



УДК 577.112.6:543.544

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
ПЕПТИДНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ, ИХ ФРАГМЕНТОВ
И ПРОИЗВОДНЫХI. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ КОРТИКОТРОПИНА
НА СОРБЕНТЕ ZORBAX ODS*Григорьев В. Д., Шати В. Д., Бривкалне Л. А.,
Чиненс Г. И.**Институт органического синтеза Академии наук Латвии, Рига*

Изучено влияние концентрации ацетонитрила в элюенте и гидрофобности пептидов на коэффициенты емкости. Предложено уравнение, описывающее удерживание как функцию этих характеристик элюента и состава пептидов. Найден инкремент гидрофобности функциональных групп $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $=\text{CH}-\text{CONH}-$ для использованной хроматографической системы. Уравнение пригодно для априорной оценки состава элюента, необходимого для элюирования пептида при заданном значении коэффициента емкости и для качественной интерпретации хроматограмм пептидов.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), главным образом ее так называемый обращенно-фазовый вариант, все шире применяется для анализа и выделения пептидов [1–8]. Показано [3–5], что величины удерживания ряда пептидов в обращенно-фазовой хроматографии являются аддитивными, включающими удерживание соответствующих аминокислот. В работах [1, 6] отмечено, что удерживание пептидов, как и соединений других классов, уменьшается при увеличении концентрации органического компонента элюента. Тем не менее выбор условий разделения некоторых пептидов часто осуществляется либо чисто эмпирически, либо на основе общих представлений о взаимосвязи удерживания с полярностью разделяемых веществ.

В связи с разработкой методов постадийного контроля синтеза кортикотропина представлялось целесообразным провести систематическое исследование влияния строения пептидных фрагментов и состава элюента на удерживание.

В качестве характеристики удерживания использовали коэффициент емкости k'

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}, \quad (1)$$

где t_R — время удерживания изучаемого соединения, t_0 — время удерживания несорбирующегося вещества.

В данной работе изучена хроматографическая система, состоящая из обращенно-фазного сорбента Zorbax-ODS (микросферический, пористый силикагель, модифицированный октадецилдиметилсилильными группами) и элюента — фосфатного буфера и ацетонитрила.

Удерживание пептидов и концентрация ацетонитрила в подвижной фазе. Строение изученных фрагментов кортикотропина и их коэффициенты емкости приведены в табл. 1. Видно, что удерживание всех соединений уменьшается с увеличением концентрации ацетонитрила в элюенте.

Согласно литературным данным, влияние концентрации C сильного компонента элюента на коэффициенты емкости может быть описано уравнением

$$f_1(k') = a + bf_2(C), \quad (2)$$

Коэффициенты емкости пептидов и их производных

Соединение	Коэффициент емкости при концентрации ацетонитрила, об. %										lg P _{орт}	lg P *
	25	35	40	45	50	55	65					
(I) Z-Ser-Tyr-OMe	4,1	1,52	—	0,5	0,39	—	—	0,784	1,414	—	—	1,414
(II) Z-Ser-Tyr-N ₂ H ₃	1,57	0,74	0,5	0,18	—	—	—	-1,860	-1,230	—	—	-1,230
(III) Z-Ser-Tyr-OEt	7,07	2,22	—	0,71	0,5	0,29	—	1,314	1,944	—	—	1,944
(IV) Z-Val-Gly-OEt	11,6	4,3	—	1,5	1,0	0,64	—	1,634	2,264	—	—	2,264
(V) Z-Pro-Val-Gly-OEt	9,67	3,33	—	1,44	0,86	0,68	—	1,614	2,874	—	—	2,874
(VI) Z-Ser-Tyr-Ser-Met-ONb	—	7,22	3,36	1,43	0,82	0,39	—	0,880	2,770	—	—	2,770
(VII) Z-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBzl)-His-Phe-ONb	—	—	29,3	7,64	3,71	1,75	—	1,808	5,588	—	—	5,588
(VIII) Boc-Glu(OBzl)-His-Phe-ONb	—	—	26,9	9,18	5,0	2,57	—	4,108	5,368	—	—	5,368
(IX) Z-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBzl)-His-Phe-Arg-(NO ₂)-Trp-Gly-ONb	—	—	14,6	5,86	2,68	0,18	—	-0,972	4,698	—	—	4,698
(X) Boc-Arg(NO ₂)-Trp-Gly-ONb	10,6	3,22	1,82	1,0	0,68	0,46	—	0,400	1,660	—	—	1,660
(XI) Boc-Arg(NO ₂)-Pro-ONb	—	11,7	5,71	2,61	1,64	1,0	—	0,431	0,761	—	—	0,761
(XII) Boc-Ser-Met-ONb	—	7,52	4,0	1,96	1,32	0,64	—	1,642	2,271	—	—	2,271
(XIII) Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OBzl	—	—	29,9	23,9	10,2	4,04	—	5,414	6,044	—	—	6,044
(XIV) 2HCl-H-Glu(OBzl)-His-Phe-ONb	—	8,93	4,0	1,96	1,29	0,96	—	2,680	3,94	—	—	3,94
(XV) 2HCl-H-His-Phe-ONb	3,77	1,33	—	0,54	0,46	—	—	1,702	2,332	—	—	2,332
(XVI) H-Lys(Z)-Lys(Z)-OBzl	—	33,8	13,9	5,32	3,18	1,71	—	3,986	4,616	—	—	4,616
(XVII) Z-Ser-Tyr-Ser-Met-OH	—	0,92	0,57	0,25	—	—	—	-2,499	-0,719	—	—	-0,719
(XVIII) Boc-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-OH	2,8	7,04	3,61	1,57	1,04	0,54	—	0,259	2,149	—	—	2,149
(XIX) Boc-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-OH	—	—	—	12,6	6,04	2,11	—	2,415	5,565	—	—	5,565
(XX) Z-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBzl)-His-Phe-OH	—	—	—	1,57	0,96	0,54	—	-1,571	2,209	—	—	2,209
(XXI) Z-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBzl)-His-Phe-Arg(NO) ₂ -Trp-Gly-OH	—	11,3	4,11	1,57	0,96	0,54	—	-1,571	2,209	—	—	2,209
	—	11,7	5,54	1,64	1,0	0,46	—	-4,351	1,319	—	—	1,319

Параметры уравнений (2) для Вос-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-OH (VIII)

$f(k')$	$f(C)$	Способ выражения концентрации ацетонитрила	a	b	n	r	σ
$\lg k'$	C	Объемная	2,766	-0,055	5	0,995	0,037
$\lg k'$	$\lg C$	Молярная	5,503	-5,646	5	0,997	0,030
$\lg k'$	C	Молярная доля	2,035	-7,941	5	0,991	0,069
$\lg k'$	$\lg C$	То же	5,625	-4,008	5	0,997	0,030
$1/k'$	C	Весов-объемная (г/100 мл)	-2,919	0,103	5	0,951	0,243

Примечание. n — число измерений, r — коэффициент корреляции, σ — стандартное отклонение вычисленных значений функции от экспериментальных.

где $f_1(k') = \lg k'$ [9–12], $f_1(k') = 1/k'$ [13, 14], $f_2(C) = C$ [10, 11, 13, 14], $f_2(C) = \lg C$ [9, 12], a , b — коэффициенты, C — молярная доля [9, 10], молярность [12], весов-объемная (г/100 мл) концентрация [13, 14], объемная концентрация [11]. Выбор того или иного способа выражения удерживания и концентрации авторами обычно связывается с предполагаемым механизмом сорбции. Однако часто различные варианты уравнения (2) в равной степени пригодны для описания экспериментальных данных, что при современной точности измерения k' в ВЭЖХ не позволяет сделать заключение в пользу того или иного механизма. В табл. 2 в качестве примера приведены параметры различных вариантов уравнения (2) для одного из рассматриваемых соединений. Видно, что погрешность аппроксимации велика только при применении уравнения, предложенного Скоттом и Кучерой [13, 14], и значительно меньше во всех других случаях. Чтобы выяснить, существует ли статистически значимая разница в качестве аппроксимации между остальными приведенными в табл. 2 уравнениями, были найдены парные отношения дисперсий (σ^2). Эти отношения сравнивались с табличными значениями критерия Фишера ([15], с. 230). Во всех случаях с вероятностью 0,99 установлено, что различие между дисперсиями статистически незначимо.

В дальнейших расчетах для выражения зависимости коэффициентов емкости от состава элюента мы пользовались уравнением

$$\lg k' = a + b \lg C, \quad (3)$$

где C — молярная концентрация ацетонитрила. Согласно [12], b в этом уравнении соответствует числу сольватирующих молекул ацетонитрила, которые высвобождаются при ассоциации анализируемых молекул с неподвижной фазой, a характеризует сорбционную способность колонки по отношению к анализируемому веществу:

$$a = \lg K + \lg [C_m B] + \lg V_s/V_m, \quad (4)$$

где K — константа равновесия; $[C_m B]$ — концентрация сольватированной неподвижной фазы, представляющей собой ассоциат I органического радикала B неподвижной фазы с m молекулами органического компонента элюента; V_s/V_m — отношение объемов неподвижной и подвижной фаз.

В табл. 3 приведены параметры уравнения (3) для изучаемых соединений. Сопоставление значений a и b обнаруживает их корреляцию:

$$a = -1,001 - 1,168b \quad (5)$$

($r=0,992$; $n=21$; $\sigma=0,269$), что не является неожиданным, если иметь в виду влияние b на значение константы равновесия K .

Структурные фрагменты пептидов и коэффициенты емкости. Хроматографическое удерживание, измеряемое с помощью коэффициента емкости, определяется коэффициентом распределения между подвижной и неподвижной фазами P и отношением объемов неподвижной и подвижной фаз V_s/V_m :

$$\lg k' = \lg P + \lg V_s/V_m. \quad (6)$$

Параметры уравнений (3)

Соединение	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>	<i>n</i>	σ
(I)	3,018	-3,514	0,995	3	0,038
(II)	3,731	-4,622	0,994	3	0,041
(III)	3,511	-3,899	0,998	4	0,027
(IV)	3,609	-3,693	0,997	5	0,037
(V)	3,352	-3,482	0,997	5	0,032
(VI)	5,979	-6,216	0,998	4	0,021
(VII)	9,030	-8,648	0,992	4	0,054
(VIII)	7,729	-7,193	0,997	5	0,034
(IX)	8,056	-7,817	0,999	4	0,010
(X)	3,773	-4,016	0,997	5	0,028
(XI)	5,525	-5,433	0,998	5	0,023
(XII)	5,273	-5,324	0,996	5	0,033
(XIII)	8,430	-7,703	0,978	5	0,118
(XIV)	4,568	-4,495	0,988	6	0,062
(XV)	2,830	-3,312	0,999	4	0,014
(XVI)	6,895	-5,546	0,998	6	0,031
(XVII)	2,738	-3,373	0,999	3	0,011
(XVIII)	5,503	-5,646	0,997	5	0,030
(XIX)	9,341	-8,811	0,991	3	0,040
(XX)	6,517	-6,692	0,995	5	0,046
(XXI)	7,047	-7,239	0,994	4	0,054

В свою очередь, согласно [16, 17], существует корреляция между коэффициентами распределения в различных водно-органических системах (*A* и *B*):

$$\lg P_A = p \lg P_B + q, \quad (7)$$

где *p*, *q* — коэффициенты.

Соотношение (7) служит основанием попыток [18] связать хроматографическое удерживание с гидрофобностью, измеряемой коэффициентами распределения соответствующих соединений в системе октанол — вода ($P_{\text{окт}}$):

$$\lg k' = a_0 + a_1 \lg P_{\text{окт}}, \quad (8)$$

где a_0 , a_1 — коэффициенты.

Величины $\lg P_{\text{окт}}$ могут быть рассчитаны как сумма инкрементов f_i , соответствующих структурным фрагментам [19]:

$$\lg P_{\text{окт}} = \sum_{i=1}^n a_i f_i, \quad (9)$$

где a_i — число однотипных структурных фрагментов в молекуле.

Подробные таблицы инкрементов коэффициентов распределения приведены в [19].

Таким образом, в принципе, зная величины a_0 и a_1 в уравнении (8) и рассчитав $\lg P_{\text{окт}}$ по (9), можно вычислить коэффициенты емкости соединений, не изученных хроматографически. Следует, однако, учитывать, что соотношение (7) является не более чем грубым приближением, о чем свидетельствуют и данные, обобщенные Реккером [19] для различных водно-органических систем, и хорошо известное явление варьирования селективности разделения в различных растворителях в обращенно-фазовой хроматографии (см., например, [20]). Экспериментально наблюдаемые вклады отдельных структурных фрагментов (в первую очередь полярных) в гидрофобность соединения могут сильно зависеть от химической природы фаз. Наконец, и механизм сорбции в обращенно-фазовой хроматографии нельзя отождествлять с механизмом распределения, так как радикалы неподвижной фазы находятся в относительно упорядоченном состоянии.

Инкременты логарифма коэффициента распределения структурных фрагментов пептидов в системе Zogbaх ODS/ацетонитрил + фосфатный буфер

Фрагмент	f_i	Фрагмент	f_i
Данные по Реккеру [19]		Вычисленные по [17] инкременты	
-C ₆ H ₅	1,886	Boc-NH-	0,00
-CH ₃	0,702	Z-NH	0,160
-CH ₂	0,530	-COONb	1,046
-C-	0,150	-COOBzl	1,124
-COO(alk)	-1,292	-COOMe	-0,590
-NH(alk)	-1,825	-COOEt	-0,060
-NO ₂ (aryl)	-0,078	-CON ₂ H ₃	-3,234
-Trp	2,31	-Lys(Z)	2,108
-Phe	2,24	-Glu(OBzl)	2,008
-Leu	1,99	-Arg(NO ₂)	-2
-Tyr	1,70	-Lys(Boc)	1,948
-Val	1,46	-His(OBzl)	1,848
-Met	1,08		
-Pro	1,01	Пайденные в данной работе	
-Lys	0,52	=CH-CO-NH	-0,40
-Gly	0,00	-COOH(alk)	-2,33
-Glu	-0,07	-NH ₂ (alk)	-2,05
-His	-0,23		
-Ser	-0,56		
-Arg	-1,10		
=CH-CO-NH	-1,03		
-COOH(alk)	-0,954		
-NH ₂ (alk)	-1,428		

Таблица 5

Корреляция коэффициентов емкости с гидрофобностью пептидов по уравнению $\lg k' = a_0 + a_1 \lg P$, где $P: A - P_{\text{окт}}$ B - P^* (см. текст)

Концентрация ацетонитрила, об. %	a_0	a_1	r	n	σ
А					
55	-0,273	0,107	0,627	20	0,307
50	-0,047	0,124	0,622	21	0,357
45	0,132	0,137	0,585	21	0,433
40	0,620	0,121	0,599	15	0,429
35	0,616	0,06	0,280	16	0,43
Б					
50	-0,595	0,230	0,962	12	0,131
45	-0,534	0,277	0,970	12	0,141
35	0,091	0,219	0,843	8	0,170

Мы попытались с помощью уравнения (8) описать величины удерживания пептидов, имеющих не более одной свободной концевой группы. Значения $\lg P$ находили суммированием инкрементов f_i для аминокислот, приведенных в работе [19]. Кроме того, были вычислены значения инкрементов гидрофобности для ряда структурных фрагментов пептидов (табл. 4). Полученные значения a_0 , a_1 , а также параметры, характеризующие корреляцию, даны в табл. 5, А. Корреляция между $\lg k'$ и $\lg P$ не может быть признана удовлетворительной. При рассмотрении погрешностей аппроксимации для отдельных соединений было замечено, что они имеют тенденцию к увеличению с удлинением пептидной цепи. Эти погрешности были относительно большими также для соединений, имеющих незащищенные концевые группы. Следовательно, можно предположить, что гидрофобность наиболее полярных групп в обращенно-фа-

Прогнозирование значений $\lg k'$

Вещество	CH ₃ CN, об. %	$\lg k'$			$\frac{k'_{\text{расч.}}}{k'_{\text{эксп.}}}$
		расч.	эксп.	(расч. — эксп.)	
Boc-Ser-Met-ONb	50	-0,027	0,025	0,052	0,87
Boc-Val-Lys(Z)-Tyr-Pro-OBzl	50	0,986	0,825	0,161	1,45
Boc-Val-Tyr-OH	40	0,179	-0,041	0,22	1,66
Boc-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-OEt	40	0,801	0,852	0,051	0,89
Boc-Val-Tyr-Pro-OBzl	40	1,054	1,011	0,043	1,10
Boc-His(Boc)-Phe-ONb	50	0,238	0,193	0,045	1,11
Boc-Lys-Pro-OH	40	0,072	0,287	0,215	0,61
Z-Arg-NO ₂					
Boc-Arg(NO ₂)-Arg(NO ₂)-Pro-Val-Lys(Z)-Val-Tyr-Pro-OBzl	50	0,312	0,318	0,006	0,99
HCl-H-Trp-Gly-ONb	50	-0,071	-0,187	0,116	1,31
Boc-His(OBzl)-Phe-OH	50	0,009	0,117	0,108	0,78
Boc-Glu(OBzl)-His-Phe-Lys(Z)-Trp-Gly-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-NH ₂	50	0,899	0,922	0,023	0,95
H-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-NH ₂	35	0	0,017	0,017	0,96
Z-Ser-Tyr-Ser-Tyr-OH	35	0,013	0,117	0,104	0,79
H-Val-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-Arg(NO ₂)-Arg(NO ₂)-Pro-Val-Lys(Z)-Val-Tyr-Pro-OBzl	55	0,545	0,501	0,044	0,11
AKTГ* ₁₋₂₄	18	1,006	0,705	0,301	2,00
H-Val-Lys(Z)-Val-Tyr-Pro-OBzl	50	0,423	0,415	0,08	1,02
H-Arg-Trp-Gly-ONb	35	0,281	0,228	0,053	1,13
Boc-Val-Tyr(OBzl)-Phe-His(OBzl)-Pro-OMe	50	1,102	0,981	0,121	1,32

 $\sigma=0,13$

* Адrenокортикотропный гормон.

зовой системе не соответствует наблюдаемой в системе октанол — вода. Поэтому в дальнейших расчетах величина $\lg P_{\text{окт}}$ была заменена на $\lg P^*$, рассчитываемую исходя из следующих предположений:

1) величины $\lg P^*$, подобно $\lg P_{\text{окт}}$ являются аддитивными; 2) значения инкрементов гидрофобности для всех функциональных групп и фраг-

ментов, кроме групп $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{NH}-$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, в системах октанол — вода и Zorbax ODS — водный ацетонитрил одинаковы.

Варьированием значений f_i для фрагмента $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{NH}-$ было установлено, что принятым допущениям и экспериментальным данным больше всего соответствует значение $-0,4$. Использование этого значения существенно улучшило корреляцию (табл. 5, Б), так что среднеквадратичная погрешность аппроксимации составила $0,13-0,17$ логарифмической единицы. Значения инкрементов концевых групп ($f_{i(\text{конц})}$) были найдены с помощью уравнения, аналогичного (8), из экспериментальных данных:

$$\lg P_{\text{экс}}^* = \frac{\lg k' - a_0}{a_1};$$

$$f_{i(\text{конц})} = \lg P_{\text{экс}}^* - \sum f_{i(\text{цени})} \quad (10)$$

Установлено, что средние значения f_i для $-\text{COOH}$ и $-\text{NH}_2$ составляют $-2,33$ и $-2,05$ соответственно.

В табл. 4 обобщены исходные и использованные в дальнейших расчетах инкременты величин $\lg P^*$.

Прогнозирование коэффициентов емкости. Сопоставление значений $\lg P^*$ (табл. 1) с коэффициентами a и b (табл. 3) показывает, что в целом

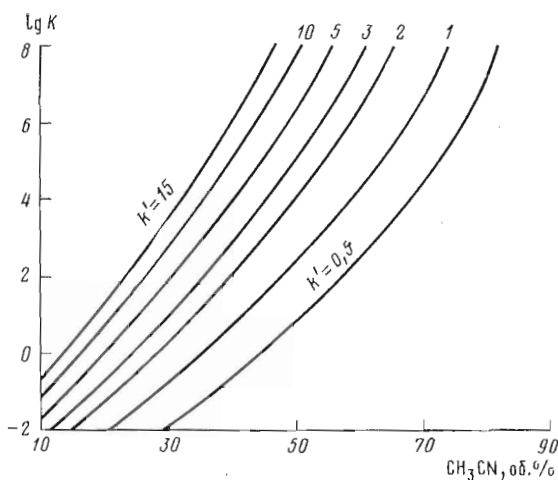


График для выбора концентрации ацетонитрила в элюенте

с увеличением $\lg P^*$ значения a и b по абсолютной величине возрастают. Коэффициенты корреляции в этом случае невелики:

$$a = a_0 + a_1 \lg P^* \quad (11)$$

$$(a_0 = 3,33; a_1 = 0,80; r = 0,754; n = 21; \sigma = 1,31),$$

$$b = b_0 + b_1 \lg P^* \quad (12)$$

($b_0 = -3,9; b_1 = -0,62; r = 0,68; n = 21; \sigma = 1,39$). Чтобы утверждать наличие зависимости между a и $\lg P^*$, b и $\lg P^*$, необходимо проверить статистическую значимость отличия найденного значения коэффициента корреляции от нуля. Для этого его сопоставили со значением $r[P, f]$ ([15], с. 210). Связь имеет место, если $r > r(P, f)$. Ближайшее значение $r(0,99; 20) = 0,54$. Следовательно, несмотря на значительный разброс, с вероятностью 0,99 можно утверждать, что связь между a и $\lg P^*$, b и $\lg P^*$ имеется.

Подставив выражения (11) и (12) в уравнение (3), получаем

$$\lg k' = a_0 + a_1 \lg P^* + b_0 \lg C + b_1 \lg P \cdot \lg C. \quad (13)$$

Обработкой данных табл. 1 методом наименьших квадратов найдено, что $a_0 = 2,337, a_1 = 0,568, b_0 = -2,826, b_1 = -0,400, r = 0,93, n = 33; \sigma = 0,15$.

Уравнение (13) является статистической моделью хроматографического поведения рассматриваемого класса веществ. Прогнозирующая способность данной модели может быть оценена сопоставлением расчетных и экспериментальных значений $\lg k'$ для соединений, не включенных в табл. 1, т. е. не использованных при определении коэффициентов уравнения (13). Сравнение расчетных и экспериментально наблюдаемых значений для 18 пептидов дано в табл. 6. Среднеквадратичное отклонение расчетных значений $\lg k'$ от экспериментальных составляет 0,13. Расчетные и экспериментально наблюдаемые значения $\lg k'$ связаны соотношением

$$\lg k'_{\text{расч}} = 0,006 + 1,059 \lg k'_{\text{эксп}}, \quad (14)$$

где $r = 0,959, n = 18, \sigma = 0,13$. Близость свободного члена к нулю, а углового коэффициента к единице свидетельствует о том, что предлагаемая модель при априорном расчете параметров удерживания не дает существенных систематических ошибок.

Достигнутая точность прогнозирования удерживания пептидов представляется нам достаточной для решения практически важного вопроса — расчетного выбора содержания ацетонитрила в элюенте на основании

строения анализируемого соединения. Рассчитав значения $\lg P^*$ и заданную желаемую величину $k'_{\text{расч}}$, можно найти C :

$$C = 10 \frac{\lg k'_{\text{расч}} - a_0 - a_1 \lg P^*}{b_0 + b_1 \lg P^*}. \quad (15)$$

Объемные концентрации ацетонитрила, при которых происходит элюирование пептида с данным $\lg P^*$ при заданном значении k' , можно найти также из графика (рисунок).

Во многих случаях оптимальным значением можно считать $k'_{\text{расч}} = 3$, $\lg k'_{\text{расч}} = 0,477$. Поскольку отклонения $k'_{\text{эксп}}$ от $k'_{\text{расч}}$ больше, чем 2σ , крайне редки, можем с высокой степенью вероятности утверждать, что $0,477 + 2 : 0,15 > \lg k'_{\text{эксп}} > 0,477 - 2 : 0,15$ и $1,50 < \lg k'_{\text{эксп}} < 5,98$. Оба предельных значения $k'_{\text{эксп}}$ легко наблюдать экспериментально в изокритическом режиме хроматографии; они в большинстве случаев приемлемы для аналитической практики.

Другим применением модели удерживания (13) может быть качественный хроматографический анализ. Например, при разделении пептидов, структура которых известна лишь предположительно, можно сопоставить значения $k'_{\text{эксп}}$ и $k'_{\text{расч}}$.

Близость этих величин можно рассматривать как подтверждение предполагаемой структуры, а их сильное различие — как несоответствие структуры предполагаемой.

Таким образом, описание величин удерживания пептидов как функции их гидрофобности и концентрации ацетонитрила в элюенте может быть использовано при разработке режимов разделения и качественной интерпретации результатов хроматографирования соединений этого класса.

Экспериментальная часть

Коэффициенты емкости пептидов измеряли на хроматографе Du Pont, модель 830, снабженном УФ-спектрофотометром. Длина волны детектирования 215 нм, длина оптического пути кюветы 1 мм. Колонка длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,5 мм заполнена сорбентом Zorbax ODS (фирма Du Pont, кат. № 850952702). В качестве элюента использовали фосфатный буфер (0,1 М KH_2PO_4 , pH 2,4). Органическим компонентом служил ацетонитрил (квалификации ч., перегнанный перед употреблением). Элюент фильтровали через фильтр из нержавеющей стали с размером пор 2 мкм. Образцы вводили с помощью петлевого дозатора (Rheodyne, мод. 7125) в виде растворов в элюенте. Объем пробы 10–25 мкл, концентрация около 1 мг/мл. Величину t_0 принимали равной времени выхода пика нитрата натрия. Расчеты выполнены по стандартной программе множественного регрессионного анализа на ЭВМ «Ванг 2200».

ЛИТЕРАТУРА

1. Abrahamsson M., Grönigson K. J. *Liquid Chromatogr.*, 1980, v. 3, № 4, p. 495–511.
2. Hearn M. T. W., Grego B. J. *Chromatogr.*, 1981, v. 203, p. 349–363.
3. Hearn M. T. W., Hancock W. S. In: *Chromatogr. Sci. Series (Biological/Biomedical Applications of Liquid Chromatography (II))* / Ed. Gerald L. H. N. Y.: 1979, v. 12, p. 243–271.
4. O'Hare M. J., Nice E. S. J. *Chromatogr.*, 1979, v. 171, № 2, p. 209–226.
5. Meek J. L., Rosetti Z. L. J. *Chromatogr.*, 1981, v. 211, № 1, p. 15–28.
6. Vigh G., Varga-Puchony Z., Hlavay J., Papp-Hites E. J. *Chromatogr.*, 1982, v. 236, № 1, p. 51–59.
7. Членов М. А., Титова Е. В., Кудряшов Л. И. *Биоорганическая химия*, 1982, т. 8, № 7, с. 914–921.
8. Членов М. А., Титова Е. В., Кудряшов Л. И. II Всес. симпоз. по жидкостной молекулярной хроматографии. Тез. докл. Черноголовка, 1982, с. 33.

9. Soczewinski E. *Anal. Chem.*, 1969, v. 41, № 1, p. 179-182.
10. Jandera P., Churaček J. *J. Chromatogr.*, 1974, v. 91, p. 207-221.
11. Snyder L. R., Dolan J. W., Gant J. R. *J. Chromatogr.*, 1979, v. 165, № 1, p. 3-30.
12. Murakami F. *J. Chromatogr.*, 1979, v. 178, № 2, p. 393-399.
13. Scott R. P. W., Kučera P. *J. Chromatogr.*, 1975, v. 112, № 3, p. 425-442.
14. Scott R. P. W., Kučera P. *J. Chromatogr.*, 1976, v. 122, № 1, p. 35-53.
15. Доерфель К. Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1969, с. 230.
16. Collander R. *Acta chem. scand.*, 1950, v. 4, № 7, p. 1085-1098.
17. Collander R. *Acta chem. scand.*, 1951, v. 5, № 5, p. 774-780.
18. Tomlinson E. *J. Chromatogr.*, 1975, v. 113, № 1, p. 1-35.
19. Rekker R. F. *The Hydrophobic Fragmental Constant*. Amsterdam: Elsevier, 1977, p. 300-305.
20. Perry J. A. *J. Chromatogr.*, 1979, v. 165, № 2, p. 117-146.

Поступила в редакцию
9.XI.1982

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF PEPTIDE BIOREGULATORS THEIR FRAGMENTS AND DERIVATIVES. I. CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR OF CORTICOTROPINE FRAGMENTS ON ZORBAX ODS PACKING

GRIGORJEVA V. D., SHATZ V. D., BRINKALNE L. A., CHIPENS G. I.

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

The influence of acetonitrile concentration in the eluent and of the peptide hydrophobicity on the capacity factors has been studied. The equation is proposed that describes retention as a function of the eluent characteristics and the peptide composition. The hydrophobicity increments for $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, and $>\text{CHCONH}$ -fragments in the studied chromatographic system have been determined. The proposed model of peptide retention is useful for a priori evaluation of the eluent composition that is necessary to elute a compound at a given capacity factor. It can be also used for the qualitative interpretation of peptide chromatograms.