



УДК 577.543

© 1990 г.

С. В. Галушко, М. Ю. Белик, В. А. Солоденко,  
Т. Н. Кашева, В. П. Кухарь

## ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ФОСФОНОДИПЕПТИДОВ

Институт биоорганической химии АН УССР, Киев

Диастереомеры свободных фосфонидипептидов эффективно разделяются посредством обращенно-фазовой ВЭЖХ на октадецильных сорбентах при  $\text{pH} < 5$ . Для разделения диастереомерных защищенных пептидов целесообразно использовать адсорбционную ВЭЖХ на нитрильных сорбентах, применяя в качестве элюента смеси гексана и изопропанола.

Аминофосфоновые кислоты и пептиды на их основе привлекают все большее внимание как перспективный класс биологически активных соединений [1, 2]. В этой связи важно получать аминофосфоновые кислоты и фосфопептиды высокой оптической чистоты.

Немного известно о возможности разделять изомерные фосфопептиды при помощи жидкостной хроматографии. Так, например, изомеры диэтилового эфира 1-(*N-L*-аланиламино)бензилфосфоновой кислоты делили на сульфокатионите [3]. Диастереомеры некоторых диалкиловых эфиров *L*-фенилаланил-1-аминоалканфосфоновых кислот не слишком успешно разделяли на силикагеле [4].

Целью настоящей работы было применить различные варианты ВЭЖХ для разделения диастереомерных фосфонидипептидов, различающихся конфигурацией  $\alpha$ -углеродного атома остатка аминофосфоновой кислоты.

Наименее гидрофобный из изученных соединений фосфопептид *L-Ala-L, D-AlaP* (I) весьма слабо удерживается на октадецильных сорбентах. В этом случае целесообразно использовать в качестве элюента растворы сульфата аммония. При увеличении его концентрации от 1,5 до 3 М возрастает как удерживание, так и селективность разделения ( $\alpha$ ) диастереомеров (табл. 1). В случае соединения *L-Val-L, D-AlaP* (II) селективность разделения диастереомеров достигает значения 2,16 при отсутствии в подвижной фазе метанола. Дальнейшее увеличение гидрофобности дипептидов — соединения *L-Leu-D, L-PheP* (III) и *L-Phe-L, D-LeuP* (IV) не приводит к улучшению разделения диастереомеров.

Если сравнить хроматографическое поведение дипептида *L-Leu-D, L-Phe* (V) и его фосфонового аналога (III), то у последнего в сравнимых условиях меньше как время удерживания, так и селективность разделения диастереомеров. Замена карбоксильной группы на фосфоновую сильнее сказывается на сорбируемости *L-D*-пептида.

Время удерживания и селективность разделения диастереомеров фосфонидипептидов значительно вырастают при уменьшении pH в интервале 5—7, соответствующем одному из рК диссоциации фосфоновой группы (рК  $\sim$  5—6) (рис. 1). Благодаря этому при  $\text{pH} < 5$  возможны достаточно большие нагрузки, что весьма облегчает препаративные разделения.

Принятые сокращения: для  $\alpha$ -аминоалкилфосфоновых кислот, являющихся аналогами природных аминокислот, используются общепринятые обозначения последних с индексом *P*, например — *L, D-1-(N-L-аланиламино)этилфосфоно*вая кислота (*L-Ala-L, D-AlaP*), диэтиловый эфир *L, D-1-(N-бензилоксикарбонилфенилаланиламино)-3-метилбутилфосфо*новой кислоты (*Z-L-Phe-L, D-LeuP(OEt)<sub>2</sub>*).

Удерживание *L-D*-изомера и селективность разделения диастереомеров при хроматографировании фосфолипидов

Вещество	Колонка	Содержание МЭП в элюенте, % по объему	$k'_2$	$\alpha = k'_2/k'_1$ **
(I)	Б	1,5 *	1,469	2,17
		3,0 *	3,384	5,76
(II)	А	0	0,735	2,16
		10	0,337	1,55
(III)	А	30	2,145	1,4
		40	1,02	1,43
	Б	30	9,11	1,73
		40	4,72	1,65
(VI)	А	62	4,26	1,17

\* Концентрация сульфата аммония, М.

\*\*  $k'_1$  и  $k'_2$  — коэффициенты емкости *L-L*- и *L-D*-диастереомеров.

Таблица 2

Параметры уравнения  $\ln k' = A - B \cdot \ln C^*$  описывающего удерживание при адсорбционной ВЭЖХ защищенных фосфолипидов

Вещество	Колонка	<i>L-D</i>		<i>L-L</i>	
		А	В	А	В
(VI)	Г	3,21	1,25	3,31	1,29
	В	2,88	1,44	2,88	1,44
(VII)	Г	3,01	1,29	3,55	1,41
	В	2,16	1,31	2,76	1,5
(VIII)	Г	2,11	1,11	2,43	1,19
	В	1,38	1,27	1,56	1,34
(IX)	Г	3,63	1,30	3,92	1,40
	В	3,28	1,44	3,48	1,52

\*  $C$  — концентрация изопропанола (% об.).

Аминокислотная последовательность изомерных фосфолипидов: *L-Leu-L,D-PheP* (III) и *L-Phe-L,D-LeuP* (IV) слабо влияет на времена удерживания *L-L*-диастереомеров, но по-разному сказывается на удерживании *L-D*-диастереомеров, что приводит к разнице в селективности (рис. 2).

Защищенные пептиды гораздо лучше сорбируются на октадецильных колонках, но разделить диастереомеры на них удалось только в случае соединения *Z-L-Phe-D,L-LeuP* (OEt)<sub>2</sub> (VI). Очевидно, в защищенных пептидах с сорбентом взаимодействуют главным образом гидрофобные защитные группы, тогда как у незащищенных пептидов основной вклад во взаимодействие вносят те участки молекул, которые различаются своей конфигурацией.

Чтобы исключить или уменьшить вклад гидрофобных защитных групп в связывание с сорбентом, мы применили адсорбционную хроматографию на нитрильном и аминопропильном сорбентах (подвижная фаза — гексан, изопропанол) для разделения защищенных фосфолипидов (рис. 3).

В табл. 2 приведены параметры уравнений, описывающих зависимость удерживания изомеров от концентрации изопропанола в элюенте. Нам

Рис. 1. Зависимость от pH коэффициента емкости ( $k_1'$ ) *L-L*-диастереомеров и селективность разделения ( $\alpha$ ) диастереомеров при обращенно-фазовой ВЭЖХ фосфонидипептидов (II) (кривые 1, 3) и (III) (кривые 2, 4) (условия см. «Экспер. часть») L |

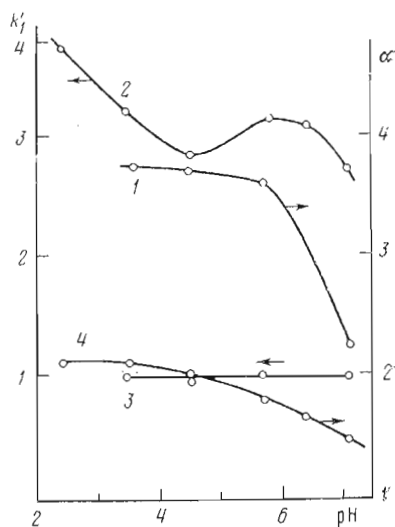


Рис. 1

Рис. 2. Разделение диастереомеров при ВЭЖХ фосфонидипептидов (IV) (а) и (III) (б). Колонка А, 40% MeOH,  $10^{-2}$  М фосфатный буфер, pH 7,1; 0,5 мл/мин

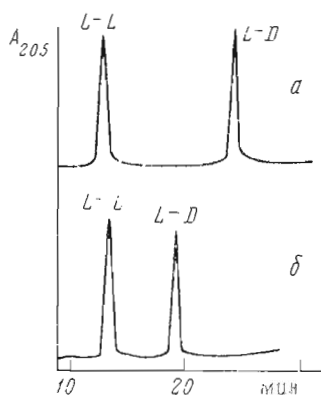


Рис. 2

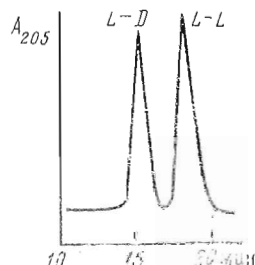


Рис. 3

удалось полностью разделить диастереомеры всех изученных защищенных дипептидов.

В одинаковых условиях (1% изопропанола) селективность разделения диастереомеров на нитрильном сорбенте уменьшается в ряду: *Z-L-Val-L,D-AlaP* (OPr<sup>t</sup>)<sub>2</sub> (VII) > *Woc-L-Leu-L,D-PheP* (OPr<sup>t</sup>)<sub>2</sub> (VIII) > > *Z-L-Ala-L,D-AlaP* (OPr<sup>t</sup>)<sub>2</sub> (IX) > (VI), а на аминопропиловом сорбенте — (VII) > (IX) > (VIII) > (VI). В целом селективность разделения и удерживание защищенных фосфонидипептидов выше на нитрильном сорбенте.

### Экспериментальная часть

Вещества получали по методикам [5, 6]. Для приготовления элюентов использовали дважды дистиллированную воду и растворители марки х.ч. Хроматографирование осуществляли на модульной системе (ЛКВ, Швеция), состоящей из насоса 2150, спектрального детектора 2140 и интегратора 2220, используя колонки Octadecyl Polyol Si 100 (5 мкм, 4,6 × 250 мм, Serva, ФРГ) (А), Separon SIX C-18 (5 мкм, 3 × 150 мм, ЧСФР) (Б), Separon SIX NH<sub>2</sub> (5 мкм, 3 × 150 мм, ЧСФР) (В) и Separon SIX CN (5 мкм, 3 × 150 мм, ЧСФР) (Г). Скорость потока для колонки (А) 0,5 мл/мин, а для остальных 0,25 мл/мин.

Применялись элюенты: а) смесь MeOH с  $10^{-2}$  М фосфатным буфером, pH 7,1 (изучение влияния метанола); б)  $10^{-2}$  М H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, нейтрализованная до нужного значения pH аммиаком (0% MeOH для (II), 20% MeOH для

(III)) (изучение влияния рН); в) смеси изопропанол — гексан (изучение влияния изопропанола).

Колонку уравнивали, прокачивая 6—10 колоночных объемов элюента. Время удерживания ( $t_R$ ) определяли как среднее трех измерений. Относительное отклонение не превышало 2% (отн.). Коэффициент емкости ( $k'$ ) определяли по формуле

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

где  $t_0$  — время элюирования несорбирующегося компонента ( $\text{KNO}_3$  в обращенно-фазовой ВЭЖХ и  $\text{CCl}_4$  в нормально-фазовой ВЭЖХ).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Allen J. G., Atherton F. R., Hall M. J., Hassall C. H., Halmes S. W., Lambert R. W., Nisbet L. J., Ringrose P. S. // *Nature*. 1978. V. 272. № 5648. P. 56—58.
2. Mastalerz P., Kupczk-Subotkowska L., Nerman Z. S., Laskawiec G. // *Naturwissenschaften*. 1982. V. 69. № 1. P. 46—47.
3. Белоз Ю. П., Дзганкоз В. А., Цырянкин В. А., Рогожин С. В. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1975. № 7. С. 1619—1620.
4. Kupczyk-Subotkowska L., Mastalerz P. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1983. V. 21. № 5. P. 485—490.
5. Atherton F. R., Hassall C. H., Lambert R. W. // *J. Med. Chem.* 1986. V. 29. P. 29—40.
6. Солоденько В. А., Кашева Т. Н., Кухарь В. П. // *Журн. общей химии*. 1989. Т. 59. Вып. 12. С. 2786—2787.

Поступила в редакцию  
25.VII.1989

После доработки  
8.V.1990

S. V. GALUSHKO, M. Y. BELIK, V. A. SOLODENKO, T. A. KASHEVA,  
V. P. KUKHAR

#### HPLC OF PHOSPHONODIPEPTIDES

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the Ukrainian SSR, Kiev*

Chromatographic (RP HPLC and NP HPLC) behaviour of some phosphonodipeptides diastereoisomers has been investigated, including the influence of the mobil phase composition on retention and selectivity of separation and conditions of optimal isocratic separation.