



УДК 547.466:543.544

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ СРЕДНЕГО ДАВЛЕНИЯ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ ФЕНИЛТИОГИДАНТОИНОВ АМИНОКИСЛОТ

Назимов И. В., Левина Н. В.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Для анализа фенилтиогидантоинов (ФТГ) аминокислот, отщепленных на секвенаторе, использована жидкостная хроматография высокого разрешения. По предлагаемой методике методом обращеннофазовой хроматографии за 25 мин разделены 17 из 20 стандартных ФТГ аминокислот (коэффициенты разделения R_s 0,8–3,6). Относительное стандартное отклонение времени удерживания не превышает 1,6% для ФТГ аминокислот, отщепленных на секвенаторе, и зависит от чистоты образца. ФТГ гидрофобных аминокислот (Pro, Ile, Leu, Phe, Val, Ala, Trp, Gly) разделены изократной элюцией на силикагеле за 20 мин с коэффициентом разделения R_s 0,9–2,4. Для достоверной идентификации достаточно 50 пмоль ($5 \cdot 10^{-11}$ моль) каждого компонента стандартной смеси. Разделение как на обращенной фазе (C_{18}), так и на силикагеле использовано для определения N-концевой последовательности (44 остатка) фосфолипазы A_2 (фракция E3) яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*.

В настоящее время в процессе определения последовательности аминокислот в полипептидах часто используют жидкостную хроматографию высокого давления ФТГ аминокислот [1–4]. Вместе с тем известные варианты использования этого метода малоприспособны для рутинного анализа. Отрицательными сторонами методик являются длительность процедуры, значительная сложность отнесения пиков, резкое снижение срока службы хроматографических колонок из-за применения высокого давления. Кроме того, в литературе отсутствует материал по статистической оценке воспроизводимости разделения широко используемых в химии белка ФТГ аминокислот.

Целью данной работы являлся поиск оптимальных условий разделения ФТГ 20 белковых аминокислот методом жидкостной хроматографии с идентификацией разделенных компонентов спектрофотометрически и масс-спектрометрически. Особое внимание уделялось получению воспроизводимого разделения и пригодности методики для анализа ФТГ аминокислот, отщепленных на секвенаторе.

Для предотвращения быстрого снижения разрешающей способности колонки при использовании высокой скорости потока (90–120 мл/ч) и соответственно высокого давления (70–200 бар) мы решили использовать диапазон небольших объемных скоростей (40–60 мл/ч) и давлений (35–40 бар).

На рис. 1 показано разделение стандартной смеси ФТГ аминокислот методом обращеннофазовой хроматографии на октадецилсиликагеле, в таб-

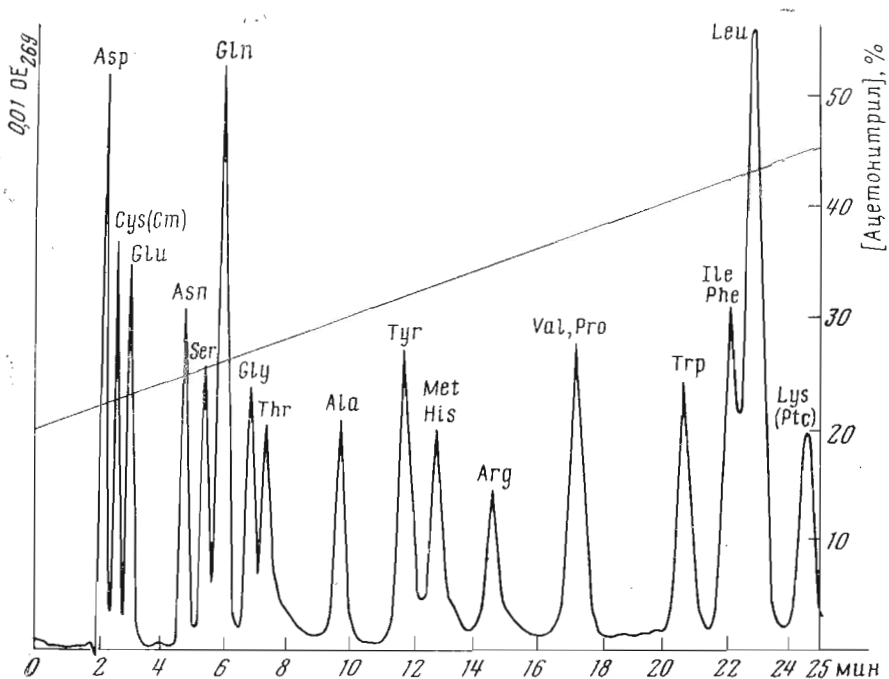


Рис. 1. Разделение стандартной смеси ФТГ аминокислот методом обращеннофазовой жидкостной хроматографии на силикагеле Lichrosorb 10RP₁₈ (колонка 4,6×250 мм) с градиентным элюированием 0,01 М ацетата натрия (pH 5,6) — ацетонитрил (1%/мин), скорость потока 60 мл/ч, давление 35 бар, температура 52° С. В пробе 1 мкл содержится 50 пмоль каждого компонента

лице представлены значения коэффициентов разделения (R_s^*). Принимая разделение достаточным при $R_s \geq 0,8$ [5], видим, что для большинства компонентов (кроме ФТГ Val, Pro, Phe, Leu, Ile) коэффициенты разделения вполне удовлетворительны (R_s 0,8—3,6). Такая селективность оказалась достаточной для разделения стандартной смеси, содержащей 20 компонентов, на 17 фракций за 25 мин. Следует отметить удовлетворительное разделение ФТГ Ser, Thr, Cys(Cm), Glu, Asn, Lys(Ptc), идентификация которых методами ГЖХ, аминокислотного анализа или масс-спектрометрии часто представляет большие трудности из-за разрушения образца при подготовке его к анализу или в ходе самого анализа. Наложение пиков ФТГ Met, His не мешает однозначности идентификации, поскольку по обычной схеме превращения тиазолинов в тиогидантоны ФТГ His и Arg находятся в водной фазе и анализируются отдельно.

В таблице представлены также значения времени удерживания компонентов смеси ФТГ аминокислот. Воспроизводимость времени удерживания, особенно для быстро элюируемых и близко расположенных друг к другу пиков ФТГ Asp, Cys(Cm), Glu; Asn, Ser, Glu, Gly, а также для ФТГ Leu, Ile представляет отдельную проблему. По предлагаемой методике разброс времени удерживания компонентов стандартной смеси составляет 0,1—1,0% (таблица).

При анализе ФТГ аминокислот, отщепленных на секвенаторе, т. е. содержащих побочные продукты реакции (квадрол, моно-, дифенилтиомочевины), относительное стандартное отклонение времени удерживания не превышает 1,6% и зависит от чистоты анализируемых образцов. Приведенные результаты получены при использовании 0,1 М квадратного бу-

$$* R_s^i = \frac{2(t_i - t_{i-1})}{w_i + w_{i-1}}.$$

Основные характеристики удерживания ФТГ аминокислот на колонке с обращенной фазой *

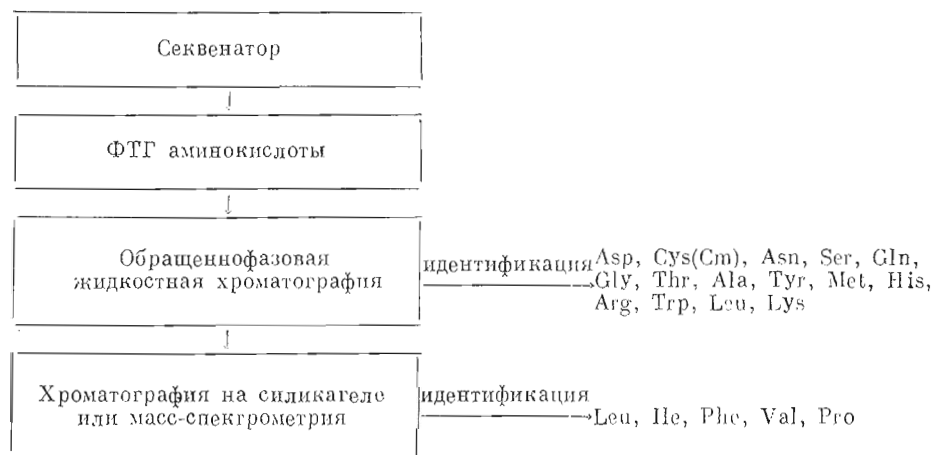
Аминокислота	R_s	Время удерживания, мин	Относительное стандартное отклонение **, %	Аминокислота	R_s	Время удерживания, мин	Относительное стандартное отклонение **, %
Asp	0,80	2,2	0,5	Tyr	0,77	12,0	0,1
Cys(Cm)		2,6	0,8	Met, His		12,7	0,1
Glu	0,81	3,0	0,6	Arg	2,01	14,4	0,9
Asn	3,60	4,7	0,4	Pro, Val	3,00	17,4	0,1
Ser	1,20			Trp	2,65	20,8	0,9
Gln	0,86	5,4	0,4	Ile, Phe	0,92	22,2	0,9
Gly	1,25	5,9	0,7	Leu	0,45	23,1	1,0
Thr	2,40	6,9	0,2	Lys(Ptc)	1,45	24,4	1,0
Ala	1,10	7,4	0,2				
	2,35	9,8	0,5				

* Условия эксперимента см. подпись к рис. 1.

** Для 6 опытов.

фера. Использование буфера на основе N,N-диметилаллиламина (вместо квадрола) осложняет идентификацию при разделении на обращенной фазе (высокий посторонний фон в районе ФТГ Val, Ile, резкое ухудшение воспроизводимости разделения).

Обычно трудно разделяемые на обращенной фазе ФТГ Val, Pro; Phe, Leu, Ile, а также ФТГ Ala, Trp, Gly были разделены изократической хроматографией на силикагеле (рис. 2) с коэффициентами разделения для Pro/Ile 1,3, Ile/Leu 0,9, Leu/Phe 1,2, Phe/Val 1,1, Val/Ala 2,4, Ala/Trp 1,7, Trp/Gly 1,0. С учетом вышензложенных результатов анализ ФТГ аминокислот после автоматической деградации по Эдману с использованием 0,1 М квадрольного буфера приводили по схеме:



В зависимости от аминокислотного состава полипептида образец, содержащий ФТГ аминокислоты, анализировали либо на колонке с обращенной фазой, либо на колонке с силикагелем. При неоднозначной идентификации

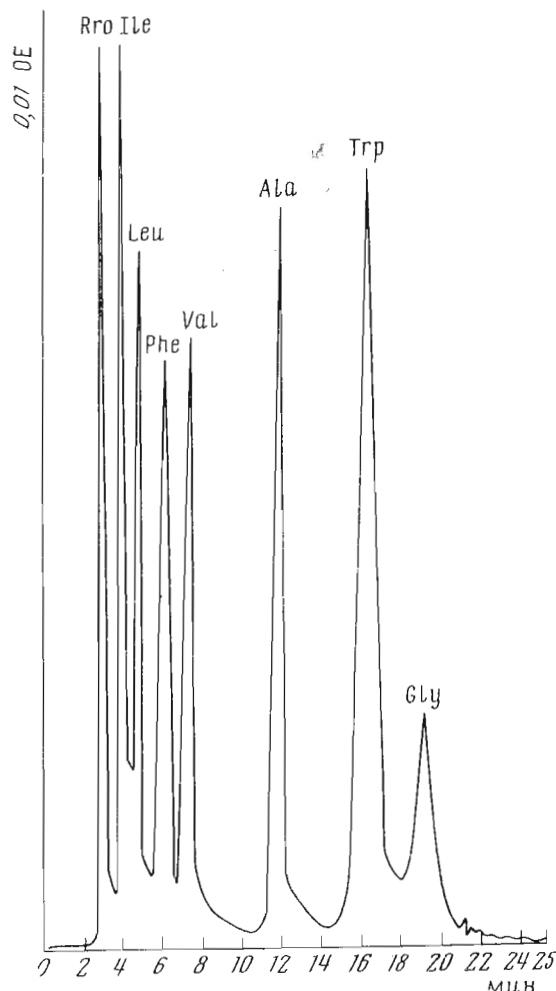


Рис. 2. Хроматография смеси ФТГ аминокислот на силикагеле MicroPack Si-10 (колонка 2×250 мм) в системе хлористый метилен – этилацетат (100:1). Скорость потока 40 мл/ч, давление 20 бар, температура 25°С. В пробе 1 мкл содержится 100 пмоль каждого компонента

лика анализ одной и той же аликвоты образца проводили последовательно в обеих системах. При этом фракции, элюированные с обращеннофазовой колонки, содержащие неразделяемые ФТГ, собирали в пробирки коллектора микрофракций; содержимое пробирок упаривали и анализировали на колонке с силикагелем.

Альтернативным вариантом анализа неидентифицированных фракций, собранных после разделения на обращенной фазе, был масс-спектрометрический анализ [6]. Поскольку при этом идентификация проводится по значению m/e молекулярного иона и одного-двух характеристических ионов, отнесение компонентов является однозначным. Так как масс-спектрометрическому анализу подвергаются устойчивые ФТГ Leu, Ile, Val, Pro, Phe, проблема термического разложения образцов не возникает.

Использование схемы (обращенная фаза+силикагель или обращенная фаза+масс-спектрометрия) позволяет идентифицировать в рутинном анализе ФТГ всех 20 белковых аминокислот за короткое время с достаточной чувствительностью (0,1–0,05 нмоль) и приемлемой воспроизводимостью (0,1–1,6%).

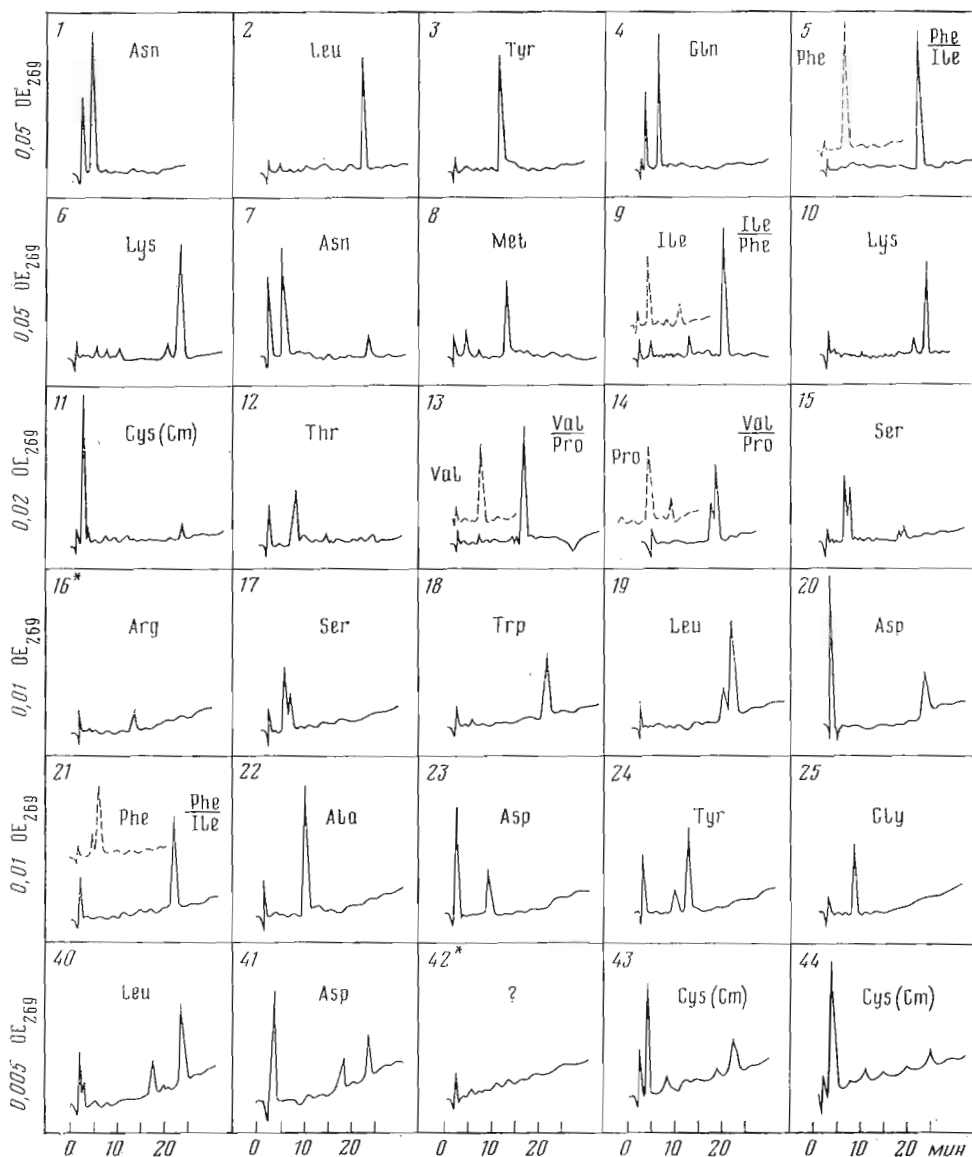
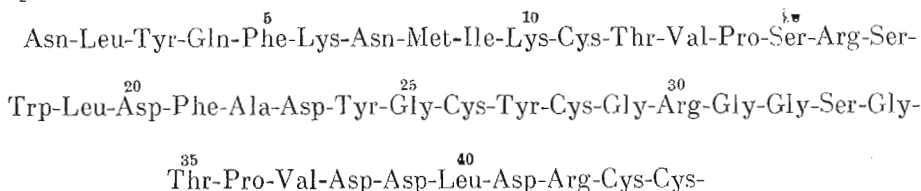


Рис. 3. Градиентная жидкостная хроматография ФТГ аминокислот после анализа на секвенаторе 50 μ моль карбоксиметилированной фосфолипазы A_2 (сплошная линия). Циклы 5, 9, 13, 14, 21 анализировали также хроматографией на силикагеле (пунктирная линия). В циклах 16 и 42 анализировали как этилацетатную, так и водную фазы; на рисунке анализ водных фаз этих циклов. Аргинин на 42-м цикле отщепления идентифицировали с помощью аминокислотного анализа. Для анализа использовали следующие аликваты: 1 – 6-й циклы – 1%, 7 – 10-й – 2%, 11 – 16-й – 3%, 17 – 25-й – 10%, 40 – 44-й – 75% раствора образца в метаноле для анализа на колонке с обращенной фазой и в хлористом метиле для анализа на колонке с силикагелем

Данная схема разделения и идентификации использовалась для определения аминокислотной последовательности полипептидов, в том числе для анализа первичной структуры фосфолипазы A_2 (фракция ЕЗ) яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* [7] (рис. 3). Приведенные результаты являются частью работы по определению полной структуры этого бел-

ка [8]:



В продуктах первых 25 циклов отщепления содержатся 18 из 20 белковых аминокислот (кроме His и Glu). Для большинства отщепленных остатков оказалось достаточно анализа на силикагеле с обращенной фазой. В случае ФТГ амидов дикарбоновых аминокислот (Gln, Asn) идентификацию проводили с учетом появляющихся при их частичном разложении ФТГ соответствующих дикарбоновых аминокислот (Glu, Asp, циклы 1, 4, 7). Для однозначной идентификации ФТГ некоторых алифатических аминокислот (циклы 5, 9, 13, 14, 21) проводили повторный анализ элюированной фракции на колонке с силикагелем (рис. 3). По предложенной схеме были однозначно идентифицированы все вышеприведенные аминокислотные остатки N-концевой области фосфолипазы A₂.

Использование указанных режимов разделения позволило провести анализ ряда других полипептидов (в сумме более 700 аминокислотных остатков) без существенной потери разделяющей способности колонки.

Таким образом, разделение 18 ФТГ аминокислот (включая His) на обращенной фазе приемлемо по затратам времени на анализ (25 мин, с уравниванием колонки — 35 мин). Общепринятые в настоящее время методики с таким же качеством разделения требуют 35–45 мин. Селективность и разрешающая способность колонки не изменяются после проведения 300 анализов. Воспроизводимость анализов по приведенной в данной работе методике оказалась достаточной для повседневного анализа первичной структуры полипептидов неизвестного строения.

Сохранение исходных параметров разделения мы объясняем использованием, во-первых, небольшой скорости потока элюента (40–60 мл/ч) и как следствие, невысокого (20–40 бар) давления на колонку; во-вторых, малыми значениями градиента концентрации ацетонитрила (1%/мин). Поэтому небольшая скорость потока элюента при тщательном подборе градиента концентрации ацетонитрила представляется наиболее перспективным вариантом проведения эффективного, воспроизводимого серийного анализа таких многокомпонентных смесей, какими являются образцы ФТГ аминокислот, отщепленные на секвенаторе.

Экспериментальная часть

В работе использовали набор ФТГ аминокислот (Pierce, США). Растворы готовили и хранили как описано в [6]. Используемые в хроматографии коммерческие ацетонитрил и хлористый метилен очищали как описано ранее [9], 0,01 M ацетат натрия (рН 5,6) перед употреблением фильтровали через пористый фильтр Millipore (Франция) с размером пор 0,45 мкм.

Хроматографию осуществляли на хроматографе 8500 (Varian, США). Разделение ФТГ аминокислот на силикагеле с обращенной фазой (Lichrosorb 10 RP₁₈, колонка 4,6×250 мм, Chrompack, Голландия) проводили при термостатировании (52° С, водяной термостат) с градиентным элюированием (см. рис. 1) и последующим хроматографированием неразделенных фракций на силикагеле MicroPack Si-10 (колонка 2×250 мм, Varian, США) (см. рис. 2). Детектирование осуществляли при 269 нм на детекторе с переменной длиной волны (Varichrom, Varian, США). Масс-спектрометрический анализ проводили как описано ранее [6].

Фосфолипаза A_2 (фракция E3) яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* получена и анализируется как описано в работе [8].

Автоматическое отщепление аминокислот проводили на секвенаторе 890 C (Beckman, США) с использованием 0,1 М квадrolьного буфера по программе № 122974. Реактивы для секвенатора — фирмы Beckman, США.

Авторы благодарят В. П. Демушкина (МГУ) за содействие в разделении ФТГ аминокислот на силикагеле и К. И. Сакодынского (НИФХИ, Москва) за ценные советы при обсуждении результатов этой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zimmerman C. L., Appella E., Pisano J. J. (1977) Anal. Biochem., 77, 569–573.
2. Huncapiller M. W., Hood L. E. (1978) Biochemistry, 17, 2124–2133.
3. Brown A. S., Mole J. E., Weissenger A., Bennet J. C. (1978) J. Chromatogr., 148, 532–535.
4. Margolies M. N., Brauer A. (1978) J. Chromatogr., 148, 429–439.
5. Киркленд Дж. (1974) Современное состояние жидкостной хроматографии, с. 13, «Мир», М.
6. Назимов И. В., Левина Н. Б., Богданова И. А., Розынов Б. В. (1977) Биоорг. химия, 3, 192–199.
7. Апсалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. (1977) Биоорг. химия, 3, 1553–1559.
8. Овчинников Ю. А., Мирошников А. И., Назимов И. В., Апсалон У. Р., Солдато-ва Л. Н. (1979) Биоорг. химия, 5, 805–813.
9. Гордон А., Форд Р. (1976) Спутник химика, с. 439–440, «Мир», М.

Поступила в редакцию
23.VII.1979

SEPARATION OF AMINO ACID PHENYLTHIOHYDANTOINS BY MODERATE PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY

NAZIMOV I. V., LEVINA N. B.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

High performance liquid chromatography has been used for analysis of amino acid phenylthiohydantoin (PTH) formed on sequenator analysis of proteins. The proposed technique allows to separate 17 of 20 standard PTH amino acids by reverse phase chromatography in 25 min, separation coefficients R_s ranging from 0.8 to 3.6. Relative standard deviation in retention time does not exceed 1.6% for PTH amino acids cleaved on sequenator, and depends upon the sample purity. The PTH of hydrophobic amino acids (Pro, Ile, Leu, Phe, Val, Met, Trp, Gly) are separated by isocratic elution on silica gel (20 min, R_s 0.8–2.4). For reliable identification 50 pmol of each component of the standard mixture is sufficient. Separation both on reverse phase (C_{18}) and on silica gel was used for N-terminal sequence determination (44 residues) of phospholipase A_2 (fraction E3) from the venom of Middle Asian cobra *Naja naja oxiana*.