



УДК 577.112.6 : 543.544

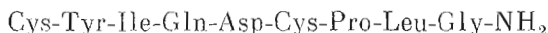
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
ПЕПТИДНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ, ИХ ФРАГМЕНТОВ
И ПРОИЗВОДНЫХ
IV. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ И ОЧИСТКА
ОКСИТОЦИНА

Григорьева В. Д., Шату В. Д.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

На основании анализа хроматографических свойств нонапептида окситоцина, возможности масштабирования и выделения продукта из хроматографических фракций предложена методика очистки препарата в системе силикагель — этиловый спирт, позволяющая с минимальными потерями получить продукт, содержащий не более 3% примесей и имеющий активность ~ 450 МЕ/мг.

Синтетический нонапептид окситоцин



применяется в медицинской и ветеринарной практике в качестве препарата, действующего на гладкую мускулатуру матки и стимулирующего ее сокращение. Выпускается он в виде лиофилизованного порошка с активностью 150—400 МЕ/мг, а для ветеринарии — в виде раствора активностью 150—250 МЕ/мл. Известно, что биологическая активность химически чистого окситоцина ~ 500 МЕ/мг [1]. Эти данные, а также результаты ВЭЖХ выпускаемого коммерческого препарата свидетельствуют о его негомогенности. Содержащиеся примеси могут быть как балластными веществами (вода, соли), так и олигопептидами — побочными продуктами синтеза окситоцина. Возможно, что некоторые из них проявляют биологическое действие, противоположное действию окситоцина. Высокоочищенные препараты окситоцина могут использоваться для медико-биологических исследований, а также при стандартизации продуктов ветеринарного и медицинского назначения.

Цель настоящей работы — изучение хроматографического поведения окситоцина и выбор условий препаративной хроматографической очистки его препаратов.

Для анализа низкомолекулярных пептидов в последние годы чаще всего используется обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В применении к окситоцину этот метод обладает высокой селективностью и позволяет отделить от основного пика целый ряд примесей [2—4]. Условия разделения, используемые в аналитической ВЭЖХ (рис. 1), далеко не всегда оптимальны для препаративной очистки. Основным препятствием для перенесения этих условий в препаративные масштабы является то, что типичные элюенты обращенно-фазовой хроматографии содержат значительные количества солей. При препаративной хроматографии немаловажно и то, что алкилсиликагели, используемые в качестве неподвижных фаз в обращенно-фазовой ВЭЖХ, значительно дороже исходных, немодифицированных силикагелей.

В условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ для свободных пептидов характерна параболическая форма зависимости коэффициентов емкости (k') от концентрации органического компонента подвижной фазы (C) [5—7]. Обычно уменьшение коэффициентов емкости с ростом концентрации ацетонитрила в диапазоне 0—50% (по объему) сменяется возрастанием коэффициентов емкости при дальнейшем увеличении концентрации ацетонит-

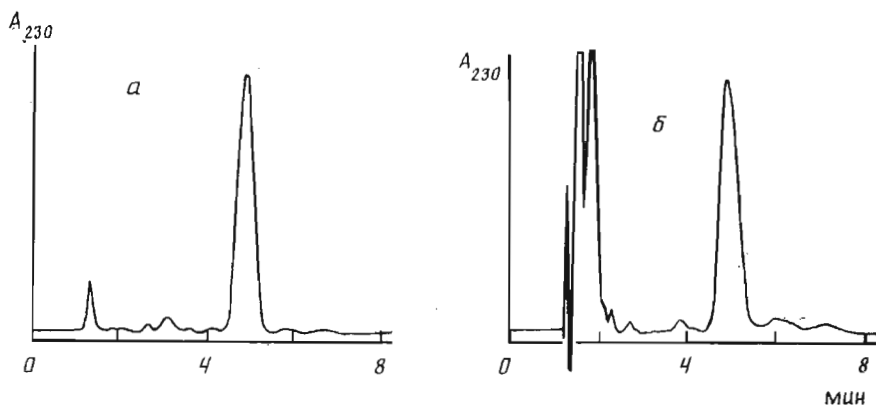


Рис. 1. Анализ окситоцина на сорбенте Silasorb C 18 (5 мкм). Колонка размером $4,6 \times 130$ мм, подвижная фаза: ацетонитрил — 0,2 М аммоний-ацетатный буфер, pH 5,0 (18 : 82). Расход подвижной фазы 1,5 мл/мин: *a* — медицинский препарат, *б* — раствор для ветеринарии

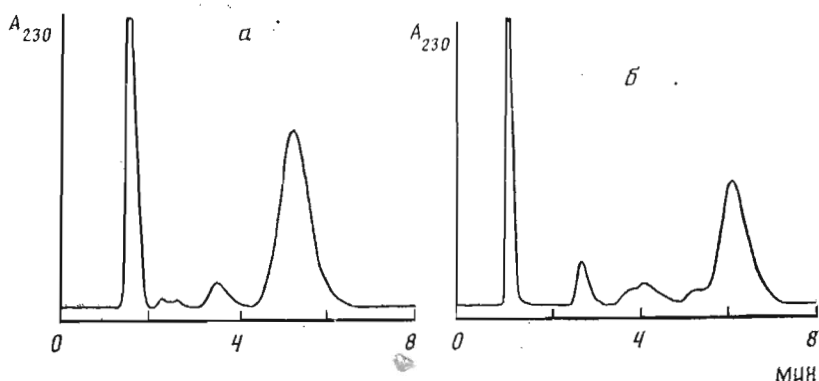


Рис. 2. Анализ препарата окситоцина для ветеринарии на сорбенте Silasorb 600 (7,5 мкм). Колонка размером $4,6 \times 120$ мм, подвижная фаза — аммоний-ацетатный буфер (pH 5,0) 0,2 (*a*) и 0,02 М (*б*). Расход подвижной фазы 1,0 мл/мин

рила. Было установлено также [5], что аналогичная параболическая зависимость $\lg k' - \lg C$ наблюдается при хроматографировании пептидов на немодифицированных силикагелях в элюентах, обычных для хроматографии на алкилсиликагелях. Эти характеристики хроматографического поведения окситоцина на немодифицированном силикагеле до сих пор не изучались.

Эксперименты показали, что при использовании немодифицированного силикагеля Silasorb 600 в качестве неподвижной фазы удовлетворительная эффективность и селективность разделения достигается при элюировании 0,2 М аммоний-ацетатным буфером (pH 5,0) без органического растворителя. Снижение концентрации буфера до 0,02 М не вызывает сколько-нибудь значительного изменения картины разделения (рис. 2*a*, *б*). Эксперимент в этих условиях был воспроизведен в препаративном масштабе на колонке размером 8×210 мм (рис. 3). Около 85% введенного окситоцина вышло из колонки с чистотой 93% и выше (рис. 4*a*). Увеличение масштаба процесса (рис. 4*б*) ухудшило его характеристики.

Было изучено хроматографическое поведение окситоцина в условиях правой части параболы $\lg k' - \lg C$. В качестве подвижных фаз применяли смеси этилового спирта и 0,2 М аммоний-ацетатного буфера, pH 5,0. Вплоть до содержания этилового спирта 80% удерживание окситоцина минимально, коэффициенты емкости не превышают 0,5. При переходе к более концентрированному этиловому спирту наблюдается увеличение времени удерживания и частичное отделение примесей. На основании полученных результатов были проведены эксперименты по препаративной

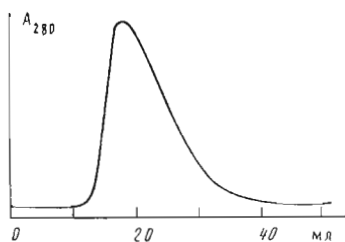


Рис. 3

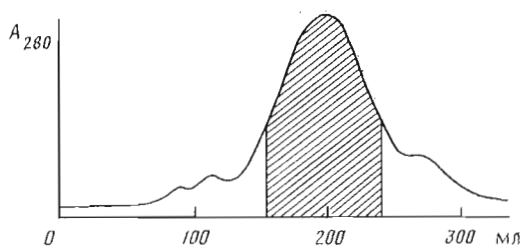


Рис. 5

Рис. 3. Результат препаративной хроматографии 80 мг медицинского окситоцина (содержание примесей 21%) на сорбенте Silasorb 600 (30 мкм). Колонка размером 8×210 мм, подвижная фаза — 0,02 М аммоний-ацетатный буфер, pH 5,0. Расход подвижной фазы 0,5 мл/мин

Рис. 5. Результаты препаративной хроматографии 403 мг окситоцина на сорбенте Silasorb 600 (30 мкм). Колонка размером $21,2 \times 250$ мм, подвижная фаза — этиловый спирт, содержащий 5% воды. Расход подвижной фазы 0,5 мл/мин. Заштрихована отбираемая фракция продукта

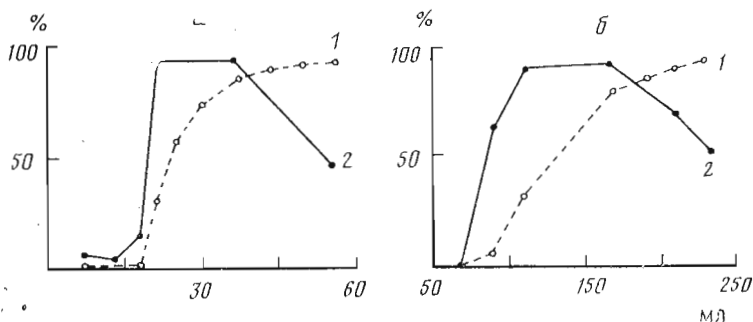


Рис. 4. Зависимость суммарного выхода (% от теории) окситоцина (1) и его чистоты (2) от объема элюента. а — 80 мг окситоцина (условия см. рис. 3); б — 200 мг окситоцина, разделение на сорбенте Silasorb 600 (30 мкм), размер колонки $21,2 \times 250$ мм, подвижная фаза — 0,02 М аммоний-ацетатный буфер, pH 5,0. Расход подвижной фазы 2,5 мл/мин. Детектирование по УФ-поглощению при длине волны 280 нм

хроматографической очистке окситоцина, содержащего 21% примесей, на сорбенте Silasorb 600 с размером частиц 30 мкм. В качестве подвижной фазы использовали этиловый спирт, содержащий 5% воды. Разделение осуществляли на колонках из нержавеющей стали размером $21,2 \times 250$ мм. Расход подвижной фазы составлял 0,5 мл/мин (рис. 5). Для выделения очищенного окситоцина к спиртовым растворам прибавляли 1% ледяной уксусной кислоты, упаривали досуха, добавляли небольшое количество воды и лиофилизировали. Около 60% введенного в колонку препарата выходило в виде фракций, содержащих не более 3% примесей, активность препарата приближалась к максимальной (таблица). Менее

Результаты препаративной очистки окситоцина на силикагеле Silasorb 600 (30 мкм) Колонка $21,2 \times 250$ мм, подвижная фаза — этиловый спирт, содержащий 5% воды

Опыт	Нагрузка, мг (мг/г сорбента)	Характеристика полученного окситоцина		
		чистота, %	выход, %	активность, МЕ/мг
1	20 (0,5)	97,6	60	Не определялась
2	42 (1,05)	98,0	54	»
3	109 (2,77)	98,5	56	420
4	202 (5,05)	98,0	50	430
5	403 (10,75)	98,2	71	445
6	403* (5,04)	87,8	73	490

* Соединены последовательно две колонки.

чистые фракции при необходимости могут быть подвергнуты повторной очистке.

Авторы выражают признательность А. П. Павару и П. Я. Романовскому за участие в обсуждении результатов, Л. А. Бривкалне, Х. А. Кажоке, В. А. Беликову, О. В. Сахартовой и О. В. Орбидане за помощь в выполнении ряда экспериментов.

Экспериментальная часть

Исследование закономерностей сорбции окситоцина в различных системах проводили методом ВЭЖХ на хроматографах Gilson (Франция), модель 303, и Du Pont (США), модель 8800. Колонки (4,6 × 120 и 6,2 × 250 мм) заполнялись суспензионным способом силикагелем Silasorb 600 (Lachema, ЧССР) с размером частиц 7,5 мкм.

Препаративную хроматографическую очистку окситоцина выполняли на стеклянных колонках (8 × 210 мм; ГДР) и колонках из нержавеющей стали (21,2 × 250 мм), заполненных сорбентом Silasorb 600 с размером частиц 30 мкм, с помощью насоса ММС (ЧССР) производительностью 0,2—4,0 мл/мин. Детектировали по УФ-поглощению при длине волны 280 нм.

Чистоту полученных фракций контролировали методом ВЭЖХ в режиме обращенно-фазовой хроматографии на приборе Du Pont (США), модель 850. Колонка (4,6 × 130 мм) заполнена октадецилсиликагелем Silasorb С 18 (Lachema, ЧССР) с размером частиц 5 мкм. Детектирование проводили по УФ-поглощению при длине волны 230 нм.

Активность окситоцина определяли по методике, приведенной в ТУ 10-07-298-86.

Для приготовления подвижных фаз использовали ацетонитрил марки ч., спирт этиловый — ректификат, содержащий 5% воды, ледяную уксусную кислоту и концентрированный 25% водный раствор аммиака для приготовления аммоний-ацетатного буфера с рН 5,0 ± 0,2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шредер Э., Любке К. // Пептиды. Т. 2. М.: Мир, 1969. С. 379.
2. Lebl M. // J. Chromatogr. 1983. V. 264. № 3. P. 459—462.
3. Larsen B., Fox B. L., Burke M. F., Hruby V. J. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1979. V. 13. № 1. P. 12—21.
4. Larsen B., Viswanatha V., Chang S. Y., Hruby V. J. // J. Chromatogr. Sci. 1978. V. 16. № 5. P. 207—210.
5. Григорьева В. Д., Бривкалне Л. А., Шатц В. Д. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 4. С. 447—453.
6. Grego B., Hearn M. T. W. // Chromatographia. 1981. V. 14. № 10. P. 589—592.
7. Wehr C. T., Correta L., Abbott S. R. // J. Chromatogr. Sci. 1982. V. 20. № 3. P. 114—119.

Поступила в редакцию
15.IX.1988
После доработки
20.II.1989

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF PEPTIDE BIOREGULATORS, THEIR FRAGMENTS AND DERIVATIVES. IV. CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR AND PURIFICATION ON OXYTOCIN

GRIGORJEVA V. D., SHATZ V. D.

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

Chromatographic behaviour of oxytocin has been studied. A simple and convenient technique has been developed for preparative purification of oxytocin using silica and ethanol. The product obtained contains not more than 3% impurities and has activity about 450 IU/mg.