



УДК 547.466.04:543.42.062

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АБСОЛЮТНОЙ КОНФИГУРАЦИИ
И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ СТЕРЕОИЗОМЕРОВ
АМИНОКИСЛОТ В СМЕСЯХ***Воскова Н. А., Романов В. В., Сумбатян Н. В.,
Коришунва Г. А., Швачкин Ю. П.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Разработан новый метод определения абсолютной конфигурации и количественного содержания стереоизомеров аминокислот в смесях, основанный на измерении кругового дихроизма и УФ-поглощения хромофорных производных энантиомеров аминокислот, образующихся при обработке последних *o*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола. Метод не требует предварительного выделения хромофорных производных из реакционных смесей, прост и быстр в выполнении, обладает высокой чувствительностью и применим для анализа как белковых, так и различных неперотенногенных аминокислот, включая нуклеоаминокислоты.

Весьма актуальной проблемой является разработка эффективного метода определения абсолютной конфигурации стереоизомеров аминокислот в смесях. Не менее актуальна задача разработки простого и надежного метода количественного определения отдельных энантиомеров аминокислот в реакционных смесях без предварительного фракционирования последних.

Нами разработан новый метод определения абсолютной конфигурации и количественного содержания стереоизомеров аминокислот *in situ*, основанный на обработке анализируемой смеси *o*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола и на последующем измерении спектров кругового дихроизма (КД) и спектров УФ-поглощения образующихся хромофорных производных. При этом абсолютная конфигурация стереоизомеров аминокислот определяется по знаку пика КД в области 340 нм, а количественное содержание соответствующих стереоизомеров — по величине УФ-поглощения в той же области. Чувствительность метода составляет $2 \cdot 10^{-5}$ М.

Метод прост в выполнении и позволяет быстро и однозначно определять абсолютную конфигурацию и количественное содержание стереоизомеров аминокислот в различных смесях.

Необходимой предпосылкой для разработки этого метода явилось предварительное проведенное нами изучение закономерностей взаимодействия индивидуальных энантиомеров различных аминокислот с *o*-фталевым альдегидом и меркаптоэтанолом.

Известно, что в присутствии меркаптоэтанола *o*-фталевый альдегид вступает с аминокислотами в реакцию, приводящую к образованию хромофорных производных с интенсивным максимумом поглощения при 340 нм [1, 2]. Недавно изучен механизм этой реакции [3], а также предложен метод количественного определения аминокислот на ее основе [4]. Однако

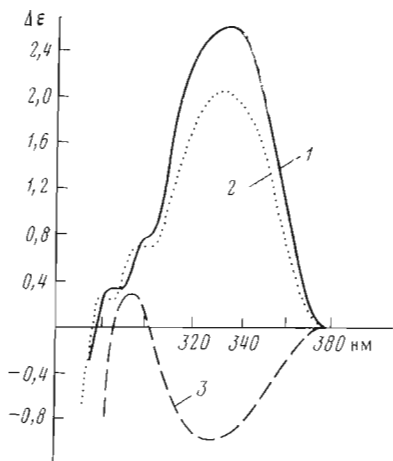


Рис. 1

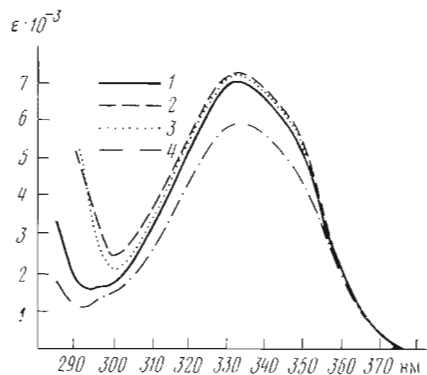


Рис. 3

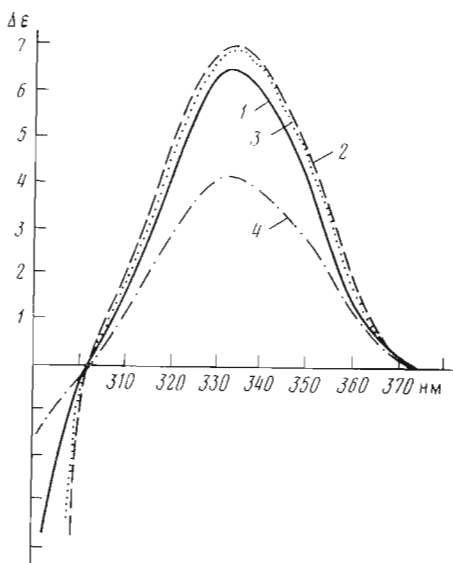


Рис. 2

Рис. 1. Спектры КД реакционных смесей *L*-лейцина (1), *L*-метионина (2) и *L*-триптофана (3) с *o*-фталевым альдегидом и меркаптоэтанолом

Рис. 2. Спектры КД реакционных смесей *L*-β-(урацил-1-ил)-α-аланина (1), *L*-β-(тимин-1-ил)-α-аланина (2), *L*-β-(цитозин-1-ил)-α-аланина (3), *L*-β-(аденил-9-ил)-α-аланина (4) с *o*-фталевым альдегидом и меркаптоэтанолом

Рис. 3. Спектры УФ-поглощения реакционных смесей *L*-β-(урацил-1-ил)-α-аланина (1), *L*-β-(тимин-1-ил)-α-аланина (2), *L*-β-(цитозин-1-ил)-α-аланина (3) и *L*-β-(аденил-9-ил)-α-аланина (4) с *o*-фталевым альдегидом и меркаптоэтанолом

сведения об изучении хироптических свойств продуктов указанной реакции до сих пор в литературе отсутствовали.

В результате изучения спектров КД продуктов реакции заведомых *L*- и *D*-изомеров различных аминокислот с *o*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола мы установили, что образующиеся производные *L*-изомеров аминокислот обнаруживают в области 340 нм положительный пик КД (рис. 1). В пределах ошибки эксперимента кривые КД производных *D*-изомеров аминокислот представляют собой зеркальные изображения соответствующих кривых КД хромофорных производных *L*-изомеров.

В группе белковых аминокислот исключения из этого правила представляют производные *L*-аланина, *L*-триптофана (см. рис. 1) и *L*-аспарагиновой кислоты, обнаруживающие в указанной области отрицательный эффект Коттона, а также производное *L*-гистидина, не дающее в области 340 нм четкого дихроичного поглощения.

Следует отметить, что аномальное поведение *L*-аланина наблюдалось и в случае его хромофорных производных с флуорескамином [5], а также с 2-метокси-2,4-дифенил-3-оксидигидрофураном [6].

Спектральные характеристики (молярные коэффициенты поглощения и разностного дихроичного поглощения) хромофорных производных, образующихся при взаимодействии белковых аминокислот с *o*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола, даны в табл. 1.

Важной особенностью рассматриваемого метода является возможность определения с его помощью абсолютной конфигурации и количественного содержания стереоизомеров аминокислот *in situ*, т. е. непосредственно в реакционных смесях, без предварительного выделения хромофорных производных. Благодаря этому обстоятельству метод можно использовать для экспрессных аналитических определений.

Предлагаемый метод применим для определения абсолютной конфигурации и количественного содержания стереоизомеров не только белковых, но и различных непротеиногенных аминокислот. В частности, на примере цуклеоаминокислот [7] мы убедились в высокой эффективности этого метода для контроля стереоспецифичности реакций ферментативного расщепления, протекающих при действии ацилаз на соответствующие ацильные производные рацемических нуклеоаминокислот [8]. Молярные коэффициенты поглощения и разностного дихроичного поглощения хромофорных производных, образующихся при взаимодействии *L*-нуклеоаминокислот с *o*-фталевым альдегидом и меркаптоэтанолом, даны в табл. 2. Спектры КД и спектры УФ-поглощения хромофорных производных некоторых *L*-нуклеоаминокислот приведены на рис. 2 и 3 соответственно.

Поскольку предлагаемый метод позволяет определять абсолютную конфигурацию стереоизомера и его количественное содержание в реакционной смеси практически одновременно, использование этого метода представляется весьма перспективным при изучении кинетики и стереоспецифичности ферментативных реакций, катализируемых не только ацилазами, но и другими ферментами, связанными с метаболизмом аминокислот и их производных.

Экспериментальная часть

В работе использовали *o*-фталевый альдегид (Koch-Light, Англия); 2-меркаптоэтанол (Merck, ФРГ); *L*- и *D*-изомеры аланина, аргипина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, валина, гистидина, глутамина, глутаминовой кислоты, изолейцина, лизина, серина, тирозина, треонина, триптофана, фенилаланина, цистина, цистеина (Reanal, ВНР), лейцина (Chemapol, ЧССР) и метионина (Merck, ФРГ).

Оптические изомеры нуклеоаминокислот получали ферментативным расщеплением соответствующих рацематов [8, 9].

Для определений применяли стандартный раствор *o*-фталового альдегида и 2-меркаптоэтанола в 0,1 М боратном буфере, pH 9,7 [4]. Концентрация растворов аминокислот в воде составляла $2 \cdot 10^{-4}$ М.

Типовая методика. К аликвоте исследуемого раствора прибавляли равный объем стандартного раствора реагентов, смесь выдерживали 5 мин при 20° С, после чего записывали спектр КД в интервале 250—400 нм (дихрограф Jobin-Ivon II, тип СД-185), а также измеряли поглощение при 330—340 нм (спектрометр EPS-3 Hitachi, Aminco DW-2 UV VIS). В качестве раствора сравнения использовали разбавленный в 2 раза стандартный раствор реагентов.

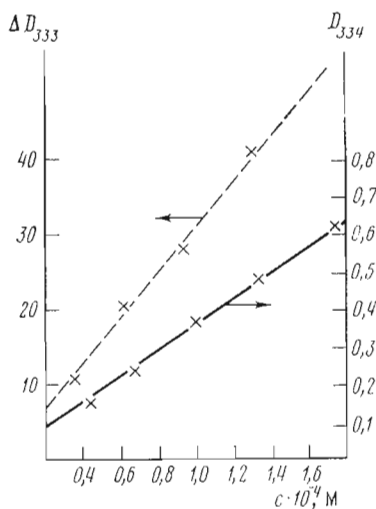


Рис. 4. Зависимость величин поглощения и разностного дихроичного поглощения хромофорного производного *L*-β-(урацил-1-ил)-α-аланина от его концентрации

Спектральные характеристики хромофорных производных
белковых аминокислот
0,1 М боратный буфер, pH 9,7

L-Аминокислота	ϵ_{334}	$\Delta\epsilon_{334}$	L-аминокислота	ϵ_{334}	$\Delta\epsilon_{334}$
Ala	6200±200	-1,00±0,05	Arg	7000±200	+2,50±0,10
Val	5800±100	+1,90±0,10	Asp	6100±200	-0,40±0,05
Leu	6500±100	+2,60±0,10	Asn	6100±100	+0,60±0,05
Ile	6400±100	+2,50±0,10	Glu	6100±100	+1,60±0,10
Ser	6000±100	+0,50±0,05	Gln	6500±100	+2,70±0,20
Thr	6200±100	+2,60±0,10	Phe	6200±100	+1,10±0,10
Cys	1000±50	+0,60±0,05	Tyr	5900±100	+0,60±0,05
Cys	9200±200	+6,00±0,20	His	6100±200	-
Met	6300±200	+2,20±0,10	Trp	6000±100	-1,10±0,10
Lys	10000±100	+2,50±0,10			

Таблица 2

Спектральные характеристики хромофорных производных
нуклеоаминокислот

Нуклеоаминокислота	ϵ_{334}	$\Delta\epsilon_{334}$
L-β-(Урацил-1-ил)-α-аланин	7100	+6,50
L-β-(Тимин-1-ил)-α-аланин	7200	+6,90
L-β-(Цитозин-1-ил)-α-аланин	7200	+7,00
L-β-(Адезин-9-ил)-α-аланин	6000	+4,10

Абсолютную конфигурацию стереоизомера устанавливали по знаку пика КД (с учетом указанных выше исключений). Концентрацию стереоизомера получали из величины УФ-поглощения, используя калибровочную прямую (см., например, рис. 4). В случае смеси L- и D-изомеров определенной аминокислоты концентрацию преобладающего изомера вычисляли по формулам

$$c_L = \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta D}{\Delta \epsilon_L} + \frac{D}{\epsilon} \right), \quad (1)$$

$$c_D = \frac{1}{2} \left(\frac{D}{\epsilon} - \frac{\Delta D}{\Delta \epsilon_D} \right), \quad (2)$$

где c_L и c_D — молярные концентрации L- и D-изомера, ϵ — молярный коэффициент поглощения, $\Delta\epsilon_L$ и $\Delta\epsilon_D$ — разностное молярное дихроичное поглощение L- и D-изомера, D — измеряемая величина УФ-поглощения, ΔD — измеряемая величина разностного поглощения кругового дихроизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roth M. (1971) Anal. Chem., 43, 880–882.
2. Schwabe C., Catlin J. C. (1974) Anal. Biochem., 61, 302–304.
3. Simons S. S., Johnson D. F. (1978) J. Org. Chem., 43, 2886–2891.
4. Швядас В.-Ю. К., Галаев И. Ю., Березин И. В. (1978) Биоорг. химия, 4, 19–25.
5. Тооме V., Wegrzynski B., Reymond G. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 69, 206–211.
6. Тооме V., Reymond G. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 66, 75–80.
7. Швачкин Ю. П. (1979) Ж. общ. химии, 49, 1157–1161.
8. Швачкин Ю. П., Воскова Н. А., Коршунова Г. А., Семилетов Ю. А., Савелова Н. В. (1976) Вестн. МГУ. Сер. хим., 17, 598–601.
9. Швачкин Ю. П., Воскова Н. А., Семилетов Ю. А., Коршунова Г. А., Купцова О. С., Яковлева И. В. (1977) Вести. МГУ. Сер. хим., 18, 482–484.

Поступила в редакцию
24.X.1979

A METHOD FOR DETERMINATION OF THE ABSOLUTE CONFIGURATION
AND QUANTITY OF AMINO ACID STEREOISOMERS IN MIXTURES

VOSKOVA N. A., ROMANOV V. V., SUMBATYAN N. V., KORSHUNOVA G. A.,
SHVACHKIN Yu. P.

M. V. Lomonosov State University, Moscow

A new method has been suggested which allows to determine the absolute configuration of amino acid stereoisomers and their quantity in mixtures. The method involves measuring the CD and UV spectra of chromophoric derivatives formed upon treatment of amino acid enantiomers with *o*-phthalaldehyde in the presence of mercaptoethanol. It requires no prior isolation of chromophore derivatives from the reaction mixtures, is facile, rapid, highly sensitive, and is applicable for either proteinaceous or nonproteinaceous amino acids including nucleamino acids.
