



УДК 547.96:577.112.083

## МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ, РАЗДЕЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА КИНИНОВ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СМЕСЯХ.

РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ГРАДИЕНТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ БРАДИКИНИНА,  
ЛИЗИЛ-БРАДИКИНИНА И МЕТИОНИЛ-ЛИЗИЛ-БРАДИКИНИНА  
НА КОЛОНКЕ С SP-СЕФАДЕКСОМ С-25

*Мажевинна Л. Г., Левина Г. О., Филатова М. П.,  
Уткина Е. А., Пасхина Т. С.*

*Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Предложен простой и хорошо воспроизводимый метод выделения, разделения и количественного анализа смесей брадикинина, Lys- и Met-Lys-брадикинина на колонке с SP-сефадексом С-25, не требующий предварительного концентрирования и обессоливания кининсодержащего раствора. Показано, что для идентификации кининов анализируемая проба должна содержать каждого кинина не менее 0,02 мкг-экв. БК; для количественного анализа содержание кининов должно быть на порядок выше. Описаны две модификации метода, в которых используются летучий и нелетучий буферы. Обсуждены оптимальные условия проведения хроматографии для достижения максимальной разрешающей способности и количественного выхода кининов. Описан синтез Lys- и Met-Lys-брадикинина из миллиграммовых количеств коммерческого препарата брадикинина.

При изучении роли отдельных кининов как медиаторов определенных физиологических и патологических процессов основные методические трудности связаны с выделением соответствующего кинина из физиологической жидкости и его идентификацией. Как правило, эта задача решается в несколько этапов. После отделения кининов от белков экстракцией органическими растворителями [1] экстракт концентрируют и обессоливают на катионитах [2, 3], биполярных смолах [4] или нейтральных сорбентах [5]. Разделение смеси кининов на индивидуальные компоненты проводят с помощью ионообменной хроматографии (колонки с СМ-целлюлозой и СМ-сефадексом, SE- и SP-сефадексами [2, 5–8]), бумажной хроматографии или электрофореза на различных носителях [2, 8–10].

Предлагаемый в данной работе способ элютивной хроматографии кининов на колонке с SP-сефадексом С-25 существенно упрощает вышеописанную процедуру, так как позволяет выделить кинины в индивидуальном состоянии из многокомпонентных смесей в одну стадию, не прибегая к предварительной экстракции, обессоливанию и концентрированию кининсодержащего раствора. В работе изучено влияние различных факторов на воспроизводимость и разрешающую способность метода и определены границы его применения для качественного и количественного анализа смесей кининов. Разработаны два варианта метода, в которых используются летучая и нелетучая буферные системы.

*Хроматография кининов на колонке.* В отличие от аналитического метода Сампайо и сотр. [7] хроматографическое разделение кининов данным методом проводится после их предварительной сорбции на колонке с SP-сефадексом С-25 в условиях низкой ионной силы ( $\mu 0,04$ ) и pH 8,1, позволяющих извлекать кинины из очень разбавленных растворов.

В первом варианте смесь кининов, сорбированную на колонке с SP-сефадексом С-25 в 0,02 М трис-HCl-буфере, pH 8,1, содержащем 0,02 М

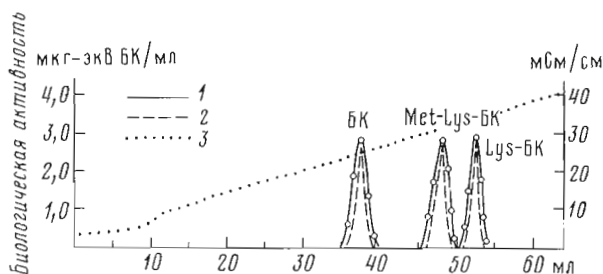


Рис. 1. Разделение смеси кининов на колонке (0,9×15 см) с SP-сефадексом С-25 в градиенте концентрации NaCl в 0,02 М трис-HCl, pH 8,1. Скорость элюции 4мл/ч, 4°С. 1 — кривая элюции при объеме наносимой пробы 0,1 мл; 2 — кривая элюции при объеме наносимой пробы 30 мл; 3 — проводимость элюата. Содержание кининов в элюате определяли как описано в работе [11]

NaCl ( $\mu$ l,04), элюируют уравнивающим буфером, в определенном объеме которого (64 мл) создается линейный градиент ионной силы ( $\Delta\mu/v$ ) путем увеличения концентрации NaCl от 0,02 до 0,50 М. На рис. 1 показано, что в этих условиях брадикинин, Lys- и Met-Lys-брадикинины элюируются в виде узких фракций объемом около 3 мл каждая после пропуска соответственно 39, 48 и 52 мл элюента. При статистической обработке результатов 20 опытов найдено, что значение объема элюции ( $v_e$ ) каждого кинина с вероятностью 95% лежит в интервале  $\pm 1$  мл. При постоянном значении  $\Delta\mu/v$  в элюирующем буферном растворе  $v_e$  кининов не зависят от скорости пропуска элюента через колонку в интервале 2—16 мл/ч. Более высокие скорости не применялись, поскольку величина 20 мл/ч для данной колонки является, как известно, предельной для равновесного ионообменного процесса [12].

Изменение в широких пределах (0,1—32 мл) объема анализируемой пробы не влияет ни на значения  $v_e$ , ни на объем фракций кининов в элюате, если pH и  $\mu$  этой пробы достаточно точно соответствуют значениям pH и  $\mu$  буфера, уравнивающего колонку. По-видимому, в условиях равновесия при низкой ионной силе и  $\text{pH} \ll \text{pI}$  сорбируемых пептидов [13] кинины достаточно прочно удерживаются катионитом.

Возможность варьировать объем анализируемой пробы существенно упрощает подготовку раствора к анализу: необходимые значения pH и ионной силы достигаются просто путем разбавления исходного раствора и доведения его pH до 8,1. При этом пробы с максимальным объемом (30—32 мл) концентрируются на колонке в 8—10 раз.

Результаты серии опытов по определению границ применения данного метода для качественного и количественного анализа кининсодержащих растворов приведены в таблице. Для предотвращения потерь кининов за счет неспецифической сорбции были предприняты все необходимые меры (см. экспериментальную часть). Тем не менее необратимые потери брадикинина при хроматографии все же имеют место; эти потери в процентном отношении тем более значительны, чем меньшие количества кинина подвергаются анализу (см. таблицу). Кроме того, как видно из таблицы, с уменьшением концентрации брадикинина в анализируемой пробе уменьшается не только количество извлекаемого брадикинина (в %), но и воспроизводимость этой величины. Поэтому при содержании в пробе менее 20 нг-экв. BK метод может использоваться только для качественного хроматографического анализа смеси кининов. При этом благодаря концентрирующему эффекту катионита можно анализировать очень разбавленные растворы (0,7—7,0 нг-экв. BK/мл), концентрация кинина в которых находится даже за пределами чувствительности используемого метода детекции (2—3 нг-экв. BK/мл).

При более высокой концентрации кининов в пробе (более 7 нг-экв. BK/мл) и общем содержании каждого из них не менее 0,2 мкг-экв. брадикинина можно установить не только качественный, но и количественный

**Количество брадикинина (в %), извлекаемое из растворов различной концентрации с помощью градиентной хроматографии на колонке с SP-сефадексом С-25 \***

Анализируемая проба			Элюат	
количество брадикинина, мкг	минимальная концентрация брадикинина **		концентрация брадикинина, мкг/мл	выход брадикинина, %
	мкг/мл	моль/мл		
1-100	0,03	$3 \cdot 10^{-11}$	0,25	$77 \pm 10$ ( $n=26$ )
0,2-1,0	0,007	$7 \cdot 10^{-12}$	0,04	$65 \pm 25$ ( $n=8$ )
0,02-0,20	0,0007	$7 \cdot 10^{-13}$	0,002	<50

\* Хроматография в градиенте NaCl в трис-HCl-буфере; брадикинин наносили на колонку в 30 мл соответствующего буферного раствора.

\*\* В растворе с  $\mu > 0,04$  концентрация кинина должна быть выше указанной, так как раствор подготавливается к анализу путем разбавления.

состав смеси кининов в растворе, поскольку при этом для количества кинина, извлекаемого из раствора с помощью данного метода, получаются статистически достоверные значения. Так как в этом районе концентраций потери брадикинина на колонке не превышают 50% (см. таблицу), описанный метод можно использовать и для препаративного разделения смесей кининов, однако в этом случае необходима дополнительная стадия обессоливания выделенных кининов.

Для выделения кининов, свободных от солей элюирующего буфера, разработан второй вариант метода, в котором элюирующий трис-HCl-буфер, содержащий NaCl, заменен на летучий аммоний-бикарбонатный буфер с тем же рН.

На рис. 2а показаны результаты хроматографического разделения брадикинина, Lys- и Met-Lys-брадикинина на колонке с SP-сефадексом С-25 в аммоний-бикарбонатном буфере, молярность которого изменяется линейно от 0,04 до 0,52 М (в объеме 64 мл). По сравнению с кривой элюции на рис. 1 максимумы пиков на кривой элюции рис. 2а сближены настолько, что пики Met-Lys- и Lys-брадикинина частично перекрываются. Чтобы устранить это явление, связанное, по-видимому, с различной вытеснительной способностью  $\text{Na}^+$ - и  $\text{NH}_4^+$ -ионов в элюирующих растворах, была изучена зависимость между объемом разделения ( $v$ ) этих пептидов и величиной градиента ионной силы  $\Delta\mu/v$  (рис. 3).  $\Delta\mu/v$  изменяли путем увеличения объема элюирующего раствора  $v$  при постоянном значении  $\Delta\mu$ , равном 0,48. Как и следовало ожидать,  $v$  кининов увеличивается с увеличением  $v$ , т.е. с уменьшением величины  $\Delta\mu/v$ . При  $v$ , равном 96 мл, достигается столь же хорошее разделение трех кининов (рис. 2б), как и в первом варианте метода (рис. 1). При дальнейшем увеличении  $v$  происходит некоторое уширение пиков на кривой элюции: на 1-1,5 мл на каждые 100 мл объема элюирующего буфера. Несмотря на это, расстояние между пиками брадикинина и Lys-брадикинина увеличивается настолько, что в его пределах может быть разрешено еще несколько пиков. Это хорошо видно на рис. 4, который наглядно демонстрирует увеличение разрешающей способности метода с увеличением  $v$ , т.е. с уменьшением градиента ионной силы в элюирующем буфере. Как видно из рис. 4, необходимые для этого большие объемы элюирующего буфера можно уменьшить, если использовать следующую особенность данного хроматографического процесса: с увеличением  $v$  (при постоянном  $\Delta\mu$ , равном 0,48) кинины десорбируются при меньшей ионной силе элюирующего буфера. Так, если  $v=96$  мл,  $v$  брадикинина и Lys-брадикинина равны 27 и 42 мл (рис. 4б), что соответствует 0,17 и 0,25 молярной концентрации элюирующего буфера; если же  $v$  увеличивается в 4 раза (до 384 мл), то  $v$  брадикинина (35 мл) и Lys-брадикинина (77 мл) соответствуют 0,08 и 0,14 молярной концентрации элюента. Благодаря этому в первом случае достаточно 60 мл элюирующего буфера с градиентом буферной соли от 0,04 до 0,34 М (рис. 4б), а во втором - 100 мл буфера с градиентом 0,04-

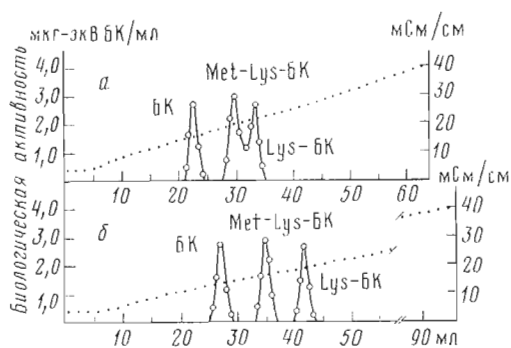


Рис. 2

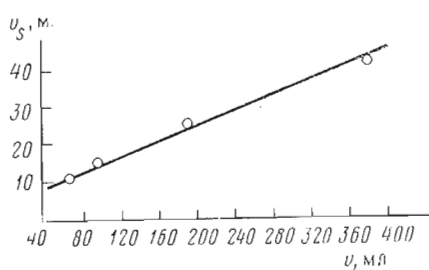


Рис. 3

Рис. 2. Разделение смеси кининов на колонке (0,9×15 см) с SP-сефадексом С-25 в градиенте концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , рН 8,1. Скорость элюции 4 мл/ч, 4° С. Дл 0,48. 1 — кривая элюции кининов, 2 — проводимость элюата. Объем элюирующего буфера 64 мл (а) и 96 мл (б)

Рис. 3. Зависимость объема разделения ( $v_s$ ) брадикинина и Lys-брадикинина от объема элюирующего буфера ( $v$ ). Дл 0,48; аммоний-бикарбонатный буфер

0,16 М (рис. 4в). Это значительно сокращает длительность хроматографического процесса. Как указывалось выше, дополнительная экономия времени может быть получена за счет увеличения скорости пропускания буфера через колонку.

Главное достоинство предложенного метода хроматографии кининов на колонке с SP-сефадексом С-25 заключается в возможности фракционировать смесь кининов без предварительного концентрирования и обессоливания исследуемого раствора. Это выгодно отличает данный метод от сложного трехстадийного метода Сампайо и сотр. [7], в котором на микроколонке с SP-сефадексом С-25 в элюенте постоянного состава (рН 8,1) можно хроматографировать лишь небольшой объем (1—4 мл) заранее сконцентрированного и полностью обессоленного раствора кининов.

Применение положительного градиента ионной силы в элюирующем буфере имеет, кроме того, и ряд других преимуществ: во-первых, позволяет элюировать кинины в виде узких фракций (объемом 3—5 мл вместо 10—15 мл, как в [7]) и, во-вторых, более чем в 10 раз уменьшить объем элюирующего буфера, необходимый для полной десорбции кининов (от 1170 до 100 мл на 1 см<sup>2</sup> поперечного сечения колонки).

Известно, что минимальное количество и соответствующая ему минимальная концентрация вещества в пробе, подвергаемой хроматографическому анализу на колонке, определяются чувствительностью выбранного метода детекции вещества, степенью концентрирования раствора ионообменником, а также процентом потерь вещества в процессе хроматографии.

Полученные в работе количественные характеристики предложенного нами метода свидетельствуют о том, что диапазон его применения очень широк: от качественного анализа растворов с концентрацией, близкой к концентрации свободных кининов в плазме крови человека и животных (1—3 нг-экв. БК/мл), до препаративного разделения миллиграммовых количеств синтетических кининов. При этом минимальный уровень кининов, необходимый для определения их количественного содержания (7—10 нг-экв. БК/мл), совпадает с концентрацией кининов в различного рода патологических жидкостях. Следует отметить, что ошибка количественного анализа в данном случае в значительной степени зависит от погрешности выбранного биологического способа тестирования кининов, которая составляет не менее 10—15% от измеряемой величины. Можно надеяться, что в комплексе с более точным способом измерения концентрации кининов (например, радиоиммунологическим [14]) градиентная хроматография на SP-сефадексе С-25 в описанных условиях будет применима для количественного анализа более разбавленных растворов кининов.

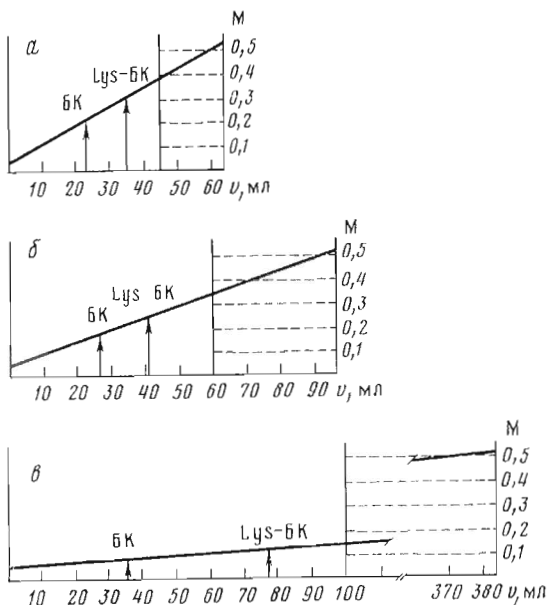


Рис. 4. Зависимость объема элюции ( $v_e$ ) кининов от величины  $\Delta u/v$ ; аммоний-бикарбонатный буфер,  $\Delta u$  0,48. Объем элюирующего буфера ( $v$ ) 64 (а), 96 (б) и 384 мл (в)

Метод апробирован нами для определения количества и природы кининов, присутствующих в абдоминальном трансудате большой с нефротическим синдромом [15], а также для анализа кининов, образующихся под влиянием панкреатического калликрейна свиньи в нативной плазме крови кролика *in vitro* и в ферментативных гидролизатах высокоочищенного кининогена кролика [16, 17].

*Синтез хроматографических стандартов кининов.* Необходимые для разработки хроматографического метода Lys- и Met-Lys-брадикинины были синтезированы из миллиграммовых количеств коммерческого препарата брадикинина (Reanal).

Известно, что введение ковалентных защитных группировок в такие сложные пептиды, каким является брадикинин, сопровождается зачастую неспецифическими модификациями и снижением оптической активности молекулы. В данной работе в синтезе Lys-брадикинина из брадикинина впервые применена нековалентная защита функциональных групп исходного нонапептида: гуанидиногруппы аргинина защищены солеобразованием с сильной кислотой, С-концевая карбоксильная группа — солеобразованием с триэтиламино. После конденсации защищенного таким образом брадикинина с *n*-нитрофениловым эфиром дибензилоксикарбониллизина и гидрирования полученного декапептида в 90% уксусной кислоте был выделен свободный Lys-брадикинин, который в случае необходимости отделяли от примесей гель-фильтрацией на колонке с биогелем Р-2 или сефадексом LH-20. Таким образом, быстро и с хорошим выходом (50%) был получен хроматографически чистый каллидин.

Синтез Met-Lys-брадикинина из миллиграммовых количеств брадикинина конденсацией *N*<sup>α</sup>-*трет*-бутилоксикарбонилметионил-*N*<sup>ε</sup>-*трет*-бутилоксикарбониллизина и триэтиламмониевой соли дихлоргидрата брадикинина азидным методом приводит к сложной смеси продуктов, из которой не удастся выделить ундекапептид с хорошим выходом. 40%-ный выход Met-Lys-брадикинина был достигнут путем последовательного присоединения *n*-нитрофениловых эфиров *N*<sup>α</sup>-бензилоксикарбонил-*N*<sup>ε</sup>-*трет*-бутилоксикарбониллизина и *трет*-бутилоксикарбонилметионила к брадикинину, функциональные группы которого были также защищены солеобразованием. Хроматографически чистый Met-Lys-брадикинин был получен после удаления защитных групп и очистки продукта реакции на колонке с биогелем Р-2 в 5% уксусной кислоте.

Очистка синтетических кининов от побочных продуктов синтеза может быть проведена с помощью описанной в данной работе хроматографической процедуры, поскольку емкость используемой колонки с SP-сефадексом С-25, как упоминалось выше, позволяет сорбировать и разделять миллиграммовые количества сильноосновных пептидов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали следующие сорбенты и реактивы: SP-сефадекс С-25 (Pharmacia, Швеция), трис-основание (Serva, ФРГ), брадикинин (Sandoz, Швейцария, и Reanal, Венгрия), бикарбонат аммония отечественного производства, х.ч.

Хроматографию проводили на стандартной колонке (0,9×15 см) из полиакрилового пластика (Pharmacia, Швеция) с использованием автоматической хроматографической системы (LKB, Швеция), включающей прибор для создания градиента концентрации соли в элюирующем буфере Ultrograd, коллектор фракций Ultroac и перистальтический насос Varioprepex. рН-метр рН М62 и кондуктометр CDM 2e фирмы Radiometer (Дания).

Для предотвращения сорбции кининов стеклянной поверхностью использовалась только пластиковая или силиконированная стеклянная посуда; во все растворы добавлялся 0,01 мМ оксалат натрия.

5–6 г сухого SP-сефадекса в  $\text{Na}^+$ -форме оставляли набухать в 1,0 М трис-НСl или 1,0 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  в течение 1 сут, периодически заменяя этот раствор на свежий. Суспензию SP-сефадекса в трис<sup>+</sup>- или  $\text{NH}_4^+$ -форме переносили на воронку Бюхнера и промывали начальным (уравновешивающим) буфером до тех пор, пока рН и проводимость промывных вод не достигали значений таковых в уравновешивающем буфере. Приготовленной суспензией сефадекса заполняли колонку и уравновешивали ее в течение 1 ч при скорости пропуска буфера 20 мл/ч.

Для уравновешивания SP-сефадекса С-25 и создания градиента ионной силы в элюирующем буфере использовали следующие растворы. *I вариант метода:* начальный буфер — 0,02 М трис-НСl, рН 8,4, содержащий 0,02 М NaCl и 0,01 мМ  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , проводимость 3,3 мСм/см при 20° С; конечный буфер — 0,02 М трис-НСl, рН 8,4, содержащий 0,50 М NaCl и 0,01 мМ  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , проводимость 40,2 мСм/см при 20° С. *II вариант метода:* начальный буфер — 0,04 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , рН 8,1, содержащий 0,01 мМ  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , проводимость 3,3 мСм/см при 20° С; конечный буфер — 0,52 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , рН 8,1, содержащий 0,01 мМ  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , проводимость 40,2 мСм/см при 20° С.

После нанесения анализируемой пробы с помощью перистальтического насоса колонку подсоединяли к системе приборов Ultrograd — Ultroac и проводили хроматографию, как описано в тексте.

*Количественное определение кининов в растворах* проводили согласно работе [11] на изолированном роге матки девственных крыс, предварительно стимулированных диэтилстильбестролом. Гладкомышечный препарат был помещен в баню объемом 10 мл с раствором Желона при 29–31° С. Аликвоты анализируемого раствора объемом до 0,2 мл вводили в баню и определяли минимальную (пороговую) дозу, которая вызывает сокращение гладкой мышцы, идентичное сокращению от пороговой дозы стандартного раствора синтетического брадикинина. Количество кинина численно выражали в микрограмм- или нанограмм-эквивалентах (экв.) синтетического брадикинина. Раствор последнего точной концентрации готовили из фиксаналов фирмы Sandoz. Пороговая доза синтетического брадикинина, как правило, находится в пределах 0,05–0,50 нг брадикинина/мл бани, т. е. минимальная концентрация кининсодержащего раствора, определяемая данным способом, равна 2–3 нг-экв. брадикинина/мл.

*Статистическую обработку* данных проводили как описано в работе [18].

*Синтез хроматографических стандартов кининов.* В синтезе хроматографических стандартов кининов использовали аминокислоты L-ряда. Индивидуальность полученных соединений проверяли хроматографией

на ленинградской бумаге марки Б в системах пиридин — изоамиловый спирт — вода (35 : 35 : 30) и бутанол — вода — уксусная кислота (4 : 5 : 1), электрофорезом на бумаге FN-17 в горизонтальном приборе при градиенте потенциала 24 В/см в 1 М ацетатном буфере (рН 2,4), ТСХ на пластинках фирмы Merck в системе бутанол — вода — уксусная кислота (4 : 1 : 1). Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer 241 (США). Аминокислотный анализ пептидов выполняли на автоматическом анализаторе ВС-201 (Biocal, ФРГ).

$N^{\alpha}, N^{\epsilon}$ -Z<sub>2</sub>-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg · 2HCl (дихлоргидрат дибензилоксикарбониллизил-брадикинина) (I). 0,02 г (0,015 ммоль) триацетата брадикинина растворяли в 0,15 мл абсолютного диметилформамида, прибавляли 0,007 мл 7 н. раствора HCl в диоксане и затем приливали 4 мл абсолютного эфира. Осадок хлоргидрата брадикинина отфильтровывали, растворяли в 0,3 мл сухого диметилформамида и прибавляли 0,007 мл триэтиламина и 0,014 г (0,026 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира  $N^{\alpha}, N^{\epsilon}$ -дибензилоксикарбониллизина [19]. Реакционную смесь оставляли на 48 ч при 37° С; пептид осаждали избытком абсолютного этилацетата, отфильтровывали. Выход хроматографически и электрофоретически однородного пептида (I) 0,022 г (90%).

Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg · 4CH<sub>3</sub>COOH (тетраацетат калидина) (II). 0,022 г (0,014 ммоль) соединения (I) растворяли в 2,0 мл 90% водной уксусной кислоты и гидрировали 8 ч над Pd-чернью. Продукт гидрирования очищали пересаживанием из метанола эфиром. Получали 0,014 г (70%) соединения (II). Аминокислотный анализ: Lys 0,9; Arg 1,8; Phe 1,9; Gly 1,0; Ser 1,1; Pro 3,2;  $[\alpha]_{D}^{20}$  —81,9° (с 0,5; вода); ср.  $[\alpha]_{D}^{22}$  —83,4° (с 0,5; вода) [20].

Z-Lys(Z)-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg · 2HCl (III). Защищенный декапептид (III) был получен аналогично декапептиду (I), исходя из 0,04 г (0,03 ммоль) дихлоргидрата брадикинина и 0,025 г (0,05 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира  $N^{\alpha}$ -бензилоксикарбонил-*N^{\epsilon}*-трет-бутилоксикарбониллизина [21] с выходом 90%.

Lys(Z)-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg · 3CH<sub>3</sub>COOH (IV). Хроматографически и электрофоретически однородный декапептид (IV) получали аналогично соединению (II) из 0,04 г (0,03 ммоль) защищенного декапептида (III) с выходом 81%.

Z-Met-Lys(Z)-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg · 2HCl (V). Ундекапептид (V) получали из 0,035 г (0,024 ммоль) дихлоргидрата декапептида (IV) и 0,014 г (0,038 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира трет-бутилоксикарбонилметионина [22] аналогично соединению (I) с выходом 80%.

Тетрахлоргидрат Met-Lys-брадикинина (VI). К раствору 0,032 г (0,02 ммоль) защищенного ундекапептида (V) в 0,2 мл диоксана приливали 0,25 мл 7 н. HCl в диоксане. Реакционную смесь оставляли на 50 мин при 22° С, упаривали досуха и остаток затирали с избытком сухого эфира. Полученный порошок пересаживали из 0,2 мл метанола избытком эфира. Выход Mea-Lys-брадикинина (VI) 83%. Аминокислотный анализ: Met 0,8; Lys 0,87; Arg 1,8;  $[\alpha]_{D}^{20}$  —82,3° (с 0,45; вода); ср. для (VI) · 2CH<sub>3</sub>COOH · 6H<sub>2</sub>O  $[\alpha]_{D}^{26}$  —86,5° (с 0,5; вода) [23].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Rocha e Silva M. In: Kinin Hormones/Eds Kugelmass J. N., Thomas Ch. C. Illinois: Springfield, 1970, p. 28—58.
2. Pierce J. V., Webster M. E. Biochem. and biophys. Res. Commun., 1961, v. 5, p. 353—357.
3. Oates J. A., Melmon K. L., Sjoerdsma A., Mason D. T. Lancet, 1964, v. 1, p. 514—519.
4. Reis M. L., Draghetto W., Camargo A. C. M., Green L. J. Anal. Biochem., 1977, v. 81, p. 358—368.
5. Yoshida H., Matsumoto K., Nakajima T., Tamura Z. Chem. Pharm. Bull. 1971, v. 19, p. 1691—1695.
6. Webster M. E., Pierce J. V. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1963, v. 104, p. 91—107.
7. Sampaio M. U., Reis M. L., Fink E., Camargo A. C. M., Green L. J. Anal. Biochem., 1977, v. 81, p. 369—383.
8. Oates J. A., Pettinger W. A., Doctor R. B. J. Clin. Invest., 1966, v. 45, p. 173—178.
9. Gaponhuk E., Henriques O. B. J. Chromat., 1968, v. 32, p. 782—784.

10. Prakash A., Roffman S., Greenbaum L. M. *Anal. Biochem.*, 1978, v. 89, p. 257-263.
11. Wilkens H. J., Steger R. In: *Screening Methods in Pharmacology*/Eds Turner R. A., Hebborn P. New York - London: Acad. Press, 1971, v. 11, p. 61-73.
12. Римап В., Уолтон Г. Ионнообменная хроматография в аналитической химии. М.: Мир, 1973, с. 125.
13. Lalka D., Back N. *Biochim. et biophys. acta*, 1971, v. 236, p. 47-51.
14. Verma P. S., Lorenz P. E., Sanger G. E. *Clin. Chem.*, 1980, v. 26, p. 429-432.
15. Paskhina T. S., Polyantseva L. R., Krinskaja A. V., Yegorova T. P., Narticova V. F., Levina G. O. *Clin. Chim. Acta*, 1979, v. 97, p. 73-82.
16. Пасхина Т. С., Макевнина Л. Г., Егорова Т. П., Левина Г. О. *Биохимия*, 1977, т. 42, с. 1144-1147.
17. Makevnina L. G., Levina G. O., Sherstjuk S. F., Paskhina T. S. In: *Current Concepts in Kinin Research*/Eds Haberland G. L., Hamberg U. Oxford - New York: Pergamon Press, 1979, v. 17, p. 151-159.
18. Алексеев П. Н. Коровин Ю. П. Руководство по вычислению и обработке результатов количественного анализа. М.: Атомиздат, 1972.
19. Chillemi F. *Gazz. chim. ital.*, 1963, v. 93, p. 1079-1083.
20. Schröder E., Gibian H. *Zieb Ann.*, 1964, v. 673, p. 176-186.
21. Sandrin E., Boissonnas R. A. *Helv. chim. acta*, 1963, v. 46, p. 1637-1643.
22. Inouye K., Watanabe K., Namba K., Otsuka H. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1970, v. 43, p. 3873-3881.
23. Schröder E. *Experimentia*, 1964, v. 20, p. 39-40.

Поступила в редакцию  
21.V.1981

**A METHOD FOR PURIFICATION, SEPARATION AND QUANTITATION OF KININS  
IN MULTICOMPONENT MIXTURES. ELABORATION OF CONDITIONS FOR GRADIENT  
CHROMATOGRAPHY OF BRADYKININ, LYS-BRADYKININ AND  
MET-LYS-BRADYKININ ON SP-SEPHADEX C-25 COLUMN**

MAKEVNINA L. G., LEVINA G. O., FILATOVA M. P.,  
UTKINA E. A., PASKHINA T. S.

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy  
of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

A simple and highly reproducible method is described for purification, separation and quantitative analysis of bradykinin (BK), Lys-BK and Met-Lys-BK mixtures. The method is based on gradient elution chromatography on a SP-Sephadex C-25 column and requires no preliminary concentration and desalting of a kinin solution. The amount of kinins is expressed in BK $\mu$ g-eq and measured by bioassay with isolated rat uterus. For chromatographic identification of kinins a sample must contain no less than 0,02 BK $\mu$ g-eq of each kinin in concentration no less than 0,003 BK $\mu$ g-eq/ml; for quantitative analysis the amount of each kinin in the sample must be ten times higher. The method may be applied using either volatile or nonvolatile buffers. The influence of various parameters of the chromatographic process on its reproducibility and resolving power is studied. Lys-BK and Met-Lys-BK-standards are synthesized from mg-amounts of the commercial BK.