

ПЕПТИДНАЯ КАРТА ГИПОТАЛАМУСА

ГАЛОЯН А. А., ЧАИЛЯН С. Г.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана АН Армении, Ереван

Гипоталамус представляет собой центр нейросекреторной деятельности организма. В областях *n. supraopticus* и *n. paraventricularis* образуются окситоцин и вазопрессин, а биосинтез нейросекреторных регуляторных гормонов гипоталамуса происходит в области *evinentia mediana* [1].

В последние годы из гипоталамуса различных животных Галояном и соавт. выделены коронароактивные вещества полипептидной природы. В дальнейшем были разработаны методы очистки этих биоактивных соединений, которые можно подразделить на три основные группы: коронарорасширяющие нейрогормоны К, G и C и их множественные формы [2—3], Ca^{2+} -независимые активаторы кальмодулинчувствительных ферментов под общим названием C-модулины [4] и аллостерические модуляторы активности кальмодулина—нейропептиды, условно обозначенные ПФ₁—ПФ₅ [5]. Как видно, гипоталамус служит источником неизвестных пептидных гормонов и биорегуляторов, которые до настоящего времени еще не выделены в чистом виде традиционными методами хроматографии.

В последние годы ВЭЖХ становится все более важным методом очистки и идентификации биологически активных соединений. Очевидно, что ВЭЖХ постепенно вытесняет многие классические методы, особенно на последних стадиях очистки, поскольку она превосходит старые методы по эффективности разделения, выходу продукта, скорости анализа и характеризуется высоким пределом обнаружения. Высокая степень разделения, которая достигается при помощи ВЭЖХ, делает этот метод пригодным для контроля чистоты и составления пептидных карт.

В настоящей работе приведены результаты по составлению пептидной карты вторичного порошка гипоталамуса (ВПП), позволяющего систематизировать большую группу биологически активных соединений гипоталамуса, обнаруженных в нашем отделе за последние 30 лет.

Эксперименты проводили на двухкомпонентной системе ВЭЖХ Biotronik BT-8100 (ФРГ). Система оснащена инжектором Rheodyne с использованием петли для образца объемом 50 мкл и детектором с изменяемой длиной волны. Спектральный диапазон дейтериевой

лампы 190—370 нм. Все растворы постоянно дегазировали для предупреждения образования пузырьков в системе. Для регистрации результатов хроматографии использовали систему хранения и поиска данных, включающую компьютер, АВМ АТ/РС 286. Для ВЭЖХ использовали колонки «Biosphere Si—300 C8, C18» и «Biosphere Si—100 C8 и C18» (4, 6×250 мм; «Bioservis», Армения и «Lichrosphere C18» ГГ).

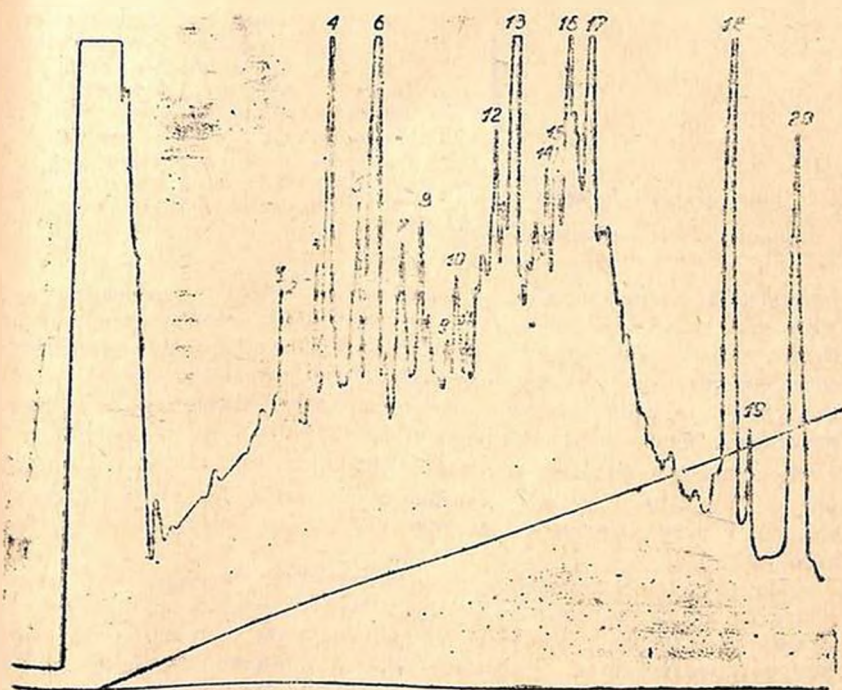


Рис. 1. Пептидная карта вторичного порошка гипоталамуса. Типичная хроматограмма на таандемной системе обращеннофазовых колонок Biosphere «Si—300 C8» и Biosphere «Si—100 C18». Элюцию осуществляли в режиме линейного градиента ацетонитрил /H₂O: 0,1% ТФУ при скорости потока 1 мл/мин за 80 мин. Обнаружение продукта при λ 210 нм.

Поскольку ВПГ содержит биоактивные соединения с большим диапазоном молекулярных масс, их разделение подразумевает применение колонок с дифференциальной пористой структурой. Для выбора оптимальных условий разделения был использован метод греко-латинского квадрата. Эксперименты, проведенные на колонке «Biosphere Si—100 C8 и C18», показали, что хроматография в режиме градиентного элюирования (ацетонитрил-вода, метанол-вода) в присутствии трифторуксусной кислоты (ТФУ) позволяет про-

водить разделение лишь с высокой эффективностью более гидрофобных соединений. Хроматография на колонке «Biosphere Si-300 C8» и «C18» в тех же условиях позволяла проводить эффективное разделение менее гидрофобных высокомолекулярных соединений. Следовательно, совмещение сорбентов с дифференциальной пористостью

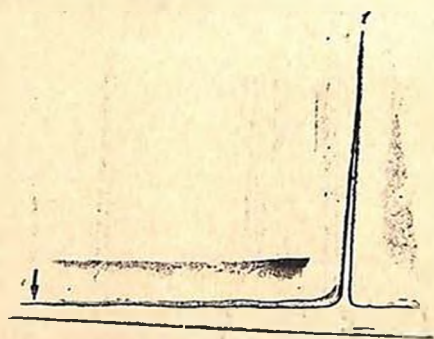


Рис. 2. Типичная рехроматограмма одного из выделенных соединений (пик № 18). Элюирование с колонки «Biosphere C18» (4,6 × 250 мм) осуществляли в изократическом режиме. В качестве подвижной фазы, применялась смесь ацетонитрил (H₂O) 0,1% ТФУ (30—70%). Скорость потока 1 мл/мин, обнаружение при λ210 нм

структур было бы наиболее оптимальным, однако оно технически затруднено, поскольку происходит неоднородное распределение сорбентов с дифференциальной пористостью структур. Анализ полученных экспериментальных данных, основанный на методе греко-латинского квадрата, позволил оптимизировать процесс хроматографического разделения биоактивных соединений гипоталамуса на tandemной системе обращенно-фазовых колонок «Biosphere Si-300 C8» и «Biosphere Si-100 C18» в режиме линейно-ступенчатого градиентного элюирования с использованием ацетонитрил/вода в присутствии 0,1%-ного ТФУ.

На рис. 1 представлена типичная пептидная карта ВПГ. Как видно из хроматограммы, tandemная система колонок позволяет проводить селективное разделение по крайней мере 50-и пиков. Повторная рехроматография, типичный пример которого представлен на рис. 2, свидетельствовала о гомогенности полученных пиков, что позволило установить аминокислотный состав 20-и из представленных на пептидной карте ВПГ.

THE PEPTIDE MAPPING OF HYPOTHALAMUS

GALOYAN A. A., CHAILYAN S. G.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Armenia, Yerevan

An high pressure liquid chromatography on tandem reversed phase „Biosphere Si—300 C8” and „Biosphere Si—100 C18” columns permitted to identify 50 ranges of the bioactive neuropeptides and determine the amino acid composition of some of them.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 4, № 3, с. 109—111. Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1962.
2. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, т. 13, с. 9—38, 1978.
3. Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 11, N 6, p. 769—787, 1985.
4. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э. Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 78—87, 1989.
5. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К. А., Закарян Т. Р. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 519—524, 1988.

Поступила 15. VI 1991