициях 3 и 4 1,2,4-триазольные кольца, методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием УФ-детектирования, соответствующий современным требованиям хроматографии и исключающий дополнительную пробоподготовку с использованием разных модифицирующих реагентов. Сегодня более 30% известных лекарственных веществ являются хиральными молекулами, энантиомерная чистота для которых является одним из важных показателей их пригодности к применению в фармацевтике. В этом аспекте разработанный метод может найти применение при стандартизации и сертификации хиральных лекарственных веществ и пищевых продуктов.

1,2,4-ՏՐԻԱԶՈՒ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ β -ՆԵՏԵՐՈՑԻԿԼԻԿ ՏԵՂԱԿԱՎԱԾ α -ԱՄԻՆԱԹՈՒՆԵՐԻ ՔԻՐԱԼԱՅԻՆ ԱՆԱԼԻԶԻ ՆՖ ԲԱՀՔ ԵՂԱՆԱԿ

Ա. Ն. ԾԱՏՈՒՐՅԱՆ, Վ. Տ. ԿՈՉԻԿՅԱՆ, Զ. Զ. ՄԱՐԴԻԱՆ և Ա. Ս. ՍԱԳԻԱՆ

Մշակվել է կողքային ռադիկալում 3,4-երկտեղակալած-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլային խմբեր պարունակող β -հետերոցիկլիկ տեղակալված ոչ սպիտակուցային α -ամինաթթուների քիրալային անալիզի արդյունավետ ԲԱՀՔ եղանակ՝ ՈւՄ դեդեկցմամբ, առանց նախնական նախաաշտարակային դերիվատիզացման: Որպես քիրալային ֆազ օգտագործվել է "БиоХимМак СТ" ընկերության արտադրության "Nautilus-E 5 μ " քրոմատոգրաֆիական աշտարակը:

CHIRAL ANALYSIS OF β -HETEROCYCLIC SUBSTITUTED 1,2,4-TRIAZOLE-CONTAINING α -AMINO ACIDS BY THE METHOD OF REVERSE-PHASE HPLC

A. H. TSATURYAN, V. T. KOCHIKYAN, Z. Z. MARDIYAN and A. S. SAGHYAN

Scientific and Production Center "Armbiotechnology" NAS RA

14, Gyurjyan Str., Yerevan, 0056, Armenia

Fax: (37410)654183

E-mail: avetis-tsaturyan@yandex.ru

An efficient method with UV-detection without preliminary precolumn derivatization for chiral HPLC analysis of β -heterocyclic substituted α -non-protein amino acids containing 3,4-disubstituted-5-thioxo-1,2,4-triazole groups in the sidechain radical has been developed. Nautilus-E 5 μ chromatographic column by "BioChemMax CT" Co. was used as a chiral phase.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. // John Wiley&Sons, Ltd, Chichester, 2010, 3 ed, p. 26.
- [2] Adamczyk M., Srinivasa R.A., Rajarathnam E.R. // Tetrahedron, 2002, v. 58, p. 6951.
- [3] Hegedus L. Acc. // Chem. Res., 1995, v. 28, p. 299.
- [4] Melkumyan M., Avetisyan N., Oganezova G., Chitchyan M., Hovhannisyan A., Hovhannisyan N. // Proceedings of the Yerevan State University, 2014, v. 3, p. 35.
- [5] Читчян М.Б., Саркисян А.С., Мелкумян М.А., Аветисян Н.С., Оганезова Г.Г., Оганесян А.М., Оганесян Н.А. // Биол. ж. Армении, 2014, т. 1 (66), с. 26.
- [6] Лоуренс Д.Р., Бенетт П.Н. Клиническая фармакология. М., Медицина, 1993.
- [7] Гуранда Д.Т., Шаповалова И.В., Швядас В.К. // Биоорганическая химия, 2004, т. 30, с. 451.
- [8] Szokan Gy., Hadfi Sz., Krizsan K., Lembeck A., Krecz I., Almks M., Somlai Cs. // Journal of Liquid Chromatography, 1994, v. 17, p. 2759.
- [9] Miyazawa T., Minowa H., Imagawa K., Yamada T. // J. Chromatographia, 2004, v. 60, July (1/2) p. 45.
- [10] Vincenzo Amico, Giovanna Oriente, Corrado Tringale // Journal of Chromatography, 1976, v. 116, p. 439.
- [11] Сагиян А.С., Симомян А.М., Петросян С.Г., Акопян К.В., Хачатрян Л.В., Геолчянан А.В., Кочикян Т.В., Арутюнян В.С. // Хим. ж. Армении, 2011, т. 64, №3, с. 352.
- [12] Saghyan A.S., Simonyan H.M., Stepanyan L.A., Ghazaryan S.G., Geolchanyan A.V., Manasyan L.L., Ghochikyan V.T., Ghochikyan T.V., Hovhannisyan N.A., Gevorgyan A., Iaroshenko V.O., Langer P. // Tetrahedron: Asymmetry, 2012, v. 23, p. 891.