

Высокоэффективная жидкостная хроматография как метод определения аминокислот в виде фенилтиокарбамильных производных

С. Г. Чаилян

Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана НАН РА

375014 Ереван, ул. Паруйра Севака, 5/1

Ключевые слова: фенилизотиоцианат, ФТК-производные аминокислот, метод ВЭЖХ, обращенная фаза, градиент

Предлагаемая методика проведения ВЭЖХ для качественного и количественного определения аминокислот является универсальной как при исследовании химии белков, пептидов, так и проведении соответствующих анализов фармацевтических препаратов.

Общепризнано, что использование ОФ-ВЭЖХ при анализе аминокислот расширяет возможности экспериментатора в исследовании химии белка. В частности, предложена методика для определения D/L конфигураций протеиногенных аминокислот использованием флюорогенного реагента Эдмана, обращенно-фазовой и хирально-стационарной системы ВЭЖХ [4]. Возможно предсказание конфигурации трансмембранных белков, комбинируя ОФ-ВЭЖХ с данными поведения каждой из двадцати аминокислот в неполярной среде н-бутанола [6]. Интересны данные об использовании ОФ-ВЭЖХ в сочетании с капиллярным форе́зом и ELISA [9,12]. Однако разделение аминокислот методом ВЭЖХ сопряжено с двумя основными проблемами. Одна из них обусловлена большим различием в полярности отдельных аминокислот. Другая проблема – следствие низких коэффициентов поглощения аминокислот в УФ-области. Для преодоления этих сложностей приходится прибегать к пред- или постколоночной модификации аминокислот. Неоднократно предпринимались попытки разделения свободных аминокислот как протеиногенных, так и непротеиногенных [1] методами хроматографии на неподвижных фазах с химически привитыми функциональными группами, например обращенных фаз, аминокислот, а также методами ион-парной, лигандононообменной хроматографии.

Условия проведения ВЭЖХ для разделения аминокислот, предлагаемые рядом авторов, крайне разнообразны, но практически ни одна методика не отвечает всем требованиям для проведения качественного и количественного определения аминокислот. Так, при применении ион-парной хроматографии показано раз-

деление всех аминокислот белкового гидролизата, за исключением пар Glu/Gly, Val/Ser, Leu/Ile [8].

Лигандообменная хроматография имеет ряд недостатков, связанных с двукратным элюированием, проводимым в изократическом режиме, с длительностью эксперимента, быстрым выходом из строя колонки, а также с образованием неразделенной пары аминокислот (Val/Gln, Leu/Ile) [2]. При ионообменной хроматографии прибегают к постколоночной модификации аминокислот, в результате чего возникает необходимость в дополнительном оборудовании, а также наблюдается уширение пиков. К недостаткам методики следует также отнести сложность обнаружения пролина [5,10]. Принято считать, что процесс предколоночной модификации аминокислот изотиоцианатом для получения фенилтиокарбамильных производных (ФТК) проводится с целью улучшения хроматографических характеристик аминокислот и протекает в три стадии. Прямой анализ аминокислотной последовательности производится исключительно с реагентами этого типа. Однако, несмотря на применение градиентного элюирования или изократического разделения при анализе ФТК-производных аминокислот, возникают проблемы при разделении групп Ser/Gln, Met/Val / Pro и Phe /Ile/ Lys/ Leu [3,7,11,13].

Целью данной работы явилась разработка новой методики и оптимизации условий для проведения ВЭЖХ при разделении аминокислот с учетом всех параметров (тщательно подбираются температура, pH, форма градиента и состав растворителя), так как они играют важную роль в процессе разделения выпечеченных негативных иоансов.

Материал и методы

Для получения ФТК-производных аминокислот смесь аминокислот (Sigma, США) растворяли в 0,1M

HCl с добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma, США), после чего полученный раствор подвергали лиофилизации. Компонентами буфера, применяемого в процессе получения ФТК-производных, являлись пиридин – 99% (Sigma, США), триэтиламин – 99% (Sigma, США), фенилизотиоцианат – 98% (Fluka, США) – необходимые реагенты на завершающем этапе получения ФТК-производных аминокислот. Тестирование полученных ФТК-производных аминокислот проводили на жидкостном хроматографе LDC Analytical с использованием насосов Biotronic BT8100, Spectromonitor 5000. Наиболее целесообразным явилось применение колонки Биосфер C_{18} (250 x 4,6 мм). Ацетонитрил – 99,9% (Sigma, США), метанол (Sigma, США) употреблялись в качестве элюента. Детекцию проводили при длине волны 254 нм. Хроматограммы обрабатывались с применением программного обеспечения SM5000.

Получение ФТК-производных аминокислот

Исследуемый раствор. К 10 мл препарата прибавляли 0,1 М хлористоводородной кислоты до объема 100 мл. 1 мл полученного раствора высушивали досуха на роторном испарителе при 45° С. Осадок растворяли в 200 мкл буфера ацетонитрил : пиридин : триэтиламин : вода (10 : 5 : 2 : 3) и снова высушивали досуха на роторном испарителе при той же температуре. Добавляли 200 мкл того же буфера и 10 мкл фенилизотиоцианата. Выдерживали в течение 5 мин при комнатной температуре и высушивали досуха под глубоким вакуумом. Сухой остаток растворяли в 10 мл 0,05 М раствора ацетата аммония, переносили в мерную колбу емкостью 50 мл, и объем раствора доводили до метки 0,05 М раствором ацетата аммония.

Стандартный раствор. В мерную колбу емкостью 100 мл вносили 70 мл раствора 0,1 М хлористоводородной кислоты, подогретой до 60° С и содержащей 0,01 мг/мл аммония сернокислого; вносили по 0,0500 г (точная навеска) каждой аминокислоты, растворяли, охлаждали и доводили объем раствора до метки 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты.

Получение ФТК-производных аминокислот стандартного раствора проводили аналогично методике для исследуемого раствора.

Хроматографическая система: жидкостной хроматограф LDC Analytical, насос Biotronic BT8100, сканирующий детектор (190 – 360 нм), Spectromonitor 5000. Детекцию проводили при длине волны 254 нм. Хроматограммы обрабатывали с применением программного обеспечения SM 5000. Разделение производных аминокислот проводили на колонке Биосфер C_{18} (250 x 4,6 мм). Термостатировали колонку при температуре 55 ± 1° С; скорость потока 1 мл/мин; вре-

мя исследования 60 мин. Элюцию проводили в градиентном режиме; элюент – смесь растворов А и В, где А – 0,05 М раствора ацетата аммония (рН 6,6), В – 0,1 М ацетат аммония в смеси ацетонитрил /метанол /вода (44:10:46); рН 7,25.

	Время, мин	
	А	В
0	100	0
20	95	5
60	40	60

Идентификация отдельных аминокислот. Готовили раствор каждой аминокислоты в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты с концентрацией 0,5 мг/мл. 1 мл раствора высушивали досуха на роторном испарителе при 45° С. Осадок растворяли в 100 мкл буфера ацетонитрил /пиридин /триэтиламин/вода (10 : 5 : 2 : 3) и высушивали в тех же условиях. Добавляли 100 мкл буфера и 5 мкл фенилизотиоцианата. Выдерживали в течение 5 мин при комнатной температуре и высушивали досуха под глубоким вакуумом. Сухой осадок растворяли в 50 мл 0,05 М раствора ацетата аммония и вводили пробу в хроматограф объемом 50 мкл стандартного и исследуемого растворов. Регистрировали хроматограммы и определяли время удерживания каждой аминокислоты.

Содержание каждой аминокислоты (мг/мл) вычисляли по формуле:

$$\frac{C \times r_u \times 50 \times 100}{r_s \times 1 \times 10 \times 1000} = r_u / r_s \times 5 \quad (1)$$

где С – содержание аминокислот в стандартном растворе, С = 10 мкг/мл; r_u и r_s – величины пиков исследуемого и стандартного растворов, мм²; 50 – количество 0,05 М раствора ацетата аммония, мл; 10 – количество исследуемого раствора, мл; 100 – количество разведенного раствора, мл; 1 – количество разведенного раствора, взятого для превращения аминокислот в ФТК-производные, мл; 1000 – коэффициент перевода мкг в мг.

Определение посторонних примесей, образующихся в процессе получения ФТК- производных аминокислот, проводили по формуле

$$100 \frac{r_p}{r_s}$$

где r_p – отклик пиков примесей; r_s – сумма откликов всех пиков. Сумма примесей должна быть не более 7 %. Содержание аминокислот (мг) в 1 мл препарата должно быть:

L-аланин	5,12 – 7,68	L-валин	3,92 – 5,88
L-лейцин	7,84 – 11,7	L-метионин	4,56 – 6,84
Глицин	6,40 – 9,60	L-пролин	5,12 – 7,68
L-изолейцин	3,52 – 5,28	L-треонин	3,44 – 5,16
L-лизин гидрохлорид	9,20 – 13,80	L-фенилаланин	5,60 – 8,60
L-гистидин гидрохлорид	2,56 – 3,84	L-триптофан	1,00 – 1,88
L-аргинин гидрохлорид	5,12 – 7,68		

Результаты и обсуждение

Наличие загрязнений в реагентах, используемых в анализе, являлось отдельным фактором, влияющим на чувствительность метода. Поэтому целесообразно предварительное получение картин базовой линии

подвижной фазы, а также наличие побочных продуктов, возникающих в ходе модифицирования (рис.1). Для получения целостной картины разделения смеси аминокислот стандарта и полиамина (рис. 2,3) предпочтительно предварительное получение индивидуальных хроматограмм для каждой отдельной аминокислоты.

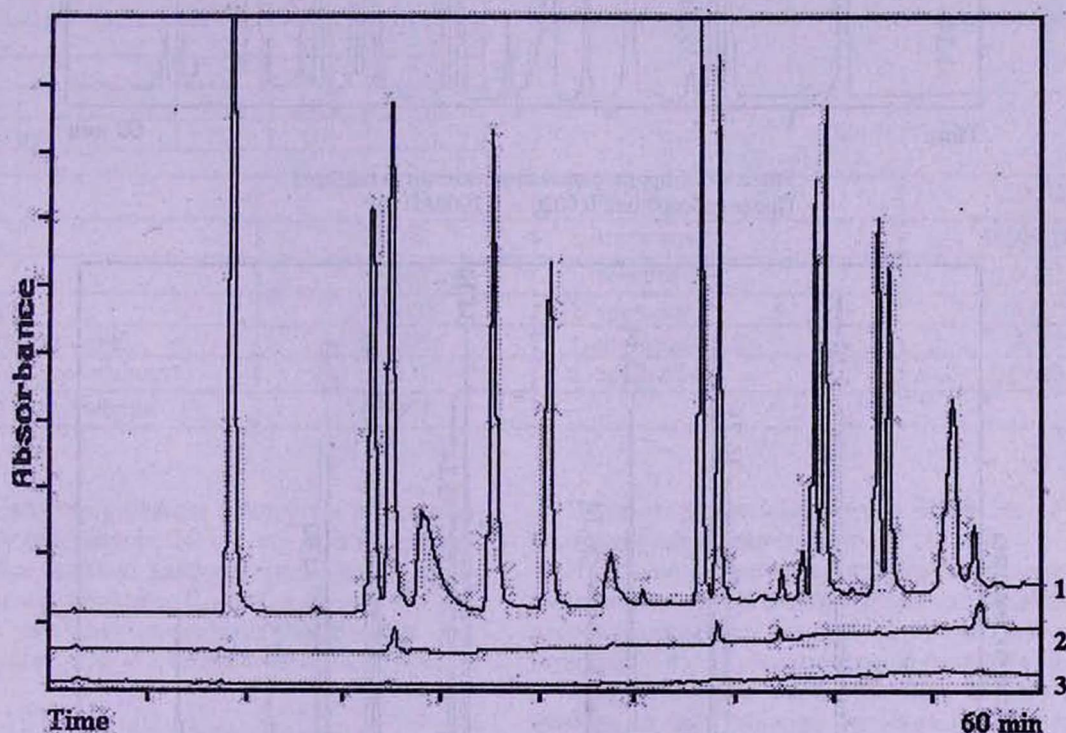


Рис.1. 1 – ФТК-производные аминокислот, 2 – побочные продукты модифицирования, 3 – смещение базальной линии.

Хроматографические параметры эксперимента здесь и на рис.2, 3:

колонка Биосфер C_{18} (250 x 4,6мм); элюенты: А – 0,05М CH_3COONH_4 , В – 0,1М CH_3COONH_4 в $CH_3CN/CH_3OH/H_2O$ (44/10/46); градиент 0–5% буфера В за 20 мин, 5–60 % буфера В за 40 мин; температура $55 \pm 1^\circ C$; скорость потока 1мл/мин; объем пробы 50 мкл; продолжительность эксперимента 60 мин. Детекцию проводили при длине волны 254 нм.

Предел абсорбции: 1 – 0,0030 – 0,2000AU; 2 – 0,0080 – 0,2000AU; 3 – 0,0020 – 0,1000AU

Представляемая методика была проверена на точность, линейность и лимиты детектирования. Экспе-

рименты дублировались в 3 повторениях.

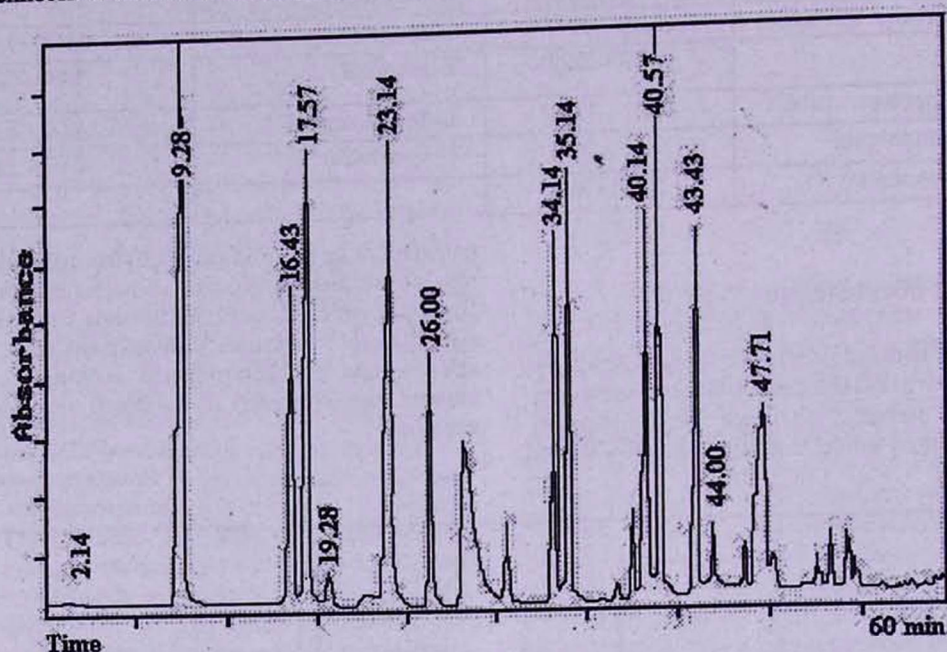


Рис.2. ФТК-производные аминокислот (стандарт).
Предел абсорбции: 0,0020 – 0,2000AU

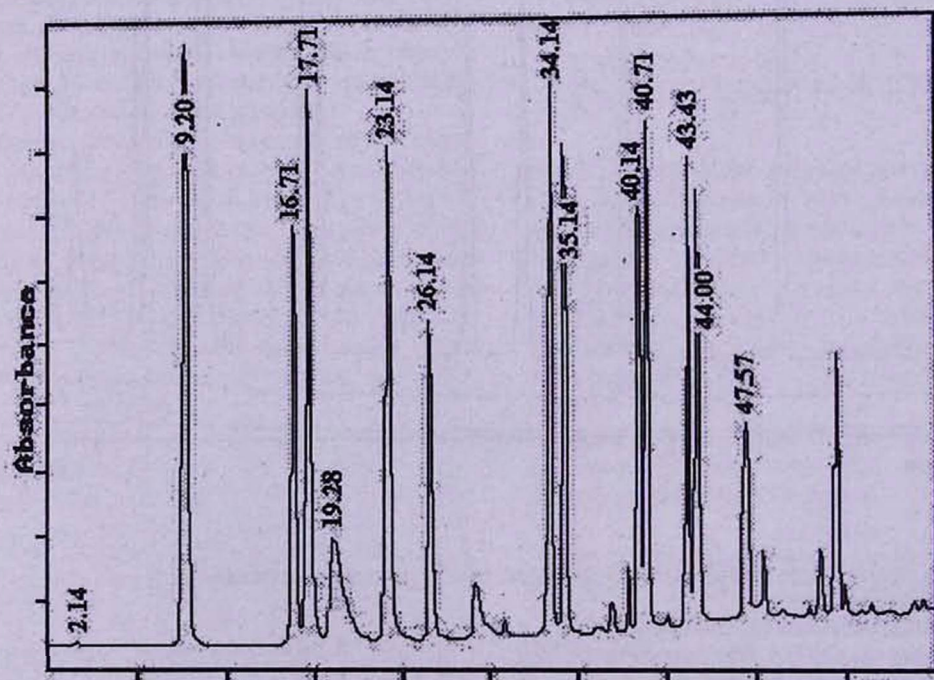


Рис.3. ФТК-производные аминокислот (проба).
Предел абсорбции: 0,0020 – 0,2000AU

Точность, повторяемость. Для определения повторяемости был использован образец препарата Лик-вамин, сер.02.11.99. Анализы были выполнены по описанной выше методике. Точность определения для аминокислот составляла 0.1%.

Линейность проверяли для 3 уровней концентрации (мг/мл). Растворы с отдельными уровнями концентрации готовили путем растворения соответствующей навески в 0,1 М хлористоводородной кислоте.

Наименования	I	II	III
L-аланин	5,0	6,5	8,5
L-аргинин гидрохлорид	5,0	6,5	8,2
L-валин	3,9	4,6	5,6
L-гистидин гидрохлорид	2,6	3,1	3,8
Глицин	6,4	8,1	9,8
L-изолейцин	3,3	4,5	6,1
L-лейцин	7,5	9,4	12,1
L-лизин гидрохлорид	8,9	11,3	13,9
L-метионин	4,2	6,1	9,1
L-пролин	5,1	6,4	7,8
L-треонин	3,2	4,8	5,5
L-триптофан	0,95	1,52	2,05
L-фенилаланин	5,3	6,8	9,1

L-аланин	0,0002	L-валин	0,00025
L-лейцин	0,0002	L-метионин	0,00025
Глицин	0,0001	L-пролин	0,0002
L-изолейцин	0,00025	L-треонин	0,00025
L-лизин гидрохлорид	0,0005	L-фенилаланин	0,0003
L-гистидин гидрохлорид	0,0001	L-триптофан	0,0003
L-аргинин гидрохлорид	0,0003		

Установлено, что растворы стандартов и образцов стабильны на протяжении 24 ч и что при исследовании различных колонок наиболее подходящей представляется колонка Биосфер C₁₈ (250 x 4,6 мм).

Проверка годности методики определялась для каждой аминокислоты в отдельности по следующим формулам:

$$K = \frac{(t_{gly} - t_0)}{t_0} \quad (3)$$

где K – коэффициент емкости колонки; t_{gly} – время удерживания аминокислоты, мин;

t_0 – мертвое время, мин.

$$R = \frac{2(t_{gly} - t_0)}{W_{gly} + W_{t_0}} \quad (4)$$

где R – степень разделения пиков; t_{gly} , t_0 – время удерживания, мин; W_{gly} , W_{t_0} – ширина пиков на 50 % высоты пиков, мин; R – коэффициент симметричности.

Лимит детектирования (LOD) для аминокислот. Для расчета LOD были использованы хроматограммы стандартов аминокислот, а также хроматограмма шума базовой линии (собственно подвижная фаза) с высокой степенью разрешения. Лимит детектирования был вычислен по уравнению, примененному Дж. Э. Кноллем (Journal of Chromatography, 1985, 23, 422–425):

$$C_{LOD} = \frac{K_{LOD} h_N C_S}{h_S} \quad (2)$$

где C_{LOD} – концентрация вещества, соответствующая лимиту детектирования, г/л;

K_{LOD} – константа, определенная для интервала измерений; h_N – наибольшее отклонение шума базовой линии, мм; h_S – высота пика вещества, мм; C_S – концентрация вещества, г/л; лимит детектирования, г/л.

Число теоретических тарелок 68326. Минимальное число теоретических тарелок 50000 т.т./м.

Исполнение. При стабилизированных хроматографических условиях выполняют анализ раствора стандартов – дважды из двух навесок. Если значение RSD (относительное стандартное отклонение) не превысит 1 %, то выполняют анализ раствора препарата, тоже дважды из двух навесок. Значение RSD результатов не должно превышать 1 %. Содержание аминокислот вычисляют по формуле (1).

Мы провели модифицирование аминокислот фенилизотионам. Процесс получения ФТК-производных аминокислот протекает в трех стадиях. Однако мы остановились на первой стадии, т.е. получили фенилтиокарбамилпроизводные аминокислот, и с последующим выбором условий ОФ-ВЭЖХ достигли оптимального разделения, доведя время эксперимента до минимума. Известно, что при анализе ФТК-производных используются три типа обращенных

фаз-октильная, октадецильная, цианопропильная. По нашему мнению, наиболее подходящей является Биосфер C_{18} (учитывалось качество разделения и воспроизводимость хроматограмм). В ходе работы были подобраны оптимальные температура ($55 \pm 1^\circ\text{C}$) и pH 6.6, так как в случае незначительных изменений значений

этих параметров, происходило сливание пиков. С особой тщательностью подбирались состав элюента. Эффективность предлагаемой методики подтвердилась получением картины полного разделения аминокислот стандарта и полиамина, а также 100% воспроизводимостью хроматограмм.

Поступила 15.03.04

Բարձր արդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրաֆիան որպես ամինաթթուների ԹԹ-Կ-ածանցյալների որոշման մեթոդ

Ս.Գ.Շաիլյան

ԲԱՀԶ-ի մեթոդով ամինաթթուների քանակական և որակական որոշումը ունիվերսալ է պրոթեինների և պեպտիդների որոշման և նրանց կիրառման դեղագործական պատրաստուկների համար: Ամինաթթուների մոդիֆիկացիան տարվել է ֆենիլիզոթիոցիանատով: ԹԹ-Կ-ածանցյալների ԲԱՀԶ-ի մեթոդով բաժանումը կատարվել է մի քանի չափանիշների համա-

ձայնեցվածությամբ (t^0 , pH): Ամենակիրառելի պինդ ֆազա հանդիսացավ Biosfer C_{18} (250×4.6 մմ): Այս մեթոդը ստուգվել է պոլիամինի օրինակի վրա: Մեզ հաջողվել է ամբողջովին բաժանել ամինաթթուները, արդյունքների վերարտադրողականությունը լիովին ապահովվել է:

High performance liquid chromatography as a method for determination of phenylthiocarbamil derivatives of amino acids

S.G.Chailyan

The suggested HPLC for quantitative and qualitative determination of amino acids is universal for protein and peptide researches and for realization of appropriate analyzes of pharmaceutical preparations. Modification of amino acids was carried out by phenyl isothiocyanate. During separation of PTA-derivatives of amino acids by RP HPLC there was picked up carefully the scheme of

gradient elution with account of some parameters (t^0 , pH). The most appropriate solid phase for these experiments was Biosfer C_{18} (250×4.6 mm). The method was tested on polyamin sample. Consequently, we achieved full separation into detached peaks of investigated amino acids with complete reproducibility of the results.

Լիտերատուրա

1. Chen X., Wang F., Chen Q., Qin X.C., Li Z. Agric. Food Chem., 2000, 48(8), p. 3383.
2. Foucault A., Gaude M., Oliveros L. J. Chromatogr., 1979, 185, p. 345.
3. Gates F. T., Coligan J. E., Kindt T. J. J. Biochemistry, 1979, 18, p. 2267.
4. Huang Y., Matsunaga H., Toriba A. et al. Anal. Biochem., 1999, Jun 1. 270(2), p. 257.
5. Ishida Y., Fujita T., Asai K. J. Chromatogr., 1981, 204, p. 143.
6. Liu L.P., Deber C.M. J. Bioorg. Med. Chem., 1999, 7(1), p. 7.
7. Moser P.W., Rickli E.E. J. Chromatogr., 1979, 176, p. 451.
8. Radjai M.K., Hatch R.T. J. Chromatogr., 1980, 196, p. 319.
9. Rosso I., Giraudi G., Gamberini R. et al. J. Agric. Food Chem., 2000, 48(1), p. 33.
10. Roth M. Anal. Chem., 1971, 43, p. 880.
11. Van Beeumen J., van Damme J., Tempst P., de Loy J. In: C. Birred: Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis. Elsevier, Amsterdam, 1980, p. 503.
12. Wu S.L. Anal. Biochem., 1997, Nov 1. 253(1), p. 85.
13. Zimmerman C.L., Appella E., Pisano J. J. Anal. Biochem., 1977, 77, p. 48.