

АНАЛИТИЧЕСКОЕ ВЭЖХ-РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ РЕТИНОИДОВ ПРИРОДНОГО И 3,4-ДИДЕГИДРОРЯДОВ

Н.Е. Беликов, младший научный сотрудник, **А.А. Ходонов**, старший научный сотрудник, **О.В. Демина**, старший научный сотрудник, **М.А. Яковлева**, научный сотрудник, **Т.Б. Фельдман**, старший научный сотрудник, **М.А. Островский**, академик РАН, заведующий лабораторией физико-химических основ рецепции

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия
e-mail: nikolay@belikov.me

Вданной работе предложен подход к аналитическому разделению методом ВЭЖХ изомеров природного ретиналя и его 3,4-дидегидропроизводного, что необходимо для создания прямого протокола определения состава хромофорных групп зрительных пигментов различных представителей животных.

Ключевые слова: ретиноиды, *all-E*-3,4-дидегидроретиналь, ВЭЖХ-анализ.

Введение

Ретиноиды – производные витамина А играют ключевую роль в функционировании природных светопреобразующих систем, основанных на ретинальсодержащих белках, к которым относят родопсин, бактериородопсин, галородопсин и зрительные пигменты [1, 2]. Под действием кванта света происходит изомеризация кратной C=C-связи в определенном положении хромофора, и этот процесс инициирует цепь событий, которые необходимы для генерации определенных физиологических или химических сигналов в клетках живых организмов. Молекула ретинальсодержащих белков состоит из белковой части (апобелка) и хромофорной группы, представляющей собой протонированное основание Шиффа одного из производных ретиналя с ϵ -аминогруппой остатка лизина. Среди зрительных пигментов в состав хромофорных групп входят следующие представители ретиноидов: 11Z-изомеры природного ретиналя, его 3,4-дидегидропроизводного и 3-гидроксиретиналя.

Исследование состава производных ретиналя из хромофорных групп различных животных способствует расширению наших знаний о функционировании ретинальсодержащих белков, что очень важно как для фундаментальной науки, так и для практического применения в офтальмологии. Установление точного состава производных ретиналя в хромофорных группах является сложной задачей, поскольку возможные производные ретиналя находятся в данной системе в нанограммовых количествах, и использование ряда традиционных аналитических и спектроскопических методов для их идентификации невозможно. Наиболее приемлемым вариантом идентификации набора производных ретиналя в таких количествах является использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением современных ВЭЖХ-систем и отнесением

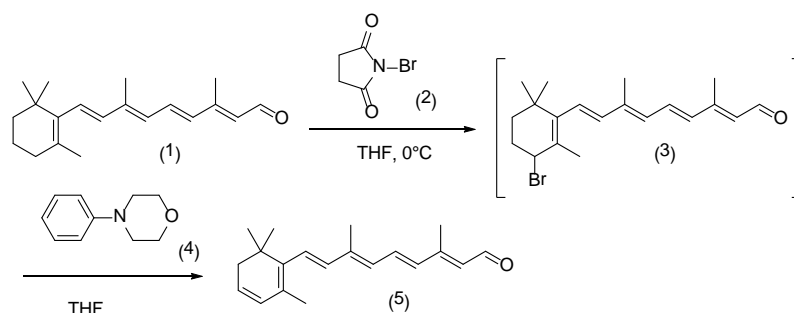
структуры каждого производного путем сравнения его хроматографической подвижности с реперными стандартами с точно идентифицированной структурой. Получение индивидуальных производных ретиналя в качестве стандарта – отдельная достаточно трудоемкая задача, так как только ограниченное число ретиноидов являются коммерчески доступными, а полного набора ретиналей-стандартов не существует. Для создания прямого протокола определения состава хромофорных групп зрительных пигментов различных представителей животных на первом этапе необходимо разработать эффективные пути синтеза ряда производных ретиналя в качестве стандартов.

Таким образом, цель данной работы состояла в разработке методики получения одного из стандартов-реперов – *all-E*-3,4-дидегидроретиналя, а также подхода к анализу состава хромофорных групп зрительных пигментов различных животных с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты и их обсуждение

Для создания прямого протокола анализа состава производных ретиналя из хромофорных групп зрительных пигментов различных животных на первом этапе нам требовалось решить две задачи: 1) отработать методику получения индивидуального *all-E*-изомера 3,4-дидегидроретиналя – одного из стандартов, используемых при идентификации ретиноидов; 2) подобрать условия аналитического хроматографического разделения изомеров природного ретиналя и его 3,4-дидегидропроизводного методом ВЭЖХ.

Синтез 3,4-дидегидроретиналя (**5**) был разработан на кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова ранее [3] и приведен на схеме. 3,4-Дидегидроретиналь (**5**) получали путем аллильного бромирования *all-E*-ретиналя (**1**) *N*-бромсукцинимидом (**2**) с последующим дегидробромированием 4-бромретиналя (**3**) под действием *N*-фенилморфолина (**4**) в ТГФ.



Индивидуальный *all-E*-изомер 3,4-дидегидроретиналя (**5**) получали с помощью препаративной ВЭЖХ смеси его изомеров. Конечный выход соединения **5** составил 47%. Структура полученного стандарта – 3,4-дидегидроретиналя (**5**) была подтверждена с использованием ^1H -ЯМР-спектроскопии.

Процесс хроматографического разделения *Z*-изомеров ряда природного ретиналя (**1**) и его 3,4-дидегидропроизводного (**5**) был исследован нами в изократическом режиме с использованием одной колонки или системы из двух последовательно соединенных колонок с нормальной фазой. За основу для подбора параметров хроматографического разделения были взяты литературные данные [4–7]. Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз; погрешность во временах удерживания при использовании системы, содержащей этилацетат, составляла не более 0.08 мин.

Состав модельных смесей для разделения был следующим: 1) смесь *all-E*-ретиналя и *all-E*-3,4-дидегидроретиналя; 2) фотостационарная смесь изомеров ретиналя; 3) фотостационарная смесь изомеров 3,4-дидегидроретиналя. Фотостационарные смеси изомеров получали методом фотоизомеризации *all-E*-изомеров в ацетонитриле в течение 60 мин.

Хроматограммы аналитического разделения смеси *all-E*-ретиналя и *all-E*-3,4-дидегидроретиналя методом ВЭЖХ с использованием одной или двух колонок, соединенных последовательно, представлены на рис. 1. Установлено, что использование двух последовательно соединенных колонок приводит к увеличению разницы во временах удерживания соединений, обладающих близкой хроматографической подвижностью (рис. 1б), и, таким образом, позволяет увеличить степень разделения пиков.

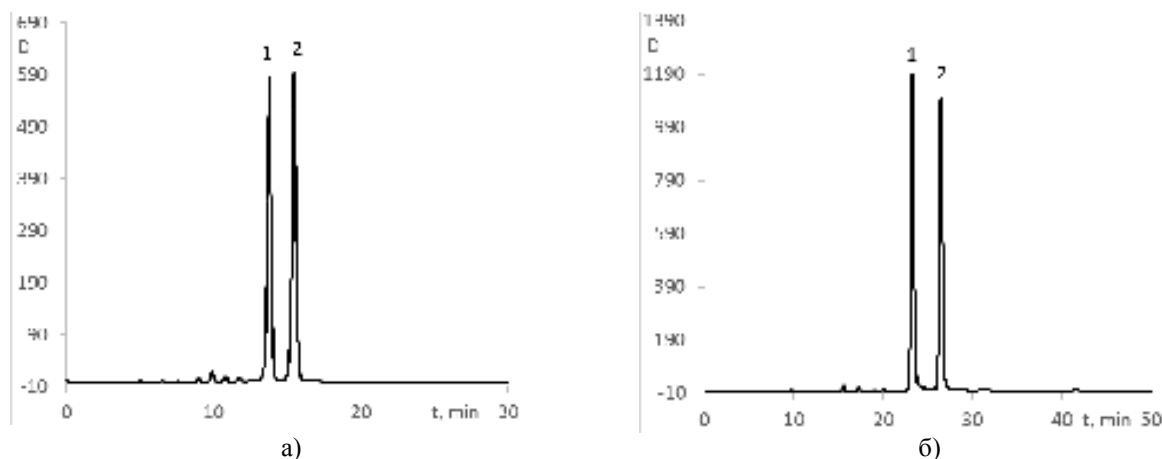


Рис. 1. ВЭЖХ-хроматограммы аналитического разделения смеси изомеров *all-E*-ретиналя и *all-E*-3,4-дидегидроретиналя: а) колонка Silica (7 мкм, 250×4.6 мм), элюент – 8% об. диэтилового эфира в гексане с добавлением 100 мкл метанола на 1 л смеси; б) две последовательно соединенные колонки Silica (7 мкм, 250×4.6 мм), Kromasil (5 мкм, 250×4.6 мм), элюент – 7% об. этилацетата в гексане с добавлением 100 мкл метанола на 1 л смеси. Детекция пиков при 370 нм; скорость потока 1 мл/мин.

Обозначения пиков: 1 – *all-E*-ретиналь; 2 – *all-E*-3,4-дидегидроретиналь.

На рис. 2 представлены хроматограммы аналитического разделения фотостационарных смесей изомеров ретиналя (**1**) (рис. 2а) и 3,4-дидегидроретиналя (**5**) (рис. 2б) при использовании двух последовательно соединенных колонок. Из данных хроматограмм следует, что индивидуальные изомеры ретиналя обладают

более равномерным распределением времен выхода определенных изомеров, чем изомеры 3,4-дидегидроретиналя, что значительно облегчало их идентификацию. Окончательная идентификация изомеров 3,4-дидегидроретиналя была сделана при помощи анализа их спектральных данных.

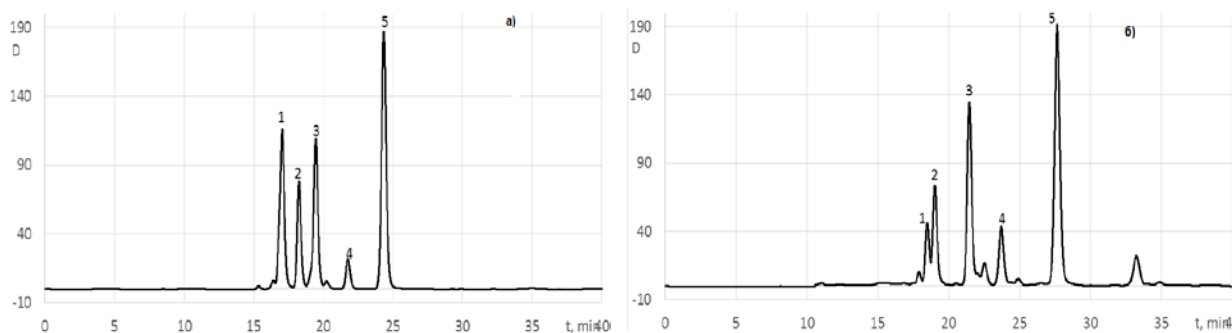


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограммы смеси изомеров (а) ретиналя (1) и (б) 3,4-дидегидроретиналя (5) после фотоизомеризации при использовании двух колонок:

1 – 13Z-изомер; 2 – 11Z-изомер; 3 – 9Z-изомер; 4 – 7Z-изомер; 5 – *all-E*-изомер.

Необходимо отметить, что использование системы из двух последовательно соединенных колонок обеспечивает более надежное отнесение пиков всех основных компонентов использованных нами смесей.

Условия хроматографического разделения смеси ретиналя (1) и 3,4-дидегидроретиналя (5) представлены в таблице. Применение в качестве элюентов смесей гексан – диэтиловый эфир и

гексан – этилацетат приводит к практически одинаковым параметрам разделения изомеров (времени удерживания) с хорошей воспроизводимостью хроматограмм, однако диэтиловый эфир обладает повышенной летучестью, и в связи с этим возможны флуктуации времен удерживания одних и тех же соединений в ходе ряда разделений.

Условия хроматографического разделения смеси ретиналя (1) и 3,4-дидегидроретиналя (5)

Колонка	Элюент*	Время удерживания, мин	
		Соед. 1	Соед. 5
Silica 7 мкм, 250×4.6 мм	8% об. диэтилового эфира в гексане	13.80	15.48
Kromasil 5 мкм, 250×4.6 мм	7% об. этилацетата в гексане	13.76	15.77
Две последовательно соединенные колонки Silica – Kromasil	7% об. этилацетата в гексане	23.31	26.50

* с добавлением 100 мкл метанола на 1 л смеси.

Разработанный нами подход к аналитическому хроматографическому разделению был использован в дальнейшем для определения изомерного состава смесей ретиноидов из экстрактов глаз креветок методом аналитической ВЭЖХ с помощью синтезированных реперов – ретиналя (1) и 3,4-дидегидроретиналя (5).

Экспериментальная часть

В работе использовали *all-E*-ретиналь, N-бромсукцинимид, N-фенилморфолин (Россия), растворители отечественного производства марки «х.ч.»: ацетонитрил, гексан, дихлорметан, диэтиловый эфир, метанол, тетрагидрофуран, этанол, этилацетат. Безводные этанол и метанол получали путем нагревания при кипении с этилатом или метилатом магния в течение 6-8 ч с последующей перегонкой. Все остальные растворители перегоняли перед использованием.

Спектры $^1\text{H-NMR}$ регистрировали в дейтеро-хлороформе на спектрометре «Bruker DPX-300» (Германия) с рабочей частотой 300 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.) относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана (δ 0.000 м.д.), величины констант спин-спинового взаимодействия измерены в герцах (Гц).

Тонкослойную хроматографию всех соединений проводили на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, Германия) в системе растворителей гексан–этилацетат, 4:1, детекцию пятен осуществляли в УФ-свете.

***all-E*-3,4-Дидегидроретиналь (5).** 500 мг (1.76 ммоль) *all-E*-ретиналя (1) растворяли в 30 мл ТГФ, охлаждали на ледяной бане, при интенсивном перемешивании прибавляли раствор 780 мг (4.40 ммоль, 2.5 экв.) N-бромсукцинимид (2) в 20 мл ТГФ и оставляли при 0°C и перемешивании в течение 30 мин. Мониторинг реакции проводили при помощи ТСХ (R_f продукта 3 ~ 0.05). Затем к реакционной смеси прибавляли 570 мг (3.52 ммоль, 2 экв.) N-фенилморфолина (4) и выдерживали в течение 12 ч при 0°C. За ходом реакции следили при помощи ТСХ (R_f целевого продукта 5 0.55, R_f побочных продуктов ~ 0.25). После завершения реакции смесь промывали 0.1 М водным раствором HCl (2×50 мл), затем водой (3×50 мл) до pH 7. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, растворитель удаляли в вакууме. Фракции, содержащие 3,4-дидегидроретиналь (5), очищали колоночной флеш-хроматографией на силикагеле, используя в качестве элюента смесь петролейного эфира и этилаце-

тата, с градиентом последнего от 0 до 15%. Индивидуальный *all-E*-изомер 3,4-дидегидроретиналя (**5**) получали препаративным разделением смеси изомеров на жидкостном хроматографе Smartline 1000 фирмы Knauer (Германия) со спектрофотометрическим детектором К-2500 (длина волны детектирования 370 нм), с использованием препаративной нормально-фазовой колонки Silosorb Si60 (7 мкм, 20×250 мм) и элюента – 7% об. этилацетата в гексане, при скорости потока 7 мл/мин. Выход чистого *all-E*-3,4-дидегидроретиналя (**5**): 227 мг (47%); R_f 0.55. УФ-вид-спектр: λ_{\max} 404 нм (CH₃OH). ¹H-ЯМР-спектр: 1.02 (6 H, с, 1,1-CH₃), 1.86 (3 H, с, 5-CH₃), 2.02 (3 H, д, J 1.0, 9-CH₃), 2.07 (2 H, дд, J 4.0/1.5, 2-CH₂), 2.31 (3 H, д, J 1.5, 13-CH₃), 5.74 (1 H, дт, J 9.5/4.0, 3H), 5.84 (1 H, дт, J 9.5/1.5, 4H), 5.96 (1 H, д, J 8.5, 14H), 6.20 (1 H, д, J 11.5, 10H), 6.26 (1 H, д, J 16.0, 8H), 6.35 (1 H, д, J 16.0, 7H), 6.37 (1 H, д, J 15.0, 12H), 7.12 (1 H, дд, J 11.5/ 15.0, 11H), 10.09 (1 H, д, J 8.5, 15H).

Заключение

В результате проведенного исследования был разработан подход к аналитическому хроматографическому разделению смесей ретиноидов с помощью ВЭЖХ, позволяющий с высокой степенью достоверности определять наличие их индивидуальных изомеров в исследуемых смесях и в экстрактах. Данный подход был опробован на модельных смесях изомеров ретиналя и 3,4-дидегидроретиналя, и была показана высокая воспроизводимость результатов. Синтезированный в ходе данного исследования *all-E*-3,4-дидегидроретиналь был использован нами в качестве реперного соединения для идентификации соответствующего пика на хроматограмме сложной смеси ретиноидов.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ для молодых ученых (проект 12-04-31190) и грантом Президента Российской Федерации для молодых ученых – кандидатов наук (проект № МК-6901.2013.4).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ходонов А.А., Еремин С.В., Локшин Дж.Л., Швец В.И., Демина О.В., Хитрина Л.В., Каулен А.Д. Аналоги ретиналя и их применение для исследования бактериородопсина // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. № 10-11. С. 745–778.
2. Островский М.А., Фельдман Т.Б. Химия и молекулярная физиология зрения: светочувствительный белок родопсин // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 11. С. 1071–1090.
3. Варга М. Синтез и изучение свойств модифицированных ретиналей: дис. ... канд. хим. наук. – М., МИТХТ, 1987.
4. Suzuki T., Makino-Tasaka M. Analysis of retinal and 3-dehydroretinal in the retina by high-pressure liquid chromatography // *Analyt. Biochem.* 1983. V. 129. № 1. P. 111–119.
5. Suzuki T., Makino-Tasaka M., Eguchi E. 3-Dehydroretinal (vitamin A2 aldehyde) in crayfish eye // *Vision Res.* 1984. V. 24. № 8. P. 783–787.
6. Suzuki T., Fujita Y., Noda Y., Miyata S. A simple procedure for the extraction of the native chromophore of visual pigments: The formaldehyde method // *Vision Res.* 1986. V. 26. № 3. P. 425–429.
7. Makino-Tasaka M., Suzuki T. Quantitative analysis of retinal and 3-dehydroretinal by high-pressure liquid chromatography // *Methods in Enzymology.* 1986. V. 123. P. 53–61.

ANALYTICAL HPLC-SEPARATION OF RETINOID DERIVATIVES OF NATURAL AND 3,4-DIDEHYDRO SERIES

N.E. Belikov[®], A.A. Khodonov, O.V. Demina, M.A. Yakovleva,
T.B. Feldman, M.A. Ostrovsky

N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119977 Russia

[®] Corresponding author e-mail: nikolay@belikov.me

The goal of the present study was the development of composition analysis method for vision pigments chromophore groups of different animals with the use of high performance liquid chromatography as well as the development of synthetic method for all-E-3,4-didehydroretinal – one of standard compounds. The all-E-3,4-didehydroretinal synthetic route developed earlier has been polished, and the product structure has been confirmed by physical-chemical analysis methods. The chromatographic separation process of Z-isomers of natural retinal and 3,4-didehydroretinal has been studied under isocratic flow conditions with the use of one and two sequentially connected normal phase columns. Optimal chromatographic conditions have been proposed for the separation and analysis of both retinoid model mixtures and animal eye extracts.

Keywords: retinoids, *all-E*-3,4-didehydroretinal, HPLC-assay.