

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Факультет естественных наук
Кафедра аналитической химии

Курсовая работа

**Предсказание объёмов удерживания
и УФ спектров пептидов
в обращенно–фазовой ВЭЖХ**

Выполнила:
Кучкина А.Ю., гр. 147

Научный руководитель:
к.х.н. Азарова И.Н.

Новосибирск-2005

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение.....	3
2. Литературный обзор	
2.1. Пептиды. Аминокислоты.....	4
2.2. ВЭЖХ пептидов.....	6
2.3. Предсказание объёмов удерживания и УФ спектров пептидов в ОФ ВЭЖХ.....	7
3. Экспериментальная часть.....	10
4. Результаты и их обсуждение	
4.1. Контроль стабильности работы хроматографической системы.....	11
4.2. Вычисление объёмов удерживания пептидов.....	12
4.2.1. Линейная модель «состав – удерживание».....	13
4.2.2. Нелинейная модель «состав – удерживание».....	14
4.3. Вычисление УФ спектров пептидов.....	17
5. Выводы.....	21
6. Литература.....	21
7. Приложение.....	23

1. ВВЕДЕНИЕ

Идентификация функционирующих в живых клетках белков на основе известной информации о структуре генома – *протеомика* - считается одной из важнейших задач современной молекулярной биологии. Эта проблема появилась после полной расшифровки геномов некоторых организмов в последние несколько лет. Оказалось, что геномы кодируют намного больше белков, чем организм их продуцирует.

Идентификация интересующего белка в сумме всех белков является сложнейшей методической задачей, не решаемой, как правило, прямым методом. Один из подходов к решению такого рода задач, названный *пептидомикой*, заключается в том, что сумму белков гидролизуют специфической протеазой, и сумму образовавшихся пептидов разделяют методами капиллярного электрофореза или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Конечной задачей является обнаружение пептида (пептидов) известного строения, являющегося (являющихся) *априори* фрагментом белка, кодируемого геномом исследуемого организма. Если такой пептид (пептиды) определяется в образце, то делается вывод о том, что данный белок организмом продуцируется.

Методические проблемы, возникающие при решении такого рода задач, можно разделить на 2 группы. Первая – проблема разделения смеси, состоящей, как правило, из нескольких тысяч пептидов. Вторая – определение структуры выделенных индивидуальных пептидов. Проблема разделения решается фракционированием первичной смеси с последующим разделением выделенных фракций на индивидуальные компоненты. Вторая проблема решается, главным образом, масс-спектрометрическими методами, которые в конечном итоге позволяют определить молекулярные массы индивидуальных компонентов (пептидов). Если пептид имеет достаточно «уникальную» структуру (набор аминокислот) – к таким относятся, как правило, длинные (свыше 10-20 аминокислотных остатков) пептиды -, то его молекулярная масса так же будет «уникальна», и вероятность ошибочной идентификации становится пренебрежимо малой.

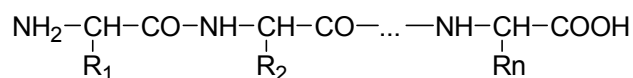
Так как процедура разделения пептидов нацелена на выделение пептида с известным набором аминокислот, то возникает вопрос: нельзя ли предсказать время выхода такого пептида из ВЭЖХ колонки, зная его аминокислотный состав? Впервые такой подход был продемонстрирован в начале 80-х годов.

Целью настоящего исследования являлась разработка методики предсказания объемов удерживания пептидов на хроматографе «Миличром А-02» в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) с использованием подвижной фазы, пригодной для прямого ввода в масс-спектрометр.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

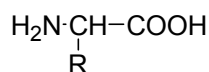
2.1. Пептиды. Аминокислоты

Пептиды – это биополимеры, построенные из остатков α -аминокислот, соединённых между собой пептидными связями (-NH-CO-). Общую формулу пептида можно представить в следующем виде:



Между белками и пептидами нет чёткой границы, как правило, к пептидам относят биополимеры, содержащие не более 100 аминокислотных остатков.

Аминокислоты - это любые органические кислоты, в состав молекул которых входит аминогруппа, часто под этим названием подразумевают именно α -аминокислоты, т.к. они имеют важное биологическое значение. Молекулы большинства природных аминокислот, входящих в состав белков, имеют общую формулу



Как видно из структурной формулы, аминокислоты (за исключением пролина) отличаются друг от друга только структурой боковой цепи R. Аминокислоты являются амфотерными соединениями, поскольку в состав их молекулы входит как кислотная – карбоксильная группа, так и основная – аминогруппа. В сильнокислой среде карбоксильная группа преимущественно недиссоциирована, а аминогруппа протонирована. В сильнощелочной среде аминогруппа находится в виде свободного основания, а карбоксильная группа – в виде карбоксилат-аниона. В кристаллическом же состоянии аминокислоты существуют в виде цвиттер-иона, где протон с карбоксильной группы перенесён на аминогруппу [1].

В биосинтезе природных пептидов и белков участвуют всего 20 аминокислот. Аминокислоты и их свойства приведены в таблице 1.

Таблица 1. Аминокислоты и их свойства.

Название аминокислоты	Код	Структура	pK_a [2]		
			-COOH	-NH ₂	-R
Глицин	G	$\text{H}-\underset{\text{COOH}}{\text{CH}}-\text{NH}_2$	2,35	9,78	
Аланин	A	$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{COOH}}{\text{CH}}-\text{NH}_2$	2,35	9,87	
Валин	V	$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\underset{\text{COOH}}{\text{CH}}-\text{NH}_2$	2,29	9,74	

Название аминокислоты	Код	Структура	pK_a [2]		
			-COOH	-NH ₂	-R
Лейцин	L	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_3 \qquad \text{COOH} \end{array}$	2,33	9,74	
Изолейцин	I	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\overset{*}{\text{C}}\text{H}-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_3 \qquad \text{COOH} \end{array}$	2,32	9,76	
Пролин	P	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad / \quad \backslash \\ \text{HC} \quad \text{NH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	1,95	10,64	
Фенилаланин	F	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH}$	2,20	9,31	
Триптофан	W	$\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH}$	2,46	9,41	
Тирозин	Y	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH}$	2,20	9,21	10,46
Серин	S	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH}$	2,19	9,21	
Треонин	T	$\begin{array}{c} \text{HO}-\overset{*}{\text{C}}\text{H}-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_3 \qquad \text{COOH} \end{array}$	2,09	9,10	
Цистеин	C	$\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH}$	1,92	10,70	8,37
Аспарагиновая кислота	D	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH}$	1,99	9,90	3,36
Глутаминовая кислота	E	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH}$	2,10	10,47	4,07
Аспарагин	N	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \qquad \qquad \\ \text{O} \qquad \text{COOH} \end{array}$	2,14	8,72	
Глутамин	Q	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \qquad \qquad \\ \text{O} \qquad \text{COOH} \end{array}$	2,17	9,13	
Лизин	K	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH}$	2,16	9,06	10,54
Аргинин	R	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \qquad \qquad \\ \text{NH} \qquad \text{COOH} \end{array}$	1,82	8,99	12,48
Гистидин	H	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH}$	1,80	9,33	6,04
Метионин	M	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH}$	2,13	9,28	

В зависимости от характера боковых цепей, аминокислоты подразделяются на две группы: аминокислоты с неполярными (гидрофобными) алифатическими или ароматическими R- группами; аминокислоты с полярными (гидрофильными) R- группами. К первой группе относят 8 аминокислот: аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, пролин, фенилаланин, триптофан. Семь аминокислот содержат в боковой цепи группировки, способные нести отрицательный или положительный заряд: аспарагиновая и глутаминовая кислоты при рН 7,0 заряжены отрицательно; лизин, аргинин, гистидин – основные аминокислоты, боковые цепи которых могут быть заряжены положительно; в щелочных условиях отрицательно заряженными могут быть боковые группы тирозина и цистеина [3].

2.2. ВЭЖХ пептидов

Разделение смесей пептидов является очень сложной задачей. В настоящее время ОФ ВЭЖХ является важнейшим методом разделения пептидов. Пептиды являются полярными веществами, что препятствует их взаимодействию с гидрофобной поверхностью неподвижной фазы и приводит к взаимодействию с остаточными силанольными группами. Для того, чтобы уменьшить взаимодействие с силанольными группами, в элюент добавляют сильные кислоты или соли. Для уменьшения полярности пептидов хроматографирование следует проводить при низких значениях рН (ниже 3). Если следовать этим принципам, то ВЭЖХ окажется очень гибким методом разделения пептидов. Это обусловлено тем, что данный метод характеризуется высокой скоростью разделения, воспроизводимостью результатов и возможностью проведения анализа микрограммовых количеств веществ. Ещё одним преимуществом ОФ ВЭЖХ является возможность сбора фракций в малом объёме летучих растворителей, что упрощает дальнейшее проведение масс – спектрометрического анализа. Как правило, в качестве летучих растворителей используют 0,1 % - трифторуксусную и муравьиную кислоты. Трифторуксусная кислота прозрачна в УФ области до 205 нм, что является большим преимуществом при хроматографировании сложных смесей. Кроме того, пептиды хорошо растворяются в трифторуксусной кислоте.

Элюирование пептидов с обращённых фаз, как правило, проводится в градиентном режиме с добавлением органического модификатора. Наиболее распространённый органический модификатор – ацетонитрил. Он прозрачен в УФ области до 200 нм и характеризуется хорошей селективностью [4].

Ещё одним фактором, обуславливающим широкое применение ОФ ВЭЖХ для анализа пептидов, является возможность предсказания их хроматографического поведения [5–9].

2.3. Предсказание объёмов удерживания и УФ спектров пептидов в ОФ ВЭЖХ

Идею о том, что хроматографическое поведение пептидов, содержащих менее 25 аминокислотных остатков, можно предсказать, зная их аминокислотный состав, впервые высказал J. Meek [5]. Удерживание пептидов на обращённой фазе определяется гидрофобностью аминокислотных остатков, входящих в их состав. Аминокислоты с ароматической или большой алифатической цепью вносят основной вклад в удерживание. Исходя из вышесказанного, Meek предложил рассчитывать объёмы удерживания пептидов на обращённой фазе как сумму вкладов остатков аминокислот, входящих в состав пептида. Им была предложена линейная (аддитивная) модель «состав-удерживание»:

$$V_R = V_0 + Z_{N^*} + Z_{C^*} + \sum Z_i \quad (1)$$

где V_R – объём удерживания пептида; V_0 – свободный объём колонки; Z_{N^*} и Z_{C^*} соответственно вклады свободных $-NH_2$ и $-COOH$ или модифицированных концевых групп пептида; Z_i – вклад i -той аминокислоты (константа удерживания).

Meek проводил хроматографирование 25 пептидов в условиях градиентной ОФ ВЭЖХ и, решая обратную задачу, вычислял константы удерживания аминокислот. Коэффициенты корреляции зависимости $V_R(\text{выч.}) = f(V_R(\text{эксп.}))$ составили 0,997 (при pH 2,1) и 0,999 (при pH 7,4). Несмотря на высокие коэффициенты корреляции, данная модель противоречит физическому смыслу, поскольку полученные таким образом константы удерживания аминокислот не отражают реальных различий в их гидрофобности и некоторые из вкладов имеют отрицательные значения. Кроме того, существует множество фактов, согласно которым с ростом числа аминокислотных остатков в пептиде поверхность его гидрофобного контакта с обращённой фазой, определяющая удерживание, увеличивается нелинейно.

Авторами работы [6] также было принято допущение, согласно которому объёмы удерживания пептидов рассчитываются из суммы вкладов аминокислотных остатков. Для расчёта объёмов удерживания пептидов ими была предложена следующая модель:

$$V_R = A * \ln (1 + \sum Z_j^* \cdot n_j) + B \quad (2)$$

где Z_j - эмпирический параметр удерживания, который рассчитывают исходя из гидрофобности аминокислот; A и B константы; n_j - число аминокислотных остатков j в пептиде.

Эта модель даёт хорошую корреляцию между расчётными и экспериментальными объемами удерживания пептидов. Недостаток модели заключается в том, что она справедлива лишь для конкретной хроматографической системы (линейный градиент с заданной крутизной, фиксированная скорость потока, подвижная и неподвижная фазы). Таким образом, применение этой модели весьма ограничено. Поэтому авторами рассматриваемой работы была предложена другая модель, основанная на теории градиентной элюции, которая позволяет рассчитывать объёмы удерживания пептидов для более широкого круга хроматографических систем. Учитывая, что доступная площадь гидрофобного контакта пептида с неподвижной фазой изменяется пропорционально его молекулярной массе в степени $2/3$, авторы подобрали функцию для расчета объемов удерживания пептидов:

$$V_R = f[a \cdot \sum(Z_j \cdot n_j)^{2/3} + (b/\sum Z_j \cdot n_j) + c] \quad (3)$$

где a , b , c константы, зависящие от свойств конкретной хроматографической системы, определялись экспериментально из данных по хроматографированию 15 выбранных для этой цели пептидов.

Коэффициент корреляции зависимости $V_R(\text{выч.}) = f(V_R(\text{эксп.}))$ составил 0,98.

Существенным недостатком, который ограничивает применение этого метода, является необходимость вычисления констант a , b и c для конкретной хроматографической системы из предварительных экспериментов с модельными пептидами, что является весьма трудоёмкой процедурой.

В работе [10] вычисляли объёмы удерживания и УФ спектры пептидов с известной аминокислотной последовательностью, предварительно определив вклады аминокислот в вышеуказанные параметры. Величины этих вкладов находили экспериментально из хроматограмм растворов индивидуальных аминокислот, полученных при многоволновом фотометрическом детектировании в тех же условиях, в которых хроматографировались пептиды. Авторы работы предложили следующее уравнение для вычисления объемов удерживания пептидов:

$$V_R = 209 \cdot [(\sum Z_i) + Z_{C^*+N^*} + V_0]^{1/3} - 990 \quad (4)$$

где Z_i - коэффициент удерживания аминокислоты « i »; V_0 - свободный объём колонки; $Z_{C^*+N^*}$ - суммарная константа удерживания концевых групп пептида.

При вычислении УФ спектров пептидов рассматривали спектр пептида как сумму спектров всех его структурных элементов. Для проверки предложенного метода были

хроматографированы 30 пептидов, и коэффициент корреляции между вычисленными и экспериментально найденными объемами удерживания составил 0,95. Предложенный способ вычисления УФ спектров пептидов также обладает удовлетворительной предсказательной силой. В рассматриваемой работе в качестве элюентов использовали ацетонитрил и водный раствор перхлората лития (0,2М LiClO₄ – 0.005М HClO₄), являющийся нелетучим веществом, что делает последующую масс-спектрометрическую идентификацию пептидов весьма затруднительной. Поэтому нам показалось целесообразным разработать метод, используя подвижную фазу состава ацетонитрил - трифторуксусная кислота, все компоненты которой являются летучими веществами и не мешают проведению масс- спектрометрического анализа.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ВЭЖХ проводили на хроматографе «Милихром А-02» на колонке 2x75 мм с фазой ProntoSIL-120-5-C₁₈ AQ («Bischoff Analysentechnik und Geräte GmbH», Германия) в следующих условиях:

элюент А: 0,01М трифторуксусная кислота;

элюент Б: ацетонитрил;

линейный градиент: 40 мин от 5 до 100% Б;

скорость потока: 100 мкл/мин;

температура колонки: 40°С;

детекция: при 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм, $\tau = 0,18$ с;

объем пробы: 4 мкл.

Раствор для тестирования хроматографической системы: КВг - 0,2 мг/мл; уридин - 0,2 мг/мл; кофеин-1 мг/мл; *m*-нитроанилин - 0,1 мг/мл; *o*-нитроанилин-0,1 мг/мл; растворитель – 2% ацетонитрила в воде. Все реактивы с массовой долей основного вещества не менее 98%.

В работе использовали аминокислоты («Serva», Германия), ацетонитрил «Сорт 0» (НПФ «Криохром», г. Санкт-Петербург), безводную трифторуксусную кислоту («ICN Biomedicals», США). Образцы пептидов были любезно предоставлены В.В. Самуковым (НПО «Вектор», г. Новосибирск) и И.В. Назимовым (ИБХ РАН, г. Москва). Концентрации аминокислот в хроматографируемых растворах составляли 0,2 – 1 мг/мл, пептидов 0,1 – 2 мг/мл.

Обработку хроматограмм проводили с помощью программы «Мультихром» (ЗАО "Амперсенд", г. Москва). Для вычисления V_R , площадей хроматографических пиков при детектировании на 8 длинах волн (S_λ) и графического представления хроматограмм пептидов использовали программу «ХРОМ – П» (ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова», г. Новосибирск). Линеаризацию кривой, приведённой на рисунке 1, проводили с помощью программы «Microsoft Excel» (Microsoft Corporation, 1985-2001).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Контроль стабильности работы хроматографической системы

Контроль стабильности работы хроматографической системы проводили с использованием процедуры, регламентированной методикой [11]. Хроматографировали тестовый раствор и из полученных хроматограмм вычисляли 14 параметров, каждый из которых контролирует определённый показатель хроматографической системы: V_R бромид-иона – свободный объём колонки; спектральное отношение S_{280}/S_{250} уридина – точность настройки детектора в диапазоне от 250 до 280 нм; спектральное отношение S_{260}/S_{280} кофеина – линейный диапазон детектора; спектральное отношение S_{260}/S_{230} м-нитроанилина – пригодность элюента А. По пику о-нитроанилина контролировали: V_R – отклонение градиента от заданной формы, спектральные отношения – точность настройки детектора в диапазоне от 210 до 300 нм, асимметрия пика $A_{10\%}$ – нарушения в упаковке колонки, S_{210} – точность дозирования образца. Периодическое измерение хроматографических и спектральных параметров модельного раствора позволило нам убедиться в воспроизводимости работы используемой хроматографической системы. Результаты тестирования приведены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты тестирования хроматографической системы, $n = 8$.

Вещество	Параметр	Среднее значение параметра	S_r (%)
Бромид	V_R , мкл	148	1,0
Уридин	S_{280}/S_{250}	0,53	1,3
Кофеин	S_{260}/S_{280}	0,73	0,6
м-Нитроанилин	S_{260}/S_{230}	0,80	1,0
о-Нитроанилин	V_R , мкл	1544	0,6
	S_{220}/S_{210}	1,71	0,5
	S_{230}/S_{210}	1,76	0,7
	S_{240}/S_{210}	1,11	0,6
	S_{260}/S_{210}	0,58	0,9
	S_{250}/S_{210}	0,40	1,4
	S_{280}/S_{210}	0,59	0,9
	S_{300}/S_{210}	0,32	1,2
	$A_{10\%}$	1,05	1,1
Выходной сигнал (площадь пика) S_{210} , е.о.п.·мкл	25,00	1,4	

Полученные значения S_r позволяют сделать вывод о стабильности работы описываемой хроматографической системы.

4.2. Вычисление объёмов удерживания пептидов

Исходные хроматографические данные, необходимые для вычисления коэффициентов удерживания аминокислот, получали из хроматограмм этих аминокислот и пептидов GG и GGG в условиях, указанных в разделе 3. Коэффициенты удерживания аминокислот вычисляли по уравнению:

$$Z_i = V_{Ri} - V_0 - Z_{C^*+N^*} \quad (5)$$

где V_{Ri} – объём удерживания аминокислоты «i»; V_0 – свободный объём колонки (объём удерживания V_r , в данной хроматографической системе он составил 148 мкл.); Z_{C+N} – суммарная константа удерживания концевых групп пептида.

Z_{C+N} вычисляли по уравнению:

$$Z_{C^*+N^*} = V_R(G) - [V_R(GGG) - V_R(GG)] - V_0 \quad ((6)$$

где $V_R(G)$ – объём удерживания глицина, мкл; $V_R(GGG)$ и $V_R(GG)$ – объёмы удерживания пептидов GGG и GG, мкл. Сумму коэффициентов удерживания концевых групп $[(-NH_2) + (-CONH_2)]$ считали равной сумме коэффициентов удерживания групп $[(-NH_2) + (-COOH)]$.

Хроматографические данные и вычисленные константы удерживания структурных элементов пептидов приведены в таблице 3.

Таблица 3. Объёмы удерживания аминокислот и пептидов GG и GGG. Константы удерживания структурных элементов пептидов.

Код	V_R , мкл	Z_i , мкл	Код	V_R , мкл	Z_i , мкл
N	169	0	P	197	24
S	172	0	V	291	118
G	173	0	M	331	158
Q	173	0	Y	578	405
D	174	1	I	586	413
H	181	8	L	622	449
T	181	8	F	753	580
E	183	10	W	917	744
K	183	10	GG	180	-
C	183	10	GGG	180	-
A	184	11	$(C^*+N^*)_{end}$	-	25
R	190	17			

4.2.1. Линейная модель «состав – удерживание»

Для предсказания объёмов удерживания пептидов в рамках линейной модели предложенной в работе [5], мы вычислили объёмы удерживания 28 пептидов (табл. 4) и сравнили полученные данные с данными, найденными экспериментально (рис. 1).

Таблица 4. Экспериментально найденные и вычисленные объёмы удерживания пептидов (линейная модель).

№	Пептид	V_R (эксп.), мкл	V_R (выч.), мкл
1	GG	180	173
2	GGG	180	173
3	AS	186	184
4	GRGDS	228	191
5	TKPR	292	232
6	WAGGDASGE	794	950
7	GL	793	622
8	MY	812	736
9	KPVGKKRRPVKVYP	962	1078
10	W-D-YGGDASGE	1061	1344
11	W-D-AGGDA	1097	940
12	NCMLDY	1109	1196
13	SYSMEHFRWG	1194	2095
14	W-D-VGGDASGE	1120	1057
15	YGGFLRKYPK	1123	2073
16	RPPGFSPFR	1220	1439
17	MEHFRWG	1231	1690
18	RVYIHPF	1233	1738
19	YGGFLRRIRPKLK	1241	2564
20	YGGFM	1248	1316
21	DRVYIHPF	1306	1739
22	QATVGDINTERPGMLDFTGK	1338	1989
23	ELYENKRPRRPYIL	1365	2406
24	DRVYIHPFHL	1391	2196
25	Y-D-AGFL	1426	1618
26	RPKPQQFFGLM-NH ₂	1472	2015
27	PQQFFGLM-NH ₂	1552	1964
28	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	2034	4314

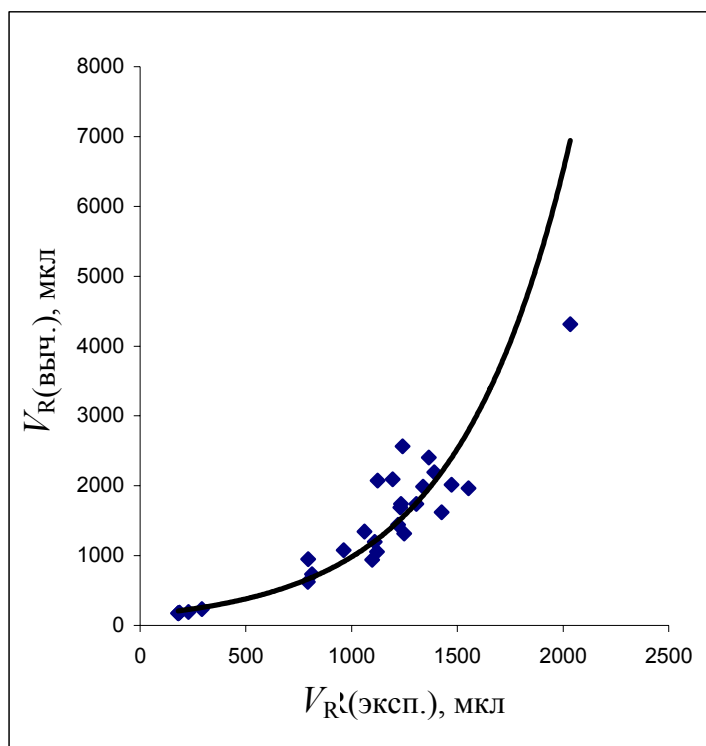


Рис. 1. Сравнение экспериментально найденных и вычисленных объёмов удерживания пептидов. Вычисление значений V_R проводили по уравнению (1).

Как видно из полученных данных, линейная модель даёт удовлетворительные результаты лишь для относительно гидрофильных пептидов; для гидрофобных пептидов вычисленные значения оказываются заметно выше экспериментальных. Подобные результаты были получены в работе [10].

4.2.2. Нелинейная модель «состав – удерживание»

Линеаризация кривой, приведённой на рис. 1, даёт уравнение:

$$V_R = 173 \cdot [(\sum n \cdot Z_i) + V_0]^{1/3} - 785 \quad (7)$$

Сравнение вычисленных значений и найденных экспериментально объёмов удерживания для 28 пептидов показано в таблице 5 и на рис. 2.

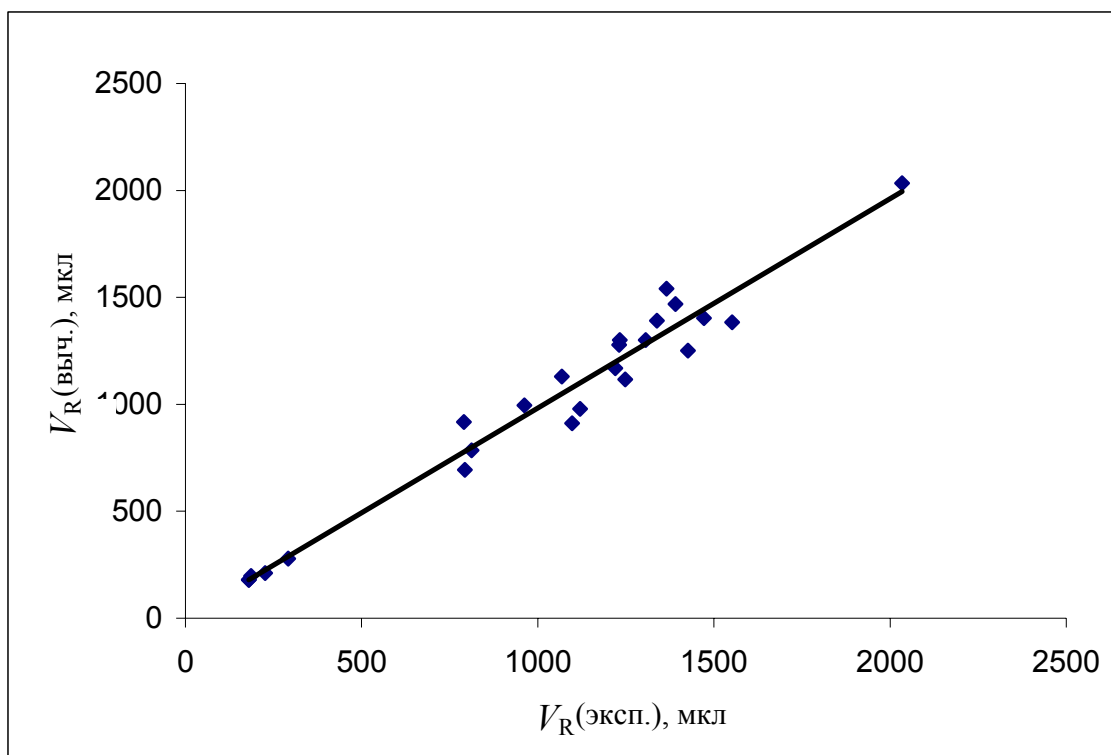


Рис. 2. Сравнение экспериментально найденных и вычисленных объёмов удерживания пептидов. Вычисление значений V_R проводили по уравнению (7).

Таблица 5. Экспериментально найденные и вычисленные объёмы удерживания пептидов (нелинейная модель).

№	Пептид	V_R (эксп.), мкл	V_R (выч.), мкл
1	GG	180	180
2	GGG	180	180
3	AS	186	200
4	GRGDS	228	212
5	TKPR	292	279
6	WAGGDASGE	794	917
7	GL	793	693
8	MY	812	779
9	KPVGKKRRPVKVYP	962	991
10	W-D-YGGDASGE	1061	1126
11	W-D-AGGDA	1097	911
12	NCMLDY	1109	1053
13	SYSMEHFRWG	1194	1431
14	W-D-VGGDASGE	1120	979
15	YGGFLRKYPK	1123	1423
16	RPPGFSPFR	1220	1170
17	MEHFRWG	1231	1278
18	RVYIHPF	1233	1297
19	YGGFLRRIRPKLK	1241	1585
20	YGGFM	1248	1113
21	DRVYIHPF	1306	1297
22	QATVGDINTERPGMLDFTGK	1338	1393
23	ELYENKRPRRPYIL	1365	1535
24	DRVYIHPFHL	1391	1466
25	Y-D-AGFL	1426	1248
26	RPKPQQFFGLM-NH ₂	1472	1402
27	PQQFFGLM-NH ₂	1552	1384
28	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	2034	2034

Коэффициент корреляции зависимости $V_R(\text{выч.})=f(V_R(\text{эксп.}))$ составил 0,96.

В Приложении приведены экспериментальная и вычисленная хроматограммы модельной смеси 11 пептидов.

4.3. Вычисление УФ спектров пептидов

Удельные спектральные коэффициенты структурных элементов пептидов были взяты из работы [10], т.к. в используемой нами хроматографической системе корректному вычислению спектральных отношений мешают системные пики, а также слабое удерживание гидрофильных аминокислот и коротких пептидов. Значения удельных спектральных коэффициентов приведены в таблице 6.

Таблица 6. Спектральные коэффициенты поглощающих УФ излучение структурных элементов пептидов как площади хроматографических пиков при $C=1$ мМ и объёме пробы 4 мкл, (е.о.п.·мкл) [10].

λ , нм	W	F	Y	H	C	M	R	Q	N	E	D	N*+C*	ПС
210	99.38	30.03	21.72	20.93	1.55	5.81	1.28	0.59	0.44	0.12	0.05	0.23	3.22
220	134.76	6.75	29.23	14.61	0.70	2.37	0.03	0.25	0.18	0.08	0.03	0.12	0.86
230	37.61	0.23	21.34	2.44	0.32	0.64	0	0.07	0.05	0.03	0.01	0.04	0.22
240	8.56	0.23	2.16	0.05	0.09	0.12	0	0.02	0.01	0.01	0	0.01	0.03
250	9.26	0.48	0.99	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0
260	15.74	0.64	2.35	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
280	22.91	0.03	4.86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	1.99	0.03	0.18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

где $S_{N^*+C^*}$ – спектральные коэффициенты суммы групп (-NH+ -COOH) пептида, $S_{ПС}$ – поглощение пептидной связи.

Спектральные характеристики пептидов как площади их хроматографических пиков при $C=1$ мМ и объёме пробы 4 мкл вычисляли по уравнению:

$$a_{\text{пептид}}^{\lambda} = a_{N^*+C^*}^{\lambda} + (m-1) \cdot a_{ПС}^{\lambda} + \sum a_i^{\lambda} \quad (9)$$

где m – общее число аминокислотных остатков в пептиде, $a_{N^*+C^*}^{\lambda}$ – условная площадь пика концевых групп пептида, $a_{ПС}^{\lambda}$ - удельное поглощение пептидной связи при длине волны λ , a_i^{λ} - спектральные характеристики аминокислотных остатков для длины волны λ . Величины, входящие в уравнение (9), были получены следующим образом.

Вычисляли удельные спектральные характеристики структурных элементов пептидов при длине волны $\lambda=210$ нм (a_i^{210}) как площади их хроматографических пиков для раствора с концентрацией 1мМ и объёма пробы 4 мкл по уравнению:

$$a_i^{210} = a_{\text{АК}}^{210} - a_{N^*+C^*}^{210}, \quad (10)$$

где $a_{\text{АК}}^{210}$ – площадь пика аминокислоты; $a_{N^*+C^*}^{210}$ – условная площадь пика концевых групп пептида. Величину $a_{N^*+C^*}^{210}$ брали равной a_{Leu}^{210} , т.к группы $-\text{NH}_2$ и COOH являются единственными хромофорами Leu в диапазоне длин волн 210-300 нм.

Удельное поглощение пептидной связи ($a_{\text{ПС}}^{210}$) вычисляли как разность удельных поглощений пептидов GGG и GG:

$$a_{\text{ПС}}^{210} = a_{\text{GGG}}^{210} - a_{\text{GG}}^{210} \quad (11)$$

Спектральные характеристики для длины волны λ вычисляли по уравнению:

$$a_i^\lambda = a_i^{210} \cdot (S_\lambda/S_{210}), \quad (12)$$

где S_λ/S_{210} – спектральные отношения аминокислот и пептидов GG и GGG, представляющие собой отношения площадей пиков при длинах волн λ к площади пика при $\lambda = 210$ нм.

В таблице 7 приведено сравнение вычисленных спектральных отношений S_λ/S_{210} для 28 пептидов с полученными экспериментально. Экспериментально полученные и вычисленные спектральные отношения пептидов достаточно хорошо согласуются между собой. В большинстве случаев различия составляют не более 0,06. Для некоторых пептидов (5, 9, 12, 16, 18, 22, 23, 26, 27) наблюдаются более заметные различия предсказанных и экспериментальных спектральных отношений. Причины этих различий требуют дополнительных исследований.

Таблица 7. Сравнение экспериментальных и вычисленных величин спектральных отношений пептидов.

Пептид	Значение	Спектральные отношения S_λ/S_{210} для длин волн λ (нм):						
		220	230	240	250	260	280	300
1	Выч.	0.28	0.08	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Эксп.	0.28	0.08	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
2	Выч.	0.28	0.07	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Эксп.	0.27	0.07	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
3	Выч.	0.28	0.08	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Эксп.	0.31	0.10	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
4	Выч.	0.25	0.06	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Эксп.	0.32	0.11	0.03	0.01	0.01	0.00	0.00
5	Выч.	0.24	0.06	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Эксп.	0.38	0.12	0.03	0.01	0.00	0.00	0.00
6	Выч.	1.13	0.31	0.07	0.07	0.13	0.18	0.02
	Эксп.	1.07	0.35	0.08	0.07	0.11	0.18	0.02
7	Выч.	0.28	0.08	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Эксп.	0.32	0.10	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
8	Выч.	1.05	0.72	0.07	0.03	0.08	0.16	0.01
	Эксп.	0.94	0.70	0.10	0.03	0.06	0.14	0.00

Пептид	Значение	Спектральные отношения S_λ/S_{210} для длин волн λ (нм):						
		220	230	240	250	260	280	300
9	Выч.	0.61	0.37	0.04	0.01	0.04	0.07	0.00
	Эксп.	0.52	0.28	0.05	0.01	0.01	0.03	0.00
10	Выч.	1.16	0.41	0.07	0.07	0.12	0.19	0.01
	Эксп.	1.07	0.40	0.10	0.06	0.11	0.18	0.01
11	Выч.	1.20	0.33	0.08	0.08	0.14	0.20	0.02
	Эксп.	1.22	0.35	0.08	0.09	0.14	0.18	0.04
12	Выч.	0.80	0.51	0.06	0.02	0.05	0.11	0.00
	Эксп.	0.64	0.43	0.07	0.02	0.03	0.07	0.00
13	Выч.	0.94	0.31	0.05	0.05	0.09	0.13	0.01
	Эксп.	0.93	0.47	0.08	0.04	0.07	0.12	0.01
14	Выч.	1.13	0.31	0.07	0.07	0.13	0.18	0.02
	Эксп.	1.07	0.33	0.07	0.07	0.11	0.17	0.02
15	Выч.	0.70	0.43	0.05	0.02	0.05	0.09	0.00
	Эксп.	0.65	0.43	0.07	0.02	0.03	0.07	0.00
16	Выч.	0.23	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
	Эксп.	0.39	0.09	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00
17	Выч.	0.93	0.24	0.05	0.06	0.09	0.13	0.01
	Эксп.	0.93	0.39	0.07	0.05	0.08	0.12	0.02
18	Выч.	0.60	0.27	0.03	0.02	0.03	0.05	0.00
	Эксп.	0.45	0.21	0.06	0.04	0.06	0.09	0.02
19	Выч.	0.49	0.26	0.03	0.02	0.03	0.05	0.00
	Эксп.	0.51	0.27	0.04	0.01	0.02	0.04	0.00
20	Выч.	0.59	0.33	0.04	0.02	0.04	0.07	0.00
	Эксп.	0.64	0.38	0.06	0.02	0.04	0.07	0.00
21	Выч.	0.59	0.26	0.03	0.02	0.03	0.05	0.00
	Эксп.	0.58	0.30	0.05	0.01	0.02	0.04	0.00
22	Выч.	0.26	0.05	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00
	Эксп.	0.36	0.11	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00
23	Выч.	0.81	0.53	0.06	0.02	0.05	0.11	0.00
	Эксп.	0.64	0.42	0.07	0.01	0.02	0.07	0.00
24	Выч.	0.59	0.23	0.02	0.01	0.02	0.04	0.00
	Эксп.	0.61	0.23	0.04	0.01	0.02	0.03	0.00
25	Выч.	0.61	0.35	0.04	0.02	0.05	0.08	0.00
	Эксп.	0.64	0.39	0.05	0.02	0.04	0.00	0.00
26	Выч.	0.25	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
	Эксп.	0.39	0.10	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00

Пептид	Значение	Спектральные отношения S_λ/S_{210} для длин волн λ (нм):						
		220	230	240	250	260	280	300
27	Выч.	0.25	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
	Эксп.	0.36	0.08	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00
28	Выч.	0.85	0.24	0.05	0.05	0.09	0.12	0.01
	Эксп.	0.82	0.39	0.06	0.03	0.05	0.10	0.01

Из полученных данных видно, что описываемый метод вычисления объёмов удерживания пептидов известного состава и их УФ спектров в условиях градиентной ОФ ВЭЖХ обладает удовлетворительной предсказательной силой и может быть полезен при проведении исследований, связанных с разделением смесей пептидов.

5. ВЫВОДЫ

1. Разработан метод, позволяющий предсказывать объемы удерживания пептидов известного состава в режиме градиентной ОФ ВЭЖХ на хроматографе «Милихром А-02» с использованием летучей подвижной фазы, пригодной для прямого ввода выделенных фракций в масс-спектрометр.

2. Разработан метод расчета оптического поглощения пептидов при длинах волн 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм непосредственно в подвижной фазе, применяемой для разделения пептидов.

3. Разработанные методы апробированы для 28 модельных пептидов. Коэффициент корреляции вычисленных объемов удерживания с соответствующими экспериментальными величинами составил 0,96. Расхождение вычисленных и экспериментально полученных спектральных отношений S_{λ}/S_{210} составило не более 0,06.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. Резников В.А., Штейнгарц В.Д. Аминокислоты. Новосибирск: НГУ, 1999. С. 22.
2. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. Москва: Мир, 1991. 543 с.
3. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. Москва: Просвещение, 1987. 815 с.
4. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии (под ред. Хеншен А.). Москва.: Мир, 1988. 687 с.
5. Meek J.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980, V. 77. No.3. P. 1632-1636.
6. Sakamoto Y., Kawakami N., Sasagawa T. // J. Chromatogr. 1988. V. 442. P. 69-79.
7. Sasagawa T., Okuyama T., Teller D.C. // J. Chromatogr. 1982. V. 240. P. 329-340.
8. Browne C.A., Bennet H.P.J., Solomon S. // Anal. Biochem. 1982. V.124. P.201-208.
9. Meek J.L., Rossetti Z.L. // J. Chromatogr. 1981. V. 211. P. 15-28.
10. Азарова И.Н., Барам Г.И., Гольдберг Е. Л. // Биоорганическая химия. В печати.
11. Массовая концентрация УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. №ФР.1.31.2003.00950. Иркутск. 2003.

7. Приложение

Экспериментальная (А) и вычисленная (Б) хроматограммы смеси 11 пептидов.
Номера пептидов в соответствии с табл. 5.

