



УДК 577.112.6:543.544

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ЖИДКОСТНАЯ
ХРОМАТОГРАФИЯ ЗАЩИЩЕННЫХ ПЕПТИДОВ НА МЯГКИХ
И ПОЛУЖЕСТКИХ ГЕЛЯХ***Дейгин В. И., Ульяшин В. В., Иванов В. Т.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва**Нефедов П. П., Жмакина Т. П., Беленький Б. Г.**Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР, Ленинград*

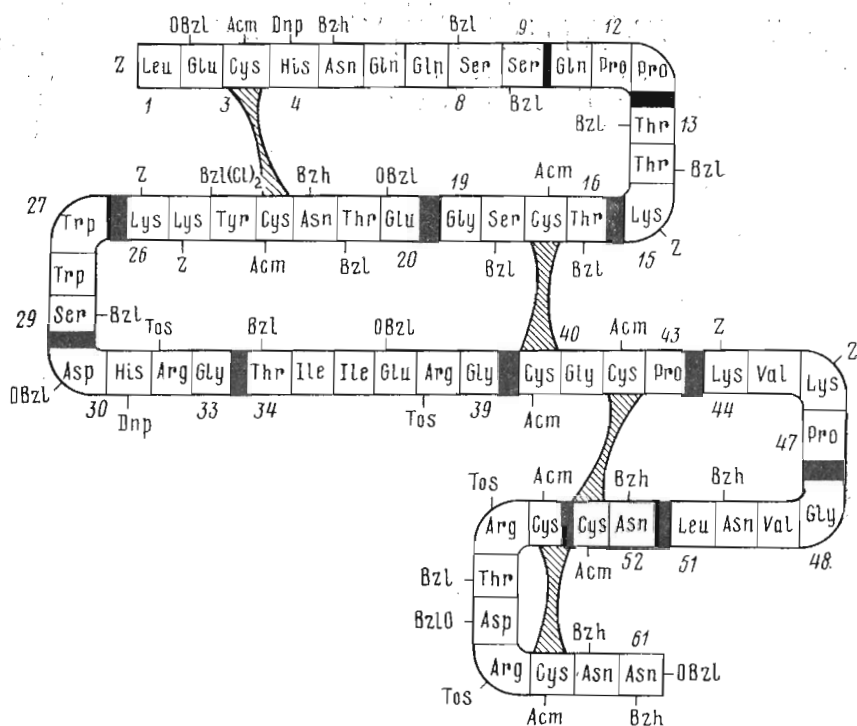
Исследована возможность использования мягких и полужестких гелей для высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии защищенных пептидов — фрагментов нейротоксина II из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*. В качестве мягких гелей исследованы сефадексы LH-20, LH-60 и энзакирил К-2, из полужестких — сфероны Р-40, Р-300 и Р-1000. Обсуждаются возможности и ограничения каждого типа гелей при хроматографии защищенных пептидов в органических растворителях.

Синтез биологически активных пептидов имеет многолетнюю практику. От синтеза окситоцина [1], насчитывающего девять аминокислотных остатков, до синтеза такого крупного полипептида, как β -липотропин [2], содержащий 91 аминокислоту, прошло почти три десятилетия. За это время предпринимались многочисленные попытки синтеза крупных полипептидов, чаще всего оканчивавшиеся неудачей [3]. Одна из главных причин этих неудач — отсутствие эффективных методов очистки промежуточных защищенных пептидов как от исходных соединений, так и от различных побочных продуктов, образующихся почти на каждой стадии синтеза. Такие методы, как экстракция, кристаллизация и пересаживание, пригодны для очистки самых простых пептидов; адсорбционная хроматография на открытых стеклянных колонках применима лишь для пептидов, хорошо растворяющихся в таких растворителях, как хлороформ, этилацетат, или в смеси этих растворителей с метанолом. В большинстве случаев пептиды, имеющие больше пяти—семи аминокислотных остатков, растворимы только в полярных растворителях, таких, как диметилформамид и диметилсульфоксид, поэтому их очищают, как правило, гель-фильтрацией на мягких органических гелях.

В настоящее время в литературе появились работы, описывающие успешное применение высокоэффективной жидкостной хроматографии для разделения, очистки и анализа свободных и защищенных пептидов [4—9].

Свободные (незащищенные) пептиды удается успешно анализировать и выделять с помощью эксклюзионной, обращенно-фазовой и ионообменной жидкостной хроматографии. Чрезвычайно полезные для свободных пептидов, эти методы пока не нашли широкого применения для очистки синтетических защищенных пептидов. Например, использование ионообменной жидкостной хроматографии ограничено отсутствием у большинства защищенных пептидов ионогенных групп. Низкая растворимость синтетических защищенных пептидов в неполярных растворителях, обычно используемых для адсорбционной хроматографии, и водных системах, применяемых для обращенно-фазовой хроматографии, затрудняет использо-

Использованы стандартные символы для обозначения защитных групп, рекомендуемые номенклатурным комитетом IUPAC — IUB. Кроме того, Aoc — *tert*-амилокси-карбонил; Bzh — бензгидрил; Acm — ацетамидометил; Bzl(Cl₂) — 2,6-дихлорбензил.



Styragel (Waters Ass, США), TSK-Gel (Toyo-Soda, Япония), Bio-Beads (Bio-Rad Laboratory Ltd, США), полиакрилметакрилатные гели — Spheron P (Lachema, СССР), Sepharon H (Laboratory Pristroje, СССР), поли-N-морфолиновые гели — Enzakryl K, (Koch-Light Laboratory, Великобритания), оксипропилированные декстрановые гели — Sephadex LH (Pharmacia, Швеция) и другие, выпускаемые широкими сериями с различной степенью сшивки, структурой и пределами проницаемости, обычно большими, чем у сефадекса LH-20.

При выборе гелей мы исходили из их относительной доступности, учитывая при этом присутствие в них частиц малого размера, а также устойчивость геля к действию апротонных растворителей и продуктов их распада.

В настоящей работе с целью получения высокоэффективных хроматографических колонок испытанию были подвергнуты следующие гели: сефадексы LH-20 и LH-60, энзакрил К-2, сферы Р-40, Р-300 и Р-1000.

Для характеристики качества колонок использовали следующие параметры: удерживаемый объем, хроматографическую эффективность и разрешающую способность колонки [17].

Удерживаемый объем V_R хроматографического пика индивидуального вещества рассчитывается из уравнения

$$V_R = V_m + K_d V_s, \quad (1)$$

где V_m — объем межчастичного пространства в колонке и подводящих к детектору жидкостных коммуникаций, V_s — полный объем элюента в частицах геля насадки, K_d — коэффициент распределения вещества, зависящий при ЭЖХ от соотношения размеров хроматографируемых молекул и пор геля.

Хроматографическая эффективность оценивается числом теоретических тарелок (т. т.)

$$N = 16 \left(\frac{V_R}{W_v} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{W_t} \right)^2, \quad (2)$$

где t_R — время удерживания пика, W_t и W_v — временной и объемный интервал выхода пика, ограниченный двумя касательными, проведенными в точках перегиба. Эффективность колонки может быть оценена также высотой эквивалентной теоретической тарелки (ВЭТТ)

$$H = L/N, \quad (3)$$

где L — длина столба насадки в колонке.

Разрешающая способность колонки характеризуется коэффициентом разрешения

$$K_R = 2 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_{t_1} + W_{t_2}} = 2 \frac{V_{R_2} - V_{R_1}}{W_{v_1} + W_{v_2}}, \quad (4)$$

где индексы 1 и 2 относятся к очередным выходящим из колонки индивидуальным веществам. При $K_R \geq 1$ пики разделяются полностью.

Использование критериев качества хроматографического носителя и колонки в целом позволяет стандартизировать разделительные системы и сравнивать их между собой, в особенности колонки, заполненные одним и тем же гелем. Основные характеристики изученных гелей и колонок, заполненных ими, приведены в табл. 1.

Рассмотрим вначале данные по мягким гелям. Сефадекс LH-20 упаковывался в виде разбавленной суспензии частиц $40 \leq d_p \leq 56$ мкм, полученной фракционированием на ситах в токе дистиллированной воды из большой партии коммерческого сорбента. Выход нужной фракции составлял ~10%. Коэффициент набухания в воде в диметилформамиде $\gamma \approx 4,2$ мл/г сухого геля [17]. Перед заполнением колонки гель тщательно деаэрировался под вакуумом с перемешиванием до прекращения выделения пузырьков воздуха.

Параметры полученных колонок

Тип сорбента	Фракция геля d_p , мкм	Размеры, см	Эффективность N , т. т.	H , мкм	H/d_p^*
Сефадекс LH-20	40-56	0,8×120	6000	200	3,6
			6500	185	3,3
			8000	150	2,7
	56-70	0,8×60	2500	240	3,4
			3600	167	2,4
3700			162	2,3	
LH-60	100-120	2,5×60	4000	150	2,1
			1200	500	4,2
			1400	570	4,7
Энзакрил К-2	40-45	0,8×60	3000	100	2,2
			5600	143	3,2
Сферон Р-40 Р-300 Р-1000	25-40	1,6×60	3000	200	5,0
	20-25	1,6×60	3200	188	7,5
	25-40	1,6×60	2780	216	5,4

* Рассчитан на максимальный размер частиц геля.

Упаковку колонок производили при разных давлениях. Было обнаружено, что с увеличением давления упаковки до некоторого предела эффективность колонок возрастает. Наиболее эффективными колонки длиной 60 см получались при конечном давлении 5-20 атм. Более высокие давления и соответственно скорости потока ухудшали качество упаковки, что проявлялось в отклонении от гауссовой формы хроматограмм индивидуальных веществ (см., например, рис. 2).

Для выяснения причин этого явления мы изучали зависимость давления упаковки свободно заполненной колонки от скорости потока. Характерная форма кривой зависимости $\Delta P = f(U, t)$ приведена на рис. 3. На графике хорошо различаются три участка, переходящие один в другой в точках 1 и 2. В точке 1 наблюдается первое отклонение от закона Дарси, а за точкой 2 следует резкое нарастание давления. Участок 1-2 отвечает уплотнению насадки и, по-видимому, частичной упругой деформации соприкасающихся между собой частиц геля, что сопровождается повышением селективности насадки за счет увеличения отношения V_s/V_m .

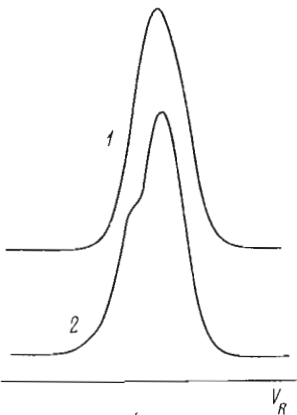


Рис. 2

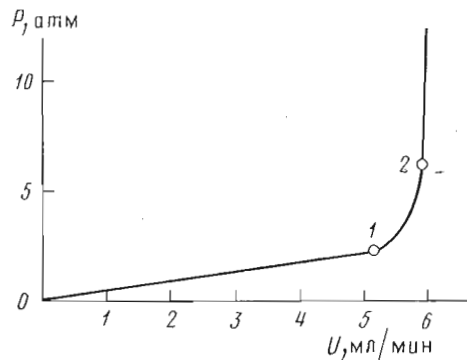


Рис. 3

Рис. 2. Формы пиков индивидуального вещества — нафталина, полученные на колонке, упакованной в оптимальных условиях (1) и при давлении выше оптимального (2)

Рис. 3. Зависимость перепада давления на свободно упакованной колонке (колонка 0,8×60 см, сефадекс LH-20, 40 d_p <math>< 56</math> мкм) от времени при линейно возрастающей во времени скорости элюции. 1 и 2 — критические точки

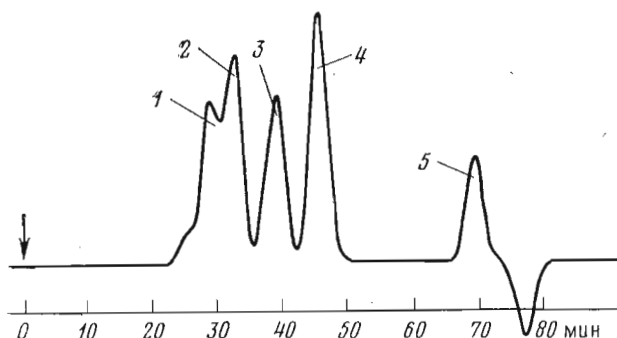


Рис. 4

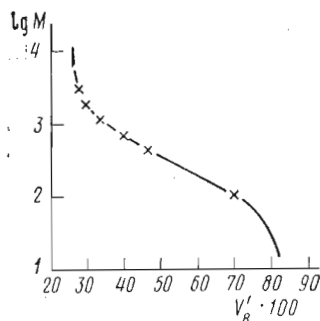


Рис. 5

Рис. 4. Хроматограмма искусственной смеси защищенных пептидов и нафталина (в скобках указана молекулярная масса): 1 - Aoc-Arg⁵⁵(Tos)-Asn⁶¹(Bzh)-OBzl (1963), 2 - Aoc-Arg⁵⁸(Tos)-Asn⁶¹(Bzh)-OBzl (1265), 3 - Boc-Asn⁶⁰(Bzh)-Asn⁶¹(Bzh)-OBzl (768), 4 - Boc-Asn(Bzh)-OBzl (488), 5 - нафталин (130). Колонка 0,8×60 см, U 0,4 мл/мин, детектор - рефрактометр; N 2500 т. т.

Рис. 5. Калибровочная кривая сефадекса LH-20 синтетическими защищенными пептидами, указанными на рис. 4

(см. уравнения (1) и (4)). Колонки, упакованные при таких давлениях (в нашем случае до 5–20 атм), обладают стабильной, эффективной насадкой. При больших давлениях происходит неупругая деформация частиц геля, приводящая к искажению профиля поля скоростей элюента по сечению колонки и нарушению гауссовой формы пиков индивидуальных веществ (см. рис. 2). Деформация частиц к тому же уменьшает объем и распределение пор геля, что должно приводить к дополнительной асимметрии пиков.

Благодаря высокой селективности ($V_s/V_m > 2$) сефадекса LH-20, упакованный надлежащим образом, позволяет разделять относительно низкомолекулярные пептиды с $K_R = 0,8$ при менее чем двукратном отношении молекулярных масс (см., например, рис. 4). Из рис. 5, на котором приведена калибровочная кривая сефадекса LH-20 по защищенным пептидам, видно, что рабочий интервал лежит в пределах молекулярных масс 100–2000.

Колонки диаметром 1,6 и 2,5 см, упакованные сефадексом LH-20, использовали для препаративного (сотни миллиграммов) выделения защищенных пептидов (см., например, рис. 6, 7).

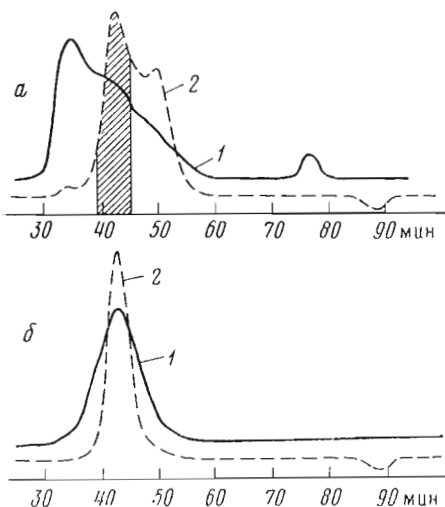


Рис. 6. Очистка пептида Boc-His⁴(Boc)-Pro¹²-OBu^t на сефадексе LH-20 (а) и его рехроматография (б). Колонка 1,6×120 см; U 2 мл/мин, нагрузка - 300 мг исходной смеси. Детектор: 1 - УФ-280 нм, 2 - рефрактометр. Заштрихованная зона отвечает отбираемой фракции

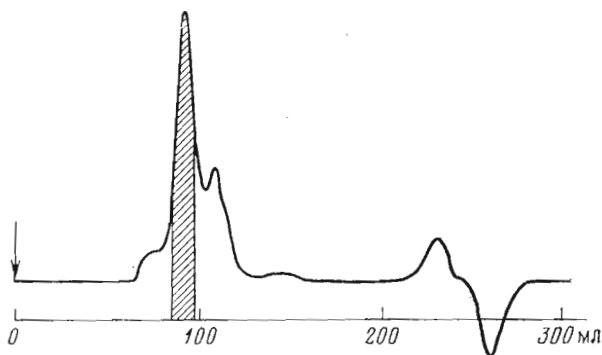


Рис. 7. Выделение пептида $\text{Voc-Trp}^{27}\text{-Gly}^{33}\text{-OH}$ (заштрихованная зона) на колонке ($2,5 \times 45$ см) с сефадексом LH-20. U 5 мл/мин; детектор — рефрактометр, нагрузка 300 мг

Улучшение разделения достигается не только повышением эффективности, но и увеличением длины колонки или их числа, а также использованием рецикла. На рис. 8 показано, как на каждом новом цикле улучшается отделение пептида $\text{Aoc-Arg}^{55}(\text{Tos})\text{-Asn}^{61}(\text{Bzh})\text{-OBzl}$ от примесей. К преимуществу рецикла следует отнести в первую очередь существенную экономию сорбента и растворителя. Чем выше эффективность колонок, тем больше циклов разделения можно на ней провести до перекрывания разошедшихся пиков из двух соседних циклов.

По сравнению с традиционной ЭЖХ на открытых колонках высокоэффективная ЭЖХ позволяет на порядок увеличить скорости разделения при одновременном улучшении разрешения и увеличении нагрузки (см. рис. 9). Здесь же следует особо обратить внимание на целесообразность использования как минимум двух детекторов — спектрофотометрического (λ 280 нм) и рефрактометрического, показания которого ближе соответствуют концентрации пептидов в хроматографических пиках. Два детектора существенно повышают информативность высокоэффективной ЭЖХ ([16], с. 186).

Пятилетняя практика применения высокоэффективной ЭЖХ показала, что стабильность колонок с сефадексом LH-20 характеризуется сроками

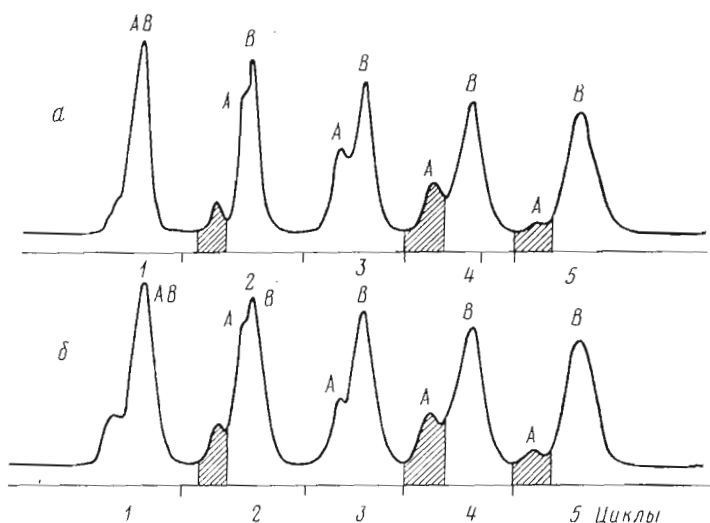


Рис. 8. Очистка фрагмента $\text{Aoc-Arg}^{55}(\text{Tos})\text{-Asn}^{61}(\text{Bzh})\text{-OBzl}$ (B) от примесей (A) в режиме рецикла на колонке с сефадексом LH-20 в DMF (две последовательно соединенные колонки ($1,6 \times 60$ см). U 3 мл/мин; заштрихованные зоны — отбираемые фракции; a — спектрофотометрический (280 нм), b — рефрактометрический детектор

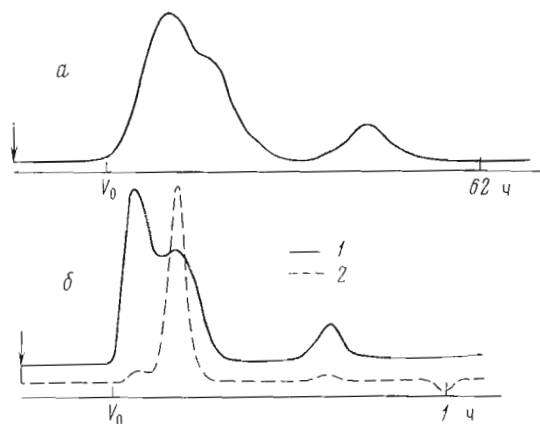


Рис. 9. Хроматографическое отделение защищенного пептида Вос-His⁴-(Tos)-Pro¹²-OBU¹ от примесей, осуществленное: *a* — на открытой стеклянной колонке (40×200 см) при нагрузке 300 мг (*U* 0,6 мл/мин); *б* — на высокоэффективной колонке (1,6×60 см) при той же нагрузке (*U* 2 мл/мин). 1 — спектрофотометрический (280 нм); 2 — рефрактометрический детектор

от 2 до 6 мес при практически круглосуточном использовании. Рабочая скорость потока и давление при этом не должны превышать значений, соответствующих точке 1 рис. 3 для данной колонки. Резкое повышение скорости элюции приводит к падению эффективности колонки, поскольку нарушается внутренняя структура сорбента. Следует отметить, что ЭЖХ некоторых пептидов на сефадексе ЛН-20 сопровождается сорбционными эффектами. Пептиды, содержащие свободные аминокислоты, не защищенные по гуанидиногруппе остатки Arg и по имидазольной группе остатки His и остатки Trp и Tyr, частично сорбируются матрицей геля.

Сефадекс ЛН-60 получают путем оксипропилирования сефадекса G-50. Его коэффициент набухания в воде и диметилформамиде 12,6 и 13,1 мл/г сухого геля соответственно. По сравнению с сефадексом ЛН-20 молекулярно-массовый предел проницаемости геля поднят за счет уменьшения числа штифов, однако это в свою очередь приводит к большей деформируемости частиц сефадекса ЛН-60.

Попытка использовать сефадекс ЛН-60 в качестве сорбента для высокоэффективной ЭЖХ высокомолекулярных, защищенных пептидов не дала желаемых результатов. Узкую фракцию геля ($20 \leq d_p \leq 30$ мкм) упаковать в колонку не удалось вследствие чрезвычайно низкой предельной скорости заполнения. Даже при скорости 1 мл/ч деформация частиц геля приводила к закупориванию колонки. Колонка, упакованная фракцией 100—120 мкм, имела крайне низкую эффективность ($N=1200$ т.т./м). Отдельные положительные результаты, полученные при разделении защищенных пептидов на сефадексе ЛН-60 (см., например, рис. 10), можно отнести в основном за счет сорбционного эффекта. В дальнейшем мы отказались от попыток создания высокоэффективных колонок на основе сефадекса ЛН-60.

Энзакрил К-2, однородносетчатый поли-N-акрилоилморфолиновый гель, был впервые применен для разделения защищенных пептидов в работе [19]. По пределу проницаемости и соответственно деформируемости в потоке гель энзакрил К-2 занимает промежуточное место между сефадексом ЛН-60 и ЛН-20. Колонка размером 0,8×60 см, заполненная фракцией с d_p 40—45 мкм, показала хорошую эффективность ($N=5500$ т.т.) по толуолу при скорости элюции 1 мл/мин; на ней успешно разделялись искусственные смеси полиэтиленгликолей.

Однако вследствие основной природы матрицы геля мы наблюдали при хроматографии значительную сорбцию пептидов (элюция DMF), содержащих свободную карбоксильную группу. Защищенные пептиды, содержащие остаток β-бензилового эфира аспарагиновой кислоты, после хрома-

Рис. 10. Разделение смеси пептидов Аос-Arg⁵⁵(Tos)-Asn⁶¹(Bzh)-OBzl (I) и Н-Thr⁵⁶(Bzl)-Asn⁶¹(Bzh)-OBzl (II) на колонке (2,5×60 см) с сефадексом LH-60 (d_p 100–120 мкм) в DMF, U 5 мл/мин, контроль спектрофотометрический (280 нм)

Рис. 11. Результаты ТСХ защищенного пептида Аос-Arg⁵⁵(Tos)-Asn⁶¹(Bzh)-OBzl до (а) и после (б) хроматографии на колонке с энзакрилом К-2. Пластика 5×2 см (Merck, ФРТ), элюент — CHCl₃ — MeOH — этилацетат, 6 : 3 : 1

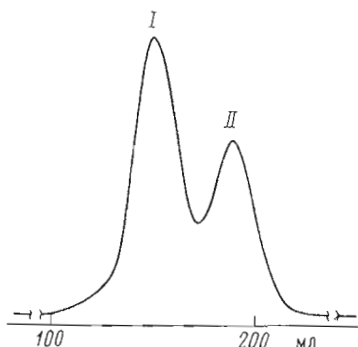


Рис. 10

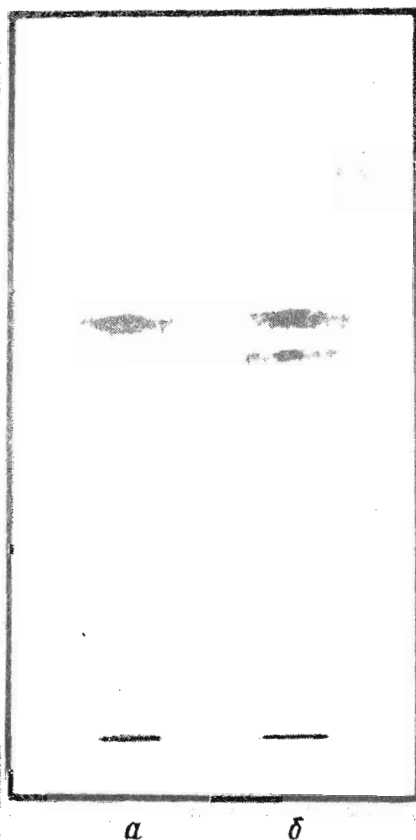


Рис. 11

тографии на колонке с энзакрилом К-2 обнаруживали до 50% примеси с той же молекулярной массой, что и исходный продукт, но имеющий меньшую подвижность при ТСХ (см., например, рис. 11). Вполне вероятно, что эта примесь представляет собой продукт транспептидации по остатку Asp(OBzl) [20], легко протекающей в щелочной среде. По указанным причинам мы отказались от дальнейшего применения этого геля для высокоэффективной ЭЖХ защищенных пептидов.

Таким образом, нам не удалось повысить молекулярно-массовый предел высокоэффективной ЭЖХ защищенных пептидов путем использования слабосшитых мягких однородносетчатых гелей. Кроме того, было обнаружено, что все исследованные мягкие гели при работе частично разрушаются и экструдируют через колоночные фильтры. Поэтому мы перешли к изучению полужестких гетеросетчатых и макропористых гелей, имеющих более прочную матрицу.

Сферон Р (сепарон Н) получается в результате суспензионной сополимеризации 2-оксиэтилметакрилата и этилендиметакрилата, его частицы имеют сферическую форму [20]. Нами были приготовлены колонки, содержащие сфероны Р-40, Р-300 и Р-1000 и имеющие пределы проницаемости (по мол. массам декстранов соответственно 40 000, 300 000 и 1 000 000). Все три геля приблизительно одинаково набухают в воде и диметилформамиде (γ 2,2 мл/г). Параметры колонок, упакованных по стандартной методике ([16], с. 179), приведены в табл. 1. Колонки, упакованные при давлении менее 25 атм, обладали эффективностью около 5000 т.т./м даже при скоростях элюции до 2 мл/мин. Колонки, полученные при давлении упаковки более 25 атм, дают несимметричные пики, подобно изображенному на рис. 2. Причины этого явления, по-видимому, те же, что и в случае сефадекса LH-20, хотя в проспектах фирмы «Lachema» указывается,

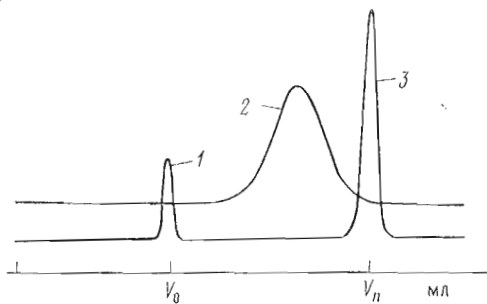


Рис. 12

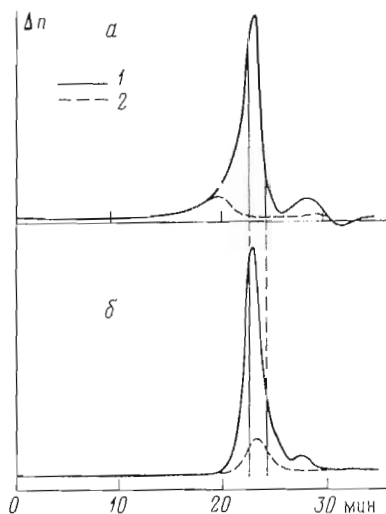


Рис. 14

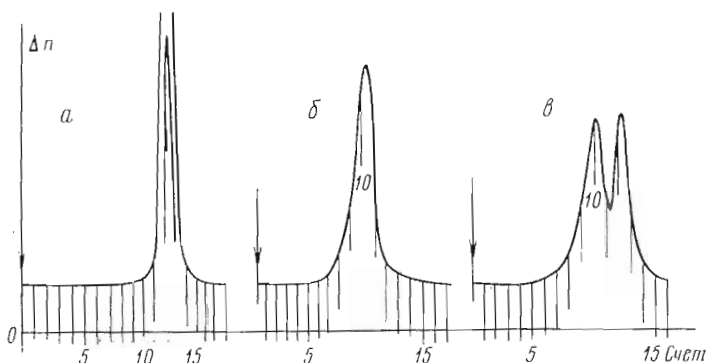


Рис. 13

Рис. 12. Совмещенная хроматограмма: 1 — высокомолекулярного полистирола ($M \cdot 2 \cdot 10^6$), 2 — пептида $\text{Aoc-Arg}^{58}(\text{Tos})-\text{Asn}^{61}(\text{Bzh})-\text{OBzl}$ ($M \cdot 1265$), 3 — нафталина ($M \cdot 93$) на колонке $1,6 \times 60$ см со сфероном P-40 ($25 < d_p < 40$) в DMF; $U \cdot 3$ мл/мин; детектор — рефрактометр

Рис. 13. Хроматограмма индивидуальных пептидов: $\text{Woc-His}^4-\text{Pro}^{12}-\text{OBu}^t$ (а), $\text{Z-Leu}^1-\text{Pro}^{12}-\text{OH}$ (б) и их смеси (в) на колонке $0,8 \times 60$ см со сфероном P-300 ($32 < d_p < 40$) в DMF; $U \cdot 1$ мл/мин, детектор — рефрактометр

Рис. 14. Совмещенные хроматограммы пептида $\text{Woc-Glu}^{20}(\text{OBzl})-\text{Lys}^{26}(\text{Z})-\text{OH}$ (1) и фракция (2), выделенной из пика 1 (обозначена вертикальными линиями) в чистом DMF (а) и в DMF с добавлением 1% CH_3COOH (б). В случае б ионная эксклюзия подавлена (подробнее см. текст)

что сферон P может работать при давлениях более 100 атм. Сферон P-40 имеет наибольшую селективность по сравнению с остальными типами сферонов, однако эффективности разделения пептидов он не обеспечивает. Уменьшение эффективности разделения пептидов связано, по-видимому, с низкой массопередачей пептидов на этих типах гелей. Как видно из рис. 12, пик защищенного пептида в 3–4 раза шире пиков веществ, выходящих с пределом исключения и полным объемом колонки. Сравнивая рис. 12 и 4, можно сделать вывод, что массопередача на гелях типа сферон значительно ниже, чем на сефадексе.

При хроматографии защищенных пептидов, содержащих свободную карбоксильную группу, на всех типах геля сферон наблюдается явление ионной эксклюзии [21]. Оно проявляется в аномальных смещениях пиков веществ в сторону меньших значений V_R и в асимметрии пиков пептидов, содержащих свободную карбоксильную группу, по сравнению с полностью защищенными пептидами тех же молекулярных масс. Согласно рис. 13,

Свойства сорбентов

Сорбенты	Побочные эффекты *	Смена растворителя	Скорость элюирования	Селективность	Массообмен
Сефадекс ЛН-20	Сорбция некоторых аминокислот	Невозможна	Средняя	Высокая	Удовлетвор.
ЛН-60	»	»	Низкая	Средняя	»
Энзакрил К-2	Сорбция R-COOH	»	Средняя	»	»
Сферон Р-40	Сорбция R-NH ₂	Возможна	Высокая	»	Неудовлетвор.
Р-300	Электроексклюзия	»	»	Низкая	»
Р-1000	R-COOH	»	»	»	»

* R-COOH и R-NH₂ — соответственно пептиды со свободными COOH- и NH₂-группами.

ионная эксклюзия, как и сорбция (рис. 10), при определенных условиях может улучшить разделение. Однако значительные концентрационные эффекты, сопровождающие явление ионной эксклюзии, приводят к тому, что фракции, повторно введенные в колонку, выходят раньше места отбора, что затрудняет и фракционирование, и идентификацию (см., например, рис. 14). Из рис. 14 также видно, что добавление к диметилформамиду 1% ледяной уксусной кислоты подавляет электростатическое взаимодействие пептидов с матрицей геля. Добавки 1% CH₃COOH достаточно для того, чтобы вести в одинаковых условиях ЭЖХ пептидов со свободной и защищенной COOH-группой.

Относительно невысокие эффективности колонок со сфероном Р и низкая селективность этих сорбентов не позволяют проводить разделение пептидов с молекулярными массами, различающимися даже в 2 раза (см. рис. 15).

Относительные достоинства и недостатки исследованных гелей суммированы в табл. 2. По нашему мнению, наилучшим комплексом свойств из всех исследованных гелей: высокой селективностью, умеренной жесткостью для работы под давлением, стабильностью во времени — обладает сефадекс ЛН-20. К недостаткам можно отнести частичную сорбцию некоторых пептидов, а главное, невозможность разделения защищенных пептидов с молекулярной массой, превышающей 2000. Остальные типы исследованных гелей, на наш взгляд, могут найти лишь ограниченное применение в химии пептидов. Энзакрил К-2 следует использовать для разделения пептидов, не содержащих свободных карбоксильных групп, а также связей, нестабильных в слабощелочных средах. Применение сефадекса ЛН-60 для высокоэффективной ЭЖХ не представляется возможным ввиду неудовлетворительных механических свойств этого поля.

На изученных нами полужестких гелях типа сферон Р с размером частиц $25 \leq d_p \leq 40$ мкм высокоэффективного разделения защищенных пептидов добиться не удастся. Гели сферон Р-40, Р-300, Р-1000 имеют широкий молекулярно-массовый диапазон от небольших пептидов до крупных белков (M 2500—100 000), но в изученном варианте пригодны для разделения защищенных пептидов, различающихся по молекулярной массе не менее чем в 5 раз.

Экспериментальная часть

Фракционирование гелей по размерам частиц проводили на прецизионных ситах с использованием установки для вибропросеивания Analizette-Pulverizette М-3 (Frich, ФРГ). Полученные фракции дополнительно седиментировали в стеклянных цилиндрах для отделения пыли. Для эксперимента отбирали наиболее мелкодисперсную фракцию геля, количество которой позволяло обеспечить проведение упаковочной процедуры.

Колонки, в которые упаковывали все типы сорбентов, представляли собой трубки из нержавеющей стали длиной 60 и 120 см и внутренним диаметром 0,8 и 1,6 см в различной комбинации. Колонки с обоих концов

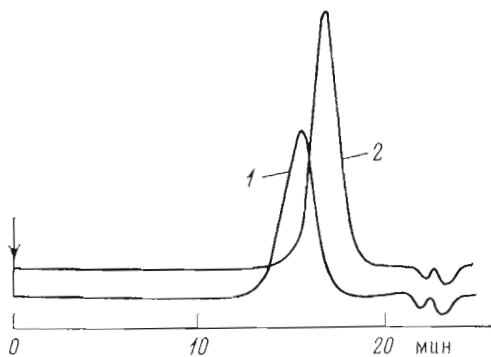


Рис. 15. Совмещенная хроматограмма пептидов Boc-Thr³⁴·(Bzl)-Pro⁴⁷-OH (1, *M* 2380) и Boc-Thr³⁴(Bzl)-Gly³⁹-OH (2, *M* 1138) на колонке 0,8×60 см со сфероном P-1000 ($25 < d_p < 40$) в DMF с добавкой 1% CH₃COOH; *U* 1 мл/мин; детектор — рефрактометр

оканчивались штуцерами с конусными уплотнениями от жидкостного хроматографа ХЖ-1303, СКБ НТО АН СССР. В качестве фильтров использовали пористую нержавеющую сталь толщиной 100 мкм и средним размером пор 10 мкм.

Упаковка хроматографических колонок производилась суспензионным методом (см. [16], с. 179). В развитие метода было предложено использовать насосы постоянного расхода типа MC-300 (Мастерские ЧСАН, ЧССР) или M 6000 A с программатором потока M 660 (Waters Ass, США), причем последний с помощью встроенного датчика давления обеспечивал непрерывный контроль давления упаковки с регистрацией его на ленте самописца. Подбор условий упаковки производился либо ступенчатым, либо линейным программированием потока через колонку промывающей жидкости, в качестве которой всегда использовался диметилформамид.

Для каждого типа сорбента, дисперсного состава и геометрических параметров колонки оптимальная скорость подачи элюента определялась экспериментально по показаниям самописца.

Хроматография низкомолекулярных и высокомолекулярных стандартных веществ и синтетических защищенных пептидов на заполненных гелями колонках производилась на нескольких установках, включающих в себя: насос постоянного расхода (Varian, 8500 фирмы Varian Aerograph, США; M 6000 фирмы Waters Ass, США, или MC-300, ЧССР); петлевой шестиходовой крап-дозатор (кран ХЖ-1304, СКБ НТО АН СССР или кран У6К фирмы Waters Ass, США) с объемом петли 0,2–1 мл; вышеупомянутые колонки; последовательно соединенные детекторы-рефрактометры (от ХЖ-1307 СКБ НТО АН СССР; R-401 фирмы Waters Ass, США, или Varian фирмы Varian Aerograph) и ультрафиолетовые фотометры на 280 нм (Uvicord II фирмы LKB, Швеция, U-440 фирмы Waters Ass, США) в различной комбинации. Получаемые хроматограммы регистрировались двухперьевыми самописцами (Perkin Elmer, США) или A-25 (Varian Aerograph, США).

Синтез использованных пептидов описан в работе [14].

В качестве элюента использовался диметилформамид, очищенный по стандартной методике. В некоторых случаях в элюент добавляли свежепергнанную ледяную уксусную кислоту. Хроматографическую эффективность упакованных колонок определяли введением небольших количеств растворенных в диметилформамиде толуола или нафталина. Искусственные смеси пептидов получали растворением приблизительно эквимольных количеств образцов в 1 мл диметилформамида с последующим использованием аликвот для анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bodanszky M., DuVigneaud V. J. Amer. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 17, p. 5688–5691.
2. Yamashiro D., Li C. H. J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, № 16, p. 5174–5179.
3. Вольпина О. М., Михалева И. И., Иванов В. Т. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 1, с. 5–49.
4. Knox J. H., Szokan G. J. Chromatogr., 1979, v. 171, p. 439–444.
5. Axelsen K. S., Vogelsang S. H. J. Chromatogr., 1977, v. 140, p. 174–179.

6. Lewis R., Stein S., Udenfriend S. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1979, v. 13, p. 493-497.
7. Hancock W., Bishop C., Battersby J., Harding D., Hearn M. *J. Chromatogr.*, 1979, v. 168, p. 377-384.
8. Bishop C. A., Harding D., Meyer L. J., Hancock W. *J. Chromatogr.*, 1980, v. 192, p. 222-227.
9. Ганкина Э. С., Костюк И. О., Беленький Б. Г. *Биоорганическая химия*, 1979, т. 5, № 3, с. 325-329.
10. Gabriel T. F., Michalevsky J., Meienhofer J. *J. Chromatogr.*, 1976, v. 129, p. 287-293.
11. Gabriel T. F., Jimenez M. H., Felix A. M., Michalevsky J., Meienhofer J. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1977, v. 9, p. 129-136.
12. Bakkm J. T. M., Beyerman H. C., Hoogerhout P., Olieman C., Voscamp D. *Requiel*, 1977, v. 96, № 12, p. 301-306.
13. Ulyashin V. V., Deigin V. I., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. *J. Chromatogr.*, 1981, v. 215, p. 263-277.
14. Mikhaleva I. I., Deigin V. I., Ulyashin V. V., Ivanov V. T. In: *Peptides 1978*/Eds Siemion I., Kupryschewski G. Poland: Wroclaw University Press, 1979, p. 391-395.
15. Yau W. W., Kirkland J. J., Bly D. D. In: *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography*. N. Y.: Wiley, 1979.
16. Неведов П. П., Лавренко П. Н. *Транспортные методы в аналитической химии полимеров*. М.: Химия, 1979.
17. Энгельгардт Х. *Жидкостная хроматография при высоких давлениях*. М.: Мир, 1980.
18. «Sephadex» — проспект фирмы «Farmacia Fine Chemicals», Uppsala, 1976.
19. Galpin I. J., Handa B. K., Kenner G. W., Moore S., Ramage R. *J. Chromatogr.*, 1976, v. 123, p. 237-242.
20. Martinez J., Bodanszky M. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1978, v. 12, № 5, p. 277-283.
21. Borak J., Smrz M. *J. Chromatogr.*, 1977, v. 144, № 1, p. 57-62.
22. Senlung B. *Adv. in Chromatogr.*, v. 14, ch. 2/Eds Giddings J. C., Grushka E., Cazes J., Brown P. R. N. Y.: Marcel, Decker, 1976.
23. Стюарт Дм., Янг Дж. Д. *Твердофазный синтез пептидов*. М.: Мир, 1963, с. 62.

Поступила в редакцию
28.IX.1982
После доработки
11.XI.1982

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF PROTECTED PEPTIDES ON SOFT AND SEMIRIGID GELS

DEIGIN V. I., ULYASHIN V. V., IVANOV V. T., NEFEDOV P. P.,
ZHMAKINA T. P., BELEN'KY B. G.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; Institute of High Molecular Weight Compounds,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad*

Fractionated soft gels Sephadex LH-20, Sephadex LH-60, Enzakryl K-2 and semirigid gels — Spheron P-40, Spheron P-300 and Spheron P-1000 were tested for separation of protected synthetic fragments of neurotoxin II from the Central Asian cobra (*Naja naja oxiana*) venom. Applicability of the above gels for size exclusion HPLC of protected peptides in organic media is discussed.