



УДК 547.964.4.058:543.544

## АНАЛИЗ ЗАЩИЩЕННЫХ ПЕПТИДОВ — ФРАГМЕНТОВ АСТН-(1—24) МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

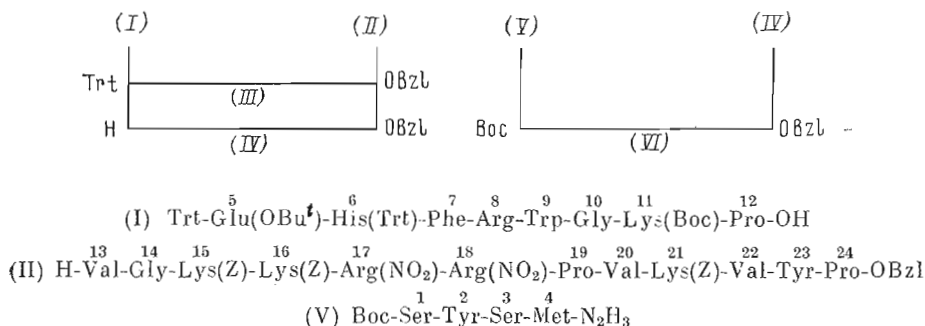
*Титова Е. В., Членов М. А., Кудряшов Л. И.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт технологии кровезаменителей и гормональных препаратов, Москва*

Исследована возможность применения метода обращенно-фазовой ион-парной ВЭЖХ для разделения фрагментов АСТН-(1—24), получаемых на конечной стадии синтеза. Проведена оптимизация условий анализа (выбор сорбента, подвижной фазы и концентрации ион-парного реагента) защищенных пептидов. Показано, что смесь фрагментов 1—4, 5—12, 13—24, 5—24 и 1—24 последовательности АСТН удается разделить на колонке Zorbax С8 при элюировании смесью метанол — 0,01 М водный раствор тетрабутиламмонийбромида (94 : 6).

В литературе имеются примеры разделения пептидов с защитными группами методами обращенно-фазовой [1—3], эксклюзионной [4], адсорбционной [5—7] хроматографии. Целью нашей работы была оптимизация разделения в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ фрагментов АСТН, получаемых на конечных стадиях синтеза АСТН-(1—24).

Ранее нами было показано [8—10], что контроль за ходом синтеза полипептида АСТН-(1—24) может осуществляться обращенно-фазовой ион-парной ВЭЖХ на колонке Zorbax ODS при использовании в качестве элюента водно-метанольных смесей с добавкой ТВАВ. Однако удовлетворительного разделения защищенных фрагментов АСТН, получаемых на конечных стадиях синтеза — конденсациях фрагментов 5—12 и 13—24, а также фрагментов 1—4 и 5—24 последовательности АСТН (см. схему), — добиться не удавалось. Время удерживания пептидов (IV) и (VI) было велико, и пики значительно уширены, а пептид (III) практически не элюировался с колонки. Увеличение содержания метанола или ТВАВ в ПФ не привело к существенному улучшению хроматографического разделения.



Так как основным препятствием при анализе данных пептидов было большое время удерживания, требовалось ослабить их взаимодействие со стационарной фазой. В случае незащищенных пептидов это достигается, например, путем снижения рН фосфатного буфера в ПФ. Предполагается [11, 12], что при низких рН пептиды со свободными аминогруппами спо-

АСТН — адренкортикотропный гормон, ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, ПФ — подвижная фаза, ТВАВ — тетрабутиламмонийбромид.

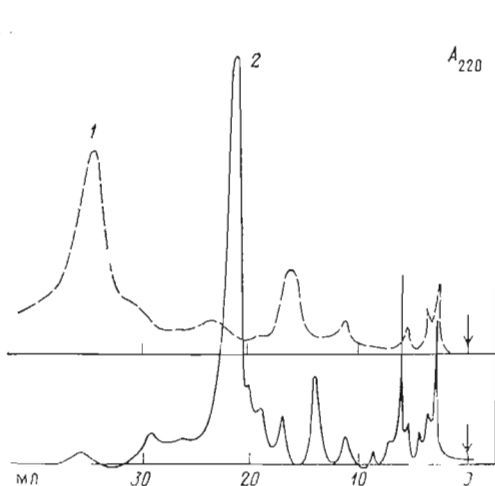


Рис. 1

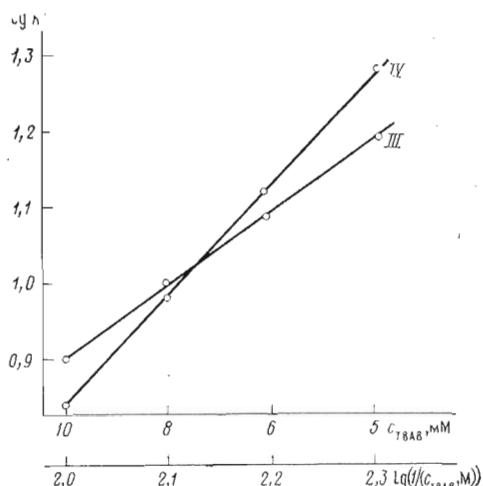


Рис. 2

Рис. 1. Хроматограммы АСТН-(5-24)-пептида (IV) на колонках Zorbax ODS (1) и C8 (2). Условия разделения: элюент – MeOH – 0,01 M водный раствор TBAB (94 : 6), скорость потока 1 мл/мин. Стрелкой отмечен момент ввода пробы

Рис. 2. Влияние концентрации TBAB (M) в элюенте на  $k'$  пептидов (III) и (IV). Условия: колонка Zorbax C8, элюент – MeOH – водный раствор TBAB (94 : 6)

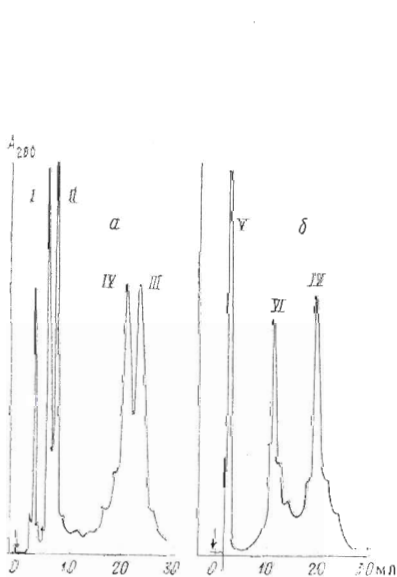


Рис. 3

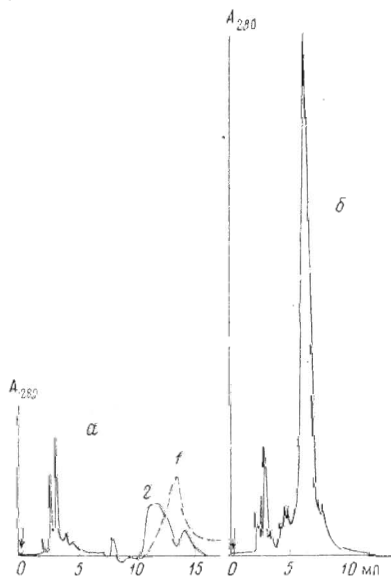


Рис. 4

Рис. 3. Хроматографическое разделение искусственных смесей пептидов (I)–(IV) (а) и (IV)–(VI) (б) на колонке Zorbax C8. Условия см. в подписи к рис. 1

Рис. 4. Зависимость времени удерживания и формы пика пептида (I) от объема элюента, пропущенного через колонку Zorbax C8 при ее уравнивании. Условия см. в подписи к рис. 1. Объем элюента, пропущенного через колонку (мл): а – 40 (1), 50 (2), б – 300

способны образовывать ионные пары с фосфат-ионами, в результате чего уменьшается сродство пептидов к стационарной фазе, а значит, и время удерживания. Этот эффект наблюдался нами в случае защищенного пептида (IV), имеющего свободную  $\text{NH}_2$ -группу, при использовании в качестве ПФ смеси MeCN–0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 2,1) (74:26). Однако в тех же условиях пептид (III), N-конец которого защищен Tgt-группой, не элюировался с колонки, что мешало оценить полноту превращения пептида (III) в пептид (IV) в ходе синтеза. Отсутствие в защищенных пептидах

(III) и (IV) ионогенных функциональных групп препятствовало образованию ионных пар, поэтому одним из подходов при выборе оптимальных условий разделения было уменьшение гидрофобности стационарной фазы. Этого можно достигнуть, например, при использовании ТВАВ в качестве модификатора поверхности сорбента [10, 12, 13]. Но такой прием оказался недостаточно эффективным для анализа крупных защищенных фрагментов АСТН-(1-24) на колонке Zorbax ODS. Поэтому был испытан сорбент Zorbax C8, так как, по данным работы [11], сорбенты с более короткой привитой углеродной цепочкой обладают меньшей удерживающей способностью по сравнению с ODS-сорбентами.

Хроматограммы пептида (IV), полученные на колонках Zorbax ODS и C8, показывают (рис. 1), что при использовании колонки Zorbax C8 разделение улучшилось, а время анализа сократилось. Аналогичным образом замена сорбента повлияла на хроматографическое поведение пептида (III). Если данный пептид не элюировался с колонки Zorbax ODS, то при анализе его на колонке Zorbax C8 фактор емкости  $k'$  (см. «Экспериментальную часть») уменьшился до 8.

Чтобы выбрать оптимальные условия разделения фрагментов АСТН на конечных стадиях синтеза АСТН-(1-24)-пептида, была исследована также зависимость удерживания наиболее гидрофобных пептидов (III) и (IV) от концентрации ТВАВ в ПФ. Зависимость  $\lg k'$  этих пептидов от  $\lg(1/c_{\text{ТВАВ}})$  свидетельствует о том, что с увеличением концентрации ТВАВ от 0,005 до 0,01 М  $k'$  пептидов уменьшается (рис. 2). Наибольшее влияние ион-парный реагент оказывает на удерживание пептида (IV), имеющего свободную аминогруппу. Ранее, при анализе не защищенного с N-конца пептида H-Val-Lys(Z)-Val-Tyr-Pro-OBzl, мы также наблюдали резкое снижение его удерживания после добавления ТВАВ в элюент [3]. На основании найденной зависимости можно сделать вывод, что минимальное удерживание в изученном диапазоне концентраций ТВАВ и удовлетворительная селективность при разделении пептидов (III) и (IV) достигаются при  $c_{\text{ТВАВ}}$  0,01 М. При этой концентрации ТВАВ в ПФ был возможен анализ и других ключевых фрагментов АСТН-(1-24) — пептидов (I), (II) и (VI). Таким образом, для разделения данных фрагментов АСТН на колонке Zorbax C8 использовался элюент MeOH—0,01 М водный раствор ТВАВ (94:6).

На рис. 3 изображены хроматограммы смесей пептидов, образующихся на конечных стадиях синтеза АСТН-(1-24). Оба продукта синтеза на каждой стадии — (IV) и (VI) — отделяются от своих полупродуктов (I) — (III) и (IV), (V) соответственно). Лишь наиболее гидрофильный АСТН-(1-24)-пептид (V) элюируется в свободном объеме колонки. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при использовании смеси MeOH—0,01 М ТВАВ (94:6) в качестве элюента на колонке Zorbax C8 становится возможным контроль за ходом синтеза АСТН-(1-24), за степенью очистки фрагментов 5-24 и 1-24 последовательности АСТН от их полупродуктов. Выбранные условия хроматографии позволяют в изократическом режиме (без изменения состава ПФ) разделять пептиды, значительно различающиеся по своей гидрофобности. При необходимости в данных условиях можно не только определять в конечном защищенном продукте синтеза — АСТН-(1-24)-пептиде наличие его полупродуктов (пептидов (IV) и (V)), но и обнаруживать примеси непрореагировавших пептидов (I) — (III) (см. рис. 3а, б).

Здесь, однако, следует отметить, что применение элюента с большим содержанием метанола было сопряжено с некоторыми трудностями. Во-первых, требовалось строгое соблюдение соотношений компонентов ПФ, так как при незначительных отклонениях концентраций MeOH или ТВАВ от оптимальных время выхода пептидов существенно изменялось. Во-вторых, при уравнивании колонки смесью MeOH — водный раствор ТВАВ (94:6) (в случае замены элюента в хроматографической системе) было необходимо промывать ее большим объемом данной ПФ (~120 объемов колонки); при меньшей концентрации MeOH в ПФ для уравнивания колонки достаточно 25—50 мл этого элюента, что составляет 10—20 объ-

емов колонки. При анализе пептидов, проводимом в процессе уравнивания колонки элюентом, было показано, что время удерживания этих пептидов уменьшается и воспроизводимые результаты получаются лишь после пропускания через колонку 250–300 мл ПФ. Этот факт, вероятно, можно объяснить малой скоростью установления равновесия ввиду малой степени диссоциации ТВАВ в растворе с большим содержанием органического растворителя, либо ослаблением взаимодействия между ТВАВ и привитой фазой [14]. Наибольшее влияние степени уравнивания колонки Zorbax C8 выбранным элюентом наблюдалось при анализе пептида (I). Хроматограммы этого пептида, полученные после промывания колонки 40, 50 и 300 мл ПФ (рис. 4), показывают изменение не только времени удерживания, но и формы пика пептида, что говорит о сложности взаимодействия «сорбент — ТВАВ — пептид», в особенности при отсутствии защитных групп на С-конце и на аргининовом остатке пептида (I). В связи с наблюдаемым влиянием объема элюента, пропущенного через колонку для ее уравнивания, анализ полупродуктов АСТН-(1–24) проводился лишь после промывания колонки 300 мл ПФ. Вместе с тем обнаруженное явление свидетельствует о том, что применение градиентного элюирования, вероятно, ухудшит воспроизводимость времен удерживания анализируемых пептидов по сравнению с изократическим.

Таким образом, была показана возможность разделения защищенных пептидов — фрагментов 1–4, 5–12, 13–24, 5–24 и 1–24 последовательности АСТН — методом обращенно-фазовой ион-парной ВЭЖХ на колонке Zorbax C8 при использовании в качестве элюента смеси MeOH — 0,01 M водный раствор ТВАВ (94 : 6). В найденных условиях хроматографии осуществлялся контроль за степенью очистки фрагментов 5–24 и 1–24 последовательности АСТН от их полупродуктов. Данные, опубликованные ранее [10], и результаты настоящей работы позволяют считать, что предложенный метод может быть использован для постадийного контроля процесса получения всех фрагментов в промышленном синтезе полипептида АСТН-(1–24).

### Экспериментальная часть

В работе исследовались синтетические пептиды, структура которых изображена на схеме (сведения об их синтезе и физико-химических свойствах приведены в работах [15, 16]).

Хроматографию осуществляли при 20° С с помощью жидкостного хроматографа, модель 8800 (фирма Du Pont, США), снабженного УФ-спектрофотометрическим детектором и инжектором, модель 7125 (Rheodyne, США) с петлей 50 мкл. Использовали колонки (250×4,6 мм) Zorbax ODS и C8 (Du Pont, США). Образцы растворяли в MeOH или ПФ. Концентрация пробы составляла 0,02–0,1%.

Фактор емкости ( $k'$ ) рассчитывали по формуле

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

где  $t_R$  — время удерживания определяемого компонента,  $t_0$  — время удерживания несорбирующегося вещества ( $\text{NaNO}_3$ ).

Для приготовления ПФ использовали метанол (Rathburn Chemicals, Шотландия) марки «для хроматографии», ТВАВ марки ч. и дважды перепланную воду.

Авторы выражают благодарность Е. П. Крысину, В. Н. Карельскому и А. К. Рабиновичу за предоставление образцов синтетических пептидов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьева В. Д., Шац В. Д., Бриквалле Л. А., Чипенс Г. И. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 7, с. 869–877.
2. Knox J. H., Szokah G. J. Chromatogr., 1979, v. 171, p. 439–444.
3. Bakum J. T. M., Beyerman H. C., Hoogerhout P., Olieman C., Voscamp D. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 1977, v. 96, № 12, p. 301–306.

4. Дейгин В. И., Ульяшин В. В., Иванов В. Т., Нефедов П. П., Жмакина Т. П., Бельский Б. Г. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 616–627.
5. Kullmann W. J. Liquid Chromatogr., 1979, v. 2, № 7, p. 1017–1031.
6. Kullmann W. J. Liquid Chromatogr., 1981, v. 4, № 7, p. 1121–1134.
7. Naidner F., Sipzner R., Steinfeld A. S., Becker J. M. J. Chromatogr., 1979, v. 176, № 2, p. 264–269.
8. Членов М. А., Титова Е. В., Кудряшов Л. И., Карельский В. Н., Антонов А. А. V Всес. симпоз. по химии и физике белков и пептидов. Тез. докл. Баку, 1980, с. 245.
9. Членов М. А., Титова Е. В., Кудряшов Л. И. II Всес. симпоз. по молекулярной жидкостной хроматографии. Тез. докл. Черногоровка, 1982, с. 33.
10. Членов М. А., Титова Е. В., Кудряшов Л. И. Биооргани. химия, 1982, т. 8, № 7, с. 914–921.
11. Wehr C. T., Correia L., Abbott S. R. J. Chromatogr. Sci., 1982, v. 20, № 3, p. 114–119.
12. Hancock W., Bishop C., Hearn M. Chemistry in New Zealand, 1979, v. 43, № 1, p. 17–24.
13. Hancock W., Bishop C., Battersby J., Harding D., Hearn M. J. Chromatogr., 1979, v. 168, № 2, p. 377–384.
14. Bartha A., Vigh G. J. Chromatogr., 1983, v. 260, № 2, p. 337–345.
15. Антонов А. А., Крысин Е. П., Карельский В. Н., Асташкина Л. Н., Каширин И. А. V Всес. симпоз. по химии и физике белков и пептидов. Тез. докл. Баку, 1980, с. 178.
16. Крысин Е. П., Глинка Э. Д., Рабинович А. К. Всес. конф. Методы получения и анализа биохимических препаратов. Тез. докл. Олайн, 1979, с. 56.

Поступила в редакцию  
6.IV.1984

## HPLC ANALYSIS OF PROTECTED PEPTIDES, ACTH-(1–24) FRAGMENTS

TITOVA E. V., CHLENOV M. A., KUDRYASHOV L. I.

*All-Union Research Institute of Technology for Blood Substitutes  
and Hormone Preparations, Moscow*

The applicability of reversed-phase ion-pair HPLC for separating the ACTH-(1–24) fragments obtained at the final stage of the synthesis has been examined. Optimization of chromatographic conditions (selection of proper packing material, eluent and concentration of ion-pairing reagent) for separation of protected peptides has been performed. A mixture of the ACTH fragments 1–4, 5–12, 13–24, 5–24, and 1–24 has been resolved on a Zorbax C8 column using methanol – 0,01 M tetrabutylammonium bromide (94 : 6) as mobile phase.