



УДК 543.632.562.1

НОВОЕ *N*-АЦИЛЬНОЕ ПРОИЗВОДНОЕ (*S*)-ЦИСТЕИНА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНАНТИОМЕРОВ АМИНОСОЕДИНЕНИЙ МЕТОДОМ ВЭЖХ С ПРЕДКОЛОНОЧНОЙ МОДИФИКАЦИЕЙ *орто*-ФТАЛЕВЫМ АЛЬДЕГИДОМ

© 2004 г. Д. Т. Гуранда, И. В. Шаповалова, В. К. Швядас[#]Факультет биоинженерии и биоинформатики, Институт физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 25.08.2003 г. Принята к печати 29.10.2003 г.

Новый тиол – *N*-фенилацетил-(*R*)-фенилглицил-(*S*)-цистеин (NPPC) использовали для определения энантиомеров первичных аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с предколоночной модификацией *орто*-фталевым альдегидом. Проведено сравнительное изучение предложенного меркаптана и классического SH-реагента *N*-ацетил-(*S*)-цистеина (NAC) при анализе стереоизомеров нефункционализированных аминов и аминокислот. При модификации NAC хроматография образующихся изоиндолов характеризуется низкой диастереоселективностью и удовлетворительного разделения стереоизомеров удается достичь лишь для некоторых алифатических аминокислот. Применение NPPC позволяет улучшить хроматографический анализ стереоизомеров аминокислот и провести энантиомерный анализ нефункционализированных аминов. Близкая природа боковых радикалов аминокислоты и тиолового реагента способствует разделению диастереомеров. Метод использовали для определения абсолютной концентрации отдельных энантиомеров аминов в ходе стереоселективных ферментативных реакций. Оптически активный NPPC получали с высоким выходом при помощи хемозиматического синтеза, основанного на региоселективном ацилировании аминокислоты (*S*)-цистеина в водной среде под действием пенициллинацилазы.

Ключевые слова: хиральный анализ, амины, тиоловый реагент, хемоселективное ацилирование, пенициллинацилаза из *Alcaligenes faecalis*.

ВВЕДЕНИЕ

Метод обращенно-фазовой ВЭЖХ с предколоночной модификацией аминокислот реагентом, состоящим из *орто*-фталевым альдегидом и оптически активного тиолсодержащего соединения, является одним из наиболее известных способов косвенного определения энантиомеров аминокислот. Данный подход основан на предварительной модификации первичных аминокислот хиральным реагентом и последующем разделении образующихся диастереомерных изоиндолов на ахиральной стационарной фазе. Метод использовали для энантиомерного анализа широкого ряда аминокислот: α -аминокислот [1, 2], их эфиров и амидов [3–5], аминокислот [5–7], арилалкиламинов [8], α -алкил- α -аминокислот [3–5, 9], нуклеоаминокислот [10]. Впервые возможность разделения стереоизомеров аминокислот была показана при использовании *N*-ацетил-(*S*)-цистеина

(NAC) в качестве SH-реагента [1, 2]. Впоследствии другие хиральные тиосоединения также применялись для образования диастереомерных аддуктов с ОРА: различные *N*-ацильные производные цистеина [2, 6, 11–14], тиосахара [7, 15], 3-меркапто-2-метилпропионовая кислота [5]. Сравнительный анализ показал, что структура меркаптосоединения, используемого для модификации первичных аминокислот, в значительной мере определяет как диастереоселективность разделения [2, 5–7, 16], так и устойчивость образующихся изоиндолов [5, 17]. Интерпретация экспериментальных данных с привлечением результатов молекулярного моделирования дает основание полагать, что механизм хиральной дискриминации диастереомерных изоиндолов базируется на различной конформационной жесткости двух диастереомеров, определяемой внутримолекулярными взаимодействиями [16]. Решающую роль при этом играют электростатические взаимодействия, водородные связи, π -взаимодействия [5, 6, 8, 16, 18].

Несмотря на многочисленные попытки использовать этот подход к хиральному анализу широкого круга аминокислот, к настоящему времени метод предколоночной модификации ОРА

Сокращения: *Alcaligenes* ПА – пенициллинацилаза из *Alcaligenes faecalis*; NAC – *N*-ацетил-(*S*)-цистеин; NPPC – *N*-фенилацетил-(*R*)-фенилглицил-(*S*)-цистеин; ОРА – *орто*-фталевый альдегид.

[#] Автор для переписки (тел./факс: (095) 939-2355; эл. почта: vytas@belozersky.msu.ru).

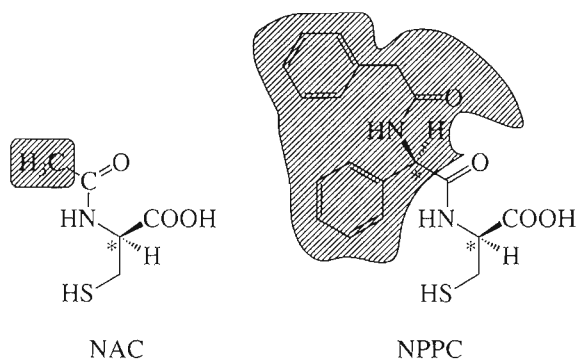


Схема 1. Хиральные SH-реагенты для определения оптической чистоты первичных аминсоединений: традиционный *N*-ацетил-(*S*)-цистеин (NAC) и новый *N*-фенилацетил-(*R*)-фенилглицил-(*S*)-цистеин (NPPC).

нашел применение в основном для определения энантиомеров аминокислот [19, 20]. Такое ограничение связано с тем, что в противоположность эффективному разделению производных аминокислот попытки использовать NAC для анализа энантиомеров аминоспиртов и нефункционированных аминов выявили низкую диастереоселективность разделения [6, 14].

В настоящей работе показана возможность анализа стереоизомеров аминоспиртов и нефункционированных первичных аминов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с предколоночной модификацией ОРА при использовании нового оптически активного тиолового реагента NPPC. Метод успешно использовали как для определения энантиомерного избытка и абсолютной концентрации стереоизомеров аминов в различных химических препаратах, так и для слежения за ходом стереоселективных ферментативных процессов без разделения анализируемых соединений и других компонентов реакционной системы.

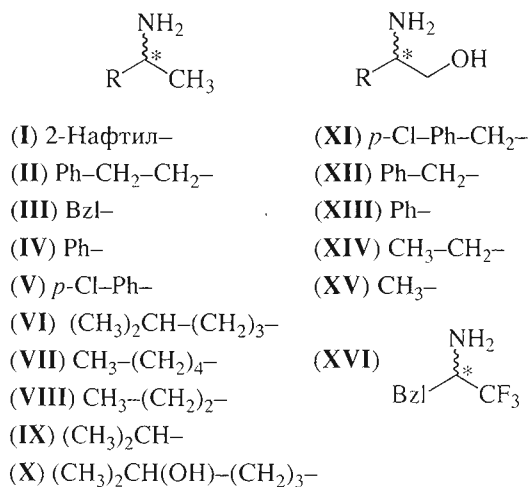


Схема 2. Структуры исследованных аминсоединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разделение диастереомерных изоиндолов

Новый тиол – *N*-фенилацетил-(*R*)-фенилглицил-(*S*)-цистеин (NPPC) предложен для определения энантиомеров первичных аминсоединений методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с предколоночной модификацией ОРА. Энантиомерно чистый NPPC синтезировали хеомэнзиматическим методом, основанном на региоселективном ацилировании аминогруппы (*S*)-цистеина, катализируемом пенициллинацилазой из *Alcaligenes faecalis* (*Alcaligenes* ПА) [21, 22]. Предложенный меркаптан и классический SH-реагент NAC (схема 1) использовали для разделения стереоизомеров ряда алифатических и ароматических аминов и аминоспиртов (схема 2). Модификация первичных аминогрупп реагентом, состоящим из ОРА и оптически активного тиола, приводит к образованию двух диастереомерных изоиндольных аддуктов (схема 3) с характерным максимумом поглощения при 340 нм. Образующиеся диастереомеры анализировали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке С-18 в изократическом режиме при использовании спектрофотометрического детектора.

Очевидно, параметры хроматографического разделения диастереомерных форм определяются структурой и состоянием ионизации образующихся аддуктов в условиях анализа. Предварительные эксперименты показали, что при смещении pH подвижной фазы из кислой в нейтральную область и уменьшении концентрации ацетонитрила значения коэффициентов емкости (k'),

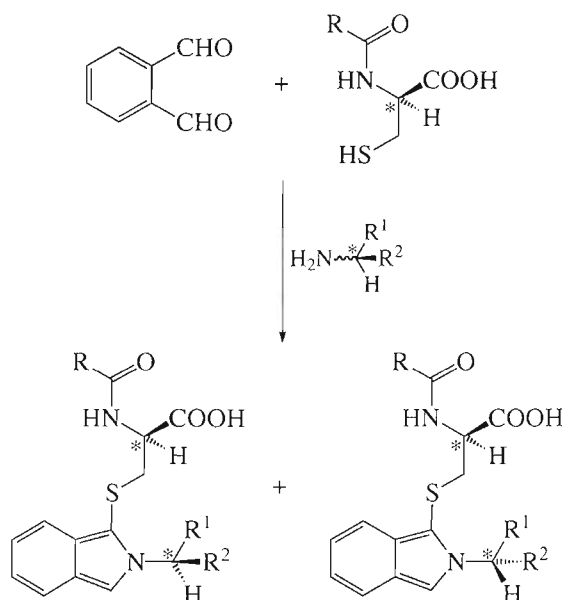


Схема 3. Образование диастереомерных изоиндольных аддуктов в реакции хиральных первичных аминсоединений с ОРА и оптически активным тиолом.

НАС и NPPC в качестве оптически активного SH-реактента для определения стереоизомеров аminosоединений методом ВЭЖХ с предколоночной модификацией ОРА

| № ^А | НАС | | | | NPPC | | | |
|----------------|---------|------------|--------------|--------------------|---------|------------|--------------|--------------------|
| | k_1^B | α^B | R^{Γ} | СЭ, % ^Д | k_1^B | α^B | R^{Γ} | СЭ, % ^Д |
| (I) | 83.5 | 1.00 | 0 | 20 | 113 | 1.07 | 1.41 | 35 |
| (II) | 55.9 | 1.06 | 0.67 | 20 | 95 | 1.10 | 1.65 | 35 |
| (III) | 24.1 | 1.05 | 1.02 | 20 | 47.6 | 1.00 | 0 | 35 |
| (IV) | 16.9 | 1.00 | 0 | 20 | 38.1 | 1.02 | 0.41 | 35 |
| (V) | 48.1 | 1.04 | 0.95 | 20 | 83.1 | 1.06 | 0.97 | 35 |
| (VI) | 52.2 | 1.13 | 0.80 | 20 | 18.4 | 1.09 | 0.44 | 40 |
| (VII) | 69.9 | 1.06 | 1.02 | 20 | 111 | 1.04 | 0.45 | 35 |
| (VIII) | 42.6 | 1.05 | 0.92 | 15 | 53.2 | 1.00 | 0 | 30 |
| (IX) | 36.4 | 1.02 | 0.36 | 15 | 45.9 | 1.05 | 0.58 | 30 |
| (X) | 24.5 | 1.23 | 4.15 | 15 | 23.8 | 1.00 | 0 | 30 |
| (XI) | 90.1 | 1.00 | 0 | 15 | 62.2 | 1.03 | 0.42 | 30 |
| (XII) | 31.1 | 1.00 | 0 | 15 | 26.1 | 1.13 | 2.35 | 30 |
| (XIII) | 21.5 | 1.07 | 1.41 | 15 | 23.2 | 1.18 | 2.96 | 30 |
| (XIV) | 30.2 | 1.23 | 3.86 | 10 | 10.3 | 1.17 | 2.72 | 30 |
| (XV) | 13.2 | 1.19 | 3.03 | 10 | 6.28 | 1.15 | 2.00 | 30 |
| (XVI) | 34.1 | 1.07 | 1.39 | 20 | 62.7 | 1.08 | 1.41 | 35 |

^АСоответствующая структура представлена на схеме 2; ^Б $k_1^B = t_1' - t_0$, $k_2^B = t_2' - t_0$; ^В $\alpha = k_1^B/k_2^B$; ^Г $R = (t_2' - t_1')/(W_1 + W_2)$, где t_0 – мертвое время, а t_1' , t_2' , W_1 , W_2 – времена удерживания и полуширина пиков изомеров; ^Д состав элюента – содержание ацетонитрила (по объему).

селективности (α) и фактора разделения (R) изоиндолных производных улучшаются, что согласуется с литературными данными [10, 16] и, по-видимому, связано с диссоциацией карбоксильной группы цистеина. В силу вышесказанного, дальнейшие исследования проводились с использованием в качестве мобильной фазы буфера с pH 6.8.

Полученные данные свидетельствуют о том (таблица), что эффективность разделения (параметры α и R) образующихся диастереомеров определяется как природой самого аминокомпонента, так и структурой SH-реактента. Селективность разделения энантиомеров аминоспиртов значительно выше, чем нефункционализированных аминов, что объясняется образованием внутримолекулярной водородной связи между карбоксильной группой цистеина и спиртовой группой [16]. Близкая природа боковых радикалов аминокомпонента и тиолового реактента, в данном случае *N*-ацильной части цистеина, способствует разделению диастереомеров. Так, в случае использования классического реактента НАС более эффективно разделяются алифатические аminosоединения (амины (VI)–(VIII) и аминоспирты (X), (XIV), (XV)), в то время как селективность NPPC-производных выражена сильнее для ари-

аминсоединений (амины (I), (II), (V) и аминоспирты (XII), (XIII)). Показательно сравнение селективности NPPC- и НАС-изоиндолов ароматических аminosоединений ((I), (IV), (XI), (XII)) и, с другой стороны, алифатических структур ((VIII), (X)), когда разница в эффективности двух реактентов наиболее выражена.

Таким образом, в случае НАС изоиндолные аддукты характеризуются низкой диастереоселективностью адсорбции и удовлетворительного разделения стереоизомеров удается достичь лишь для некоторых алифатических аминоспиртов. Применение NPPC позволяет улучшить анализ стереоизомеров аминоспиртов и провести определение энантиомеров нефункционализированных аминов. Более эффективное разделение NPPC-диастереомерных изоиндолов, по-видимому, можно объяснить реализацией дополнительных внутримолекулярных взаимодействий с участием фенилацетильного и фенилглицильного остатков модификатора.

Порядок элюирования диастереомерных форм определялся при модификации индивидуальных энантиомеров. Для обоих хиральных реактентов первыми элюируются (*S*)-энантиомеры β -аминспиртов и (*R*)-энантиомеры нефункционализированных аминов (–ОН-группа меняет отнесение конфигура-

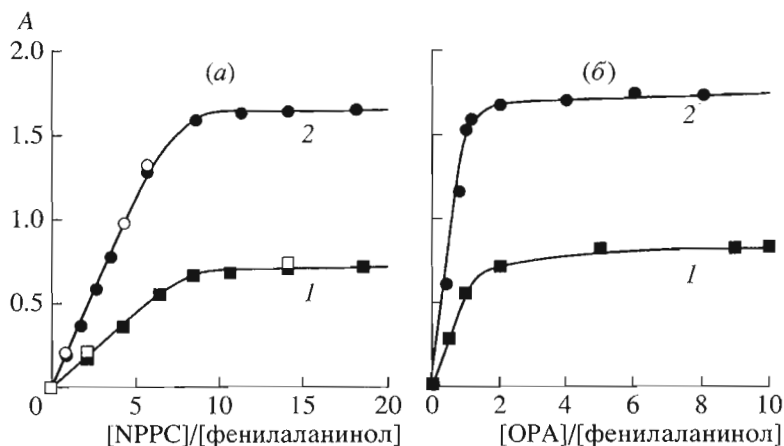


Рис. 1. Зависимость максимального значения оптического поглощения от концентрации тиолового реагента (а) и ОРА (б). Условия: 0.4 М боратный буфер, pH 9.6, регистрация при 340 нм. (а): 0.1 мМ фенилаланинол (кривая 1), 0.25 мМ фенилаланинол (кривая 2), 0.3 мМ ОРА (заполненные символы) или 3.0 мМ ОРА (пустые символы); (б): 0.1 мМ фенилаланинол (кривая 1), 0.25 мМ фенилаланинол (кривая 2), 3 мМ NPPC.

ции по номенклатуре Кана–Ингольда–Прелого). В аналогичной последовательности элюируются и стереоизомеры изоиндолных производных α -аминокислот [2, 6]. В случае ε -аминоспирта (X) (R)-, (S)-последовательность наблюдается в случае обоих реагентов.

Определение абсолютной концентрации энантиомеров. Анализ реакционной смеси

Реакция взаимодействия ОРА и тиолсодержащих соединений с аминокислотами хорошо изучена и используется для количественного спектрофотометрического определения первичных аминогрупп [23–25]. Можно ожидать, что использование метода ВЭЖХ с предколоночной модификацией ОРА даст возможность определять не только относительный состав или энантиомерный избыток, но и абсолютную концентрацию стереоизомеров аминокислот. Такая задача представляет интерес и потому, что ввиду характерного спектра поглощения изоиндоллов (максимум при 340 нм), метод может быть использован для количественного анализа первичных аминокислот и их стереоизомеров в многокомпонентных системах.

Для определения условий наиболее эффективной модификации аминогрупп была исследована зависимость максимальной оптической плотности образующегося хромофорного аддукта от концентрации ОРА и сульфгидрильного реагента в реакционной смеси. Абсолютная концентрация первичных аминогрупп может быть определена при использовании практически эквимольного количества ОРА и 3–4-кратного избытка НАС или 8–10-кратного избытка NPPC (рис. 1). Модификация всех исследованных аминокислот (за исключением амина (XVI) протекала в течение

10–15 мин при концентрациях реагентов порядка сотни микромолей на литр. При модификации амина (XVI) образование хромофорного аддукта протекало в течение 3 ч, что обусловлено, по-видимому, низкой нуклеофильностью аминогруппы. Молярный коэффициент поглощения образующихся изоиндоллов одинаков для обоих стереоизомеров, не зависит от природы N-ацильной части SH-реагента и составляет $\epsilon_{340} 6000 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Метод пригоден для количественного анализа хиральных аминов и аминокислот ввиду высокой стабильности образующихся изоиндолных аддуктов. Интенсивность поглощения разбавленных элюентом образцов (необходимое условие для количественного анализа) не менялась в течение 4–5 ч. Количественный ВЭЖХ-анализ стереоизомеров проводили на основании площади пиков, которые для двух диастереомерных форм при модификации рацематов изученных аминов были идентичны. Анализ стандартных растворов индивидуальных энантиомеров подтвердил отсутствие рацемизации в ходе реакции модификации аминогрупп. Предел обнаружения составляет 3–5 пмоль. Линейность детектируемого сигнала от концентрации определяемого вещества ((IV), (XII), (XIV)) наблюдали в интервале концентраций энантиомеров аминокислот 20 пмоль–20 нмоль (данные не приведены), что свидетельствует о широких возможностях метода.

Разработанный метод использовали для спектрофотометрического слежения за абсолютной концентрацией энантиомеров аминокислот в ходе двух стереоселективных ферментативных реакций – ферментативного ацилирования рацематов аминов и аминокислот, а также гидролиза N-ацильных производных аминокислот, катализируемых ПА (рис. 2). Другие компоненты реакционной смеси не мешали проведению ана-

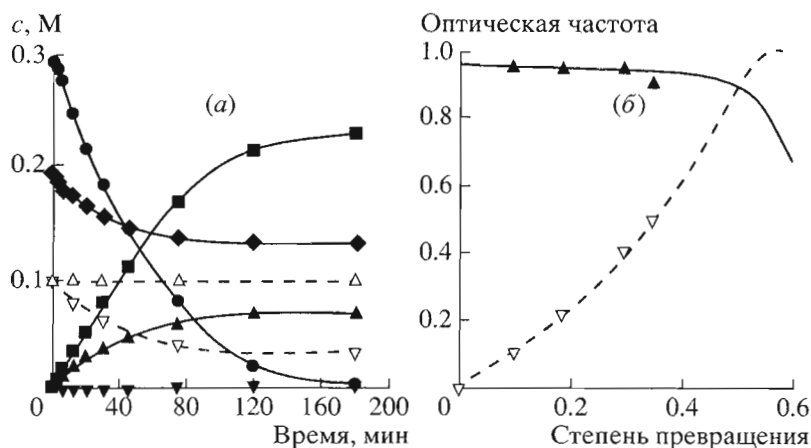


Рис. 2. Ацилирование (\pm)-фенилаланинола амидом (*R*)-миндальной кислоты, катализируемое *Alcaligenes* ПА: интегральные кривые изменения концентрации компонентов реакционной смеси (а) и зависимость энантиомерного избытка от степени превращения (б). Заполненные символы представляют результаты обычного ВЭЖХ-анализа с детекцией при 210 нм; пустые символы показывают данные хирального анализа методом ВЭЖХ с предварительной модификацией ОРА и детекцией при 340 нм. Амид (*R*)-миндальной кислоты (●), (*R*)-миндальная кислота (■), (*R*)-манделил-(*S*)-фенилаланинол (▲), (*R*)-манделил-(*R*)-фенилаланинол (▼), (\pm)-фенилаланинол (◆), (*S*)-фенилаланинол (△), (*R*)-фенилаланинол (▽). Сплошная и пунктирная линии на рис. (б) представляют расчетные кривые, полученные при математическом моделировании ферментативной реакции со стереоселективностью 50.

лиза. Результаты обычного ВЭЖХ-анализа (детекция при 210 нм) и данные хирального анализа с предколоночной модификацией (детекция при 340 нм) при слежении за ходом стереоселективного гидролиза *N*-фенилацетильного производного (XII) показали хорошее соответствие между двумя методами. Примечательно, что оба анализа проводили при использовании одной хроматографической колонки.

Таким образом, применение нового хирального тиосоединения NPPC позволило улучшить ВЭЖХ-анализ стереоизомеров аминоспиртов и провести энантиомерный анализ нефункционализированных аминов при использовании предколоночной модификации ОРА. Метод характеризуется хорошим разделением, чувствительностью, воспроизводимостью сигнала и может быть использован для количественного определения энантиомеров первичных аминосоединений как в индивидуальных препаратах, так и в реакционных смесях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ОРА (Koch Light, Великобритания); NAC, фенилацетилхлорид (Sigma, США); (*R*)-, (*S*)-фенилглицинол, фенилуксусную кислоту (Aldrich Chemie, ФРГ); (*S*)-цистеин, (*R*)-, (*S*)-, (\pm)-1-фенилэтиламин, (*R*)-, (*S*)-фенилаланинол, (\pm)-2-аминопентан, (*R*)-, (*S*)-1-(2-нафтил)этиламин, (*R*)-, (*S*)-2-амино-1-пропанол, (\pm)-2-амино-4-фенилбутан, (\pm)-2-амино-6-метилгептан, (\pm)-6-амино-2-метил-2-гептанол гидрохлорид (Fluka, Швейцария); фенилметилсульфонилфторид, метанол, додецилсульфат

натрия (Merck, ФРГ); (\pm)-1-(4-хлорофенил)этиламин, (\pm)-2-гептиламин, (\pm)-2-аминобутанол, (\pm)-*p*-хлорфенилаланинол, (\pm)-2-амино-3-метилбутан (Acros, Бельгия); фенилацетамид (Реахим, Россия); ацетонитрил (Криохром, Россия); (\pm)-1-бензил-2,2,2-трифторэтиламин был любезно предоставлен проф. В.А. Солошонком (Институт нефтехимии и биоорганической химии, г. Киев, Украина); *N*-фенилацетильные производные аминосоединений синтезированы как описано ранее [21]; (*R*)- и (*S*)-миндальная кислота и ее амиды, (*R*)-фенилглицин, (*R*)-фенилглицинамид, препарат *Alcaligenes* ПА были предоставлены компанией DSM (Нидерланды). Концентрацию активных центров пенициллинацилазы определяли согласно [26].

ВЭЖХ-анализ. Хроматографическая система состояла из модуля подачи элюента Waters М6000, инжектора типа Reodyne 7125 с инъекционной петлей объемом 50 мкл, колонки для обращенно-фазовой хроматографии Nucleosil C-18 Chrompack Varian (250 \times 4 мм, 5 мкм), детектора Waters М481 LC. Хроматограммы регистрировали на программно-аппаратном комплексе для сбора и обработки хроматографических данных Мультихром (Амперсенд, Россия). Скорость потока 1 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали смесь 6 мМ фосфатного буфера и ацетонитрила. Изоиндолные диастереомеры анализировали при 340 нм, с использованием в качестве подвижной фазы 6 мМ фосфатного буфера (рН 6.8), содержащего ацетонитрил (10–40% по объему). ВЭЖХ-анализ химических компонентов проводили при 210 нм, с использованием 6 мМ фосфатного буфера (рН 3.0), содержащего ацето-

нитрил (30% по объему) и 0.7 г/л додецилсульфата натрия. Время удерживания (мин): фенилглицин (5.5), *N*-(*R*)-фенилглицил-(*S*)-цистеин (11), фенилглицинамид (20), фенилацетамид (4.4), фенилуксусная кислота (6.8).

За кинетикой образования изоиндолных аддуктов непрерывно следили при 340 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1601 при 25°C, pH 9.6 в 0.4 М боратном буфере (pH 9.6).

Синтез *N*-фенилацетил-(*R*)-фенилглицил-(*S*)-цистеина. NPPC получали при помощи хемоэнзиматического синтеза, основанного на региоселективном ацилировании аминогруппы (*S*)-цистеина под действием пенициллинацилазы. На первой стадии синтезировали *N*-(*R*)-фенилглицил-(*S*)-цистеин путем переноса ацильной группы от (*R*)-фенилглицинамида (0.3 М) на аминогруппу (*S*)-цистеина (0.2 М), катализируемого *Alcaligenes* ПА при pH 10, 25°C в водной среде. В момент накопления максимального количества продукта реакционную смесь подщелачивали до pH 12, непрореагировавший (*R*)-фенилглицинамид экстрагировали этилацетатом, а водную фазу, содержащую *N*-(*R*)-фенилглицил-(*S*)-цистеин использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

На второй стадии проводили химическое ацилирование аминогруппы *N*-(*R*)-фенилглицил-(*S*)-цистеина фенилацетилхлоридом в водно-ацетонном растворе при pH 7.5–8.0 и 0–5°C на ледяной бане. По завершении реакции ацетон выпаривали на ротаторном испарителе, продукт экстрагировали этилацетатом из кислого раствора (pH 3) и перекристаллизовывали из водного этанола. Детальная методика синтеза и физико-химическая характеристика NPPC будет приведена в последующих публикациях.

Предколовочная модификация аминогрупп ОРА. Модификацию первичных аминогрупп проводили следующим образом: к 900 мкл 0.5 мМ раствора аминокислоты в 0.4 М боратном буфере (pH 9.6) добавляли 50 мкл метанольного раствора SH-реагента, содержащего тиол (40 мМ НАС или 100 мМ NPPC) и ОРА (20 мМ). Полученную смесь перемешивали, через 15 мин после начала реакции разбавляли элюентом из хроматографической системы, центрифугировали в течение 3 мин при 12000 об/мин и анализировали. Растворы ОРА и тиолов хранили в течение месяца в темном сосуде при +5°C.

Количественный анализ реакционной смеси. Стереоселективные ферментативные реакции ацилирования рацемического амина и гидролиз рацематов *N*-ацилированных аминокислот, катализируемые *Alcaligenes* ПА проводили в термостатируемой ячейке pH-стата (719 S Titrino, Metrohm) при 25°C, pH 10 или pH 7.5 соответственно. Для количественной регистрации изменения концентраций компонентов отбирали алик-

воту реакционной смеси (50–100 мкл), добавляли в элюент (1 мл, pH 3.0) для полного растворения компонентов реакционной смеси и остановки ферментативной реакции, а затем одну порцию полученного раствора анализировали при помощи ВЭЖХ с детекцией при 210 нм; а другую порцию (для определения концентрации индивидуальных энантиомеров аминокислот) подвергали процедуре модификации ОРА и анализировали на той же хроматографической колонке с детекцией при 340 нм.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантами РФФИ № 03-04-48472-а и ФЦП "Интеграция" 33384.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aswad D.W. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 137. P. 405–409.
2. Buck R.H., Krummen K. // *J. Chromatogr.* 1984. V. 315. P. 279–285.
3. Florance J., Galdes A., Konteatis Z., Kosarych Z., Langer K. // *J. Chromatogr.* 1987. V. 414. P. 313–322.
4. Duchateau A., Crombach M., Kamphuis J., Boesten W.H.J., Schoemaker H.E., Meijer E.M. // *J. Chromatogr.* 1989. V. 471. P. 263–270.
5. Duchateau A.L.L., Knuts H., Boesten J.M.M., Guns J.J. // *J. Chromatogr.* 1992. V. 623. P. 237–245.
6. Buck R.H., Krummen K. // *J. Chromatogr.* 1987. V. 387. P. 255–265.
7. Jegorov A., Trnka T., Stuchlik J. // *J. Chromatogr.* 1991. V. 558. P. 311–317.
8. Desai D.M., Gal J. // *J. Chromatogr.* 1993. V. 629. P. 215–228.
9. Maurs M., Trigalo F., Azerad R. // *J. Chromatogr.* 1988. V. 440. P. 209–215.
10. Гуренцова О.И., Савченко М.В., Сумбатян Н.В., Коршунова Г.А., Шведас В.К. // *Биоорг. химия.* 1997. Т. 23. С. 877–881.
11. Bruckner H., Wittner R., Godel H. // *J. Chromatogr.* 1989. V. 476. P. 73–82.
12. Euerby M.R., Partridge L.Z., Gibbons W.A. // *J. Chromatogr.* 1989. V. 483. P. 239–252.
13. Bruckner H., Haasmann S., Langer M., Westhauser T., Wittner R., Godel H. // *J. Chromatogr. A.* 1994. V. 666. P. 259–273.
14. Guranda D.T., Kudryavtsev P.A., Khimiuk A.J., Švedas V.K. // *Proceedings of Int. Symp. "100 Years of Chromatography"*. Moscow, Russia, 2003. P. 388–389.
15. Jegorov A., Triska T., Trnka T., Cerny M. // *J. Chromatogr.* 1988. V. 434. P. 417–422.
16. Duchateau A.L.L., Boesten J.M.M., Coussens B.B. // *Chirality.* 1995. V. 7. P. 547–555.
17. Jacobs W.A., Leburg M.W., Madaj E.J. // *Anal. Biochem.* 1986. V. 156. P. 334–340.
18. Lindner W. // *Indirect Separation of Enantiomers by Liquid Chromatography* / Eds M. Zief, L.J. Crane. *Chromatographic Chiral Separations.* Chromatographic Sci-

- ence Series. V. 40. New York: Marcel Dekker, 1988. P. 116.
19. Bruckner H., Langer M., Lupke M., Westhauser T., Godel H. // *J. Chromatogr. A*. 1995. V. 697. P. 229–245.
 20. Vermeij T.A.C., Edelbroek P.M. // *J. Chromatogr. B*. 1998. V. 716. P. 233–238.
 21. Guranda D.T., van Langen L.M., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. // *Tetrahedron: Asymm.* 2001. V. 12. P. 1645–1650.
 22. Guranda D.T., van Langen L.M., Khimiuk A.J., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. // *Proceedings of the 5th Int. Symp. on Biocatalysis and Biotransformations* / Ed. W.-D. Fessner. Darmstadt. Germany, 2001. P. 95.
 23. Шведас В.К., Галаев И.Ю., Березин И.В. // *Биоорг. химия*. 1978. Т. 4. С. 19–24.
 24. Švedas V.K., Galaev I.J., Borisov I.L., Berezin I.V. // *Anal. Biochem.* 1980. V. 101. P. 188–195.
 25. Cooper J.D.H., Ogden G., McIntosh J., Turnell D.C. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 142. P. 98–102.
 26. Švedas V., Guranda D., van Langen L., van Rantwijk F., Sheldon R. // *FEBS Lett.* 1997. V. 417. P. 414–418.

A New *N*-Acyl Derivative of (*S*)-Cysteine for Quantitative Determination of Enantiomers of Amino Compounds by HPLC with a Precolumn Modification with *o*-Phthalaldehyde

D. T. Guranda, I. V. Shapovalova, and V. K. Švedas[#]

[#] Phonelfax: +7 (095) 939-2355; e-mail: vyta@belozersky.msu.ru

*Department of Bioengineering and Bioinformatics and Belozerskii Institute of Physicochemical Biology,
Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia*

N-Phenylacetyl-(*R*)-phenylglycyl-(*S*)-cysteine (NPPC) was used for the determination of enantiomers of primary amines by rpHPLC with a precolumn modification with *o*-phthalaldehyde. NPPC was compared with the classic SH reagent *N*-acetyl-(*S*)-cysteine (NAC) in the analysis of stereoisomers of nonfunctionalized amines and amino alcohols. After the NAC modification, the resulting diastereomeric isoindoles were difficult to separate by HPLC, and satisfactory resolution was achieved only for some aliphatic amino alcohols. The use of NPPC improved the chromatographic analysis of stereomeric amino alcohols and, in addition, allowed the enantiomeric analysis of the nonfunctionalized amines. Similarity between the side radicals of the amino component and the thiol reagent favored the diastereomer separation. This method was used for determination of the absolute concentration of individual enantiomers of amines in the course of stereoselective enzymatic reactions. The optically active NPPC was prepared with a high yield by a chemoenzymatic synthesis based on a regioselective acylation of the (*S*)-cysteine amino group in aqueous medium by the action of penicillin acylase. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 5; see also [http:// www.maik.ru](http://www.maik.ru).

Key words: amines, chemoselective acylation, chiral analysis, penicillin acylase from Alcaligenes faecalis, thiol reagent