



УДК 577.112.6:543.544

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
ПЕПТИДНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ, ИХ ФРАГМЕНТОВ
И ПРОИЗВОДНЫХ****II. СОРБЦИЯ ПЕПТИДОВ ИЗ ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ ЭЛЮЕНТОВ
ОКТАДЕЦИЛСИЛИЛСИЛИКАГЕЛЕМ И НЕМОДИФИЦИРОВАННЫМ
СИЛИКАГЕЛЕМ***Григорьева В. Д., Бривкалне Л. А., Шати В. Д.**Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

В широком диапазоне концентрации ацетонитрила в элюенте для пептидов обнаружена параболическая зависимость логарифма коэффициента емкости от логарифма молярности ацетонитрила. Такая зависимость наблюдается при использовании в качестве сорбентов октадецилсилилсиликагеля и немодифицированного силикагеля. Выявленные закономерности расширяют аналитические и препаративные возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии пептидов за счет использования нетрадиционных составов элюента и сорбента.

В течение последних лет описано разделение самых разнообразных пептидов методом ВЭЖХ. Практически все исследования выполнены в режиме обращенно-фазовой хроматографии на силикагелях, модифицированных алкильными группами. Согласно теории, развитой в работах [1–3], в этом режиме сорбция органических соединений из подвижных фаз, содержащих воду либо буферные растворы, определяется гидрофобным эффектом; взаимодействие разделяемых веществ с неполярными группами на поверхности сорбента, как правило, обуславливается слабыми дисперсионными силами. В этих условиях механизм сорбции достаточно прост, что дало возможность выявить ряд закономерностей, связывающих величины удерживания пептидов с их строением и составом подвижной фазы [4–8]. В частности, для гидрофобного механизма хроматографии характерна приближенная линейная зависимость логарифма удерживания, выражаемого через коэффициент емкости (см. «Экспериментальную часть»), от логарифма молярной концентрации органического модификатора подвижной фазы:

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

где k' — коэффициент емкости (см. «Экспериментальную часть»), C — молярная концентрация органического модификатора, a , b — коэффициенты уравнения. С увеличением C $\lg k'$ уменьшается, поэтому знак b отрицателен.

Более детальное исследование [9, 10] показало, что даже при гидрофобном механизме удерживания уравнение (1) не выполняется вполне строго, и для учета кривизны зависимости предложено уравнение второй степени. Следует отметить, что кривизна зависимости $\lg k' - \lg C$ для мало и умеренно полярных веществ (для которых преобладание гидрофобного механизма вполне вероятно) крайне незначительна. Гораздо более выражена кривизна зависимости для пептидов [11–13]. Столь сильное отклонение поведения этого класса соединений от уравнения (1) уже не может быть объяснено предпосылками, из которых исходили авторы работ [9–10].

В работах [11–13] отмечено, что при ВЭЖХ пептидов на ODS-силикагелях в подвижных фазах, состоящих из ацетатного либо фосфатного

Использованные сокращения: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, ODS — октадецилсилил.

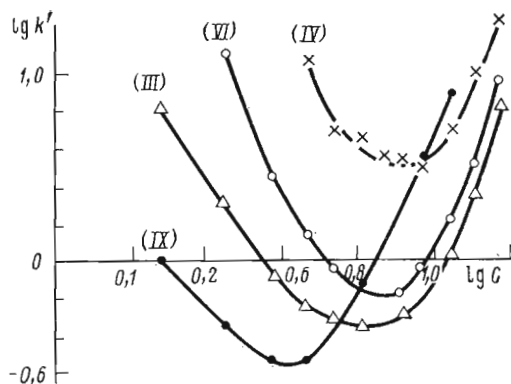


Рис. 1. Зависимость коэффициента емкости пептидов от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе. Неподвижная фаза — Zorbax ODS, подвижная фаза — ацетонитрил в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,0. Цифры на кривых соответствуют номерам соединений в табл. 1

буфера с ацетонитрилом, наблюдается anomальное увеличение удерживания при возрастании концентрации ацетонитрила свыше 50–60% (здесь и далее % по объему). Аналогичные результаты, полученные нами для некоторых пептидов (рис. 1), свидетельствуют, что для этих соединений характерна необычная в обращенно-фазовой хроматографии параболическая зависимость $\lg k'$ от $\lg C$. В работах [11, 12] такой характер зависимости связывается с двойственным механизмом удерживания на ODS-силикагеле: при малых C удерживание определяется гидрофобными взаимодействиями, в то время как при больших C все более существенным становится вклад адсорбции на остаточных (не подвергшихся алкилсилированию) силанольных группах поверхности сорбента, обсуждаемый в работе [14] как «силанофильный эффект».

Наряду с влиянием органического растворителя в работах [1, 15, 16] показано влияние солевого буфера на удерживание пептидов, особенно при концентрации ниже 0,02 М. Однако в использованных нами условиях при изменении концентрации буфера (pH 5,0) в диапазоне 0,01–0,1 М его вклад в изменение удерживания оказался незначительным. Так, разница в положении параболической зависимости $\lg k'$ от $\lg C$ для соединения (IV) составила ~0,2 величины $\lg k'$ при изменении концентрации буфера от 0,01 до 0,1 М; для соединения (VI) в аналогичных условиях разница составила 0,2–0,28 величины $\lg k'$. В то же время $\lg k'$ исследованных пептидов изменяется в среднем на 0,7 при изменении концентрации ацетонитрила от 50 до 25 и от 50 до 70%. Влияние концентрации буфера с pH 2,5 на удерживание пептидов, вероятно, также невелико, так как зависимости $\lg k'$ от $\lg C$ имеют параболический вид как при pH 5,0; так и при pH 2,5. По-видимому, роль солевого буфера в данной системе (пептиды на ODS-силикагеле в водном ацетонитриле) сводится в основном к нейтрализации отрицательного заряда поверхности силикагеля, что было показано в работе [17] и проявляется при низких концентрациях солей (до 0,01–0,02 М). Мы считаем, что в настоящее время недостаточно данных, чтобы однозначно интерпретировать имеющиеся результаты. Однако, не вдаваясь в сущность наблюдаемых зависимостей, а лишь признав наличие двух механизмов сорбции, в которых изменение $\lg C$ вызывает различные изменения $\lg k'$, можно показать, что результирующая зависимость $\lg k'$ от $\lg C$ действительно может быть близка к параболической. Пусть для двух механизмов справедливы следующие выражения:

$$\lg k'_1 = a_1 + b_1 \lg C,$$

$$\lg k'_2 = a_2 + b_2 \lg C,$$

где a_1 , a_2 , b_1 , b_2 — коэффициенты уравнений, причем $b_1 < 0$, а $b_2 > 0$. Не-

Значения $\lg K'$ пептидов при ВЭЖХ на Zorbax ODS в 0,1 М фосфатном буфере (рН 2,5) с добавками ацетонитрила

Соединение	$\lg K'$ при концентрации ацетонитрила, % по объему									
	10	15	20	25	30	45	50	60	70	75
Lys-Ala-Val-Tyr-Ile-Pro-Phe- <u>I</u>	-	-	0,73	0,16	-0,15	-0,57	-0,48	-0,22	0,07	0,08
Lys-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Arg- <u>I</u> (II)	-	-	0,58	0,02	-0,28	-0,52	-0,40	-0,07	0,37	0,38
Lys-Tyr-Ser-His-Pro-Glu-OH (III)	0,84	0,16	-0,25	-0,70	-0,68	-0,70	-0,30	-0,15	0,29	0,48
Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-Arg- <u>I</u> (IV)	-	-	1,13	0,59	0,25	-0,17	-0,11	0,11	0,47	0,53
Asn-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Arg (V)	-	0,57	-0,06	-0,62	-0,70	-0,70	-0,43	0,06	0,73	-
Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe (VI)	-	0,97	0,32	-0,18	-0,42	-0,58	-0,48	-0,10	0,40	0,54
Arg-Trp-Gly-Lys (Boc)-Pro (VII)	-	-	0,85	0,33	-0,01	-0,48	-0,43	-0,24	0,04	0,25
Tyr-D-Orn-Gly-Phe (VIII)	0	-0,31	-0,55	-	-0,74	-	-0,57	-0,30	0,12	0,15
Gly-Lys-Pro-Arg (IX)	-1,0	-	-	-	-	-0,70	-0,33	0,20	0,92	-

Значения $\lg k'$ пептидов при ВЭЖХ на Zorbax ODS в 0,1 М ацетате аммония (рН 5) с добавками ацетонитрила

Соединение	$\lg k'$ при концентрации ацетонитрила, % по объему											
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	60	70	80
(I)				0,86	0,37	0,24	0,07	-0,07	-0,03	-0,18	-0,29	
(II)					0,46	0,42	0,29	0,25	0,16	0,33	0,49	0,90
(III)	0,81	0,33	-0,13	-0,21		-0,25	-0,29	-0,25	-0,11	0	0,44	0,86
(IV)				1,09	0,68	0,65	0,55	0,54	0,50	0,69	1,01	1,29
(V)			0,58	0,39		0,15	0,14	0,09	0,24	0,50	0,98	0,98
(VI)		1,19	0,46	0,15		-0,04	-0,07	-0,19		0,23	0,50	0,95
(VII)			0,69	0,48		0,13	0,07	-0,01	-0,04	0,40	0,45	0,86
(VIII)		-0,13	-0,30	-0,35			-0,22	-0,18	-0,14	0	0,32	

однородная поверхность ODS-силикагеля может сольватироваться компонентами подвижной фазы. При этом на полярных центрах сорбируются преимущественно молекулы воды (или компоненты буфера), на неполярных — органического модификатора. Относительная степень сольватации центров двух типов зависит от состава подвижной фазы и определяет вклад двух механизмов, f_1 и f_2 ($f_1+f_2=1$). Можно предположить, что вклад механизма меняется от некоторого максимального до минимального аналитично величинам удерживания:

$$f_1 = f_{1 \text{ макс}} + d \lg C. \quad (4)$$

Объединяя выражения (2)–(4), получаем

$$\lg k' = m_0 + m_1 \lg C + m_2 \lg^2 C, \quad (5)$$

где d , m_0 , m_1 , m_2 — коэффициенты уравнений.

Для сопоставления реально наблюдаемого поведения пептидов с уравнением (5) нами проверены значения k' ряда пептидов на Zorbax ODS в присутствии буферных растворов разного состава и рН (табл. 1 и 2). Оказалось, что возрастание удерживания при увеличении доли ацетонитрила в элюенте свыше 50% характерно для всех пептидов в обеих примененных буферных системах. Полученные данные удовлетворительно описываются уравнением (5) (табл. 3).

Таблица 3

Параметры параболического уравнения $\lg k'$ (5)
Сорбент — Zorbax ODS, подвижная фаза — ацетонитрил
с 0,1 М фосфатным (Ф) или 0,1 М ацетатным (А) буфером

Соединение	Подвижная фаза	m_0	m_1	m_2	Коэффициент корреляции
(I)	Ф	8,84	-20,4	11,1	0,99
	А	7,14	-13,6	6,3	0,99
(II)	Ф	9,14	-22,0	12,5	0,99
	А	9,27	-19,4	10,3	0,96
(III)	Ф	3,40	-10,6	6,9	0,97
	А	2,84	-8,4	5,5	0,97
(IV)	Ф	9,62	-21,3	11,6	0,99
	А	9,22	-19,2	10,5	0,99
(V)	Ф	7,34	-20,5	12,9	0,98
	А	6,44	-15,3	9,2	0,96
(VI)	Ф	7,23	-18,5	11,0	0,98
	А	6,13	-14,8	8,8	0,99
(VII)	Ф	9,35	-21,2	11,5	0,99
	А	6,44	-14,6	8,3	0,95
(VIII)	Ф	1,75	-6,8	4,7	0,97
(IX)	А	1,09	-4,8	4,3	0,97

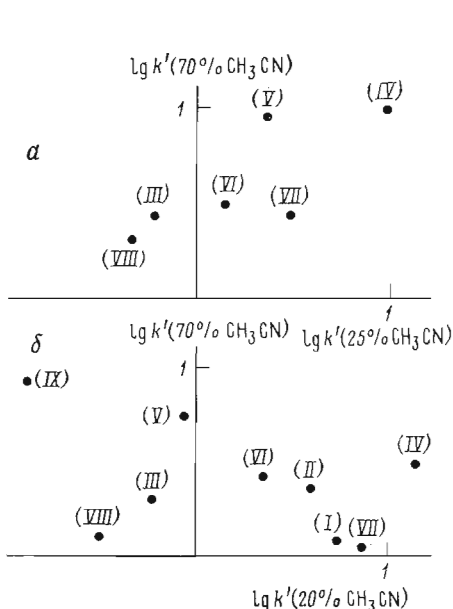


Рис. 2

Рис. 2. Сопоставление коэффициентов емкости пептидов (I)–(IX) на Zorbax ODS в условиях, соответствующих правой и левой ветвям параболы (*a* – ацетатный буфер, *б* – фосфатный буфер)

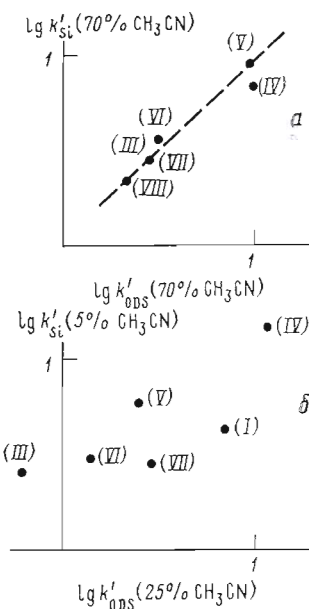


Рис. 3

Рис. 3. Сопоставление коэффициентов емкости пептидов на Zorbax ODS (k_{ODS}) и Silasorb 600 (k_{Si}) в условиях, соответствующих правой и левой ветвям параболы (*a* – правая ветвь, *б* – левая ветвь)

Интересно сопоставить порядок элюирования в правой и левой ветвях параболы (5). При сохранении «обращенно-фазового» порядка элюирования точки на рис. 2, соответствующие удерживанию пептидов, должны были бы располагаться на прямой с положительным углом наклона, а при переходе к «прямо-фазовому» порядку – вдоль прямой с отрицательным углом наклона. Из рис. 2 видно, что четкие закономерности такого рода отсутствуют. Порядок элюирования меняется сложным образом, и можно говорить лишь о тенденциях. В присутствии ацетатного буфера при высоких концентрациях ацетонитрила в целом сохраняется последовательность элюирования, характерная для обращенно-фазовой хроматографии. В присутствии фосфатного буфера можно проследить тенденцию к изменению последовательности выхода соединений на противоположную.

Ряд авторов [11, 12, 14] приписывает увеличение удерживания при больших *C* роли остаточных силанольных групп поверхности модифициро-

Таблица 4

Значения $\lg k'$ пептидов на Silasorb 600 в 0,1 М ацетате аммония (рН 5) с добавками ацетонитрила

Соединение	$\lg k'$ при концентрации ацетонитрила, % по объему									
	0	5	10	20	40	50	60	70	80	90
(I)	0,90	0,63	0	-0,46	-0,52	-0,30	-0,13	0	0,15	0,70
(III)	0,51	0,42	0,18	0,04	0	0,20	0,26	0,48	0,98	
(IV)	1,56	1,18	0,53	0,36	0,38	0,53	0,58	0,82	0,98	
(V)	1,18	0,77	0,26	0,27	0,34	0,50	0,62	0,95	1,62	
(VI)	0,88	0,48	0	-0,10	0	0,18	0,26	0,56	1,04	
(VII)	0,81	0,46	0,20	0,11	0,08	0,08	0,15	0,42	0,88	
(VIII)	-1,0	-1,0	-1,0	-0,70	-0,10	0,08	0,15	0,34	0,73	1,85
(IX)	0,40	0,27	0,15	0,06	0,42	0,83	1,04	1,56		

Параметры параболического уравнения $\lg k'$ (5)
Сорбент — Silasorb 600, подвижная фаза — ацетонитрил
с 0,1 М ацетатным буфером (pH 5)

Соединение	m_0	m_1	m_2	Коэффициент корреляции
(I)	0,65	-3,71	2,86	0,94
(III)	0,46	-2,01	1,87	0,86
(IV)	1,12	-2,66	2,10	0,98
(V)	0,77	-2,77	2,70	0,91
(VI)	0,48	-2,60	2,43	0,93
(VII)	0,50	-1,80	1,57	0,80
(IX)	0,31	-1,97	2,59	0,97

важных сорбентов. Это дало нам основание для измерения коэффициентов емкости пептидов на немодифицированном силикагеле. Из данных табл. 4 видно, что удерживание на немодифицированном силикагеле при высоких C близко к значениям, которые наблюдаются на ODS-силикагеле. В области средних концентраций ацетонитрила удерживание уменьшается, а при малых C снова возрастает. Согласно табл. 4, возрастание удерживания на силикагеле происходит при меньших величинах C , чем это имеет место на ODS-силикагеле. Однако и для немодифицированного силикагеля параболическая зависимость $\lg k'$ от $\lg C$ в целом сохраняется (табл. 5). Сопоставление удерживания пептидов на немодифицированном силикагеле и ODS-силикагеле при высоких и низких концентрациях ацетонитрила (рис. 3) показало, что при высоких C поведение пептидов на двух различных сорбентах почти идентично. При малых C порядок элюирования в общем не меняется, однако селективность разделения различная. Следует отметить, что эффективность разделения большинства пептидов на немодифицированном силикагеле не уступала эффективности обращенно-фазового разделения.

Таким образом, изучение удерживания пептидов на двух сорбентах, принадлежащих к различным классам, при использовании водно-органических элюентов с широко варьируемой концентрацией ацетонитрила позволило выявить ряд особенностей, расширяющих возможности ВЭЖХ этого класса веществ:

1) получение при высоких концентрациях ацетонитрила в подвижной фазе приемлемых значений k' (3—10) на ODS-силикагеле для высокополярных пептидов, не удерживаемых при малых концентрациях ацетонитрила (соединение (VIII), табл. 2);

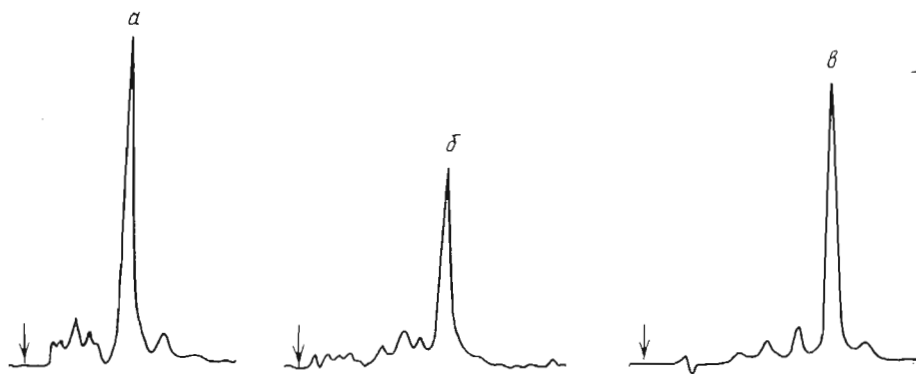


Рис. 4. Использование нетрадиционных условий хроматографии пептидов: а — соединение (IV), сорбент — Silasorb 600, подвижная фаза: ацетонитрил — 0,1 М ацетатный буфер (pH 5,0), 20 : 80; б — соединение (VI), сорбент — Silasorb 600, подвижная фаза: ацетонитрил — 0,1 М ацетатный буфер (pH 5,0), 70 : 30; в — соединение (VI), сорбент — Zorbax ODS, подвижная фаза: ацетонитрил — 0,1 М ацетатный буфер (pH 5,0), 70 : 30

2) регулирование селективности разделения на ODS-силикагеле с помощью концентраций ацетонитрила, превышающих 40–60% (рис. 2);

3) регулирование селективности разделения путем замены ODS-силикагеля на немодифицированный силикагель (рис. 3);

4) удешевление в ряде случаев препаративной хроматографии за счет использования немодифицированного силикагеля и элюентов с уменьшенным содержанием органического модификатора.

На рис. 4 даны примеры использования таких нетрадиционных режимов хроматографии пептидов.

В рамках настоящей работы остаются невыясненными причины обнаруженного сходства поведения пептидов на столь различных сорбентах. Можно лишь отметить, что не все наши наблюдения отвечают гипотезам, высказанным в работах [11, 12]. Детальное исследование причин обнаруженного поведения пептидов предполагается провести в дальнейшем.

Экспериментальная часть

Удерживание исследованных соединений оценивали величиной коэффициента емкости

$$k' = (t_R - t_0) / t_0,$$

где t_R — время удерживания соединения, t_0 — время выхода несорбирующегося 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 и Silasorb 600 с размерами частиц 5 мкм. Для приготовления подвижных фаз использовали ацетонитрил марки ч., 0,1 М фосфатный буфер (рН 2,5) и 0,1 М ацетат аммония (рН 5,0). Расход подвижных фаз 1,5 мл/мин. Разделенные соединения детектировали по УФ-поглощению при 220 либо 254 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Horwath C., Melander W., Molnar I. J. Chromatogr., 1976, v. 125, № 1, p. 129–156.
2. Horwath C., Melander W., Molnar I. Anal. Chem., 1977, v. 49, № 2, p. 142–153.
3. Horwath C., Melander W., Molnar I. Anal. Chem., 1977, v. 49, № 14, p. 2295–2303.
4. Abrahamsson M., Gröningson K. J. Liquid Chromatogr., 1980, v. 3, № 4, p. 495–511.
5. Meek J. L., Rossetti Z. L. J. Chromatogr., 1981, v. 211, № 1, p. 15–28.
6. O'Hare M. J., Nice E. S. J. Chromatogr., 1979, v. 171, № 2, p. 209–226.
7. Vigh G., Varga-Puchony Z., Hlavay J., Papp-Hites E. J. Chromatogr., 1982, v. 236, № 1, p. 51–59.
8. Григорьева В. Д., Шарц В. Д., Бривкалне Л. А., Чупенс Г. И. Биоорганическая химия, 1983, т. 9, № 7, с. 869–877.
9. Schoenmakers P. J., Billiet H. A. H., Tijssen R., de Galan L. J. Chromatogr., 1978, v. 149, № 1, p. 519–537.
10. Schoenmakers P. J., Billiet H. A. H., de Galan L. J. Chromatogr., 1979, v. 185, № 1, p. 179–195.
11. Grego B., Hearn M. T. W. Chromatographia, 1981, v. 14, № 10, p. 589–592.
12. Wehr C. T., Correia L., Abbott S. R. J. Chromatogr. Sci., 1982, v. 20, № 3, p. 114–119.
13. Григорьева В. Д., Бривкалне Л. А., Шарц В. Д. VI Всес. симпоз. по химии белков и пептидов. Тез. докл. Рига, 1983, с. 397–398.
14. Hearn M. T. W. In: High performance liquid chromatography, advances and perspectives/Ed. Horvath Cs. N. Y.: Acad. Press. 1983, v. 3, p. 88–156.
15. Krummer K., Frei R. W. J. Chromatogr. 1977, v. 132, № 1, p. 27–36.
16. Horvath C., Melander W. J. Chromatogr. Sci., 1977, v. 15, № 9, p. 393–404.
17. Вульфсон А. Н., Якимов С. А. Биоорганическая химия, 1983, т. 9, № 3, с. 365–390.

Поступила в редакцию
11.IV.1984
После доработки
5.XI.1984

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF PEPTIDE
BIOREGULATORS, THEIR FRAGMENTS AND DERIVATIVES.
II. SORPTION OF PEPTIDES FROM AQUEOUS-ORGANIC ELUENTS ON
OCTADECYLSILYL- AND UNMODIFIED SILICA

GRIGORJEVA V. D., BRIVKALNE L. A., SHATZ V. D.

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

Dependence of the peptide retention upon the organic component concentration in eluent has been studied. A parabolic dependence has been found in a wide range of acetonitrile concentrations. The effect observed with ODS- and unmodified silica as stationary phases extends analytical and preparative potentialities of HPLC of peptides.