



УДК 577.112.088.3 : 543.544

© 1994 В. Е. Ключниченко, С. А. Якимов, А. М. Арутюнян,  
А. Е. Иванов, К. В. Мальцев, А. Н. Вульфсон

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЙ ИНСУЛИН ЧЕЛОВЕКА  
IV. РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ АНАЛИЗА  
С ПОМОЩЬЮ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ  
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

Ключевые слова: инсулин, проинсулин, офВЭЖХ, многофакторная оптимизация, гидрофобные сорбенты.

Изучена эффективность применения обращенно-фазовой (оф) ВЭЖХ для постадийного анализа продуктов производства генно-инженерного инсулина человека. Испытано несколько элюентов для офВЭЖХ и ион-парной офВЭЖХ, влияющих на селективность, разрешение и чувствительность анализа. Проведены трехмерные оптимизации селективности и разрешения в зависимости от рН и состава подвижной фазы. Найдены оптимальные по разрешению и информативности условия проведения офВЭЖХ инсулинсодержащих белков на коммерческих и специально разработанных сорбентах. Рассмотрен механизм разделения белков в условиях высокой концентрации соли в подвижной фазе и вблизи изоэлектрической точки. Качество разработанной системы позволяет анализировать все нормируемые примеси и обеспечивает производство высококачественного и активного препарата.

В последнее время опубликовано много работ, касающихся ВЭЖХ инсулина [2]. Основная причина, объясняющая повышенное внимание исследователей к этому объекту, состоит в том, что инсулин является важнейшим белковым фармацевтическим препаратом и производство его достаточно сложно. Постоянно ведется поиск более эффективных методов выделения и очистки рекомбинантного инсулина человека и его близких аналогов животного происхождения. Кроме того, так как лекарство, приготовленное на основе инсулина, вводится непосредственно в кровь человека, малейшие посторонние примеси могут вызывать мощный иммунный ответ организма или оказывать токсическое действие. Следовательно, должна быть совершенная система гарантированного контроля качества инсулина, что в настоящее время большей частью обеспечивает ВЭЖХ.

Разделение инсулинсодержащих белков наиболее эффективно осуществляется методом офВЭЖХ. Несмотря на небольшие различия в структуре и последовательности животных и человеческого инсулинов, офВЭЖХ обеспечивает селективное разделение этих белков, их производных и предшественников [3—5]. Гибкость этого метода продемонстрирована в работе [6], где показаны изменения

\* Сообщение III см. [1].

селективности и разрешения между пиками инсулина, проинсулина и дезами-динсулина в зависимости от подвижной и стационарной фаз.

Один из способов получения фармацевтического инсулина — полусинтетический — состоит в биотрансформации свиного инсулина в человеческий через замену аланина в положении В-30 на треонин [7]. При этом образуются побочные продукты, сходные с продуктами, обнаруживаемыми при получении рекомбинантного инсулина человека [8]. Хотя нельзя непосредственно переносить результаты разделения инсулинсодержащих белков животных на рекомбинантные человеческие, общие закономерности обращенно-фазовой хроматографии в основном сохраняются.

офВЭЖХ является эффективным методом не только для анализа инсулина, но и для его препаративного выделения [9, 10]. Так как на последних стадиях технологии требуется высокая чистота конечного продукта, именно с помощью офВЭЖХ эффективнее всего проводить разделение инсулина, его производных, проинсулина и родственных пептидов.

Цель данного исследования — изучение эффективности применения специально разработанных для офВЭЖХ белков сорбентов Армсорб-Si-300 на основе синтетического силикагеля с узким распределением пор [1] для решения задачи постадийного анализа продуктов производства генно-инженерного инсулина человека и сравнение их с коммерческими аналогами. Для этого была испытана работоспособность колонок для офВЭЖХ и ион-парной офВЭЖХ в сочетании с серией элюентов, влияющих на селективность ( $\alpha$ ), разрешение ( $R_s$ ) [11] и чувствительность анализа, а также проведена оптимизация селективности и разрешения в зависимости от состава подвижной фазы. Качество разработанной системы должно позволять анализировать все возможные примеси в соответствии с принятыми нормами фармакопей [12].

Разделение проинсулина и инсулина и их близких аналогов в обращенно-фазных системах обусловлено различием в их гидрофобных свойствах. Для развернутого анализа этих белков элюирование проводили на коммерческих колонках типа  $C_{18}$ ,  $C_8$ ,  $C_4$  и на специально разработанных отечественных типа  $C_{16}$ ,  $C_8$ ,  $C_4$  на основе сорбентов Армсорб-Si-100Å и Армсорб-Si-300Å (совместная разработка ИБХ РАН и ЕрОНЕМ «АРМХРОМ», Армения).

Для получения системы анализа примесей инсулина необходимо найти условия, при которых селективность разделяемых пиков максимальна, а затем оптимизировать разрешение системы. Общую работоспособность колонок определяли элюированием модельных смесей белков (инсулин, проинсулин, лизоцим, альбумин, овальбумин, цитохром с, миоглобин) в различных условиях в градиентном режиме. При этом использовали как традиционные системы подвижной фазы (например,  $CH_3CN$  — TFA), так и встречающиеся реже (см. «Экспериментальную часть»). На основании полученных результатов были выбраны несколько лучших условий разделения белков. Затем на каждой колонке проводили изократическое разделение инсулина и проинсулина, подбирая оптимальную концентрацию органических модификаторов в элюенте.

В обращенно-фазовой хроматографии происходит сольватация сорбентов активным компонентом подвижной фазы и вытеснение сольватирующих молекул сорбатом. Ранее, при изучении механизма разделения в офВЭЖХ олигонуклеотидов [13], впервые была показана линейная зависимость их времени удерживания от концентрации органического модификатора и соли в логарифмических координатах [11]. Для описания процесса разделения белков в этих условиях в общем случае можно использовать уравнение (1) [11, 14].

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

где  $a$  — параметр гидрофобности сорбента,  $C$  — концентрация активного компонента,  $b$  — число молекул органического растворителя, выделяемое в подвижную фазу при сорбции молекулы белка.

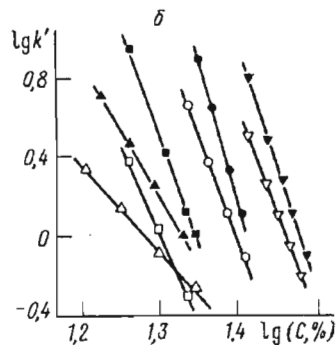
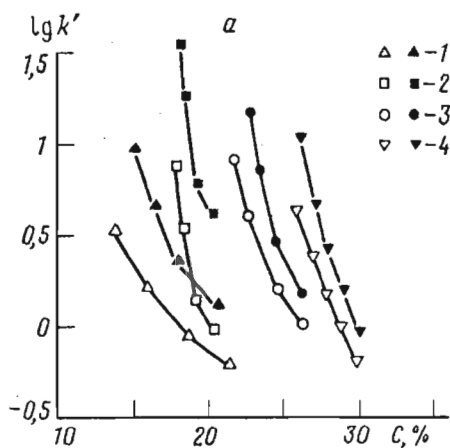


Рис. 1. Зависимость логарифма коэффициента удерживания от концентрации (а) и от логарифма концентрации органического модификатора в подвижной фазе (б) при изократических разделениях инсулина и проинсулина на коммерческих колонках: 1 — VUDAC C<sub>4</sub> 15-20и в Z-модуле; скорость 2 мл/мин; 2 — Nucleosil 300-7 Protein RP; скорость 0,8 мл/мин; 3 — Nucleosil 5 C<sub>8</sub>; скорость 0,8 мл/мин; 4 — TSK GEL-120T (TOSOH); скорость 0,8 мл/мин. Элюенты: А — 10% CH<sub>3</sub>CN в 0,1% TFA, В — 0,1% TFA в CH<sub>3</sub>CN. Светлыми значками обозначен инсулин, черными — проинсулин

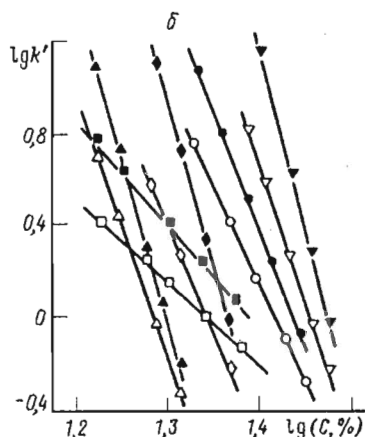
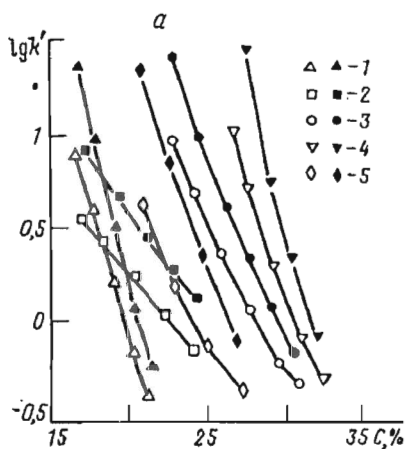


Рис. 2. Зависимость логарифма коэффициента удерживания от концентрации (а) и от логарифма концентрации органического модификатора в подвижной фазе (б) при изократических разделениях инсулина и проинсулина на колонках Армсорб: 1, 5 — Армсорб-Si-300-C<sub>8</sub>P(DM), 2 — Армсорб-Si-C<sub>4</sub>-Protein, 3 — Армсорб-Si-300-C<sub>8</sub> RP-PR, 4 — Армсорб-Si-500-C<sub>16</sub>-PR. Для колонок 1—4 элюенты: А — 10% CH<sub>3</sub>CN в 0,1% TFA; В — 0,1% TFA в CH<sub>3</sub>CN. Скорость потока 0,8 мл/мин. Для колонки 5 элюенты: А — 10% CH<sub>3</sub>CN в 1 М NH<sub>4</sub>OAc; В — 50% CH<sub>3</sub>CN в 1 М NH<sub>4</sub>OAc (pH 5,5). Остальные условия и обозначения см. рис. 1

Из уравнения (1) видно, что зависимость  $\lg k'$  ( $\lg C$ ) линейна и прямые, отражающие эту зависимость для каждого из веществ, элюируемых на одной колонке, стремятся к пересечению в одной точке (для данного диапазона  $k'$ ).

Исходя из полученных данных, были построены зависимости  $\lg k'(C)$  и  $\lg k'(\lg C)$ . При этом зависимость  $\lg k'(C)$  более наглядна для демонстрации гидрофобных свойств колонок, так как по оси X отложена реальная концентрация органического модификатора в подвижной фазе, но при этом графики принимают параболический вид. Для зависимости  $\lg k'(\lg C)$  графики принимают близкий к линейному вид, что удобно для обработки результатов.

Для разделения инсулинсодержащих белков использовали системы элюентов,

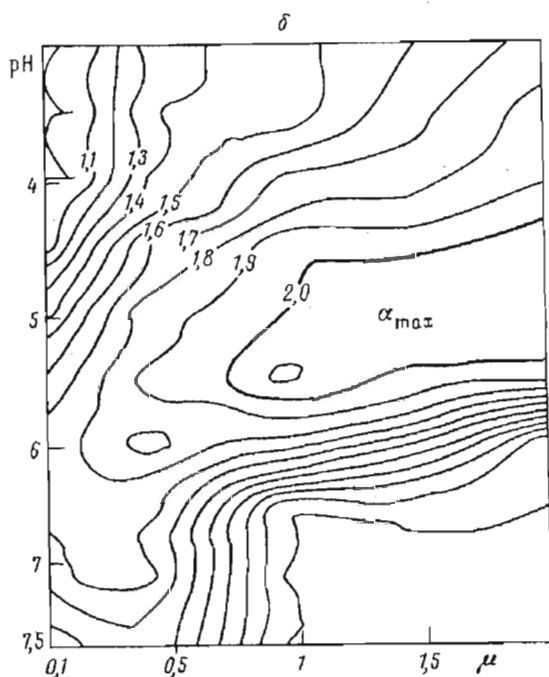
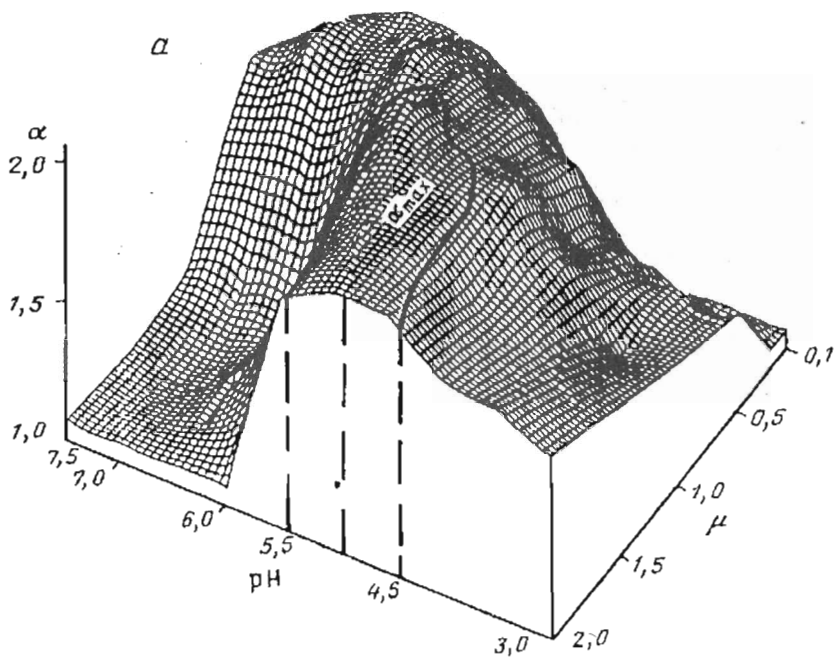


Рис. 3. Зависимость селективности разделения пиков инсулина и проинсулина от pH и ионной силы ( $\mu$ ) подвижной фазы. Зависимость выражена в виде трехмерной поверхности (а) и топографических изолиний (б). Зона максимального значения ( $\alpha_{max}$ ) дополнительно обведена. Условия проведения хроматографии: колонка Армсорб-Si-300-СзР(DM), элюенты: А — 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  в 0,1—2 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , В — 50%  $\text{CH}_3\text{CN}$  в 0,1—2 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (pH 3—7,5). Начальная концентрация элюента В 15%, далее скорость градиента 2%/мин. Скорость потока 0,8 мл/мин

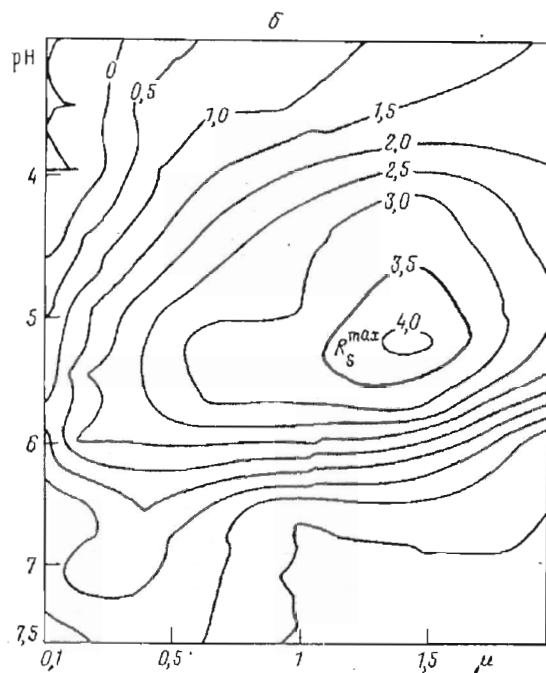
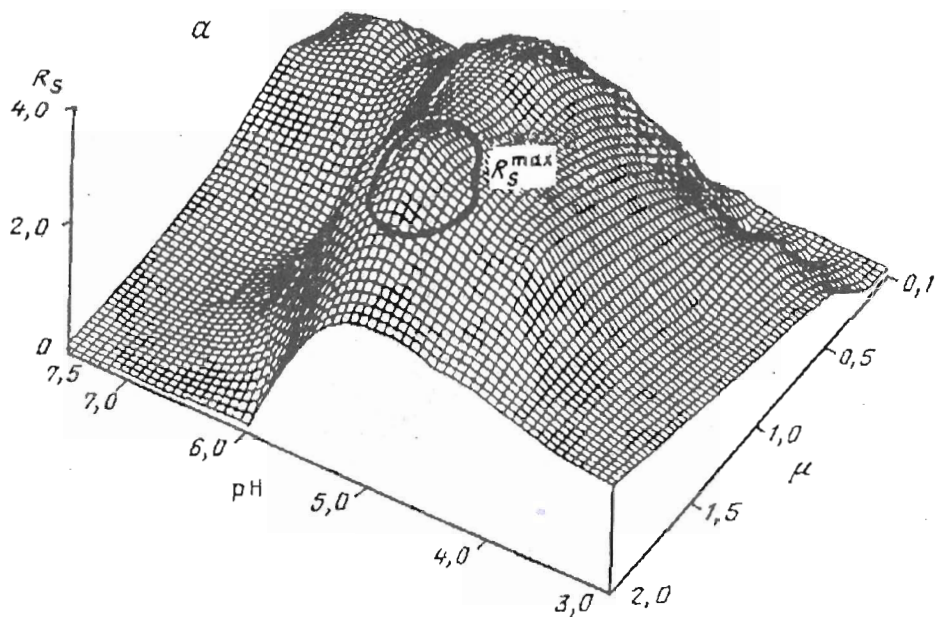


Рис. 4. Зависимость разрешения пиков инсулина и проинсулина от pH и ионной силы ( $\mu$ ) подвижной фазы. Зависимость выражена в виде трехмерной поверхности (а) и топографических изолиний (б). Зона максимального значения ( $R_s^{\max}$ ) обведена. Условия и обозначения см. рис. 3

представленные в «Экспериментальной части». Для каждой колонки были найдены условия, при которых селективность разделения пиков инсулина и проинсулина была максимальной. Зависимость значений логарифма коэффициента удерживания инсулина и проинсулина от концентрации органического модификатора и от логарифма концентрации для наиболее удачных систем изображена на рис. 1а, б и 2а, б.

Разделение инсулина и проинсулина проводили в изократическом режиме. Были найдены характеристики коммерческих колонок (рис. 1а, б) и колонок Армсорб (рис. 2а, б). Расстояние по оси  $Y$  между прямыми, соответствующими инсулину и проинсулину, элюируемым на одной колонке в одной и той же системе подвижной фазы, является параметром коэффициента селективности разделения этих двух белков. Чем больше расстояние между их пиками при одних и тех же значениях  $k'$ , тем выше селективность разделения пиков данных белков. Проекция точки воображаемого пересечения прямых, соответствующих разделяемым белкам, на ось абсцисс при  $\lg k' = \text{const}$  и угол наклона этих прямых являются составляющими параметра общей гидрофобности колонки ( $a$ ) (ур-е 1) [15]. Таким образом, из вида данной зависимости можно охарактеризовать каждую систему и колонку и найти наиболее удачный вариант. В частности, на рис. 1 показана зависимость параметра общей гидрофобности сорбентов от длины привитой алкильной фазы. Данная зависимость может не всегда соблюдаться при изменении состава подвижной фазы (рис. 2). Так, сорбент колонки Армсорб-Si-300- $C_8P$ (DM) (силикагель с  $d_{\text{пор}} = 300 \text{ \AA}$ , модифицированный  $\gamma$ -глицидиллом с привитой фазой  $C_8$ ) проявляет большую общую гидрофобность в системе  $\text{CH}_3\text{CN} - 1 \text{ M NH}_4\text{OAc}$ , чем в  $\text{CH}_3\text{CN} - 0,1\% \text{ TFA}$  (ср. кривые 1 и 5). Это связано с тем, что при большей ионной силе и значении pH, близком к изоэлектрической точке, происходит усиление гидрофобных взаимодействий по мере возрастания сродства белка к алкильной стационарной фазе, поэтому белок элюируется с колонки при более высокой концентрации органического модификатора. Из рис. 2 видно, что наибольшей селективностью обладает Армсорб-Si-300- $C_8P$ (DM) в системе  $\text{CH}_3\text{CN} - 1 \text{ M NH}_4\text{OAc}$  (pH 5,5). Разделение проходит с хорошим разрешением пиков инсулина, дезамидоинсулина и проинсулина благодаря высокой селективности, что особенно важно для проведения завершающих стадий очистки и их контроля при идентификации малых количеств примесей. Достаточно перспективен сорбент Армсорб-Si-300- $C_4$ -Protein, который отличается пониженной относительной гидрофобностью и высоким разрешением пиков.

Наиболее эффективное разделение инсулинсодержащих белков достигнуто на колонке Армсорб-Si-300- $C_8P$ (DM) в системе  $\text{CH}_3\text{CN} - \text{NH}_4\text{OAc}$ . На этом сорбенте была выполнена двумерная оптимизация селективности (рис. 3а, б) и разрешения (рис. 4а, б) пиков инсулина и проинсулина сетевыми методами в зависимости от ионной силы ( $\mu$ ) и pH элюента в одной и той же системе градиента органического модификатора. В результате были получены зависимости  $\alpha^s$  и  $R_s^z$  в виде трехмерных поверхностей и двумерных топографических изолиний. Так как в данном опыте элюирование проведено не в изократическом, а в градиентном режиме, числовые значения  $\alpha$  и  $R_s$  нельзя получать непосредственно из хроматограммы. Поэтому на рис. 3 и 4 приведены значения  $\alpha$  и  $R_s$  с поправкой к градиенту, которые соответствуют числовым значениям, полученным в изократическом режиме при соответствующих значениях pH и ионной силы буфера при значениях  $k' \sim 8$ . При этом вид трехмерной поверхности сохраняется прежним, а значения селективности и разрешения между пиками инсулина и проинсулина соответствуют реальным изократическим. На рис. 3 видно, что максимальное значение селективности наблюдается при pH 4,7—5,5 и концентрации  $\text{NH}_4\text{OAc}$  0,5—2 М. Из данных рис. 4 для максимального разрешения получаем диапазон pH 4,7—5,5 и  $\mu$  1—1,7 М. Необходимо отметить, что в диапазоне концентрации  $\text{NH}_4\text{OAc}$  1,5—2 М на хроматограмме наблюдается нарушение классической гауссовой формы пика инсулина и ухудшение разделения. При низких значениях  $\mu$  (0,1—0,5) и pH 3—4 разделения между пиками инсулина и проинсулина практически нет и значения  $\alpha$  близки к 1, а  $R_s$  — к нулю. При высоких значениях  $\mu$  (1—2) и pH 6—7 ацетонитрил перестает смешиваться с концентрированным раствором  $\text{NH}_4\text{OAc}$  и разделение в этой системе становится невозможным. Поэтому массив значений, приходящийся на эти координаты, принят равным 1 для  $\alpha$  и нулю для  $R_s$ .



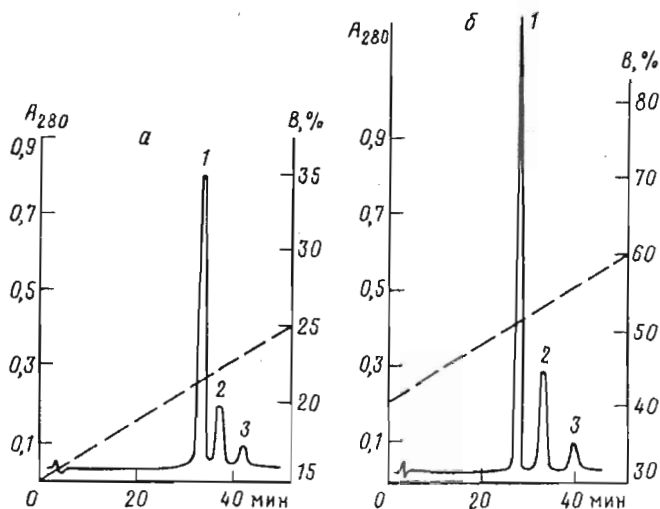


Рис. 5. Разделение инсулина (1), дезамидо- $A_{21}$ -инсулина (2) и проинсулина (3) на колонке (0,4 × 15 см) Армсорб-Si-300- $C_8P$ (DM). Системы элюентов: а) А — 10%  $CH_3CN$  в 0,1% TFA; В — 0,1% TFA в  $CH_3CN$  (рН 2); б) А — 10%  $CH_3CN$  в 1 М  $NH_4OAc$ ; В — 50%  $CH_3CN$  в 1 М  $NH_4OAc$  (рН 5,5). Скорость потока 0,8 мл/мин

На основании данных оптимизации было осуществлено разделение инсулина, дезамидо- $A_{21}$ -инсулина и проинсулина на аналитической колонке Армсорб-Si-300- $C_8P$ (DM) (рис. 5). Видно, что разделение в условиях «б» проходит с более высоким разрешением, чем в традиционной системе  $CH_3CN$  — TFA (рис. 5а), хотя обе хроматограммы удовлетворяют требованиям фармакопей. ( $R_{S_{1,2}} = 1,8$ ;  $R_{S_{1,3}} = 3,9$  для системы  $CH_3CN$  — TFA и  $R_{S_{1,2}} = 2,3$ ;  $R_{S_{1,3}} = 5,0$  для системы  $CH_3CN$  —  $NH_4OAc$ ).

Повышение селективности разделения, а следовательно, и разрешения между пиками инсулина, дезамидоинсулина и проинсулина при использовании данной системы можно объяснить сложными механизмами взаимодействия белков с подвижной и стационарной фазами. Из классических механизмов взаимодействий в обращенно-фазовой хроматографии известно, что при повышении концентрации солей в подвижной фазе увеличивается время удерживания белка на колонке (так называемый эффект высаливания). На этом принципе основан метод гидрофобной хроматографии. Однако в данном случае высокая концентрация ацетата аммония может выполнять несколько функций: обеспечивается высокая ионная сила раствора, а так как ацетат является слабогидрофобным агентом, повышающим растворимость гидрофобных белков, и хорошо растворяется в водных растворах, он предотвращает полярные взаимодействия белка с незкранированными силанольными группами, присутствующими на поверхности модифицированного силикагеля.

Ионы аммония в данном случае выполняют важную роль слабого ион-парного агента, увеличивающего удерживание белков на колонке и обеспечивающего возрастание селективности за счет ион-парного механизма взаимодействий.

И наконец, третий немаловажный момент — значение рН. При значении рН, близком к изоэлектрической точке, часто наблюдается неспецифическая сорбция белка на колонке, или преципитация. В данном случае за счет повышенной концентрации ацетонитрила в подвижной фазе белки растворимы при рН, близком к изоэлектрической точке, хотя они и проявляют повышенное сродство к сорбенту колонки, что приводит к увеличению их времени удерживания.

Учитывая вышеизложенные соображения о механизмах взаимодействия между белками, подвижной и стационарной фазами и изменяя параметры подвижной

фазы, мы получаем средство многофакторного управления селективностью разделения белков.

В результате проделанной работы проведено сравнение обращенно-фазовых сорбентов Армсорб и импортных коммерческих колонок при разделении инсулина и сопутствующих белков. Проведена оптимизация условий аналитического разделения в условиях офВЭЖХ сетевым методом с применением компьютерной графики (изменение селективности и разрешения в зависимости от pH и ионной силы элюента). Осуществлено разделение инсулина, дезамидоинсулина и проинсулина в системе  $\text{CH}_3\text{CN} - \text{NH}_4\text{OAc}$  с лучшими показателями селективности и разрешения, чем в традиционных системах типа  $\text{CH}_3\text{CN} - \text{TFA}$ . Предложен механизм взаимодействий белка с подвижной фазой и сорбентом для данной системы.

### Экспериментальная часть

Хроматографию проводили с помощью насоса Waters 510 с инжектором Waters U6K, спектрофотометра Waters 490E, интегратора Waters 740 (США) и следующих колонок: TSK GEL-120T ( $0,4 \times 30$  см; TOSOH, Япония), Nucleosil 5  $\text{C}_8$  ( $0,4 \times 15$  см), Nucleosil 300-7 Protein RP ( $0,4 \times 15$  см) (Machery Nagel, Германия), VYDAC  $\text{C}_4$  15-20u ( $0,8 \times 15$  см) в Z-модуле (Millipore, США), Армсорб-Si-300- $\text{C}_8$ P (DM) ( $0,4 \times 15$  см), Армсорб-Si-500- $\text{C}_{16}$ -PR ( $0,4 \times 30$  см), Армсорб-Si-300- $\text{C}_8$ -RP-PR ( $0,4 \times 30$  см), Армсорб-Si-300- $\text{C}_4$ -Protein ( $0,4 \times 15$  см) («АРМХРОМ», Армения). Для разделения были использованы образцы инсулина, проинсулина и дезамидоинсулина, полученные в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН. Для идентификации использовали стандартный образец инсулина человека (Atlanta, Chemie und Handelsgesellschaft mbH, cat. N 83/500, D-6900 Heidelberg 1, Германия). Использовали следующие реактивы квалификации ос. ч.: ацетонитрил, метанол, этанол, 2-пропанол, вода (очищенная на установке Milli-Q, Waters, США), NaOH, NaCl,  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (Fluka, Германия). Работу осуществляли с системами хроматографических элюентов для офВЭЖХ:  $\text{CH}_3\text{CN} - 0,1\%$  TFA (pH 2),  $\text{CH}_3\text{CN} - 0,1\%$   $\text{H}_3\text{PO}_4$  (pH 2),  $\text{CH}_3\text{CN} - 0,1\%$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 2),  $\text{CH}_3\text{OH} - 0,2$  M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  ( $3 < \text{pH} < 7$ ),  $\text{CH}_3\text{CN} - \text{NH}_4\text{OAc}$  ( $3 < \text{pH} < 7,5$ ), EtOH — 0,2 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  ( $3 < \text{pH} < 7,5$ ), iPrOH — 0,1% TFA (pH 2),  $\text{CH}_3\text{CN} - 0,1-1\%$   $\text{Et}_3\text{NHOAc}$  ( $3 < \text{pH} < 7$ ),  $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH} - 0,1-1\%$   $\text{Et}_3\text{NHOAc}$  ( $3 < \text{pH} < 7$ ). Перед хроматографией элюенты фильтровали через нитроцеллюлозные и GVWP-фильтры (диаметр пор 0,45 мкм, Waters, США) и дегазировали 20 мин.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klyushnichenko V. E., Kulish D. M., Yakimov S. A., Maltsev K. V., Grishina G. A., Nazimov I. V., Wulfson A. N. // J. Chromatogr. A. 1994. V. 661. P. 83—92.
2. Schrader E., Preiffer E. F. // J. Liq. Chromatogr. 1985. V. 8. № 6. P. 121—137.
3. McLeod A., Wood S. P. // J. Chromatogr. 1984. V. 285. № 1. P. 319—331.
4. Rivier J., McClintock R. // J. Chromatogr. 1983. V. 268. № 1. P. 112—119.
5. Peter A., Szepesi G., Balaspiri L., Burger K. // J. Chromatogr. 1987. V. 408. № 1. P. 43—52.
6. Welinder B. S., Linde S., Hansen B. // J. Chromatogr. 1985. V. 348. № 1. P. 347—361.
7. Зенгбуш Л. Молекулярная и клеточная биология. М.: Мир, 1982. Т. 2. С. 110; Т. 3. С. 136.
8. Linde S., Welinder B. S. // J. Chromatogr. 1991. V. 548. № 1. P. 195—206.
9. Kroeff E. P., Owens R. A., Campbell E. L., Johnson R. D., Marks H. I. // J. Chromatogr. 1989. V. 461. № 1. P. 45—61.
10. Vigh G., Varga-Puchony Z., Szepesi G., Gazdag M. // J. Chromatogr. 1987. V. 386. № 1. P. 353—362.
11. Wulfson A. N., Yakimov S. A. // Chromatography '84/Eds H. Kalasz, L. S. Ettre. Budapest: Akad. Kiado, 1986. P. 545—555.
12. The United States Pharmacopeia. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 1984. P. 2177—2179. British Pharmacopeia. London Her Majesty's Stationery Office 1988. P. 312, 313.
13. Вульфсон А. Н., Якимов С. А. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 3. С. 365—390.



14. Шатц В. Д. Закономерности сорбции органических соединений в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Автореф. дис. ... д-ра хим. наук. Рига, 1989.
15. Wulfson A. N., Yakimov S. A.//J. High Resol. Chromatogr. 1984. V. 8. № 7. P. 442—460.

Поступила в редакцию  
11.X.1993

После доработки  
3.III.1994

V. E. Klyushnichenko, S. A. Yakimov, **A. M. Arutyunyan**,  
A. E. Ivanov, K. V. Maltsev, A. N. Wulfson

RECOMBINANT HUMAN INSULIN  
IV. DESIGN AND OPTIMIZATION OF THE SYSTEM OF CONTROL  
BY REVERSE-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute  
of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Key words: insulin, proinsulin, RP HPLC, multifunctional optimization, hydrophobic sorbents.

The effectiveness of the RP HPLC application for the step-by-step analysis of the recombinant insulin production was studied. Properties of a number of commercial and experimental columns in different chromatographic conditions were considered. A three-dimension optimization of selectivity and resolution versus pH and ion strength was carried out. A mechanism of the resolution and selectivity control is suggested.