



УДК 543.544 : 577.112.5

**УЛЬТРАМИКРОАНАЛИЗ Dns-АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ
МИКРОКОЛОНОЧНОЙ ГИДРОФОБНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
С АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ 10^{-13} МОЛЬ***Мальцев В. Г., Королева Е. М., Беленький В. Г.,
Виноградова Р. Г., Ганицкий М. Б.**Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР, Ленинград*

Разработана методика анализа Dns-аминокислот на уровне 10^{-13} моль за 1 ч, основанная на микроколоночной гидрофобной хроматографии с флюориметрическим детектированием. Разделение всех компонентов достигнуто путем создания градиента pH и концентрации ацетонитрила в элюенте. Ультравысокая чувствительность анализа обеспечивается применением капиллярных микроколонок (d_k 0,05 см) и флюориметра с объемом измерительной ячейки 1,5 мкл. При использовании скоростного (высокотемпературного) дансирования описанная методика пригодна и для аминокислотного анализа с той же чувствительностью.

Dns-производные аминокислот (Dns — 1-диметиламинонафталин-5-сульфонил) широко используются при определении аминокислотной последовательности в белках и пептидах по методу Эдмана, модифицированному Греем [1]. Высокая чувствительность (на уровне $(1-100) \cdot 10^{-12}$ моль), достигаемая при идентификации и количественном определении N-концевых аминокислот в виде Dns-производных, обеспечила привлекательность и популярность этого метода в ручной процедуре ступенчатой деградации для определения первичной структуры белка. А разработанная Шмидтом методика скоростного дансирования [2] позволяет применять Dns-производные аминокислот для высокочувствительного аминокислотного анализа.

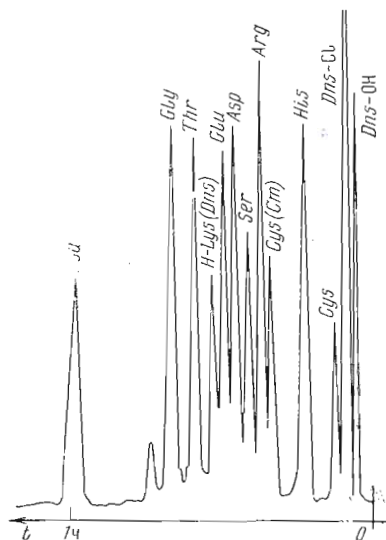
Классическим способом анализа Dns-аминокислот является тонкослойная хроматография (ТСХ) в тонком слое полгамида [3] или силикагеля [4], причем предельная чувствительность регистрации контактным фотографическим способом составляет $1 \cdot 10^{-12}$ моль Dns-аминокислоты.

Главным недостатком ТСХ является невозможность точного количественного определения Dns-производных аминокислот без использования специальной аппаратуры, которая по своей сложности не уступает современному жидкостному хроматографу.

С появлением микрочастичных и микросферических силикатных сорбентов, модифицированных органосиланами, стала возможной разработка методов высокоэффективной колоночной хроматографии (ВЭХХ) производных аминокислот. Однако если для фенилтиогидантонов аминокислот к настоящему времени создан надежный и высокоэффективный метод анализа [5], основанный на ВЭХХ, то в области разделения Dns-аминокислот результаты применения ВЭХХ значительно хуже. Описаны методики разделения Dns-аминокислот на сорбентах Spherisorb 5-ODS [6], Bondapak [6], Lichrosorb RP-8 [2, 7], основанные на гидрофобной (обратнофазной) хроматографии. Однако в этих методиках разделение некоторых пар Dns-аминокислот является неудовлетворительным, а, самое главное, чувствительность анализа значительно ниже, чем при использовании ТСХ.

Здесь следует иметь в виду, что гидрофобную хроматографию приходится осуществлять в водноорганической среде (вода — метанол, вода — ацетонитрил), а, как известно, вода тушит флюоресценцию Dns-производных [3]. Поэтому авторам указанных работ не удалось достичь чувствительности выше $100 \cdot 10^{-12}$ моль при флюориметрическом детектировании. Неудовлетворительное разделение компонентов в работах по гидрофобной

Рис. 1. Хроматограмма разделения смеси полярных Dns-аминокислот ($2 \cdot 10^{-13}$ моль каждой) в изократическом режиме. Колонка 0,5×250 мм с силасорбом 300-С18, 7 мкм; элюент — 25% ацетонитрила + 75% 0,01 н. формиата Na, pH 3,5; скорость элюции 0,5 мл/ч. Здесь и на других рисунках при символе аминокислоты Dns-заместитель по α -NH₂-группе опущен



хроматографии Dns-аминокислот [6, 7] связано с использованием буферных растворов с высоким pH (7–8). Дело в том, что исследуемые Dns-производные являются кислотами, так как содержат карбоксильную группу с pK 3–4, поэтому максимальная емкость, а значит, и максимальная селективность их сорбции на гидрофобном материале должна иметь место при $pH < pK$, когда разделяемые вещества неполярны.

Целью настоящего исследования была разработка высокочувствительного метода гидрофобной хроматографии Dns-аминокислот, обеспечивающего хорошее разделение всех компонентов.

Для достижения высокой чувствительности целесообразно осуществлять хроматографический анализ на капиллярных микроколонках с соответствующим уменьшением свободного объема дозатора, коммуникаций и ячейки детектора, как это было предложено в работах [8–10].

Как уже указывалось, для разделения более полярных Dns-аминокислот, элюирующихся первыми из колонки, выгодно, с целью увеличения факторов их емкости и коэффициентов относительного удерживания, проводить элюирование при pH 3,5 ($pH < pK$). Добавление кислоты в водный раствор Dns-аминокислоты, правда, вызывает дополнительное тушение люминесценции [3]. Однако связанная с этим потеря в чувствительности детектирования (Φ) не так велика:

$$\Phi_{(pH 7)} / \Phi_{(pH 3,5)} = 1,8 \quad (\text{по Dns-Ser}).$$

Из рис. 1 видно, что при pH 3,5 удается значительно улучшить (по сравнению с работами [6, 7]) разделение группы гидрофильных Dns-аминокислот. В то же время, несмотря на гашение люминесценции в водном растворе, флуориметрическое детектирование Dns-аминокислот обеспечивает по крайней мере в 100 раз большую чувствительность, чем фотометрическое.

Применение методики градиентного элюирования (рис. 2) обеспечивает воспроизводимость удерживаемых объемов при среднеквадратичном отклонении (σ) 1,7%, воспроизводимость приведенных высот пиков (отношение высоты пика к сумме высот всех пиков) с σ 2,3%, площадей пиков (при взвешивании) — σ 2,85%.

Использование градиента не только концентрации ацетонитрила, но и pH дало возможность значительно улучшить качество разделения Dns-аминокислот, а применение микроколоночной ВЭЖХ позволило провести анализ на уровне 10^{-13} моль каждой Dns-аминокислоты за 1 ч (рис. 2).

С помощью данной методики были идентифицированы три аминокислоты с N-конца В-цепи инсулина (рис. 3а–в). При этом на хроматограмме появляется дополнительный флуоресцирующий пик побочных продуктов

реакций Эдмана и дансилрования, который выходит между Dns-глицином и Dns-аланином.

В некоторых случаях для идентификации малых количеств аминокислот удобнее десировать пробу неизвестной Dns-аминокислоты вместе с небольшим количеством стандартной смеси, обеспечивающим высоту пиков на хроматограмме порядка 20% шкалы, и проводить идентификацию по увеличению одного из пиков по сравнению с остальными. Пример такого способа идентификации N-концевой аминокислоты А-цепи инсулина (Gly) приведен на рис. 4. При этом на хроматограмме также появляется дополнительный пик между Dns-производными глицина и аланина, но

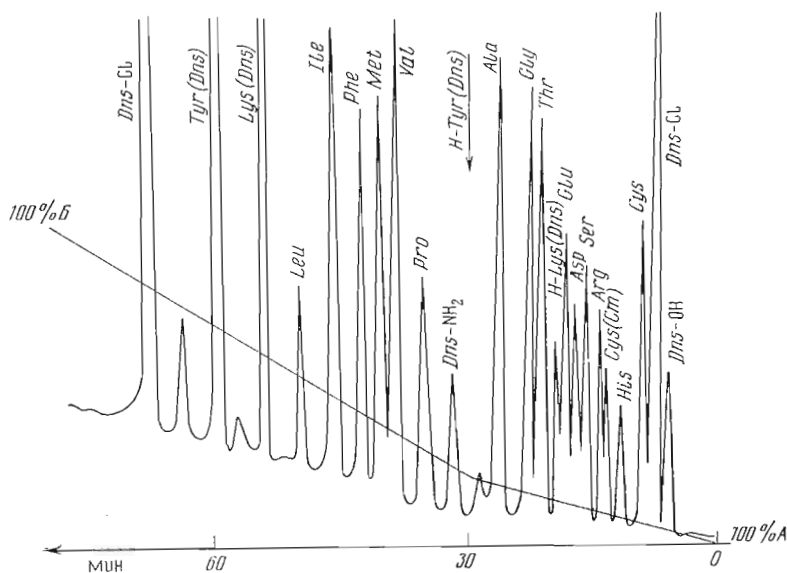


Рис. 2. Хроматограмма разделения смеси Dns-аминокислот ($(2-5) \cdot 10^{-13}$ моль каждой) в режиме градиентной элюции. Колонка $0,5 \times 250$ мм с силасорбом 300-С₁₈, 7 мкм; скорость элюции 1 мл/ч; состав элюентов А и В см. «Экспериментальную часть». Высокочувствительный анализ Tyr (Dns) при данном выборе светофильтров флюориметра невозможен

значительно меньший по размеру по сравнению с соответствующим пиком рис. 3а—в.

Рассмотрим теперь проблему увеличения чувствительности анализа Dns-аминокислот. Поскольку в микроколоночной хроматографии ($d_k 0,5$ мм) используют ячейку детектора с объемом ≤ 1 мкл во избежание губительного для разделения размывания зон в детекторе, то при конструировании флюориметра трудно получить толщину ячейки ≥ 2 мм, что существенно снижает чувствительность люминесцентной регистрации. Используемый нами микроколоночный хроматограф ХЖ-3301 (а это единственный отечественный прибор, укомплектованный флюориметром с кюветой объемом 1,5 мкл) оснащен к тому же маломощной дейтериевой лампой ДНУ-65. Поэтому единственная возможность обеспечить достаточную для микроколоночной хроматографии чувствительность регистрации Dns-аминокислот заключалась в таком выборе выделяющего и запирающего светофильтров, который позволил бы получить максимальную эффективную освещенность кюветы лампой ДНУ-65. Для выделения возбуждающего УФ-излучения был использован светофильтр УФС-1 (1 мм), а для отсеечения света люминесценции — светофильтр ЖС-12 (2 мм). Эта комбинация светофильтров обеспечивает максимальную чувствительность детектирования Dns-аминокислот на флюориметре хроматографа ХЖ-3301. Чувствительность анализа Dns-аминокислот по описанной выше методике составляет $22 \cdot 10^{13}$ % шкалы на моль ($2 \cdot 10^{-13}$ моль Dns-глицина дает пик высотой ≈ 45 % шкалы самописца). Эта чувствительность значительно выше, чем в описанных в работах [2, 6, 7] методиках, и выше, чем в ра-

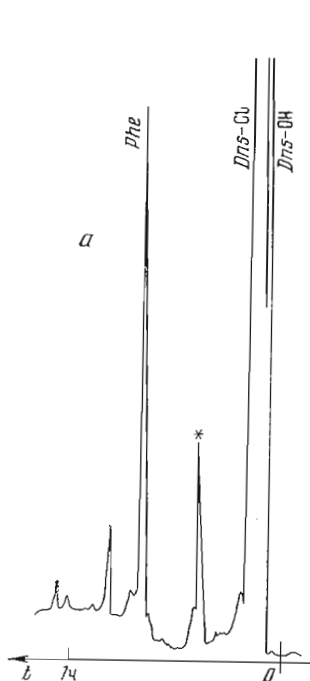


Рис. 3а

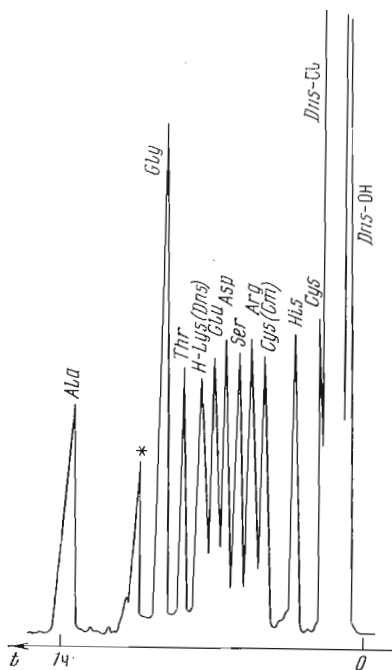


Рис. 4

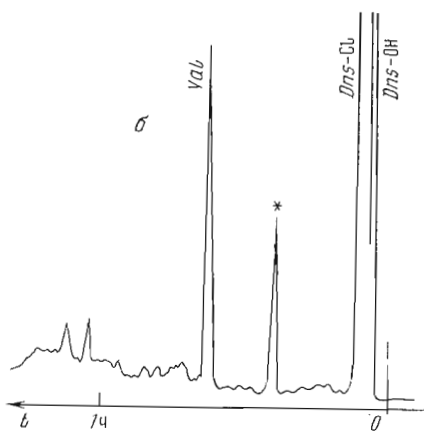


Рис. 3б

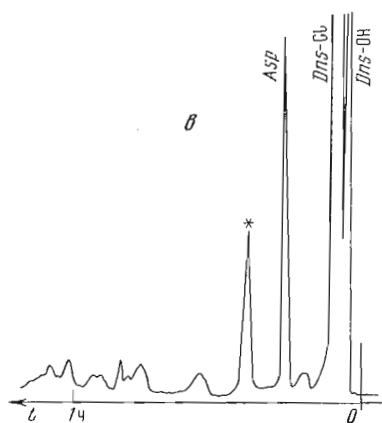


Рис. 3в

Рис. 3. Идентификация первой (а), второй (б) и третьей (в) аминокислот с N-конца В-цепи инсулина в виде Dns-производных в режиме градиентной элюции (см. рис. 2).

Звездочкой отмечен пик побочных продуктов реакций Эдмана и дансирования

Рис. 4. Идентификация N-концевой аминокислоты А-цепи инсулина в виде Dns-производного в изократическом режиме. Неизвестная Dns-аминокислота вводилась вместе с небольшим количеством стандартной смеси

боте [6], где анализ Dns-аминокислот осуществлялся на силикагеле в органических элюентах, т. е. в условиях максимального квантового выхода люминесценции Dns-аминокислот. В последней работе предел чувствительности детектирования (при двукратном превышении сигнала над шумом) составлял 10^{-13} моль.

Следует подчеркнуть, что описываемая здесь методика микроколоночной гидрофобной хроматографии Dns-аминокислот обладает большими резервами повышения чувствительности (до уровня фемтомоль) за счет совершенствования флуориметра. Здесь возможны следующие пути: 1) увеличение мощности источника УФ-излучения, 2) отбор света люминесценции по всей поверхности измерительной ячейки, 3) использование гидродинамической кюветы с возбуждением люминесценции лазером на

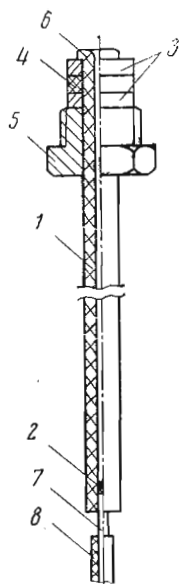


Рис. 5

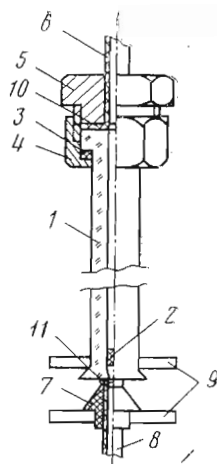


Рис. 6

Рис. 5. Схема конструкции фторопластовой колонки: 1 — микроколонка из фторопластового капилляра с внутренним диаметром 0,5 мм и наружным диаметром 2 мм; 2 — фильтр из пористого титана диаметром 0,6 мм; 3 — стальная шайба с внутренним диаметром 2 мм; 4 — фторопластовая уплотняющая шайба; 5 — болт с отверстием; 6 — развальцовка фторопластового капилляра; 7 — отрезок стального капилляра с внутренним диаметром 0,3 мм и наружным диаметром 0,6 мм, длина 2 см; 8 — полиэтиленовый капилляр для соединения с ячейкой детектора. Микроколонка ввинчивается непосредственно в дозатор и герметизируется с помощью уплотнения (3—5)

Рис. 6. Схема конструкции стеклянной колонки: 1 — микроколонка из стеклянного капилляра с внутренним диаметром 0,5 мм и наружным диаметром 5 мм; 2 — фильтр из пористого фторопласта или полиамида длиной 2 мм; 3 — фторопластовая шайба; 4, 5 — герметизирующее уплотнение из стали на резьбе; 6 — фторопластовый капилляр с внутренним диаметром 0,5 мм и наружным диаметром 1 мм; 7 — фторопластовый конус; 8 — полиэтиленовый капилляр с внутренним диаметром 0,3 мм и наружным диаметром 1 мм (для соединения с ключевой флуориметра); 9 — зажим типа «крокодил»; 10 — развальцованный конец фторопластового капилляра; 11 — развальцованный конец полиэтиленового капилляра

перестраиваемой частоте [11], 4) использование хемилюминесцентной реакции для возбуждения флуоресценции Dns-аминокислот [12].

Применение методики скоростного дансирования (за 2 мин) [2] позволяет использовать разработанную методику не только для анализа аминокислотной последовательности белков с чувствительностью на уровне 10^{-13} моль, но и для аминокислотного анализа гидролизатов белка на уровне $(1-10) \cdot 10^{-13}$ моль. Практическая реализация ультрамикрoанализа аминокислот на таком уровне связана с отработкой процедуры гидролиза нанogramмовых количеств белка и дансирования гидролизата в объеме 10—20 мкл. Этой проблеме будет посвящена следующая публикация.

Экспериментальная часть

Прибор. Для хроматографического анализа использовался микроколонный хроматограф ХЖ-3301, разработанный в СКБ аналитического приборостроения АН СССР (Ленинград). Хроматограф оснащен шприцевыми насосами с объемом камер 2 мл и производительностью подачи элюента 30—4000 мкл/ч, флуориметрическим и спектрофотометрическим детекторами с измерительной ячейкой объемом соответственно 1,5 и 0,5 мкл, дозатором на 5—10 мкл и градиентным устройством, позволяющим за счет программированного изменения частоты включения двух шприцевых насосов создать градиент состава элюирующего раствора заданной формы.

Конструкция и упаковка колонок. Использовали фторопластовую или стеклянную колонку 0,5×250 мм, упакованную сорбентом Silasorb 300—C₁₈,

($d_{\text{пор}}=7$ мкм) производства Lachema (ЧССР). Конструкции колонок изображены на рис. 5 и 6.

Благодаря своей гидрофобности частицы углеводородного сорбента сильно агрегируют в воде, поэтому для упаковки эффективной микроколонки важную роль играет правильный выбор дисперсионной среды.

Приготавливали 40–60% суспензию сорбента в 5% растворе Бридж-35 (полиоксилауриловый спирт) в смеси вода — пропанол (1:1). Суспензию деаэрировали вакуумированием. Затем с помощью шприцевого насоса колонку заполняли дисперсионной средой, а суспензию набирали во фторопластовый или металлический капилляр длиной 100–120 см с внутренним диаметром 1 мм. Капилляр с суспензией присоединяли к колонке, затем включали насос, нагнетающий дисперсионную среду. В начале набивки суспензию впрыскивали в колонку на максимальной скорости работы микронасоса (10 мл/ч). Скорость подачи дисперсионной среды постепенно уменьшали по мере роста столба осевшего сорбента и достижения предельного для данной системы давления 100–120 кг/см². При правильной сборке системы и подходящей концентрации суспензии она должна поступать в колонку непрерывным потоком. После окончания набивки давали упасть давлению в системе, затем отсоединяли колонку. Упакованную колонку отмывали от детергента раствором вода — пропанол (1:1) в течение 30 мин при скорости 2 мл/ч и уравнивали стартовым элюентом. При плохой воспроизводимости элюиционных объемов Dns-аминокислот колонку регенерировали (для вымывания накопившихся неполярных веществ) путем последовательной промывки метанолом, хлороформом, снова метанолом и затем стартовым элюентом.

Реактивы. В качестве элюентов при гидрофобной хроматографии использовали буферные водные растворы, содержащие ацетонитрил. Использовали хроматографически чистый ацетонитрил в ампулах (ТУ-617-5-09-4326-76), имеющий коэффициент пропускания $T_{260 \text{ нм}}^{1 \text{ см}} \geq 95\%$. Кроме ацетонитрила, все использованные для приготовления элюентов реактивы имели квалификацию х.ч. Модельные смеси Dns-аминокислот приготавливали из наборов фирм Serva (ФРГ), Calbiochem (США) или Reanal (ВНР).

Приготовление стандартных смесей и элюентов. Градиент концентрации ацетонитрила и pH буферного раствора получали на основе двух элюирующих растворов: А — 25% ацетонитрила + 75% 0,01 н. формиата Na, pH 3,5; Б — 60% ацетонитрила + 40% 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,0 (5 мМ Na₂HPO₄ + 5 мМ NaH₂PO₄).

Перед использованием элюенты фильтровали через стеклянную мембрану Whatman GF/F и деаэрировали вакуумированием. Для обеспечения узкой начальной зоны при дозировке в микроколонку раствора Dns-аминокислот его приготавливали в 10% растворе ацетонитрила в 0,1 н. HCl.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gray W. R. In: Methods in Enzymology. N. Y.—London: Acad. Press, 1972, v. 25, p. 121.
2. Schmidt G. J., Olson D. C., Slavin W. J. Liquid Chromatogr., 1979, v. 2, № 7, p. 1031–1035.
3. Hartley B. S. Biochem. J., 1970, v. 119, № 4, p. 805–809.
4. Белецкий Б. Г., Нестеров В. В., Ганкина Э. С. Физические и физико-химические методы анализа органических соединений. М.: Наука, 1970, с. 80.
5. Zimmermann C. L., Appella E., Pisano J. J. Anal. Biochem., 1977, v. 77, № 5, p. 569–572.
6. Wilkinson J. M. J. Chromatogr. Sci., 1978, v. 16, № 6, p. 547–550.
7. Bayer E., Grom E., Kaltenegger B. Anal. Chem., 1976, v. 48, № 8, p. 1106–1109.
8. Саидахмедов Л. С., Грачев М. А. В кн.: Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот/Ред. Кнорре Д. Г., Венкстерн Т. В. М.: Наука, 1973, с. 77 и 104.
9. Scott R. P. W. J. Chromatogr. Sci., 1980, v. 18, № 1, p. 49.
10. Ichii D., Asai K., Hibi K., Ionokushi T., Nagaya M. J. Chromatogr., 1977, v. 144, № 1, p. 157–168.
11. Hershberger L. W., Callis J. B., Christian G. D. Anal. Chem., 1979, v. 51, № 9, p. 1444–1446.
12. Kobayashi S., Imai K. Anal. Chem., 1980, v. 52, № 3, p. 424–427.

Поступила в редакцию
3.VIII.1982

ULTRAMICROANALYSIS OF Dns-AMINO ACIDS BY MICROCOLUMN
HYDROPHOBIC CHROMATOGRAPHY WITH THE ANALYTICAL SENSITIVITY
OF 10^{-13} MOLE

MALTSEY V. G., KOROLYOVA E. M., BELENKIĬ B. G.,
VINOGRADOVA R. G., GANITSKY M. B.

*Institute of High Molecular Weight Compounds,
Special Design Bureau of Analytical Instruments,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad*

A method for analysis of Dns-amino acids at the 10^{-13} mole, level taking one hour and based on microcolumn hydrophobic chromatography with fluorimetric detection, has been developed. Uniform separation of all components was achieved by applying gradients of pH and acetonitrile concentration in the eluent. Ultra-high sensitivity of analysis is ensured by capillary microcolumns ($d_c=0,05$ cm) and a fluorimeter with the cell volume of 1,5 microlitre. When a high-speed (high-temperature) dansylation is used, this method can also be employed for amino acid analysis with the same sensitivity.