



УДК 547.964.4.07:543.544

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
СИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛИПЕПТИДА АСТН(1—24)
И ПОЛУПРОДУКТОВ ЕГО СИНТЕЗА****Членов М. А., Титова Е. В., Кудряшов Л. И.***Всесоюзный научно-исследовательский институт технологии
кровозаменителей и гормональных препаратов, Москва*

Разработан метод анализа синтетического полипептида, содержащего N-концевую аминокислотную последовательность природного АСТН — АСТН(1—24)-пептида, его аналога $[\beta\text{Ala}^1]\text{АСТН}(1-24)$ -пептида и их фрагментов с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии. Показана возможность разделения ряда частично защищенных фрагментов последовательности природного АСТН: 1—4, 5—12, 13—19, 20—24, 13—24, 1—24, $[\beta\text{Ala}^1]\text{АСТН}(1-4)$ и полупродуктов их синтеза. Разработанный метод позволяет контролировать чистоту ключевых пептидов при синтезе АСТН(1—24)-пептида.

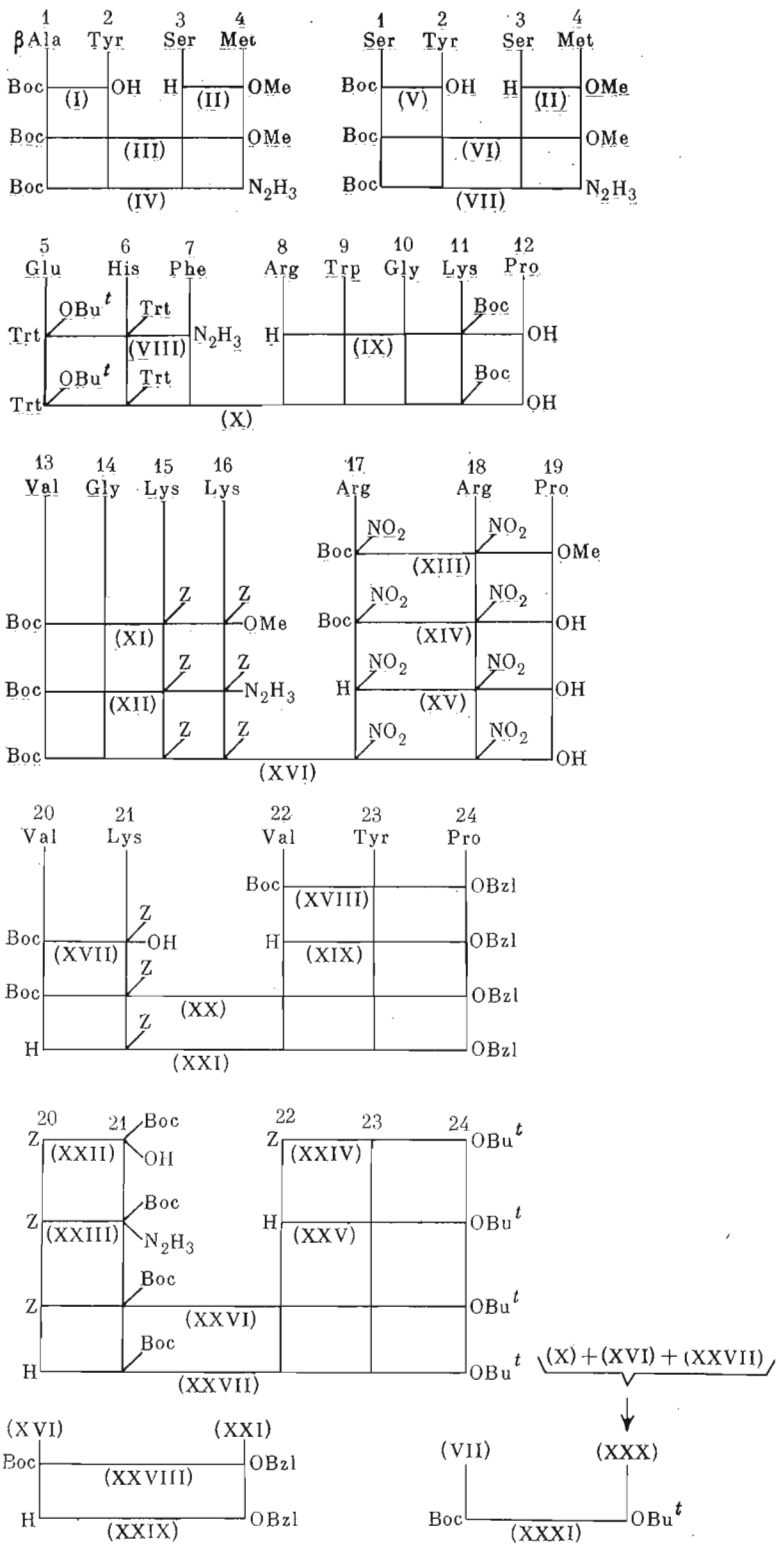
Синтетический АСТН(1—24)-пептид содержит N-концевую аминокислотную последовательность природного гормона и по своему биологическому действию близок к природному кортикотропину. При синтезе этого соединения необходим контроль за степенью чистоты как конечного продукта АСТН(1—24)-пептида, так и его ключевых фрагментов.

Опубликовано большое количество работ, посвященных анализу пептидов с применением метода ВЭЖХ [1—11] в различных вариантах — ионообменной [1], обращенно-фазовой [2—7] и ион-парной [8—11]. Описано разделение защищенных пептидов, состоящих из 2—5 аминокислотных остатков [2], пептидов, не содержащих защитных групп [3—6, 9], а также показана возможность применения ВЭЖХ для анализа ряда аналогов АСТН [7, 11]. Показано, что наилучшие результаты при анализе пептидов получают с помощью обращенно-фазовой и ион-парной хроматографии. В этом случае удастся осуществить разделение пептидов, как имеющих близкое строение, так и значительно различающихся по своему аминокислотному составу.

Целью настоящего исследования было применение метода ВЭЖХ для анализа пептида АСТН(1—24), его аналога $[\beta\text{Ala}^1]\text{АСТН}(1-24)$ -пептида и полупродуктов их синтеза — фрагментов 1—4, 5—12, 13—19, 20—24, 13—24, 1—24 последовательности АСТН. Основная задача при разработке метода заключалась в подборе таких условий хроматографического разделения, чтобы иметь возможность обнаружить в каждом из фрагментов полупродукты его синтеза, которые могут присутствовать в нем в результате неполной очистки. Так, например, при оценке чистоты синтетического пептида (IV) (см. схему) исходили только из содержания в нем пептидов (I) — (III). Побочные продукты, образующиеся в процессе синтеза на всех стадиях, не идентифицировали. Предварительные данные по разделению пептидов (IV), (VII), (XVI), (XXVII) методом ВЭЖХ были опубликованы нами ранее [12].

При выборе оптимальных условий разделения исследуемых пептидов была использована колонка «Zorbax ODS» и изучен целый ряд ПФ; подбор их состава осуществлялся на основании литературных данных [2, 3, 5, 10], а также с учетом строения анализируемых пептидов. Так, для анализа фрагментов 1—4 последовательности АСТН и полупродуктов их синтеза (см. схему, пептиды (IV), (VII)) в качестве ПФ были испытаны смеси:

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



MeOH — 5 мМ (NH₄)₂SO₄, 6:4 (1), MeOH — 5 мМ ТВАВ, 75:25, 6:4 (2), MeOH — H₂O — MeCN, 3:5:4 (3), MeCN — 0,05 М NaH₂PO₄ (рН 2,6, доведенный Н₃PO₄), 17:83 (4).

В случае смеси (4) наблюдалось значительное уширение хроматографических пиков и очень большое время удерживания пептидов, поэтому данная ПФ была признана непригодной для дальнейшей работы. Полу-

Хроматографические характеристики пептидов при ВЭЖХ *

Пептид	Элюент	Скорость потока, мл/мин	Время удерживания, мин
(II) (V) (VII) (VI)	MeOH - 5 mM TBAB, 7:3	0,55	4,7 6,0 6,4 8,0
(XXII) (XXIV) (XXIII) (XXVI) (XXV) (XXVII)	MeOH - 5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 83:17	0,6	4,8 7,0 7,5 11,3 14,7 23,7
(XVI) (XXI) (XXIX) (XXVIII)	MeOH - 5 mM TBAB, 83:17	0,5	7,6 14,0 21,0 29,6
(XXX) (XXXI)	MeOH - 8 mM TBAB, 95:5	1,2	32,5 18,0

* Использовалась колонка «Zorbax ODS» (250×4,6 мм).

ченные результаты вполне согласуются с ранее сделанным выводом о том, что добавление фосфорной кислоты или фосфатных буферов в ПФ увеличивает время удерживания пептидов с защищенными аминогруппами и свободным С-концом [5]. Существенных различий между разделением таких пептидов в ПФ (1), (2) и (3) замечено не было, что, по-видимому, объясняется их структурой и основными закономерностями обращенно-фазовой и ион-парной хроматографии. Предполагается, что TBAB как ион-парный реагент взаимодействует в большей степени с сорбентом, чем с веществом [10], поэтому пептиды со свободным N-концом в присутствии TBAB слабее удерживаются на колонке. Этот эффект наблюдался нами

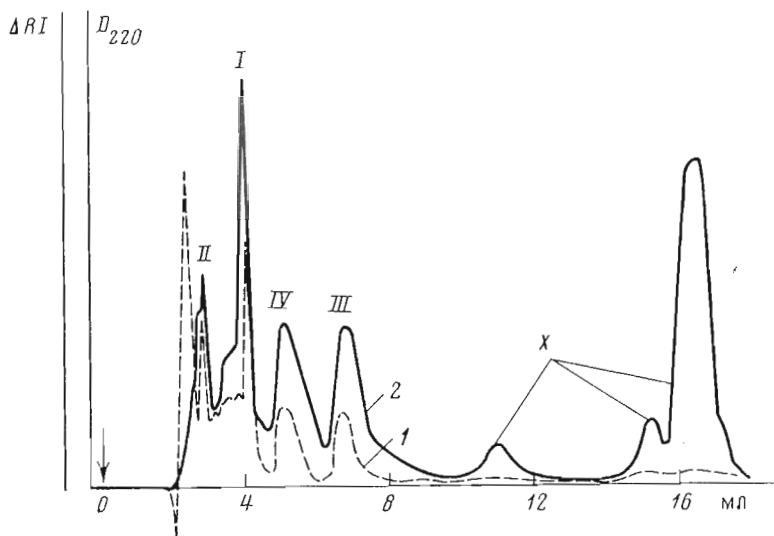


Рис. 1. Хроматографическое разделение искусственной смеси пептидов (I) — (IV). Условия разделения: колонка «Zorbax ODS»; элюент — MeOH — 5 mM (NH₄)₂SO₄, 6:4; детекторы: рефрактометр (1) и спектрофотометр (2); скорость потока 0,7 мл/мин. Здесь и на остальных рисунках римская цифра над пиком — номер отвечающего ему пептида

при анализе пептида (XXI) и полупродуктов его синтеза. При анализе пептидов (I) — (VII) присутствие TBAB в ПФ существенно не повлияло на хроматографическое разделение, что, вероятно, связано с наличием в исследованных пептидах N-защитных групп. Возможность использования

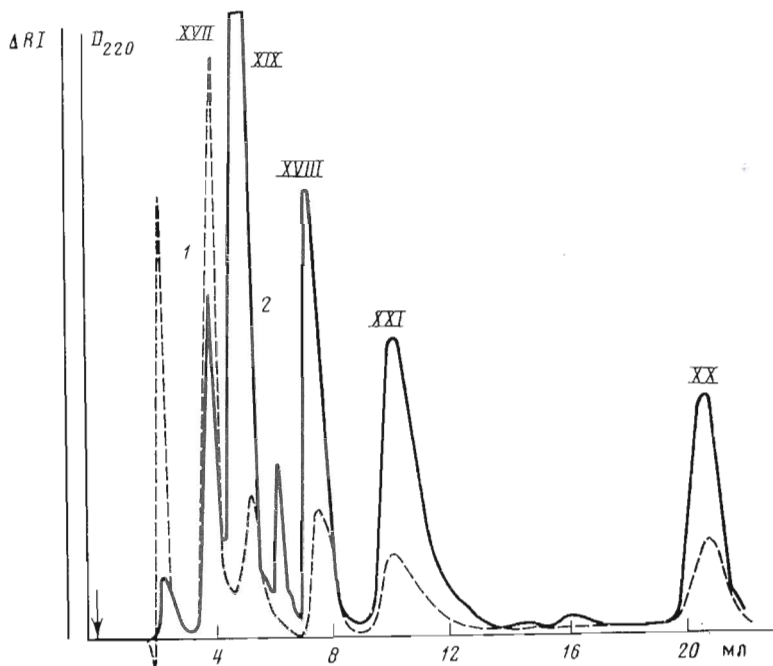


Рис. 2. Хроматографическое разделение искусственной смеси пептидов (XVII) — (XXI). Условия разделения: колонка «Zorbax ODS»; элюент — MeOH — 5 мМ ТВАВ, 75:25; детекторы: рефрактометр (1) и спектрофотометр (2); скорость потока 0,6 мл/мин

в качестве элюента смесей (1) и (2) для анализа фрагментов 1—4 последовательности АСТН* и полупродуктов их синтеза показана в таблице и на рис. 1, откуда видно, что пептиды разделяются достаточно хорошо и элюируются в виде отдельных пиков. Детектирование осуществлялось с помощью двух последовательно соединенных детекторов: УФ-спектрофотометра и дифференциального рефрактометра. Одновременное применение двух детекторов было вызвано необходимостью идентификации именно основных компонентов в анализируемых смесях, так как стандарты (чистые образцы целевых пептидов) в нашем случае отсутствовали. Так, при анализе смеси пептидов (I) — (IV) (см. рис. 1) были обнаружены примесные вещества «X», которые регистрировались УФ-спектрофотометром как основные, в то время как концентрация их была незначительной, что показало детектирование с помощью рефрактометра. В ряде случаев идентификация основного продукта удавалась лишь после проведения анализов одного и того же пептида, синтезированного или очищенного разными путями.

Разделение пептидов — полупродуктов синтеза пептида (XXVII) (см. схему) было достигнуто при использовании в качестве ПФ смеси MeOH — 5 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 83:17 (таблица). Однако при разделении пептидов (XVII) — (XXI) с использованием той же ПФ наблюдалась адсорбция пептида (XXI), и его не удалось смыть с колонки даже при значительном увеличении содержания метанола в элюенте. Можно было ожидать, что при переходе к ион-парной хроматографии в присутствии ТВАВ изменится характер взаимодействия вещества с наполнителем колонки за счет частичной модификации поверхности сорбента [10] и это приведет к уменьшению времени удерживания пептидов. Результаты анализа пептида (XXI) и полупродуктов его синтеза, полученные при использовании в качестве ПФ смеси MeOH — 5 мМ ТВАВ, показывают (рис. 2), что в этом

* Существенных различий в хроматографическом поведении пептидов (IV) и (VII) и полупродуктов их синтеза при анализе их в одинаковых условиях не наблюдалось.

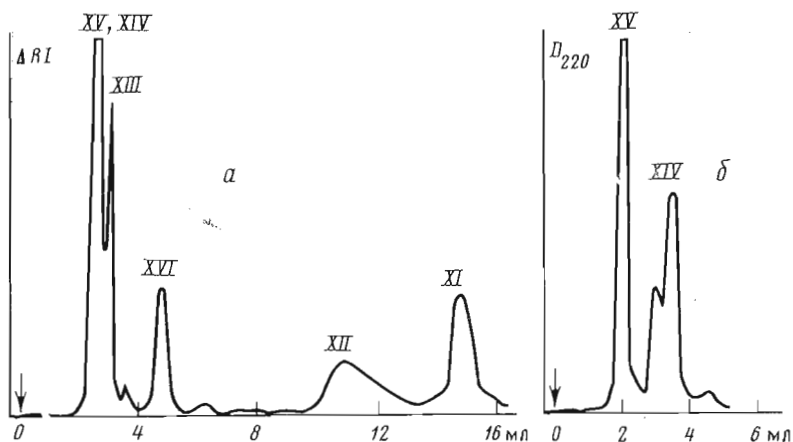


Рис. 3. Хроматографическое разделение на колонке «Zorbax ODS» искусственных смесей пептидов (XI) — (XVI) (а) и (XIV) и (XV) (б). а — элюент — MeOH — 5 мМ ТВАВ, 75 : 25, скорость потока 0,6 мл/мин; б — элюент — MeOH — 5 мМ ТВАВ, 6 : 4; скорость потока 0,5 мл/мин

случае пептиды разделяются достаточно хорошо и время удерживания пептида (XXI), как и предполагалось, меньше, чем у предшествующего пептида (XX).

Тот же элюент использовался и для анализа пептидов (XI) — (XVI) (рис. 3), хотя исследованные в качестве ПФ смеси MeOH — 5 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (75:25) и MeOH — 0,1% AcONa (75:25) также дали неплохие результаты. Как видно из рис. 3а, выбранные условия не позволяют разделять все полупродукты синтеза фрагмента 13—19 последовательности АСТН при изократическом элюировании. Пептиды (XIV) и (XV) элюируются с колонки одновременно. Однако их удается разделить при уменьшении содержания метанола в ПФ (рис. 3б).

Значительное содержание метанола в ПФ потребовалось при анализе пептидов (VIII), (XIX), (X), что, вероятно, обусловлено большей гидрофобностью этих фрагментов (рис. 4).

В таблице приведены данные о разделении пептидов, содержащих большее число аминокислотных остатков: (XXIX) и (XXXI). Хроматография таких пептидов, как (XXX) и (XXXI), осуществлялась при повышенной концентрации ион-парного реагента (8 мМ). Но и в этом случае время удерживания пептидов было очень велико. Дальнейшее увеличение концентрации ТВАВ или MeOH в ПФ не привело к заметному уменьшению времени удерживания.

Таким образом, данные, приведенные на рис. 1—4 и в таблице, позволяют заключить, что для каждого фрагмента АСТН и полупродуктов его синтеза удалось найти соответствующие условия разделения. Вещества элюируются с колошки в порядке возрастания их гидрофобности и количества аминокислотных остатков, что в целом совпадает с наблюдениями, сделанными в работе [13].

Однако анализ конечного продукта синтеза — АСТН(1—24) и его βAla^1 -аналога в подобных условиях оказался невозможным, что обусловлено, по всей видимости, их структурой и отсутствием защитных групп.

При подборе оптимального варианта хроматографии этих полипептидов использовались колонки «Zorbax ODS» и «Spherisorb ODS», а в качестве ПФ, кроме указанных ранее, были испытаны смеси MeCN — 0,1 М NaH_2PO_4 (рН 2,1, доведенный H_3PO_4), 30:70 и 23:77, как описано в работе [7] при анализе подобных ему пептидов, и смесь, состоящая из компонентов «А» и «В» (см. подпись к рис. 5). ПФ, аналогичная последней, но с использованием градиентного элюирования, была применена авторами работы [11] для разделения ряда гормонов (инсулина, аналогов АСТН и др.). При использовании именно этой ПФ нами были получены наилучшие результаты (рис. 5), причем эффективность и селективность разделения на

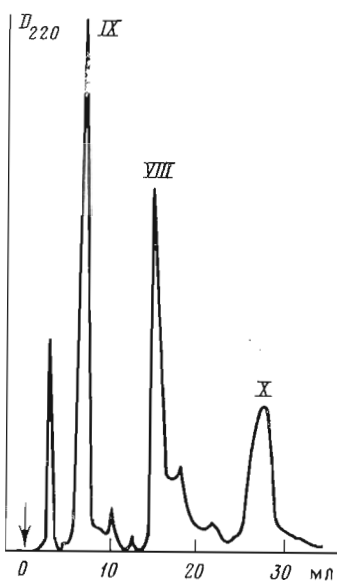


Рис. 4

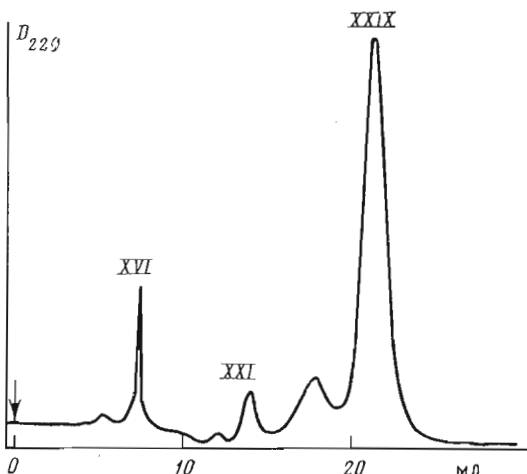


Рис. 6

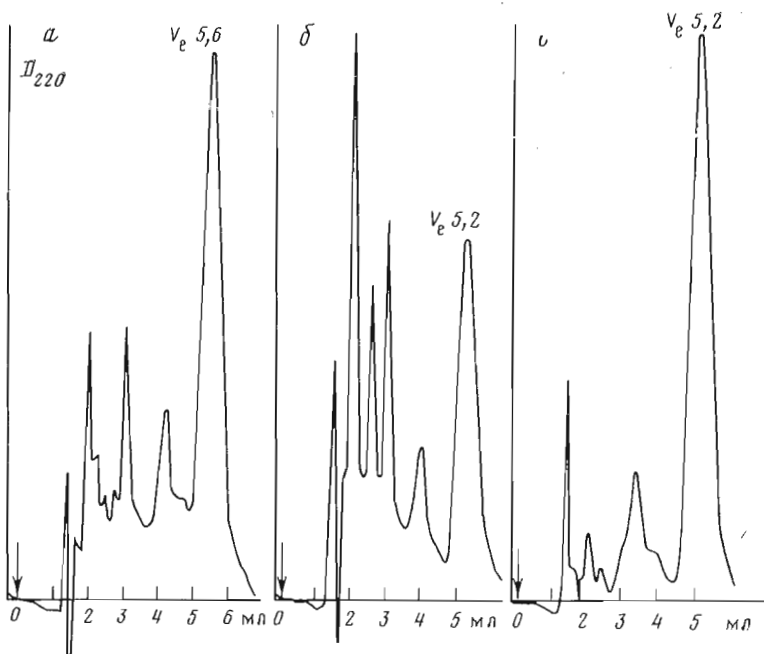


Рис. 5

Рис. 4. Хроматографическое разделение на колонке «Zorbax ODS» искусственной смеси пептидов (VIII) – (X): элюент – MeOH – 5 мМ ТВАВ, 94:6; скорость потока 1,0 мл/мин

Рис. 5. Хроматографический анализ: а – [βAla¹]ACTH(1–24) ($V_e=5,6$ мл), б – [Ser¹]ACTH(1–24) ($V_e=5,2$ мл), в – спинактена ($V_e=5,2$ мл). Условия разделения: колонка «Spherisorb ODS»; элюент «А» – «В», 1:1 («А»: 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0); 0,005 М гексансульфонат Na; 0,05 М Na₂SO₄, «В»: MeCN – 0,005 М тартратный буфер; 0,01 М гексансульфонат Na; 0,1 М Na₂SO₄, 1:1); скорость потока 0,5 мл/мин

Рис. 6. Хроматограмма фрагмента 13–24 последовательности ACTH (пептид (XXIX)). Условия разделения см. в таблице

колонке «Spherisorb ODS» были выше, чем на «Zorbax ODS». Для сравнения приведена картина хроматографического разделения синтактена — препарата фирмы «CIBA» (Швейцария), содержащего синтетический [Ser¹]АСТН(1—24)-пептид. Можно видеть, что различие в одном аминокислотном остатке приводит к различию объемов элюирования пептидов [βAla¹]АСТН(1—24) и [Ser¹]АСТН(1—24) (*V*₀ 5,6 и 5,2 мл соответственно).

Таким образом, была показана возможность применения высокоэффективной обращенно-фазовой и ион-парной жидкостной хроматографии для анализа частично защищенных фрагментов АСТН и конечного продукта синтеза АСТН(1—24). В найденных для каждого фрагмента АСТН оптимальных условиях хроматографического разделения был проведен анализ чистоты пептидов, полученных в результате химического синтеза. С помощью этого метода удавалось обнаруживать исходные компоненты, а также побочные продукты синтеза в каждом фрагменте АСТН. В качестве примера на рис. 6 представлена хроматограмма ключевого пептида — фрагмента 13—24 последовательности АСТН (пептид (XXIX)). Показано, что в конечном продукте (XXIX) наряду с некоторыми неидентифицированными примесями присутствуют в небольших количествах исходные пептиды (XVI) и (XXI).

Экспериментальная часть

В работе исследовались синтетические пептиды, структура которых изображена на схеме (подробнее об их получении и физико-химических свойствах см. [14—19]).

Анализ проводился при 20°С на приборе фирмы «Spectra-Physics» (США), модель 3500 В, снабженном в качестве детекторов дифференциальным рефрактометром (LDC, США; чувствительность X8) и УФ-спектрофотометром (Perkin-Elmer, США), модель LC-55. Использовались колонки «Zorbax ODS» (Du Pont, США) размером 250×4,6 мм и «Spherisorb-ODS» (Altex, США) размером 250×3,2 мм. Количество вводимой пробы составляло 40 мкг (10 мкл 0,4% раствора) для АСТН(1—24) и 100 мкг (10 мкл 1% раствора) для полупродуктов его синтеза. Ввод пробы осуществлялся с помощью инжектора (Rheodyne), модель 7120, с петлей 10 мкл. Пробы, как правило, растворялись в водно-метанольной смеси.

В состав элюента входили метанол (Merck, ФРГ) марки д.а.; ацetonитрил той же фирмы, марка «для хроматографии»; дважды перегнанная вода, пропущенная через ионообменные смолы; L(+)-винная кислота (Serva, ФРГ), ч.д.а.; гексансульфонат натрия (Serva, ФРГ), марка «для исследований»; ТВАВ, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ марки ч. Растворы перед использованием фильтровались через фильтр марки «НА» с размером пор 0,45 мкм (Millipore, США).

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Chang S. H., Gooding K. M., Regnier F. E. J. *Chromatogr.*, 1976, v. 125, p. 103—114.
2. Knox I. H., Szokan G. J. *Chromatogr.*, 1979, v. 171, p. 439—444.
3. Azelsen K. S., Vogelsang S. H. J. *Chromatogr.*, 1977, v. 140, № 2, p. 174—179.
4. Hancock W., Bishop C., Hearn M. *FEBS Lett.*, 1976, v. 72, № 1, p. 139—142.
5. Hancock W., Bishop C., Prestidge R., Harding D., Hearn M. J. *Chromatogr.*, 1978, v. 153, № 2, p. 391—398.
6. Lewis R., Stein S., Udenfriend S. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1979, v. 13, p. 493—497.
7. O'Hare M. J., Nice E. C. J. *Chromatogr.*, 1979, v. 171, p. 209—226.
8. Hancock W., Bishop C., Hearn M. *Chemistry in New Zealand*, 1979, v. 43, № 1, p. 17—24.
9. Hancock W., Bishop C., Meyer L., Harding D., Hearn M. J. *Chromatogr.*, 1978, v. 161, p. 291—298.
10. Hancock W., Bishop C., Battersby J., Harding D., Hearn M. J. *Chromatogr.*, 1979, v. 168, p. 377—384.
11. Terabe S., Konaka R., Inouye K. J. *Chromatogr.*, 1979, v. 172, p. 163—177.
12. Членов М. А., Тирова Е. В., Рудряшов Л. П., Карельский В. П., Антонов А. А. V Всес. симпоз. по химии и физике белков и пептидов. Тез. докл. Баку, 1980, с. 245.

13. Molnar I., Horvath C. J. Chromatogr., 1977, v. 142, p. 623-640.
14. Крысин Е. П., Карельский В. Н., Антонов А. А., Глинка Э. Д. Химия природн. соедин., 1978, № 4, с. 482-485.
15. Карельский В. Н., Крысин Е. П., Рабинович А. К. Химия природн. соедин., 1980, № 4, с. 374-379.
16. Свергун В. И., Смирнов М. Б., Карельский В. Н. Хим.-фармацевт. ж., 1980, № 6, с. 97-101.
17. Свергун В. И., Смирнов М. Б., Антонов А. А. Хим.-фармацевт. ж., 1981, № 5, с. 92-97.
18. Антонов А. А., Крысин Е. П., Карельский В. Н., Асташкина Л. Н., Каширин И. А. V Всес. симпозиум по химии и физике белков и пептидов. Тез. докл. Баку, 1980, с. 178.
19. Крысин Е. П., Глинка Э. Д., Рабинович А. К. Всес. конф. «Методы получения и анализа биохимических препаратов». Тез. докл. Олайне, 1979, с. 56.

Поступила в редакцию
25.XII.1981

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF SYNTHETIC POLYPEPTIDE ACTH (1-24) AND OF INTERMEDIATES IN ITS SYNTHESIS

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

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

Chromatographic procedures have been developed for separation of synthetic polypeptide containing N-terminal sequence of 24 amino acid residues of natural ACTH, i. e. ACTH(1-24)-peptide, its [β Ala¹]ACTH(1-24)-peptide analog and their fragments. The separation of partially protected fragments of ACTH (1-4, 5-12, 13-19, 20-24, 13-24, 1-24), [β Ala¹]ACTH(1-4) and intermediates of their synthesis has been achieved. The method developed allows to check the purity of the key peptides in the synthesis of ACTH(1-24)-peptide.