



УДК 577.112.6:543.544

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
ПЕПТИДНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ, ИХ ФРАГМЕНТОВ
И ПРОИЗВОДНЫХ
III. ЗАКОНОМЕРНОСТИ СОРБЦИИ, ПРОГНОЗИРОВАНИЕ УДЕРЖИВАНИЯ
И АНАЛИЗ ПЕПТИДОВ МЕТОДОМ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ

Григорьева В. Д., Шату В. Д.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Рассмотрены особенности хроматографического поведения и прогнозирование удерживания незащищенных линейных и циклических пептидов в режиме обращенно-фазовой хроматографии на алкилсиликагелях. Наблюдение хроматографических свойств этих соединений позволило уточнить статистическую модель удерживания, полученную для частично или полностью защищенных пептидов, и распространить ее на свободные линейные и циклические пептиды. Проведено сравнение параметров статистических моделей удерживания для двух обращенно-фазовых сорбентов Zorbax ODS и Silasorb C18.

Математическому моделированию удерживания пептидов в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ посвящен ряд работ [1—4]. Наш подход [4] был основан на моделировании величины удерживания пептидов как функции их гидрофобности и концентрации органического компонента подвижной фазы. Была показана возможность прогнозирования удерживания пептидов на Zorbax ODS на основе аддитивной оценки гидрофобности, проявляемой в условиях обращенно-фазовой хроматографии. Предметом исследования были в основном линейные N- и C-защищенные пептиды.

В настоящем сообщении рассматриваются особенности хроматографического поведения и прогнозирование удерживания незащищенных линейных и циклических пептидов, проводится сравнение моделей удерживания для октадецилсиликагелей двух различных фирм-производителей.

Известно, что алкилсиликагели различных марок, аналогичные по методу химического связывания лигандов и их структуре, могут довольно значительно различаться по хроматографическим свойствам. В связи с этим заслуживает внимания вопрос о том, насколько универсальны модели сорбции, в какой мере закономерности, справедливые для обращенно-фазового сорбента одной марки, могут быть распространены на аналогичные сорбенты других марок. Закономерности сорбции защищенных пептидов, рассмотренные нами ранее, выражаются следующими уравнениями:

$$\lg k' = a + b \lg C, \quad (1)$$

$$a = a_0 + a_1 \lg P, \quad (2)$$

$$b = b_0 + b_1 \lg P, \quad (3)$$

$$a = a_2 + a_3 b, \quad (4)$$

$$\lg k' = a_4 + a_5 \lg P, \quad (5)$$

$$\lg k' = b_2 + b_3 \lg P + b_4 \lg C + b_5 \lg P \lg C, \quad (6)$$

где k' — коэффициент емкости, C — концентрация ацетонитрила в подвижной фазе (моль/л), P — коэффициент распределения в системе октанол — вода, рассчитанный по методу Реккера [5] и модифицированным инкрементам [4], $a_0, a_1, a_2, a_3, a_4, a_5, b_0, b_1, b_2, b_3, b_4, b_5$ — коэффициенты.

Сравнение параметров этих моделей для сорбентов Zorbax ODS и Silasorb C18 показало (табл. 1), что закономерности (1) — (6) выполняются приблизительно с одинаковой точностью на обоих сорбентах. Числовые значения коэффициентов близки для этих материалов. Таким образом,

Сопоставление моделей удерживания пептидов на двух обращенно-фазовых сорбентах *
Подвижная фаза — $\text{CH}_3\text{CN} - 0,1 \text{ M KН}_2\text{PО}_4$, pH 2,5

Уравнение	Сорбент	Параметры уравнения	r	n	σ	Примечание
(1)	Z	$\lg k' = 5,5 - 5,65 \lg C$	0,997	5	0,030	Вос-Lys-(Z)-Pro-Val-Gly
	S	$\lg k' = 5,4 - 5,55 \lg C$	0,996	5	0,046	
(2)	Z	$a = 3,33 + 0,800 \lg P$	0,75	21	1,39	Соединения (I) — (XXI) [4]
	S	$a = 3,58 - 0,852 \lg P$	0,72	21	1,73	
(3)	Z	$b = -3,90 - 0,620 \lg P$	0,68	21	1,31	То же
	S	$b = -4,19 - 0,657 \lg P$	0,63	21	1,67	
(4)	Z	$a = -1,001 - 1,168 b$	0,992	21	0,269	»
	S	$a = -0,835 - 1,127 b$	0,982	21	0,454	
(5)	Z	$\lg k' = -0,595 + 0,231 \lg P$	0,962	12 **	0,131	$\text{CH}_3\text{CN} - 0,1 \text{ M}$ $\text{KН}_2\text{PО}_4$ (pH 2,5), 1:1
	S	$\lg k' = -0,552 + 0,241 \lg P$	0,877	10 ***	0,237	
(6)	Z	$\lg k' = 2,34 + 0,571 \lg P - 2,81 \lg C - 0,4 \lg C \lg P$	0,932	33	0,165	Соединение (I) — (XXI) [4]
	S	$\lg k' = 2,47 + 0,751 \lg P - 3,0 \lg C - 0,561 \lg C \lg P$	0,923	35	0,169	

* Z — Zorbax ODS, S — Silasorb C 18, r — коэффициент корреляции, n — число измерений, σ — стандартное отклонение вычисленных значений функции от экспериментальных.

** Соединения (I), (III) — (XIII) [4].

*** Соединения (I), (III) — (VI), (VIII) — (X), (XII), (XIII) [4].

Рис. 1. Зависимость $\lg k' - \lg P$ для обращенно-фазовых сорбентов Zorbax C8 (I), Zorbax ODS (II) для соединений Tyr-Phe-Gln-Asn-NHMe (1), Tyr-D-Orn-Gly-Phe (2), Val-Phe-Lys (3), Tyr-D-Arg-Gly-NH₂ (4), Tyr-Phe-Arg-Lys-Asp (5), Tyr-D-Orn-Gly-Phe

Met (6), Val-Arg-Lys-Asp (7), Tyr-Phe-Arg-Lys-Asn (8), Arg-Pro-Arg-Pro-Tyr (9), Lys-Tyr-Ser-His-Pro-Glu- (10).
Подвижная фаза: CH₃CN - 0,1 M AcONH₄, 1 : 9

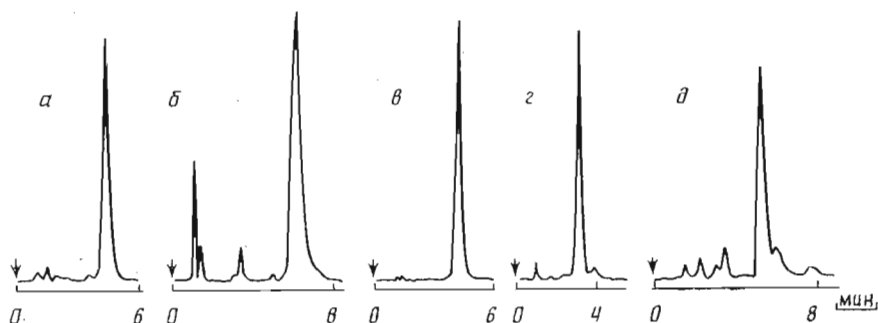
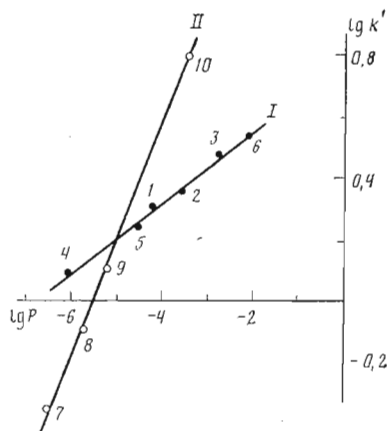


Рис. 2. Хроматография синтетических пептидов и лекарственных форм на их основе: а - пентагастрин (Zorbax C8, CH₃CN - 0,1 M AcONH₄, 29 : 71, $k' = 3,6$); б - дигидротиротилибериин (Silasorb C18, 0,1 M AcONH₄, $k' = 5,5$); в - аргинин - вазопрессин (Silasorb C18, CH₃CN - 0,1 M AcONH₄, 15 : 85, $k' = 3,0$); г - окситоцин (Silasorb C18, CH₃CN - 0,1 M AcONH₄, 18 : 82, $k' = 3,2$); д - дезаминоокситоцин (Silasorb C18, CH₃CN - 0,1 M AcONH₄, 22 : 78, $k' = 6,5$)

влияние основных структурных и композиционных факторов в данных системах одинаково. Коэффициенты корреляции уравнений (4) для обеих неподвижных фаз высоки, а параметры a_2 и a_3 близки по величине. Это свидетельствует о близости механизмов сорбции различных веществ рассматриваемого ряда на двух сорбентах. К аналогичному выводу приводит и анализ линейной зависимости между величинами $\lg k'$ для соединений (I) - (XXI) [4], измеренными на двух сорбентах:

$$\lg k'_s = c + d \lg k'_z; c = 0,036; d = 1,1; r = 0,99; \sigma = 0,07,$$

где k'_s, k'_z - коэффициенты емкости соединения на Silasorb C18 и на Zorbax ODS в тех же условиях. Наличие хорошей корреляции, близость коэффициента d к единице, а c к нулю говорят о близости механизмов сорбции [6].

Данные рис. 1 позволяют также сравнить поведение пептидов на октил- и октадецилсиликагелях Zorbax C8 и Zorbax ODS: зависимость $\lg k' - \lg P$ в обоих случаях хорошо описывается линейным уравнением (5), однако для октилсиликагеля угловой коэффициент значительно меньше, чем для октадецилсиликагеля. По существу это означает, что величины удерживания на сорбенте с меньшей длиной цепи алкильного радикала менее чувствительны к структуре разделяемых соединений. Такие сорбенты предпочтительны при анализе сложных смесей сорбатов, сильно различающихся по строению, в то время как большая длина цепи способствует лучшему разделению близких по строению веществ.

В ходе использования уравнения (6) для прогнозирования величин

Прогнозирование значений $\lg k'$ *
 Колонка Zorbax ODS, подвижная фаза — $\text{CH}_3\text{CN} - 0,1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$, pH 2,5

Таблица 3

Номер	Вещество	[CH_3CN], %	$\lg k'$		$\frac{k'_{\text{расч}}}{k'_{\text{эксп}}}$
			расч.	эксп.	
1	Boc-Trp-Gly-ONb	45	0,52	0,60	-0,08
2	Boc-Val-Lys(Z)-Val-Tyr-Pro-OBzl	55	0,78	0,60	-0,06
3	Z-Lys(Boc)-His(Bzl)-Pro-Gly-ONb	50	0,71	0,80	-0,09
4	Boc-Tyr-(Bzl)-D-Met-Gly-ONb	50	0,58	0,54	0,04
5	Boc-Glu-Gln-Phe-Glu-OBu ^t	70	0,63	0,70	-0,07
6	NH-(CH ₂) ₆ -NH-Met-Leu-Z	55	0,41	0,18	-0,07
7	Boc-Glu-Gln-Phe-Gly-OBu ^t	60	0,79	0,78	0,01
8	Boc-Glu(OBzl)-His-Phe-Lys(Z)-Trp-Gly-ONb	45	0,74	0,69	0,05
9	Z-Glu-(OBu ^t)-His(Bzl)-Phe-Arg(NO ₂)-Trp-Gly Z-Glu-Phe-Phe-Gly-OBu ^t	50	0,48	0,60	-0,12
10	NH-(CH ₂) ₆ -NH ₂ Boc-Phe-Arg(NO ₂)-Lys-Arg(NO ₂)-Pro-Pro-Gly-Phe- Ser(Bzl)-Pro	45	0,81	0,90	-0,09
11	Z-Lys-Tyr(Bzl)-Leu-Pro-Thr(Bzl)	45	0,87	0,78	0,09
12	Boc-Ala-Glu(OBzl)-NH ₂	30	0,64	0,60	0,04
13	Lys-Tyr-Ser-His-Pro-Glu-	15	0,0	0,16	-0,16
14	Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-Arg-	25	0,48	0,58	-0,10
15	Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe	20	0,16	0,32	-0,16
16	Tyr-D-Orn-Gly-Phe-	10	0,95	0,91	0,04
17	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	15	0,55	0,62	-0,07
18	Tyr-D-Orn-Gly-Phe	10	0,30	0,18	0,12
19	Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	15	0,35	0,48	-0,13
20	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys	15	0,39	0,48	0,01
21	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-	15	1,12	1,04	0,08
22	[Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Phe-	20	1,04	1,03	0,01
23	Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ala-Lys-	20	0,57	0,60	-0,03
24	Lys-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Arg-	20	0,70	0,58	0,12
25	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂	20	0,095	0,105	-0,01

* Уравнение (6) табл. 1.

удерживания было замечено, что набор параметров, приведенных в табл. 1, обеспечивающий довольно высокую точность прогнозирования для защищенных хотя бы по одному из концов молекул пептидов, приводит к недостаточно точным результатам для свободных пептидов. Можно представить себе два выхода из этого затруднения: либо найти набор параметров уравнения (6), оптимальный для каждого структурного типа пептидов, либо ввести дополнительные инкременты, учитывающие специфику гидрофобности и способности к межмолекулярным взаимодействиям. Появление в молекулах пептидов двух незащищенных концевых групп приводит к несколько неожиданному неаддитивному снижению гидрофобности. Этот эффект особенно выражен в случае циклических пептидов. Наблюдение хроматографических свойств соединений этой группы позволило ввести поправки, учитывающие особенности свободных линейных и циклических пептидов:

$$\lg P_{\text{лин}} = \lg P - 3, \quad (7)$$

$$\lg P_{\text{цикл}} = \lg P - 4. \quad (8)$$

Введение этих поправок дало возможность распространить уравнение (6) на пептиды различных групп: защищенные по обоим концам или по одному из концов молекулы свободные линейные и циклические. Оно позволяет с достаточной для практики точностью оценивать пригодность тех или иных составов подвижной фазы для хроматографического анализа пептидов заданной структуры. Результаты наших расчетов для пептидов различных типов представлены в табл. 2. Рассмотренные закономерности использованы при разработке методик анализа ряда синтетических пептидов и экспериментальных лекарственных форм на их основе (рис. 2).

Экспериментальная часть

Удерживание исследуемых соединений оценивали величиной коэффициента емкости

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0},$$

где t_r — время удерживания соединения, t_0 — время выхода несорбирующего вещества (нитрат натрия).

Времена удерживания измеряли на хроматографах моделей 830 и 850 (Du Pont, США), в работе использовали колонки длиной 150 и 250 мм с внутренним диаметром 4,6 мм, заполненные сорбентами Zorbax ODS, Silasorb C18 и Zorbax C8 с размерами частиц 5 мкм. Для приготовления подвижных фаз использовали ацетонитрил марки ч., 0,1 М К-фосфатный буфер, доведенный до pH 2,5 добавлением фосфорной кислоты, и 0,1 М ацетат аммония (pH 5,0). Расход подвижной фазы 1,5 мл/мин. Разделенные соединения детектировали по УФ-поглощению при 215–230 нм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sasagawa T., Okuyama T., Teller D. C. // J. Chromatogr. 1982. V. 240. № 2. P. 329–340.
2. Hearn M. T. W., Aquilar M. I., Mant C. T., Hodges R. S. // J. Chromatogr. 1988. V. 438. № 2. P. 197–210.
3. Sakamoto Y., Kawakami N., Sasagawa T. // J. Chromatogr. 1988. V. 442. P. 69–79.
4. Григорьева В. Д., Шару В. Д., Бривкалне Л. А., Чипенс Г. И. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 7. С. 869–877.
5. Rekker R. F. // The Hydrophobic Fragmental Constant. Amsterdam: Elsevier, 1977. P. 300–305.
6. Melander W., Stoveken J., Horvath C. // J. Chromatogr. 1980. V. 199. № 1. P. 35–56.

Поступила в редакцию
15.IX.1988
После доработки
29.XII.1988

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF PEPTIDE
BIOREGULATORS, THEIR PRAGMENTS AND DERIVATIVES.

III. SORBTION REGULARITIES, RETENTION TIME
PREDICTION AND ANALYSIS OF PEPTIDES USING REVERSED
PHASE HPLC

GRIGORJEVA V. D., SHATZ V. D.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian
SSR, Riga*

Parameters of statistical models of fully or partially protected peptides' retention on Zorbax ODS and Silasorb C18 have been compared. The proposed model can be used for non-protected linear and cyclic peptides. Special increments have to be introduced in calculation of hydrophobicity of these peptides.