



УДК 577.112.3

## АМИНОКИСЛОТНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ В ОДНОЙ СИСТЕМЕ НАТРИЙ-ЦИТРАТНЫХ БУФЕРОВ

*Родионов А. В.*

*Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Предложены программы автоматического анализа как гидролизатов белков и пептидов, так и физиологических жидкостей в одной системе натрий-цитратных буферов. Определены времена удерживания 59 нингидринположительных соединений, в том числе редких аминокислот, аминосхаров (мурамовой кислоты, глюкозамина, галактозамина, маннозамина и фукозамина) и соответствующих аминокполиолов, а также трех производных цистеина — цистеиновой кислоты, S-карбоксиметилцистеина и S-2-(пиридил-4)этилцистеина. На нескольких примерах показано, что удовлетворительного разрешения пиков можно добиться путем изменения температурного режима колонки и (или) времени элюирования данным буфером.

Аминокислотный анализ находит очень широкое применение в весьма разнообразных областях — от фундаментальных научных исследований до клинической биохимии и экологии. В связи с бурным развитием методов обращенно-фазовой хроматографии в последние годы появилось множество публикаций, посвященных разделению аминокислот в виде их различных производных (см., например, обзор [1]). Наряду с явными достоинствами (высокая чувствительность и короткое время анализа) эти методы, однако, обладают серьезным недостатком: в качестве обязательной стадии они включают предварительную модификацию аминокислот, что весьма затрудняет автоматизацию процесса, столь необходимую для серийных анализов. В первую очередь именно по этой причине классический метод, основанный на ионообменной хроматографии свободных аминокислот и лишенный указанного недостатка, не только не утратил своего значения, но и продолжает успешно развиваться и совершенствоваться.

Для разделения и количественного определения нингидринположительных соединений используют аминокислотные анализаторы, причем в зависимости от происхождения и состава анализируемой смеси элюирование проводят в разных системах буферов. Согласно устоявшемуся мнению, переход от анализа гидролизатов белков или пептидов к анализу физиологических жидкостей или экстрактов тканей с необходимостью предполагает замену натрий-цитратных буферов на литий-цитратные.

Действительно, системы литий-цитратных буферов позволяют проводить количественный анализ одновременно большого числа соединений, содержащих аминогруппы (например, в работе [2] описано разделение 52 соединений). Однако на практике такая необходимость возникает довольно редко. Обычно бывает достаточно определить присутствие, количественное содержание или проследить за изменением концентрации лишь нескольких компонентов смеси, и наиболее подходящими для таких целей были бы сравнительно короткие программы анализа, удовлетворяющие лишь одному жесткому требованию: вместе с анализируемым соединением не должны элюироваться никакие другие компоненты смеси.

Кроме того, при наличии лишь одного прибора необходимость проведения анализов как белковых и пептидных гидролизатов, так и физиологических жидкостей ставит исследователя перед дилеммой: либо каж-

Состав элюирующих буферных растворов фирмы «Biotronik» для аминокислотного анализа \*

Буфер	pH	Концентрация компонентов, мМ			
		Цитрат натрия	Лимонная кислота	Хлорид натрия	Борная кислота
A	3,44	33,3	66,6	—	16,2
B	3,61	33,3	66,6	—	16,2
C	4,21	33,3	46,6	73,6	16,2
D	4,92	59,8	—	188,2	56,6
E	5,35	34,0	41,4	900,0	64,7

\* В буфер А помимо указанных компонентов добавляют монометилловый эфир этиленгликоля до концентрации 8% (по объему). pH буферов доводят до нужных значений путем добавления концентрированных растворов HCl (буферы А и D) или NaOH (буферы В, С и Е). Для предотвращения роста микрофлоры во все буферы добавляют пентахлорфенол (50 мкл 0,5%-ного раствора в этаноле на 1 л буфера).

Таблица 2

Программы анализа нингидринположительных соединений \*

Буфер	Продолжительность элюирования, мин; в скобках — температура колонки, °С		
	Программа Р-1	Программа Р-2	Программа Р-3
A	10 (45)	10 (45)	10 (45)
B	8 (45)	8 (45)	8 (45)
C	4 (45)	4 (45)	4 (45)
D	6 (40)	15 (64)	8 (40)
E	34 (64)	34 (64)	—
0,3 M NaOH	14 (64)	14 (64)	33 (70)
	8 (70)	8 (70)	
	3 (70)	3 (70)	3 (70)

\* Р-1 — программа фирмы «Biotronik». Программы также включают стадии уравнивания колонки перед вводом образца (буфер А, 6 мин, 45°С), ее регенерации по окончании анализа (0,3 M NaOH, 3 мин, 70°С) и подготовки к следующему анализу (буфер А, 16 мин, 45°С).

дый раз переходить на новую систему буферов, что, естественно, сопряжено с нерациональными затратами времени и реактивов, либо создать более или менее универсальный набор программ, различающихся только режимом элюирования в одной и той же системе буферов, и в дальнейшем постоянно пользоваться этим набором. Очевидно, более выигрышным представляется второй подход, который и был избран в настоящей работе.

В качестве базисной была использована рекомендуемая фирмой Biotronik (ФРГ) расширенная программа анализа гидролизатов пищевых продуктов, которая обеспечивает хорошее разделение смеси, содержащей наряду с 17 обычными аминокислотами цистеиновою кислоту, метионин-S-оксид,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -дiamiнопимелиновую кислоту, норлейцин, глюкозамин, галактозамин, гидроксизин, лизиноаланин, орнитин и аммиак. Состав буферных растворов приведен в табл. 1. Эта программа привлекательна тем, что в ней использован пологий градиент pH и — до стадии элюирования основных аминокислот — умеренный градиент ионной силы. Такое сочетание двух основных факторов, определяющих хроматографическую подвижность аминокислот на ионообменниках, позволяло надеяться, что для разделения компонентов, имеющих в данных условиях одинаковые или очень близкие времена удерживания, будет достаточно изменить продолжительность элюирования тем или иным буфером и (или) температуру колонки.

Например, базисная программа Р-1 фирмы «Biotronik» (см. табл. 2 и 3) не позволяет отличить  $\beta$ -аланин от тирозина,  $\gamma$ -аминомасляную кислоту от галактозамина или маннозамина и этаноламин от гистидина.

Времена удерживания (мин) нингидринположительных соединений  
на колонке (3,2×235 мм) с ионообменником ВТС 2710 \*

Соединение	P-1	P-2	P-3
1. О-Фосфосерин		4,49	
2. Цистеиновая кислота		4,54	
3. О-Фосфоэтаноламин		5,90	
4. Таурин		6,73	
5. Мочевина		7,08	
6. β-Аспартилглицин		10,10	
7. S-Карбоксиметилцистеин		10,44	
8. Метионин-S-оксид **		10,97; 13,78	
9. 4-Гидроксипролин		12,03	
10. Аспарагиновая кислота		12,65	
11. Треонин		15,52	
12. Глутамин		15,61	
13. Аспарагин		16,04	
14. Серин		16,71	
15. Мурамовая кислота		17,92	
16. Саркозин		18,62	
17. Гомосерин		18,92	
18. Глутаминовая кислота		19,76	
19. Цитруллин		21,03	
20. Пролин		21,63	
21. α-Аминоадипиновая кислота	—	25,92	—
22. Глицин	27,16	26,84	27,16
23. Аланин	29,17	28,73	29,17
24. Цистеин	31,83	31,21	31,83
25. α-Аминомасляная кислота	32,04	31,59	32,04
26. Валин	32,73	32,17	32,73
27. Цистатион	—	32,48	—
28. α,ε-Диаминопимелиновая кислота	33,49	32,90	33,49
29. Метионин	35,61	34,01	35,61
30. Норвалин	35,71	34,57	—
31. Изолейцин	38,20	36,68	38,57
32. Лейцин	39,23	38,07	40,07
33. Норлейцин	39,54	39,61	40,50
34. Тирозин	40,77	41,73	41,68
35. β-Аланин	41,48	48,54	40,19
36. Фенилаланин	42,52	44,44	43,28
37. Гомоцистин	—	47,56	—
38. Глюкозамин	44,53	48,83	41,63
39. β-Аминоизомасляная кислота	—	49,70	—
40. Глюкозаминитол	45,64	50,42	—
41. Галактозаминитол	45,68	50,61	—
42. Маннозаминитол	46,37	51,21	—
43. Маннозамин	47,01	51,25	42,49
44. γ-Аминомасляная кислота	47,20	54,05	42,48
45. Галактозамин	47,55	51,66	42,59
46. Фукозаминитол	51,40	55,96	—
47. Фукозамин	56,74	61,01	46,20
48. Триптофан	58,20	62,90	—
49. 5-Гидроксизин	58,88	64,71	45,51
50. Алло-5-гидроксизин	59,90	65,76	45,51
51. Орнитин	66,66	72,40	47,50
52. Лизин	69,01	75,28	48,03
53. ε-Аминокапроновая кислота	73,34	82,40	52,09
54. Гистидин	73,88	81,65	49,53
55. Этаноламин	73,98	80,61	47,85
56. Аммиак	75,41	82,56	53,58
57. α-Амино-β-гуанидинопропионовая кислота	—	89,73	—
58. S-2-(Пиридил-4) этилцистенн	83,60	91,26	58,40
59. Аргинин	83,90	91,76	60,55

\* Времена удерживания соединений 1—22 не зависят от типа программы в силу идентичности режимов элюирования в течение первых 22 мин. Проверк означает, что время удерживания этого соединения в условиях элюирования по данной программе не определяли. Из-за отсутствия индивидуальных образцов 5-гидроксизина и алло-5-гидроксизина последовательность элюирования этих изомеров приведена по аналогии с работой [2].

\*\* Метионин-S-оксид (Reanal, ВНР) элюировался из колонки в виде двух пиков, что совпадает с данными работы [3].

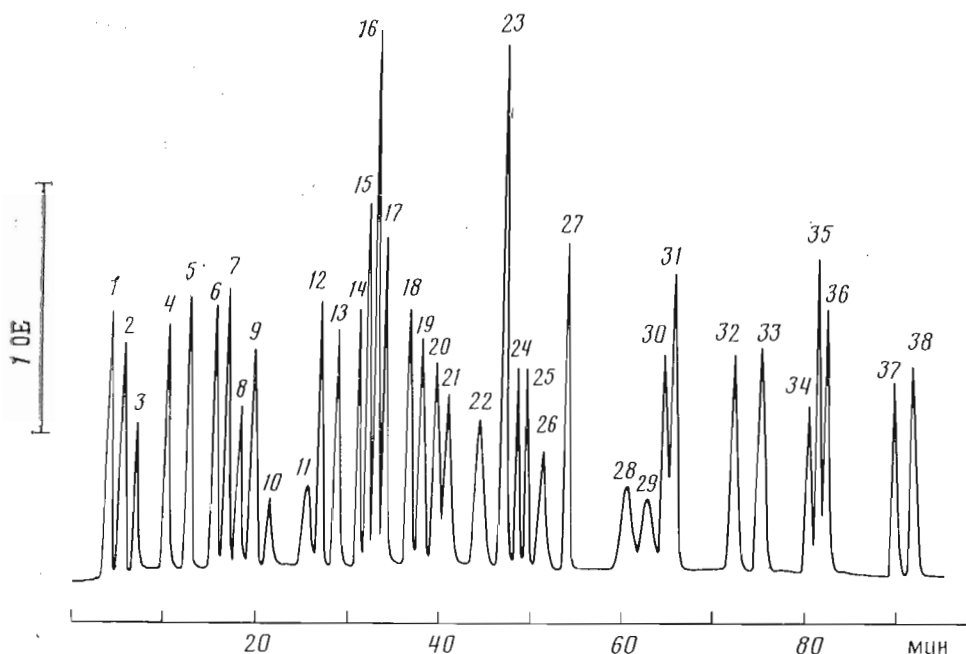


Рис. 1. Хроматограмма смеси нингидринположительных соединений, содержащей О-фосфосерин (1), О-фосфотаноламин (2), мочевины (3), β-аспартилглицин (4), аспарагиновую кислоту (5), треонин (6), серин (7), саркозин (8), глутаминовую кислоту (9), пролин (10), α-аминоадипиновую кислоту (11), глицин (12), аланин (13), цистеин (14), валин (15), α,ε-диаминопимелиновую кислоту (16), метионин (17), изолейцин (18), лейцин (19), норлейцин (20), тирозин (21), фенилаланин (22), гомоцистин (23), β-аланин (24), β-аминоизомасляную кислоту (25), маннозамин (26), γ-аминомасляную кислоту (27), фукозамин (28), триптофан (29), 5-гидроксиллизин (30), алло-5-гидроксиллизин (31), орнитин (32), лизин (33), этаноламин (34), гистидин (35), аммиак (36), α-амино-β-гуанидинпропионовую кислоту (37) и аргинин (38). Элюирование по программе Р-2 (см. табл. 2). Содержание компонентов в смеси (нмоль): 1, 2 — 5; 3 — 300; 11 — 2,5; остальных компонентов по 10 нмоль

Однако весьма незначительная модификация этой программы, осуществленная нами и заключающаяся лишь в увеличении времени элюирования буфером С и температуры колонки (см. программу Р-2 в табл. 2), приводит к вполне удовлетворительному разделению перечисленных соединений, причем разрешение остальных компонентов смеси по меньшей мере не ухудшается (см. табл. 3 и рис. 1). Правда, в этих условиях β-аланин выходит из колонки вместе с глюкозамин. Но и этот недостаток можно легко устранить: достаточно в программе Р-2 время элюирования буфером С при 64° С уменьшить до 12 мин (времена удерживания β-аланина и глюкозамина в таких условиях равны соответственно 46,1 и 47,7 мин). При этом, однако, придется смириться с некоторым ухудшением разрешения пиков, отвечающих этаноламину ( $t_e$  78,2 мин) и гистидину ( $t_e$  78,9 мин), что, впрочем, имеет какое-то значение лишь в случае количественного анализа.

В список соединений, для которых в настоящей работе определены времена удерживания, наряду с аминокислотами и аminosахарами включены также четыре аминопалиола. Это обусловлено тем, что один из наиболее простых способов ответить на вопрос, находится ли остаток данного аminosахара на восстанавливающем конце, заключается в сравнении результатов анализа гидролизатов исходного и обработанного боргидридом олигосахарида. Кроме того, как видно из табл. 3, превращение аminosахаров в аминопалиолы позволяет отличить маннозамин от галактозамина (использованная система буферов, как и большинство других описанных систем для аминокислотного анализа, независимо от режима элюирования не обеспечивает удовлетворительного разрешения этой пары). Включение в указанный список β-аспартилглицина

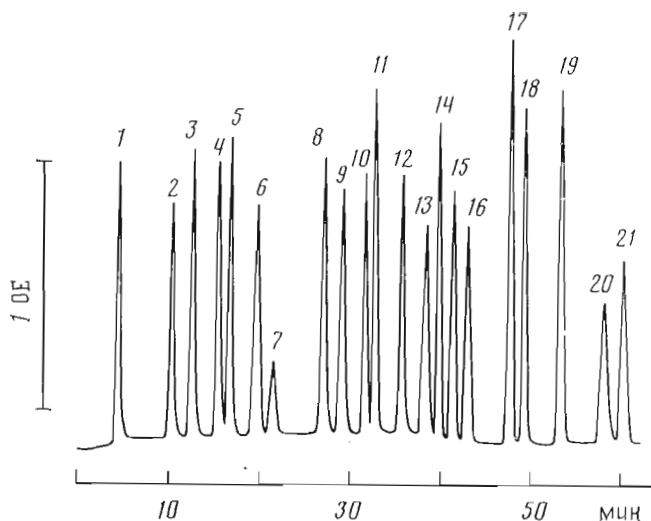


Рис. 2. Анализ смеси стандартных аминокислот и трех производных цистеина (по 10 нмоль каждого компонента) по программе Р-3 (см. табл. 2); 1 — цистеиновая кислота, 2 — S-карбоксиметилцистеин, 3 — аспарагиновая кислота, 4 — треонин, 5 — серин, 6 — глутаминовая кислота, 7 — пролин, 8 — глицин, 9 — аланин, 10 — цистеин, 11 — валин, 12 — метионин, 13 — изолейцин, 14 — лейцин, 15 — тирозин, 16 — фенилаланин, 17 — лизин, 18 — гистидин, 19 — аммиак, 20 — S-2-(пиридил-4)этилцистеин, 21 — аргинин

продиктовано тем обстоятельством, что этот дипептид является своего рода индикатором дисбактериоза кишечника [4], а его относительное содержание в экстрактах фекалий прямо коррелирует со степенью колонизационной резистентности энтерального тракта к условно-патогенным бактериям.

В нашей лаборатории программы Р-1 и Р-2 с успехом используются в структурных исследованиях липополисахаридов, для сравнительного анализа различных партий однотипных питательных сред, а также для непрерывного контроля за составом культуральной жидкости с целью выявления утилизируемых или продуцируемых данным микроорганизмом аминокислот. Хорошей иллюстрацией весьма эффективного применения программы Р-2 для скрининга физиологических жидкостей может служить проводимая в настоящее время работа, направленная на установление связи между появлением или исчезновением некоторых редких аминокислот в фекалиях млекопитающих и изменением состава микрофлоры кишечника (результаты этой работы будут предметом отдельных публикаций).

Программы Р-1 и Р-2, естественно, пригодны и для анализа белковых гидролизатов, однако в силу того, что большинство белков не содержит остатков редких аминокислот, представлялось целесообразным сократить характерный для этих программ большой разрыв между областями элюирования нейтральных и основных аминокислот. Кроме того, в задачу оптимизации такой укороченной программы анализа гидролизатов было включено требование добиться хорошего разделения смеси, содержащей различные производные цистеина.

Как известно, для корректного определения аминокислотного состава белка сульфгидрильные группы остатков цистеина предварительно либо окисляют до сульфогрупп, либо защищают путем обработки белка иодуксусной кислотой, иодацетамидом или 4-винилпиридином. После исчерпывающего кислотного гидролиза белка модифицированные остатки дают соответственно цистеиновую кислоту, S-карбоксиметилцистеин и S-2-(пиридил-4)этилцистеин. Отделить эти производные от всех остальных аминокислот позволяет предлагаемая программа Р-3 (см. табл. 2 и 3 и рис. 2).

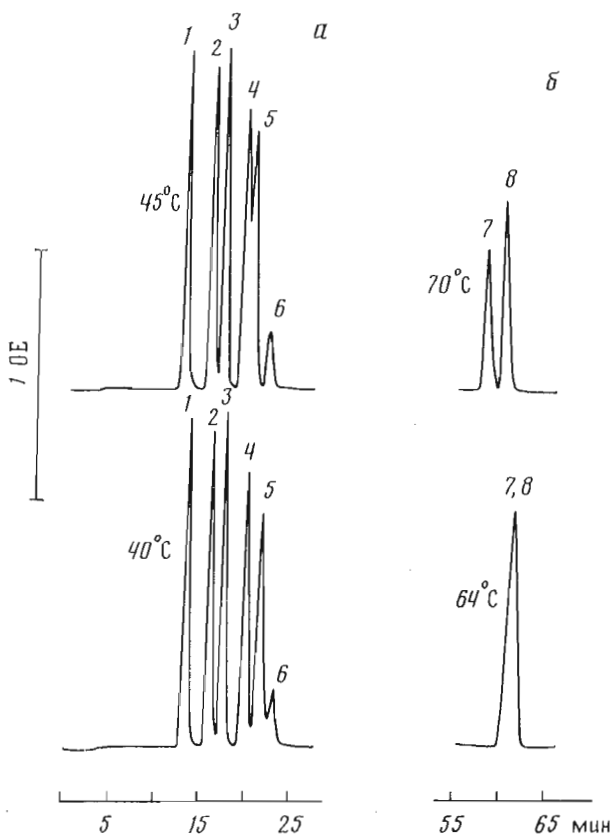


Рис. 3. Влияние температуры колонки на разрешение аминокислот: 1 — аспарагиновая кислота, 2 — треонин, 3 — серин, 4 — гомосерин, 5 — глутаминовая кислота, 6 — пролин, 7 — S-2(пиридил-4)этилцистеин, 8 — аргинин; а — элюирование буфером А, б — элюирование по программе Р-3 (указаны температуры колонки на стадии элюирования буфером Е, время элюирования увеличено на 3 мин)

Описанные программы, безусловно, не могут составить абсолютно универсального набора. Более того, в зависимости от конкретной задачи не только допустима, но и в ряде случаев необходима их модификация. В частности, для количественного определения аминокислот в гидролизатах липополисахаридов, не содержащих примеси белков, достаточно использовать один буфер D (при температуре колонки 60—70° С), а для анализа только основных аминокислот, в том числе гидроксизина и орнитина, вполне пригодна укороченная на три первых шага программа Р-1.

Следует также отметить, что эти программы, возможно, не достаточно оптимальны, поскольку из двух главных критериев оптимума, к которым относится хорошее разрешение всех компонентов смеси и минимальное время анализа, предпочтение было отдано первому. В общем случае подбор оптимальных условий аминокислотного анализа предполагает предварительное изучение влияния состава, ионной силы и рН элюента, а также температуры колонки и скорости элюирования на время удерживания каждого компонента. В рамках же настоящей работы число переменных факторов преднамеренно предельно сокращено. Более того, были наложены жесткие ограничения на изменения температурного режима колонки, поскольку в блоке программирования анализатора предусмотрена возможность запомнить лишь четыре значения температуры. Поэтому, чтобы можно было последовательно анализировать принципиально различающиеся по составу образцы в автоматическом режиме, т. е. чтобы при переходе от одной программы к другой не прерывать работу прибора, во всех программах должен фигурировать один и тот же набор температур колонки.

Тем не менее, несмотря на столь жесткие ограничения, предлагаемые программы позволяют проводить полный анализ смесей, содержащих до 38 нингидринположительных соединений (см. рис. 1). В действительности же общее число соединений, которые можно определять количественно, не меняя выбранную систему буферов, еще больше. Так, например, содержание глутамина и аспарагина, которые по хроматографической подвижности близки соответственно к треонину и серину (см. табл. 3), можно оценить путем сравнения результатов аминокислотного анализа смеси до и после ее кислотного гидролиза. Чтобы отличить  $\alpha$ -аминомасляную кислоту от цистеина, достаточно смесь предварительно обработать тетрагидратом натрия [5]. Образующийся в результате такой обработки S-сульфоцистеин не будет мешать не только обнаружению, но и количественному определению  $\alpha$ -аминомасляной кислоты.

В ряде случаев для увеличения разрешения пиков достаточно лишь незначительно изменить температуру колонки. Так, уменьшение температуры колонки всего лишь на 5° С приводит к увеличению разности времен удерживания глутаминовой кислоты и гомосерина от 0,84 до 1,56 мин (рис. 3а). Еще более яркий пример влияния температуры на разрешение компонентов — это разделение пары аргинин/S-2-(пиридил-4)этилцистеин (рис. 3б). Очевидно, и для многих других соединений кривые зависимости времени удерживания от температуры колонки имеют разный наклон, и не исключено, что такой простой прием, как изменение температурного режима элюирования, может обеспечить вполне удовлетворительное отделение интересующего компонента смеси от всех остальных.

Итак, результаты настоящей работы, имевшей целью лишь на нескольких примерах проиллюстрировать возможность использования одной системы буферов для анализа как гидролизатов белков и пептидов, так и смесей различных нингидринположительных соединений биологического происхождения, дают основания предположить, что для решения конкретных задач можно аналогичным образом адаптировать и другие известные программы аминокислотного анализа в натрий-цитратных буферах.

Автор глубоко благодарен д-ру хим. наук, проф. Б. А. Дмитриеву за постоянное внимание к работе и критические замечания, высказанные при подготовке рукописи к публикации.

### Экспериментальная часть

Работа выполнена на аминокислотном анализаторе LC 5001 (Biotronik, ФРГ), снабженном интегратором C-R2AX (Shimadzu, Япония).

Для приготовления буферных растворов и нингидринового реагента использованы реактивы фирм Merck (ФРГ) и Chemapol (ЧССР) квалификации «для аминокислотного анализа» и деионизованную воду. pH буферных растворов проверяли по истечении не менее суток после их приготовления и в необходимых случаях доводили до нужных значений. Точность определения pH составляла  $\pm 0,003$  ед.

Нингидриновый реагент готовили путем растворения в 1 л предварительно деаэрированной смеси монометилового эфира этиленгликоля и 4 М ацетата натрия, pH 5,5 (3 : 1, по объему) сначала 20 г нингидрина, а затем 0,6 г гидридантина.

В работе использовали эталонные растворы аминокислот для анализа гидролизатов (тип 1 (Chemapol, ЧССР) и тип H (Biotronik, ФРГ)) и для анализа физиологических жидкостей (ANB (Pierce, США), AN+ и B+ (Beckman, США)), а также индивидуальные соединения, L- и DL-аминокислоты производства фирм Merck, Serva (ФРГ), Chemapol (ЧССР), Reanal (ВНР), Sigma (США), L.Light & Co. Ltd (Англия); 5-гидроксилизин (Sigma, США) представлял собой эквимолярную смесь DL- и DL-алло-изомеров.  $\beta$ -Аспартилглицин любезно предоставлен Е. В. Трапезовым (НИИЭМ АМН СССР), S-2-(пиридил-4)этилцистеин — Ц. А. Егоровым (Институт общей генетики АН СССР), маннозамин — Л. В. Старухиной (ВНИИ синтезбелок), фукозамин — С. В. Ковальчук (ТИБОХ ДВНЦ АН СССР). Мурамовая кислота получена путем гидролиза ее N-ацетата (2 н. HCl, 105° С, 18 ч), аминополиолы получены путем обработки соответствующих аминокислот боргидридом натрия.

Образцы для анализа готовили в буфере следующего состава: 33,3 мМ цитрат натрия, 66,6 мМ лимонная кислота, 0,5% 2,2'-тиодизанол (Pierce, США), HCl до pH 2,2.

Анализ нингидринположительных соединений проводили на колонке (3,5 × 235 мм) с ионообменной смолой ВТС 2710 (Biotronik, ФРГ) при скорости подачи буферов и реагента соответственно 0,28 и 0,154 мл/мин. Скорость изменения температуры колонки составляла 2,4 °С/мин, температура реактора — 125° С. Регистрировали поглощение продуктов реакции при 570 и 440 нм.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кастер Т., Нидервизер А. // Хроматография. Практическое приложение метода / Ред. Э. Хефтман. М.: Мир, 1986. Ч. 1. С. 43—56.
2. Murayama K., Sugawara T. // J. Chromatogr. 1981. V. 224. N 2. P. 315—321.
3. Murayama K., Shindo N. // J. Chromatogr. 1977. V. 143. № 2. P. 137—152.
4. Чахава О. В., Рубан С. З., Шустова Н. М., Юрьева Э. А. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1985. № 8. С. 15—18.
5. Liu T.-Y., Inglis A. S. // Meth. Enzymol. 1972. V. 25B. P. 55—60.

Поступила в редакцию  
15.X.1987

### AMINO ACID ANALYSIS OF PROTEINS AND PHYSIOLOGICAL FLUIDS IN A SINGLE SYSTEM OF SODIUM CITRATE BUFFERS

RODIONOV A. V.

*N. F. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

Programmes for automatic analysis of protein and peptide hydrolysates and physiological fluids in a single system of sodium citrate buffers are proposed. Retention time values of 59 ninhydrin-positive substances, including nonprotein amino acids, amino sugars (muramic acid, glucosamine, galactosamine, mannosamine and fucosamine) and corresponding aminopolyols, as well as three cysteine derivatives, viz. cysteic acid, S-carboxymethylcysteine and S-2-(pyridyl-4)ethylcysteine, have been determined. Several examples illustrate an increase of the resolution simply by change of the temperature programme of the column and (or) elution time.