



УДК 547.854

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ НУКЛЕОАМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ПРЕДКОЛОНОЧНОЙ МОДИФИКАЦИЕЙ *o*-ФТАЛЕВЫМ АЛЬДЕГИДОМ

© 1997 г. О. И. Гуренцова, М. В. Савченко, Н. В. Сумбатьян, Г. А. Коршунова, В. К. Швядас<sup>#</sup>

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского  
119899, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 09.01.97 г. Принята к печати 05.05.97 г.

Изучена возможность использования обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием при 254 нм для разделения стереоизомеров нуклеоаминокислот – пиримидил- и пуринилпроизводных аланина – с предколоночной модификацией *o*-фталевым альдегидом и *N*-ацетил-*L*-цистеином. Удовлетворительное разделение достигается при использовании в качестве подвижной фазы 0.01 М фосфатного буферного раствора (рН 7.0), содержащего 5% ацетонитрила. Интервал определяемых содержаний нуклеоаминокислот 0.08–1.0 нмоль. Метод использован для контроля за образованием стереоизомеров при гидролизе *N*-фенилацетилцитозинилаланина.

*Ключевые слова:* нуклеоаминокислоты, энантиомеры, высокоэффективная жидкостная хроматография, *o*-фталевый альдегид, пенициллинацилаза из *E. coli*.

Нуклеоаминокислоты –  $\alpha$ -аминокарбоновые кислоты, несущие пиримидиновое или пуриновое основание, присоединенное по положению N<sup>1</sup> (пиримидин) или N<sup>9</sup> (пурин) [1] к аминокислотному фрагменту. Оптически активные нуклеоаминокислоты могут быть использованы для синтеза разнообразных стереорегулярных гомо- и гетеронуклеопептидов, аналогов биологически активных пептидов [2].

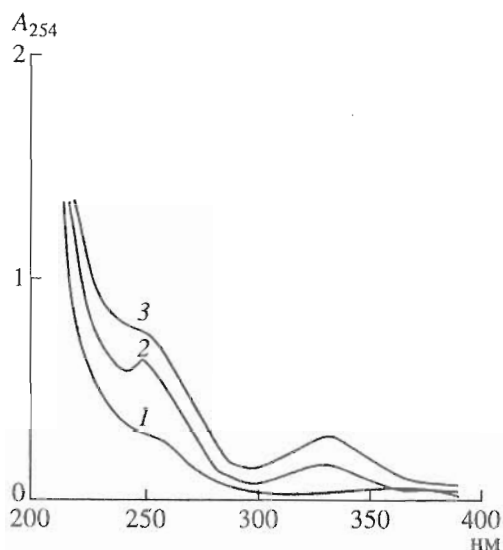
Для получения энантиомеров нуклеоаминокислот представляется перспективным использовать химико-энзиматический метод, основанный на синтезе *N*-фенилацетильных производных рацемических нуклеоаминокислот и последующем стереоселективном ферментативном гидролизе под действием пенициллинацилазы из *E. coli* (КФ 3.5.1.11). Данный метод показал эффективное разделение рацематов в случае 1-аминоалкилфосфоновых кислот, а также ряда фторзамещенных  $\alpha$ - и  $\beta$ -аминокислот [3–7]. За ходом биокаталитического превращения рацемата следили спектрофотометрически, определяя содержание образующихся свободных аминокислот в виде их производных с *o*-фталевым альдегидом. Для более строгого контроля стереоспецифичности процесса ферментативного гидролиза *N*-фенилацетильных производных рацематов нуклеоаминокислот

был необходим метод, позволяющий определять как конфигурацию образующихся стереоизомеров, так и их количественное содержание. Для этой цели наиболее эффективным представляется метод обращенно-фазовой ВЭЖХ с предварительным модифицированием аминокислот смесью *o*-фталевым альдегидом и оптически активного тиолсодержащего соединения (*N*-ацетил-*L*-цистеина) [8–13]. В данной работе изучена возможность использования ВЭЖХ с предколоночной модификацией аминокислот *o*-фталевым альдегидом и *N*-ацетил-*L*-цистеином для разделения и количественного определения энантиомеров нуклеоаминокислот – производных аланина: 3-(урацилил-1)-, 3-(цитозинил-1)-, 3-(тиминил-1)- и 3-(аденилил-9)аланина.

Реакция взаимодействия ОРА и тиолсодержащих соединений с аминокислотами, сопровождающаяся образованием изоиндольных производных, хорошо изучена и широко используется для количественного определения аминокислот [14, 15]. В спектрах поглощения продуктов взаимодействия аминокислот с ОРА и НАС присутствуют два пика с максимумами при 340 и 254–258 нм (более интенсивный) (рис. 1). Второй пик практически не используется для количественного анализа продуктов реакции из-за сильного поглощения ОРА при 254–258 нм, однако поглощение в этой области может быть использовано после хроматографического отделения исходных реагентов.

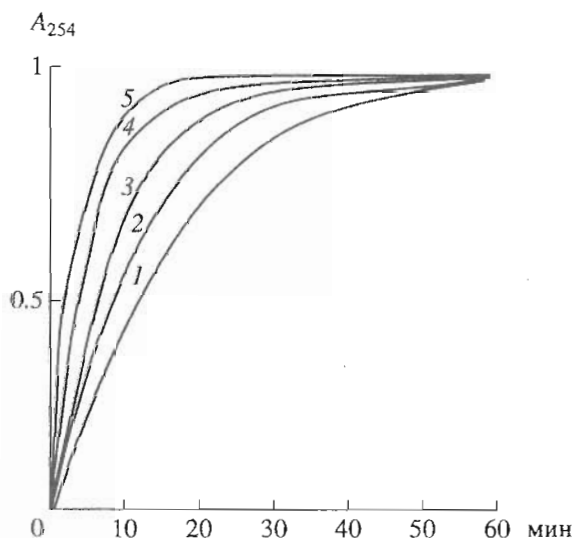
Сокращения: ОРА – *o*-фталевый альдегид, НАС – ацетил-*L*-цистеин.

<sup>#</sup> Автор для переписки.



**Рис. 1.** Спектры поглощения растворов ОРА-НАС-реагента (1), ОРА-НАС-производных рацемата 3-(урацилил-1)аланина (концентрация  $4 \times 10^{-5}$  М) (2) и *D,L*-Val (концентрация  $8 \times 10^{-5}$  М) (3) в 0.1 М боратном буфере (рН 9.6).

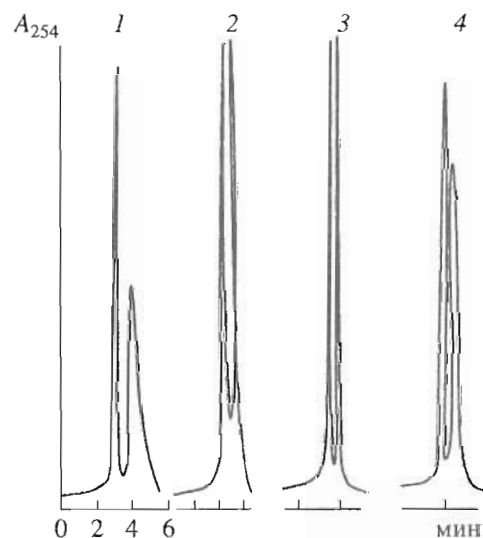
Все нуклеоаминокислоты – производные аланина реагируют с ОРА-НАС-реагентом с образованием изоиндолных производных, также имеющих максимумы поглощения при 254–258 и 340 нм (рис. 1). Скорость изучаемой реакции зависит преимущественно от концентрации ОРА-НАС-реагента в растворе. Так, при увеличении концен-



**Рис. 2.** Зависимость скорости образования ОРА-НАС-производных рацемата 3-(аденилил-9)аланина ( $1 \times 10^{-4}$  М) от концентрации ОРА-НАС-реагента. Концентрация ОРА (М): 1 – 0.002; 2 – 0.004; 3 – 0.006; 4 – 0.008; 5 – 0.01 (0.1 М боратный буфер, рН 9.6, соотношение концентраций ОРА-НАС равно 2 : 1).

трации реагента от 0.002 до 0.01 М время достижения максимального поглощения при 254 нм уменьшается от 40–60 до 15–20 мин (рис. 2). Проведение реакции при концентрации ОРА выше 0.003–0.004 М нежелательно из-за сложности последующего хроматографического отделения реагента от продуктов его взаимодействия с нуклеоаминокислотами. Следует отметить, что взаимодействие нуклеоаминокислот с ОРА и НАС протекает медленнее, чем аналогичные реакции большинства  $\alpha$ - и  $\beta$ -аминокислот [14], что, по-видимому, связано с влиянием объемного заместителя в боковой цепи нуклеоаминокислот.

Для разделения изоиндолных производных энантиомеров аминокислот описаны различные варианты обращенно-фазовой хроматографии с использованием в качестве подвижной фазы смеси фосфатного [11] или ацетатного [12] буфера с метанолом или ацетонитрилом. Поскольку изоиндолные производные нуклеоаминокислот отличаются высокой гидрофильностью, они довольно плохо удерживаются и разделяются в условиях обращенной фазы на колонках  $C_{18}$  и  $C_{16}$  (табл. 1, 2). Для выбора оптимальных условий нами изучено влияние концентрации ацетонитрила и рН буферного раствора на эффективность разделения. При смещении рН буферного раствора в щелочную область и уменьшении концентрации ацетонитрила значения факторов емкости и коэффициентов селективности изоиндолных производных нуклеоаминокислот улучшаются (табл. 1 и 2). Удовлетворительное разделение достигалось при использовании в качестве подвижной фазы



**Рис. 3.** Деление ОРА-НАС-производных рацематов 3-(аденилил-9)- (1), 3-(урацилил-1)- (2), 3-(тиминил-1)- (3) и 3-(цитозинил-1)аланина (4) на колонке (4.6  $\times$  250 мм) Ultrasphere  $C_{18}$  (5 мкм) в 0.01 М фосфатном буфере (рН 7.0), содержащем 5% ацетонитрила. Скорость потока 1 мл/мин.

**Таблица 1.** Влияние pH буферного раствора подвижной фазы, содержащей 15% ацетонитрила, на фактор емкости ( $k'$ ), селективность ( $\alpha$ ) и разрешение ( $R_s$ ) изоиндолных производных энантиомеров 3-(урацилил-1)аланина на колонке (4.6 × 250 мм) Ultrasphere C<sub>18</sub> (5 мкм)

pH буферного раствора	$k'_L$	$k'_D$	$\alpha (k'_L/k'_D)$	$R_s^{**}$	pH буферного раствора	$k'_L$	$k'_D$	$\alpha (k'_L/k'_D)$	$R_s^{**}$
5.0 (*)	2.08	2.18	1.05	0.50	6.5	1.92	2.08	1.08	0.70
6.0	1.90	2.04	1.07	0.58	7.0	2.40	2.72	1.13	1.07
6.3	1.92	2.04	1.06	0.55	7.2	2.40	2.70	1.11	1.09

\* 0.01 М ацетатный буферный раствор; остальные измерения выполнены в 0.01 М фосфатном буферном растворе.

\*\*  $R_s = (t'_D - t'_L)/(W_D + W_L)$ , где  $t'$  и  $W$  – времена удерживания и полуширина пиков  $D$ - и  $L$ -энантиомеров.

**Таблица 2.** Влияние состава подвижной фазы на фактор емкости ( $k'$ ), селективность ( $\alpha$ ) и разрешение ( $R_s$ ) ОРА-НАС-производных нуклеоаминокислот на колонке Ultrasphere C<sub>18</sub>

Нуклеоаминокислота	Содержание ацетонитрила, % по объему*	$k'_L$	$k'_D$	$\alpha (k'_L/k'_D)$	$R_s$	Нуклеоаминокислота	Содержание ацетонитрила, % по объему*	$k'_L$	$k'_D$	$\alpha (k'_L/k'_D)$	$R_s$
3-(Цитозинил-1)аланин	5	2.08	2.42	1.16	1.50	3-(Тиминил-1)аланин	5	2.70	3.40	1.25	1.50
	10	1.92	2.12	1.10	1.15		10	2.60	2.92	1.12	1.50
	25	1.72	1.90	1.10	1.00		25	2.40	2.68	1.12	0.93
3-(Урацилил-1)аланин	5	2.50	2.90	1.16	1.00	3-(Аденилил-9)аланин	5	2.90	3.60	1.24	1.75
	10	2.50	2.80	1.12	1.00		10	2.80	3.50	1.25	1.75
	25	1.80	2.00	1.11	0.80		25	2.60	3.00	1.15	0.80

\* 0.01 М фосфатный буфер, pH 7.0.

0.01 М фосфатного буфера (pH 7.0), содержащего 5% ацетонитрила (табл. 2). В этих условиях ОРА-НАС-производные нуклеоаминокислот элюируются в течение 3–4 мин (рис. 3). Значения фактора емкости максимальны для наиболее гидрофобного в этом ряду нуклеоаминокислот 3-(аденилил-9)аланина. Для всех нуклеоаминокислот первыми элюируются  $L$ -энантиомеры, далее  $D$ -энантиомеры, что характерно также и для большинства гидрофильных аминокислот [10, 12].

При хроматографическом разделении изоиндолных производных аминокислот обычно используют флуориметрическое детектирование. Результаты флуориметрического определения, как правило, плохо воспроизводимы из-за невысокой (не более 10–15 мин) стабильности регистрируемого сигнала таких соединений [12, 15]. Производные нуклеоаминокислот с ОРА и НАС, детектируемые в УФ-области при 254 нм, достаточно стабильны, интенсивность поглощения практически не меняется в течение 2–2.5 ч после завершения реакции модификации. Высоты пиков ОРА-НАС-производных нуклеоаминокислот линейно зависят от содержания нуклеоаминокислот в интервале 0.08–1.0 нмоль. Градуировочный график для  $L$ -энантиомера 3-(цитозинил-1)аланина описывается уравнением  $H = (186 \pm 6)C + (3 \pm 2)$  (предел обнаружения 44 пмоль); для  $D$ -энантиомера  $H = (145 \pm 4)C$  (предел обнаружения 54 пмоль),

где  $H$  – высота пика (мм),  $C$  – содержание нуклеоаминокислоты (нмоль).

Достаточно хорошая воспроизводимость интенсивности сигнала и времени удерживания изоиндолных соединений, высокая чувствительность

**Таблица 3.** Образование энантиомеров при гидролизе  $N$ -фенилацетил-3-(цитозинил-1)аланина под действием пенициллинацилазы из *E. coli*

Время реакции, мин	Содержание, %		
	исходного субстрата	$L$ -энантиомера	$D$ -энантиомера
0	100	0	0
5	100	3	0
60	90	11	0
85	86	14	0
120	82	23	0
180	79	28	0
240	58	43	0
465	57	49	1
540	47	50	2
750	43	50	10
1050	35	50	11
1380	30	50	18

определения, сравнимая с чувствительностью флуориметрического детектирования, позволяют использовать метод для контроля за содержанием энантиометров в процессе стереоселективного ферментативного гидролиза *N*-фенилацетильных производных нуклеоаминокислот.

В данной работе осуществлялся хроматографический контроль за реакцией ферментативного гидролиза *N*-фенилацетильного производного рацемата 3-(цитозинил-1)аланина. Метод позволил определить *D*-энантиомер 3-(цитозинил-1)аланина на фоне 50-кратного избытка *L*-энантиомера (табл. 3) и проследить за ходом ферментативной реакции вплоть до высоких степеней превращения исходного субстрата.

Таким образом, на примере пиримидил- и пуринилпроизводных аланина показано, что стереоизомеры нуклеоаминокислот удовлетворительно разделяются в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ после их предварительной модификации смесью *o*-фталевого альдегида и *N*-ацетил-*L*-цистеина.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали *o*-фталевый альдегид (Fluka, Швейцария), *N*-ацетил-*L*-цистеин (Sigma, США). Нуклеоаминокислоты – 3-(урацилил-1)-, 3-(цитозинил-1)-, 3-(тиминил-1)- и 3-(аденилил-9)-аланин – синтезировали по методике [16]. Стандартные растворы нуклеоаминокислот с концентрацией  $5.0 \times 10^{-3}$  М хранили при 4°C в течение месяца.

Работа выполнена с помощью хроматографической системы, состоящей из модуля подачи элюента 110B Solvent Delivery Module (Beckman, США), инжектора типа Reodyne 7125 с инжекционной петлей объемом 10 мкл, детектора 2138 Uvicord со светофильтром 254 нм (LKB, Швеция). Хроматограммы регистрировали на самописце фирмы Pharmacia Fine Chemicals (Голландия). Использовали колонки для обращенно-фазовой хроматографии Ultrasphere C<sub>18</sub>, 5 мкм (4.6 × 250 мм; Beckman, США) и Диасорб 130, C<sub>15</sub>, 7 мкм (3 × 250 мм). Скорость потока составляла 1.0 мл/мин.

**Предколонная модификация нуклеоаминокислот *o*-фталевым альдегидом.** К 100 мкл 0.1 М боратного буфера (рН 9.6), содержащего 3–15 мкг нуклеоаминокислоты, прибавляли 3 мкл 0.1 М раствора ОРА в метаноле и 3 мкл 0.05 М раствора НАС в метаноле. Пробирки центрифугировали 3 мин при 4000 об/мин и точно через 10 мин после начала реакции вводили в хроматографическую систему.

***N*-Фенилацетил-*D,L*-3-(цитозинил-1)аланин.** К суспензии 3.3 г (0.01 моль) *D,L*-3-(цитозинил-1)аланина в 80 мл смеси вода–диоксан (1 : 1) прибавляли при перемешивании 15 мл (0.015 моль) 1 н. NaOH. Смесь охлаждали льдом и при интен-

сивном перемешивании прибавляли по каплям 4.5 мл (0.032 моль) хлорангидрида фенилуксусной кислоты, перемешивали 30 мин при охлаждении и 15 ч при 18°C. Реакционную смесь подкисляли 0.1 н. HCl до рН 3, охлаждали, выпавший осадок отфильтровывали, промывали холодным спиртом, эфиром и сушили на воздухе. Выход 2 г (47.5%),  $R_f$  0.42 (2-пропанол – 25% NH<sub>4</sub>OH – вода, 14 : 1 : 5), 0.78 (хлороформ – 25% NH<sub>4</sub>OH – метанол, 12 : 3 : 8);  $T_{пл}$  198–200°C (разл.).

*N*-Фенилацетильные производные других нуклеоаминокислот синтезировали аналогичным образом.

**Гидролиз *N*-фенилацетильного производного 3-(цитозинил-1)аланина.** 4.5 г ( $1.9 \times 10^{-2}$  моль) рацемата *N*-фенилацетил-3-(цитозинил-1)аланина растворяли при подщелачивании 2 н. раствором NaOH в 250 мл воды, после полного растворения доводили до рН 7.5 соляной кислотой. В раствор вносили 1 г иммобилизованной на неорганическом носителе пенициллинацилазы с активностью 20 МЕ/мг и проводили реакцию при перемешивании. Для слежения за процессом гидролиза отбирали пробы объемом 8 мкл с интервалом от 20 мин до 1 ч и переносили в 800 мкл 0.1 М боратного буфера (рН 9.6). Далее 100 мкл полученного раствора обрабатывали растворами ОРА и НАС, как указано выше. Инжектировали пробу объемом 5 мкл,

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1601.

Работа поддержана грантами РФФИ 97-04-48827 и 96-04-49348.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Швачкин Ю.П., Мишин Г.П., Коршунова Г.А. // Успехи химии. 1982. Вып. 2. С. 311–332.
2. Kharkevich D.A., Sumbatyan N.V., Tapin A.N., Chichenkov O.N., Zaitsev S.V., Korshunova G.A. // FEBS Lett. 1994. V. 351. P. 308–310.
3. Solodenko V.A., Kasheva T.N., Kukhar V.P., Kozlova E.V., Mironenko D.A., Svedas V.K. // Tetrahedron. 1991. V. 47. P. 3989–3998.
4. Солошонок В.А., Галаев И.Ю., Швядас В.К., Козлова Е.В., Котик Н.В., Шишкина И.П., Галушко С.В., Розенко А.Б., Кухарь В.П. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 467–473.
5. Кухарь В.П., Солошонок В.А., Швядас В.К., Котик Н.В., Галаев И.Ю., Кириленко А.Г., Козлова Е.В. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 474–477.
6. Солошонок В.А., Швядас В.К., Кухарь В.П., Галаев И.Ю., Козлова Е.В., Свицунцова Н.Ю. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 478–483.
7. Soloshonok V.K., Kirilenko A.G., Fokina N.A., Kukhar V.P., Galushko S.V., Svedas V.K., Resnati G. // Tetrahedron: Asymmetry. 1994. V. 5. P. 1225–1228.

8. Buck R.H., Krummen K. // J. Chromatogr. 1984. V. 315. P. 279–285.
9. Aswad D.W. // Anal. Biochem. 1984. V. 137. P. 402–405.
10. Sista H.S. // J. Chromatogr. 1986. V. 359. P. 231–240.
11. Nimura N., Kinoshita T. // J. Chromatogr. 1986. V. 352. P. 169–177.
12. Hisaka A., Kasamatsu S., Takenaga N., Ohtawa M. // J. Chromatogr. 1989. V. 494. P. 183–189.
13. Solodenko V.A., Belik M.Y., Galushko S.V., Kukhar V.P., Kozlova E.V., Mironenko D.A., Svedas V.K. // Tetrahedron: Asymmetry. 1993. V. 4. P. 1965–1968.
14. Svedas V.K., Galaev I.J., Borisov I.L., Berezin I.V. // Anal. Biochem. 1980. V. 101. P. 188–195.
15. Cooper J.D.H., Ogden G., McIntosh J., Turnell D.C. // Anal. Biochem. 1984. V. 142. P. 98–102.
16. Doel M.T., Jones A.S., Taylor N. // Tetrahedron Lett. 1969. V. 25. P. 5971.

## Detection of Enantiomers of Nucleoamino Acids by HPLC with Premodification with *o*-Phthalic Aldehyde

O. I. Gurentsova, M. V. Savchenko, N. V. Sumbatyan, G. A. Korshunova, and V. K. Svedas  
*Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia*

**Abstract**—The use of reversed-phase HPLC with UV detection at 254 nm for the separation of stereoisomers of nucleoamino acids, namely, pyrimidyl and purinyl derivatives of alanine, after premodification with *o*-phthalic aldehyde and N-acetyl-*L*-cysteine was studied. The use of 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 5% acetonitrile as a mobile phase resulted in satisfactory separation. The range of the detectable amounts of nucleoamino acids was 0.08–1.0 nmol. This method was used for monitoring the formation of stereoisomers in the hydrolysis of N-phenylacetylcytosinylalanine.

*Key words:* nucleoamino acids, enantiomers, high performance liquid chromatography, *o*-phthalic aldehyde, *E. coli* penicillin acylase