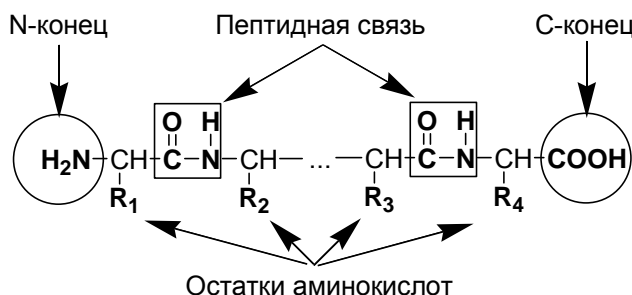


ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ВЭЖХ ПЕПТИДОВ С МНГОВОЛНОВЫМ ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

ВЫЧИСЛЕНИЕ ОБЪЕМОВ УДЕРЖИВАНИЯ И УФ СПЕКТРОВ ПЕПТИДОВ

Введение

Пептиды представляют собой линейные полимеры, составленные из остатков аминокислот, соединенных между собой пептидными связями:



Одним из наиболее распространенных методов разделения пептидов является обращенно-фазовая ВЭЖХ. Удерживание пептидов на сорбентах типа "обращенная фаза" определяется, в основном, гидрофобностью остатков аминокислот, входящих в состав пептида.

В 1980 г. J.L.Meek [1,2] предложил аддитивную (линейную) модель удерживания пептидов на обращенной фазе, согласно которой объем удерживания (V_R) пептида вычислялся как сумма вкладов всех образующих этот пептид аминокислот:

$$V_R = V_0 + \sum(n_i \cdot Z_i) \quad (1)$$

где V_0 - свободный объем колонки, Z_i - вклад i -ой аминокислоты (константа удерживания), n_i - число аминокислот " i " в пептиде.

Вклад каждой аминокислоты вычислялся путем решения обратной корреляционной задачи для объемов удерживания 25 пептидов, хроматографированных в одинаковых условиях. Следует отметить, что хотя для большого числа выбранных пептидов – 25 пептидов в работе [1] и 100 пептидов в работе [2] – зависимостям $V_R^{\text{выч.}} \leftrightarrow V_R^{\text{эксп.}}$ отвечали высокие коэффициенты корреляции (0.997-0.999), значения констант удерживания некоторых аминокислот противоречили физическому смыслу, а линейная модель не учитывала тот факт, что с ростом молекулярной массы пептида поверхность его гидрофобного контакта с обращенной фазой увеличивается нелинейно. Эти недостатки аддитивной модели в последующих работах по предсказанию удерживания пептидов критиковались многократно [3-9].

В работе [9] константы удерживания аминокислот вычисляли из величин их гидрофобности. Удерживание пептида в этой модели вычислялось по уравнению:

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

Константы *a*, *b* и *c* уравнения (2), зависящие от свойств конкретной обращенной фазы и состава элюента, определялись экспериментально из данных по хроматографированию 15 выбранных для этой цели пептидов. Этот алгоритм предсказания удерживания пептидов реализован в коммерчески доступной компьютерной программе GPMaW[®] (Lighthouse Data, Дания).

Очевидно, что предсказывание удерживания пептидов известного строения возможно лишь для какой-то определенной хроматографической системы, так как для других неподвижной и подвижной фаз константы уравнения (2) будут другими. Это обстоятельство существенно ограничивает применимость метода для конкретных хроматографических условий, сводя его лишь к расчету хроматограмм, весьма качественно напоминающих реальную картину разделения смеси пептидов. Вычисление же констант *a*, *b* и *c* уравнения (2) для конкретной хроматографической системы из предварительных экспериментов с модельными пептидами представляется весьма трудоемкой процедурой.

В данной работе нами предложен метод вычисления объемов удерживания и УФ спектров пептидов с известной структурой, основанный на получении коэффициентов удерживания и спектральных коэффициентов структурных составляющих пептидов из данных по хроматографированию свободных аминокислот. Сочетание расчетных хроматографических и спектральных характеристик, получаемых для пептидов, существенно повышает надежность предсказания картины разделения их смесей. Метод может быть реализован для любой подобной хроматографической системы.

Хроматографическая система

Хроматограф: "Милихром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", г. Новосибирск).

Колонка: Ø2x75 мм.

Сорбент: ProntoSIL-120-5C18 AQ ("Bischoff Analysentechnik und Geräte GmbH", Германия).

Элюент А: 0.2 М LiClO₄ - 0.005 М HClO₄.

Элюент Б: ацетонитрил.

Линейный градиент: 40 мин от 5 до 100% Б.

Скорость потока: 100 мкл/мин.

Температура колонки: 40°C.

Детекция: при 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм, τ=0.18 с.

Концентрация раствора: 1 мМ (по умолчанию).

Объем пробы: 4 мкл.

Исходные хроматографические и спектральные данные

Исходные хроматографические и спектральные данные, необходимые для вычисления коэффициентов удерживания и спектральных коэффициентов аминокислот, получали из хроматограмм этих аминокислот и пептидов GG и GGG. Все эти данные суммированы в таблице 1.

Таблица 1. Хроматографические и спектральные характеристики аминокислот и пептидов GG и GGG.

Название	V_R , мкл	C , мМ	S_{210} , е.о.п.·мкл	$S_{210}^{1\text{ мМ}}$, е.о.п.·мкл (4 мкл)	Спектральные отношения S_λ/S_{210}						
					220	230	240	250	260	280	300
Asn	162	1.51	1.01	0.67	0.44	0.14	0.03	0.01	0.00	0.00	0.00
Asp	164	1.50	0.42	0.28	0.51	0.19	0.05	0.02	0.02	0.02	0.03
Ser	164	9.51	1.80	0.19	0.42	0.13	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
Gln	165	1.37	1.13	0.82	0.45	0.14	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00
Gly	170	13.3	4.11	0.31	0.43	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
His	175	1.29	27.30	21.16	0.70	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Glu	177	1.36	0.47	0.35	0.56	0.20	0.06	0.01	0.01	0.01	0.01
Thr	180	8.39	1.82	0.22	0.47	0.16	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00
Lys·HCl	182	5.47	1.18	0.22	0.46	0.16	0.04	0.01	0.00	0.01	0.01
Ala	183	11.2	1.76	0.16	0.50	0.17	0.03	0.01	0.00	0.00	0.00
Arg·HCl	196	4.75	7.19	1.51	0.10	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pro	215	8.69	1.38	0.16	0.40	0.12	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00
Cys	244										
Val	309	8.5	1.91	0.22	0.51	0.18	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00
Met	354	1.34	8.10	6.04	0.41	0.11	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
Tyr	512	1.10	24.14	21.95	1.34	0.97	0.10	0.05	0.11	0.22	0.01
Ile	643	7.6	1.83	0.24	0.53	0.19	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00
Leu	686	1.52	0.35	0.23	0.50	0.17	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01
Phe	811	1.21	36.61	30.26	0.23	0.01	0.01	0.02	0.02	0.00	0.00
Trp	1029	0.98	97.62	99.61	1.35	0.38	0.09	0.09	0.16	0.23	0.02
Gly-Gly	173	1.52	6.00	3.95	0.25	0.05	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Gly-Gly-Gly	178	1.06	7.60	7.17	0.26	0.06	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00

Вычисление коэффициентов удерживания структурных элементов пептидов

Коэффициенты удерживания аминокислот вычисляли по уравнению:

$$Z_i = V_{Ri} - V_0 - Z_{CN} \quad (3)$$

где V_{Ri} - объем удерживания аминокислоты i ; V_0 - свободный объем колонки (150 мкл); Z_{CN} - суммарная константа удерживания концевых групп пептида.

Величину Z_{CN} определяли как:

$$Z_{CN} = V_{R(G)} - (V_{R(GGG)} - V_{R(GG)}) - V_0 \quad (4)$$

где $V_{R(G)}$ – объем удерживания глицина; $V_{R(GGG)}$ и $V_{R(GG)}$ – объемы удерживания пептидов GGG и GG.

Константы удерживания структурных элементов пептидов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Константы удерживания структурных элементов пептидов.

Структурный элемент пептида	Код	Объем, мкл	
		V_R	Z_i
Asn	N	162	0
Ser	S	164	0
Asp	D	164	0
Gln	Q	165	0
Gly	G	170	5
His	H	175	10
Glu	E	177	12
Thr	T	180	15
Lys	K	182	17
Ala	A	183	18
Cys	C	244	79
Arg	R	196	31
Pro	P	215	50
Val	V	309	144
Met	M	354	189
Tyr	Y	512	347
Ile	I	643	478
Leu	L	686	521
Phe	F	811	646
Trp	W	1029	864
$[(-COOH) + (-NH_2)]_{end}$	CN	-	15

Вычисление объема удерживания пептида

Удерживание пептида известной структуры вычисляли с помощью констант из таблицы 2 по уравнению:

$$V_R = 209 \cdot [\Sigma(n_i \cdot Z_i) + Z_{CN} + V_0]^{1/3} - 990 \quad (5)$$

Сравнение вычисленных значений и найденных экспериментально объемов удерживания для 30 пептидов показано в таблице 3 и на рисунке 1Б.

Из рисунка 1А видно, что вычисление объемов удерживания пептидов согласно аддитивной модели [1, 2] не дает удовлетворительных результатов.

Таблица 3. Экспериментально найденные и вычисленные объемы удерживания пептидов.

№	Пептид	Объем удерживания, мкл	
		V_R (эксп.)	V_R (выч.)
1.	GG	173	179
2.	GGG	178	190
3.	AS	180	197
4.	GRGDS	248	244
5.	TKPR	604	374
6.	WAGGDASGE	900	1162
7.	MY	916	867
8.	GL	926	858
9.	RKDVIY	1015	869
10.	W(D-A)GGDA	1108	1151
11.	W(D-Y)GGDASGE	1194	1360
12.	W(D-V)GGDASGE	1267	1242
13.	NCMLDY	1366	1292
14.	YGGFM	1395	1324
15.	KPVGKKRRPVKVYP	1398	1249
16.	SYSMEHFRWG	1485	1756
17.	QATVGDINTERPGMLDFTGK	1510	1781
18.	YGGFLRKYPK	1522	1708
19.	Y(D-A)FGYPS-NH ₂	1549	1443
20.	RPPGFSPFR	1573	1492
21.	MEHFRWG	1586	1609
22.	Y(D-A)GFL	1613	1505
23.	DRVYIHPF	1654	1585
24.	RVYIHPF	1697	1585
25.	ELYENKPRRPYIL	1701	1877
26.	PQQFFGLM-NH ₂	1707	1737
27.	YGGFLRRIRPKLK	1767	1978
28.	RPKPQQFFGLM-NH ₂	1779	1777
29.	DRVYIHPFHL	1834	1809
30.	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	2636	2603

При вычислении объемов удерживания пептидов 19, 26, 28 и 30 сумму коэффициентов удерживания концевых групп $[(-NH_2) + (-CONH_2)]$ считали равными сумме коэффициентов удерживания групп $[(-NH_2) + (-COOH)]$.

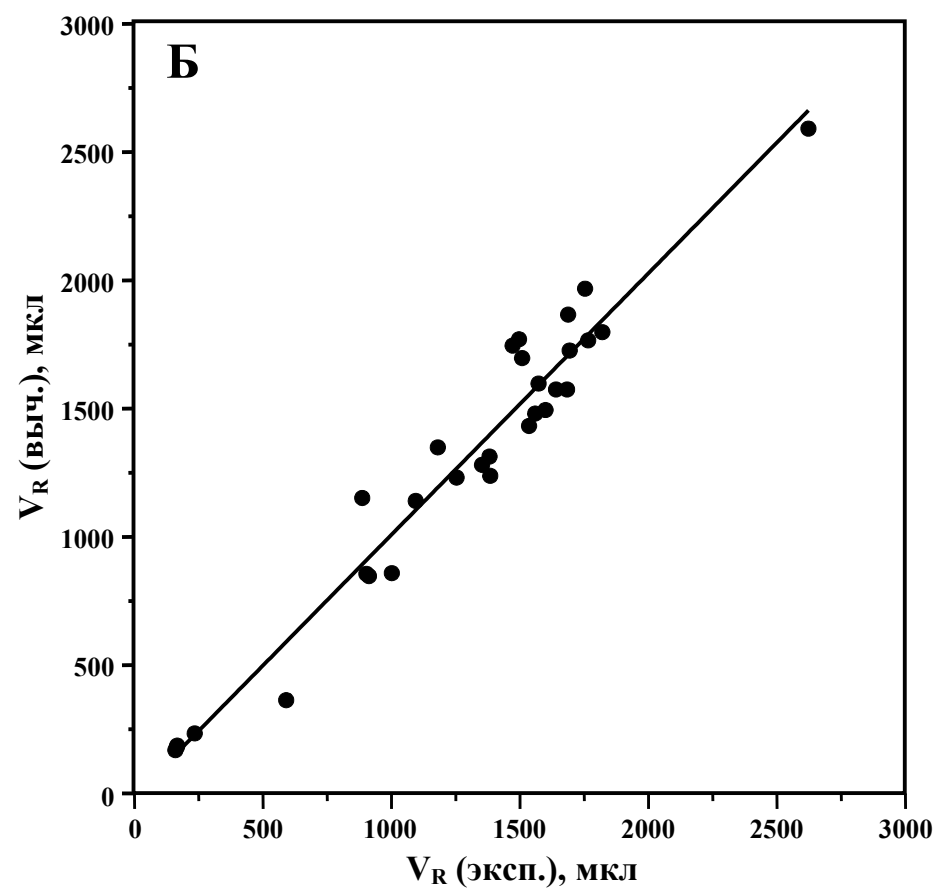
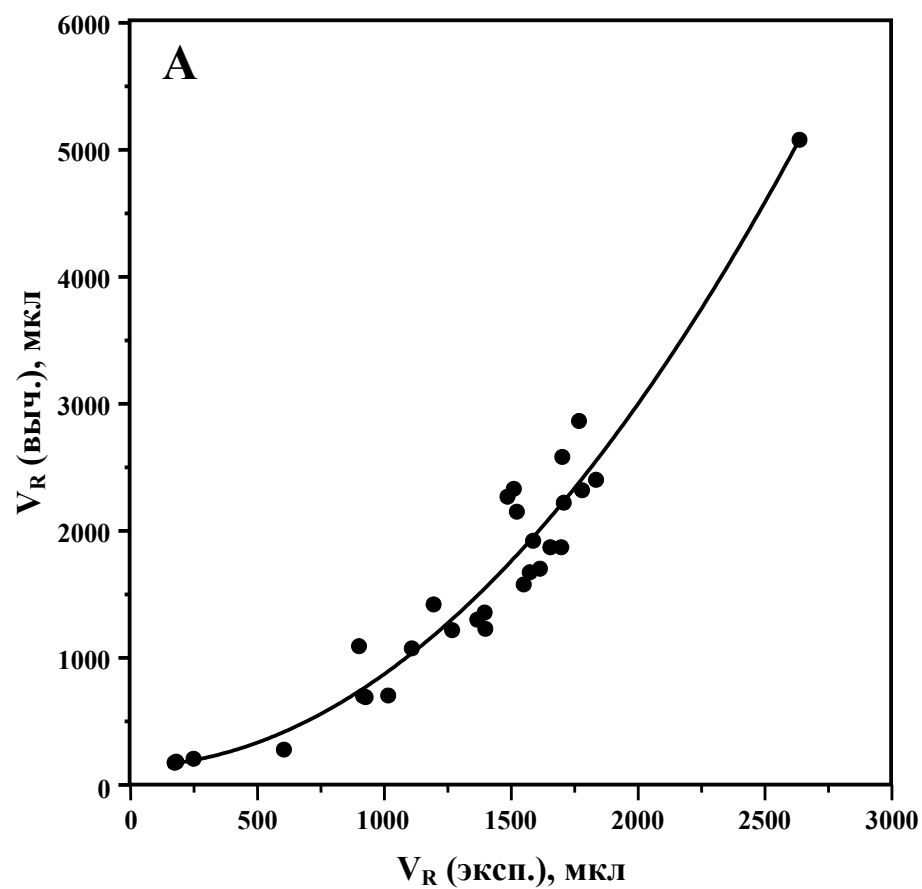


Рис. 1. Сравнение экспериментально найденных и вычисленных объемов удерживания пептидов (см. таблицу 3).

А. Вычисление V_R проводили по уравнению $V_R = V_0 + Z_{CN} + (\sum n_i \cdot Z_i)$ – аддитивная модель.

Б. Вычисление V_R проводили по уравнению (5).

Вычисление спектральных коэффициентов структурных элементов пептидов

Удельные спектральные характеристики структурных элементов пептидов при длине волны $\lambda=210$ нм (a_i^{210}) вычисляли как площади их хроматографических пиков для раствора с концентрацией $C=1$ мМ и объема пробы $v=4$ мкл (см. таблицу 1) по уравнению:

$$a_i^{210} = a_{AK}^{210} - a_{CN}^{210} \quad (6)$$

где a_{AK}^{210} - площадь пика аминокислоты; a_{CN}^{210} - условная площадь пика концевых групп пептида $-NH_2$ и $-COOH$.

Величину a_{CN}^{210} брали равной a_{Leu}^{210} , т.к. группы $-NH_2$ и $-COOH$ являются единственными хромофорами Leu в диапазоне длин волн 210-300 нм.

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

$$a_{ПС}^{210} = a_{GGG}^{210} - a_{GG}^{210} \quad (7)$$

Спектральные коэффициенты для других семи длин волн вычисляли по уравнению:

$$a_i^{\lambda} = a_i^{210} \cdot (S_{\lambda}/S_{210}) \quad (8)$$

где S_{λ}/S_{210} - спектральные отношения из таблицы 1.

Удельные спектральные коэффициенты поглощающих УФ излучение структурных элементов пептидов приведены в таблице 4.

Таблица 4. Спектральные коэффициенты поглощающих УФ излучение структурных элементов пептидов как площадь хроматографических пиков при $C=1$ мМ и $v=4$ мкл, е.о.п.·мкл.

λ , нм	W	F	Y	H	M	R	Q	N	E	D	COOH +NH ₂	Пеп. связь
210	99.38	30.03	21.72	20.93	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	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	0.64	0	0.07	0.05	0.03	0.01	0.04	0.22
240	8.56	0.23	2.16	0.05	0.12	0	0.02	0.01	0.01	0	0.01	0.03
250	9.26	0.48	0.99	0.02	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
280	22.91	0.03	4.86	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

Вычисление УФ спектра пептида

Спектральные характеристики пептидов как площади их хроматографических пиков при длине волны λ , $C=1$ мМ и $v=4$ мкл вычисляли по уравнению:

$$a_{Пеп}^{\lambda} = a_{CN}^{\lambda} + (m-1) \cdot a_{ПС}^{\lambda} + \sum a_i^{\lambda} \quad (9)$$

где m - общее число аминокислотных остатков в пептиде.

Таблица 5. Вычисленные значения a_λ для 11 пептидов, е.о.п.·мкл.

№	Структура пептида	a_λ для образца $V=4$ мкл и $C=1$ mM, е.о.п.·мкл							
		a_{210}	a_{220}	a_{230}	a_{240}	a_{250}	a_{260}	a_{280}	a_{300}
1.	GGG	6.67	1.84	0.48	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00
2.	GRGDS	14.44	3.62	0.93	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
3.	TKPR	11.17	2.73	0.70	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00
4.	WAGGDASGE	125.54	141.87	39.45	8.82	9.26	15.74	22.91	1.99
5.	NCMLDY	44.35	36.23	23.18	2.45	0.99	2.35	4.86	0.18
6.	SYSMEHFRWG	208.48	195.69	64.31	11.41	10.75	18.75	27.80	2.20
7.	YGGFLRKYPK	103.96	73.10	44.93	4.83	2.46	5.34	9.75	0.39
8.	MEHFRWG	177.10	163.88	42.31	9.16	9.76	16.40	22.94	2.02
9.	RVYIHPF	93.51	55.90	25.37	2.63	1.49	3.01	4.89	0.21
10.	YGGFLRRIRPKLK	94.46	46.51	24.25	2.76	1.47	2.99	4.89	0.21
11.	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	183.85	156.94	43.29	9.36	9.26	15.74	22.91	1.99

Таблица 6. Сравнение экспериментальных и вычисленных величин спектральных отношений для 11 пептидов (см. табл. 5).

№.№ пептидов		Спектральные отношения S_λ/S_{210}						
		220	230	240	250	260	280	300
1.	Выч.	0.28	0.07	0.01	0	0	0	0
	Эксп.	0.26	0.06	0.01	0	0	0	0
2.	Выч.	0.25	0.06	0.01	0	0	0	0
	Эксп.	0.31	0.09	0.02	0	0	0	0
3.	Выч.	0.24	0.06	0.01	0	0	0	0
	Эксп.	0.40	0.10	0.02	0	0	0	0
4.	Выч.	1.13	0.31	0.07	0.07	0.13	0.18	0.02
	Эксп.	1.07	0.34	0.08	0.07	0.12	0.18	0.02
5.	Выч.	0.82	0.52	0.06	0.02	0.05	0.11	0
	Эксп.	0.70	0.49	0.07	0.01	0.03	0.08	0
6.	Выч.	0.94	0.31	0.05	0.05	0.09	0.13	0.01
	Эксп.	0.94	0.48	0.08	0.04	0.07	0.13	0.02
7.	Выч.	0.70	0.43	0.05	0.02	0.05	0.09	0
	Эксп.	0.66	0.44	0.07	0.02	0.03	0.07	0
8.	Выч.	0.93	0.24	0.05	0.06	0.09	0.13	0.01
	Эксп.	0.95	0.42	0.07	0.05	0.08	0.13	0.02
9.	Выч.	0.60	0.27	0.03	0.02	0.03	0.05	0
	Эксп.	0.61	0.31	0.05	0.01	0.02	0.04	0
10.	Выч.	0.49	0.26	0.03	0.02	0.03	0.05	0
	Эксп.	0.52	0.28	0.04	0.01	0.02	0.04	0
11.	Выч.	0.85	0.24	0.05	0.05	0.09	0.12	0.01
	Эксп.	0.84	0.40	0.06	0.03	0.05	0.10	0.01

Графическое представление хроматограммы

Для графического представления хроматограмм веществ с вычисленными значениями V_R и S_λ использовали уравнение:

$$A_\lambda = \frac{S_\lambda}{\sigma \cdot \sqrt{\pi}} \cdot e^{-0.5 \left(\frac{V - V_R}{\sigma} \right)^2} \quad \left| \begin{array}{l} V = V_R + 40 \text{ мкл} \\ V = V_R - 40 \text{ мкл} \end{array} \right. \quad (10)$$

где σ - дисперсия гауссова пика, принятая нами для нашей хроматографической системы равной 5.54 мкл.

Площади пиков пептидов вычисляли в соответствии с их концентрациями в растворе, приведенными в таблице 7, относительно концентрации $C=1$ мМ (см. таблицу 5).

Таблица 7. Вычисленные и экспериментальные найденные значения V_R для пептидов, состав которых приведен в табл. 5.

Пептид:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
C, мМ	1.32	0.40	0.50	0.24	0.24	0.21	0.21	0.18	0.15	0.12	0.02	
V _R , мкл	Выч.	190	244	374	1162	1292	1756	1708	1609	1585	1978	2603
	Эксп.	178	248	604	900	1366	1485	1522	1586	1697	1767	2636

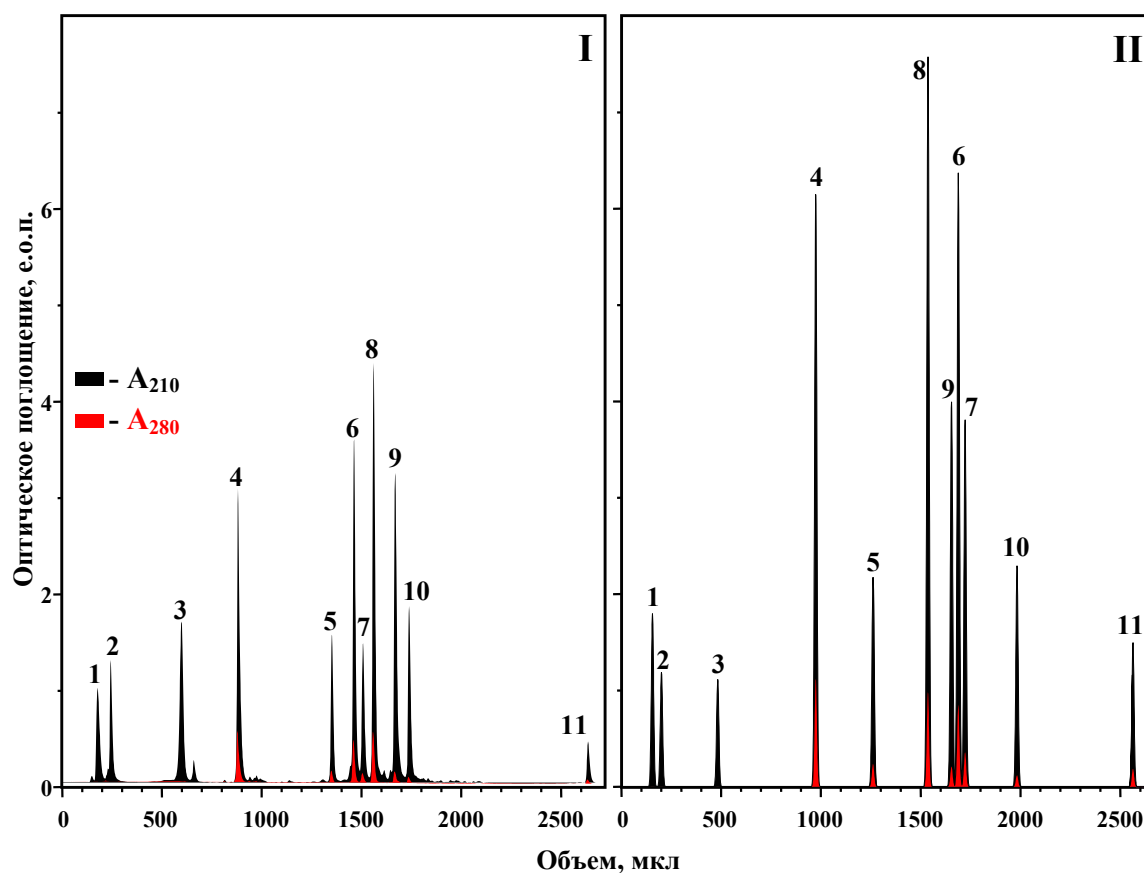


Рис. 2. Разделение смеси 11 пептидов.

I- экспериментальная хроматограмма; II- предсказанная хроматограмма.

Литература

1. Meek J.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, No. 3, p.1632.
2. Meek J.L., Rossetti Z.L. *J. Chromatogr.*, 1981, v.211, p.15.
3. Su S.J., Grego B., Niven B., Hearn M.T.W. *J. Liq. Chromatogr.*, 1981, v.4, p.1745.
4. Wilson K.J., Honegger A., Slottzel R.P., Hughes G.H. *Biochem. J.*, 1981, v.199, p.31.
5. Browne C.A., Bennett H.P.J., Solomon S. *Anal. Biochem.*, 1982, v.124, p.201.
6. Sasagawa T., Okuyama T., Teller D.C. *J. Chromatogr.*, 1982, v.240, p.329.
7. Sasagawa T., Ericsson L.H., Teller D.C., Titani K., Walsh K.A. *J. Chromatogr.*, 1984, v.307, p.29.
8. Guo D., Mant C.T., Taneja A.K., Parker J.M.R., Hodges R.S. *J. Chromatogr.*, 1986, v.359, p.499.
9. Sakamoto Y., Kawakami N., Sasagawa T. *J. Chromatogr.*, 1988, v.442, p.69.