

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ НАН УКРАЇНИ

На правах рукопису

БЕЛІК МИХАЙЛО КРІЮВИЧ

ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ ПЕПТИДОЛЕЙКОТРИЄНІВ
ТА ФОСФОНОПЕПТИДІВ

02.00.10 - біоорганічна хімія,
хімія природних та фізіологічно активних речовин

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Київ - 1994



Дисертація є рукопис.
Робота виконана в Інституті
НАН України

Наукові керівники:

академік НАН України, доктор хімічних
наук В. П. Кухар
кандидат хімічних наук С. В. Галушко

Офіційні опоненти:

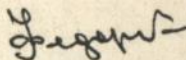
доктор хімічних наук, професор
С. Б. Серебряний
кандидат хімічних наук С. В. Сур

Провідна організація: Інститут колоїдної хімії та хімії води
ім. А. В. Думанського НАН України

Захист відбудеться <<17>> 06 _____ 1994 р. на засіданні
спеціалізованої вченої ради Д 018.85.01 в Інституті біоорганічної
хімії та нафтохімії НАН України (253094 Київ, вул. Мурманська, 1).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту
біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (253094 Київ, вул.
Мурманська, 1).

Автореферат розісланий <<17>> 05 _____ 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради  Д. М. Федоряк

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

АВ-30.244

ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність. Пептидолейкотриєни є основними продуктами 5-ліпоксигеназного метаболізму арахідонової кислоти. Вони мають високу біохімічну активність, пов'язані з розвитком ряду патологій та зараз інтенсивно досліджуються. Відкриття, встановлення будови цих сполук та їх хімічний синтез стали можливі тільки тоді, коли до поширеної експериментальної практики увійшли методи високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Реакційна суміш при синтезі лейкотриєнів вміщує декілька десятків побічних продуктів, і метод ВЕРХ, в теперішній час, є єдиним препаративним методом виділення цих сполук. Оптимальні умови проведення синтезу суттєво підвищують вихід кінцевих продуктів, але зараз відсутні методи що дозволяють оперативно аналізувати багатоконпонентні суміші при синтезі лейкотриєнів. В біологічних системах лейкотриєни знаходяться в ультрамалих концентраціях, у зв'язку з чим необхідні надійні, селективні та високочутливі методики детектування цих сполук. Відомості про хроматографічні властивості лейкотриєнів, вплив типу нерухомої та склад рухомої фаз обмежені, а дані, що є в літературі говорять про те, що проблема успішного хроматографування метаболітів арахідонової кислоти є дуже складною.

Амінофосфонові кислоти та пептиди, що їх вміщують - нова група цікавих сполук, які мають антибактеріальні, протипухлинні та гербіцидні властивості. Особливо цікаво отримання та дослідження індивідуальних стереоізомерів оскільки відомо, що біохімічні властивості стереоізомерів відрізняються. Відомості про використання хроматографічних методів в синтезі амінофосфонових кислот (АФк) та фосфопептидів (ФП) дуже обмежені. Високоефективна рідинна хроматографія дозволяє вирішити проблеми аналізу та розділення амінофосфонових кислот, дозволяє отримувати фосфопептиди та амінофосфонові кислоти високої ізомерної чистоти.

Обидва класи сполук досліджуються протягом останнього часу у лабораторії тонкого органічного синтезу ІБОНХ АН України. Аналіз продуктів синтезу цих сполук, розділення, визначення чистоти і детектування у біологічних системах, так само як і реалізація самих синтезів, стали можливі тільки завдяки застосуванню хроматографічних методів, та в першу чергу ВЕРХ. Це й визначило вибір мети цієї роботи.

Мета роботи. Метою цієї роботи було дослідження впливу будови сполук, складу рухомої фази на утримання та селективність їх

розділення за умов високоефективної рідинної хроматографії на полярних, гідрофобних та іонообмінних сорбентах; розробка методів розділення та аналізу лейкотриєнів та проміжних продуктів їх синтезу; розробка методів розділення та аналізу стереоізомерів амінофосфонових кислот та фосфопептидів.

Наукова новизна. Досліджені закономірності хроматографічної поведінки пептидолейкотриєнів в умовах обернено-фазової (ОФ) та іонообмінної (ІО) ВЕРХ; досліджені особливості розділення діастереомерів фосфопептидів на полярних, гідрофобних та іонообмінних сорбентах; при застосуванні реакції амінофосфонових кислот з ортофтальовим альдегідом та N-ацетил-L-цистеїном отримані діастереомерні похідні ізоіндолу та вивчена їх взаємодія з гідрофобними і іонообмінними сорбентами.

Практична цінність. Знайдені оптимальні умови хроматографічного розділу пептидолейкотриєнів, діастереомерів фосфопептидів та ізоіндольних похідних амінофосфонових кислот; розроблені експресні методи контролю синтезу лейкотриєнів; розроблені методи препаративного виділення пептидолейкотриєнів та проміжних продуктів їх синтезу, що дозволяють отримувати їх з високим ступенем очищення. Розроблені високочутливі методи аналізу лейкотриєну C₄ у біохімічних об'єктах; розроблені методи контролю діастереомерного та енантіомерного складу фосфопептидів та амінофосфонових кислот; розроблені методи контролю ферментативного розщеплення рацематів амінофосфонових кислот;

На захист виносяться:

- закономірності впливу змісту рухомої фази на утримання та селективність розділу пептидолейкотриєнів, проміжних продуктів їх синтезу, фосфопептидів та ізоіндольних похідних амінофосфонових кислот;
- результати визначення термодинамічних параметрів утримання та селективності розділу пептидолейкотриєнів, проміжних і побічних продуктів їх синтезу, діастереомерів ізоіндольних похідних амінофосфонових кислот та фосфопептидів на полярних, гідрофобних та іонообмінних сорбентах;
- методи отримання ізоіндольних похідних амінофосфонових кислот та аналіз їх енантіомерного складу при використанні високоефективної рідинної хроматографії;
- методи розділення діастереомерів вільних та захищених фосфопептидів за допомогою нормально-фазової (НФ), обернено-

- фазової та іонообмінної високоефективної рідинної хроматографії;
- методи контролю ферментативного розщеплення рацематів амінофосфонових кислот за допомогою обернено-фазової та іонообмінної високоефективної рідинної хроматографії;
 - методи контролю синтезу лейкотриєнів та проміжних сполук, а також методи їх препаративного виділення за допомогою обернено-фазової та іонообмінної високоефективної рідинної хроматографії;
 - методи визначення лейкотриєну C_4 у біологічних пробах за допомогою обернено-фазової та іонообмінної високоефективної рідинної хроматографії.

Апробація роботи. Результати проведених досліджень доповідалися на конференції з біоорганічної хімії Інституту біоорганічної хімії АН УРСР (1989), IV Всесоюзній конференції "Синтез и исследование простагландинов" (Мінськ 1989), V Всесоюзному симпозиумі з молекулярної рідинної хроматографії (Рига 1990), 18 Міжнародному симпозиумі з хроматографії (Амстердам 1990), 8 Міжнародному симпозиумі з хроматографії Придунайських країн (Варшава 1991), Міжнародному симпозиумі з аналізу пептидів (Стокгольм 1993).

Об'єм та структура роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, обговорення результатів, експериментальної частини, висновків, списку літератури, додатку. Робота викладена на 158 сторінках машинописного тексту, має 41 малюнок та 22 таблиці.

Хроматографія лейкотриєнів.*

Обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія лейкотриєнів. В умовах ОФ ВЕРХ на октадецильних, октильному та бутильному сорбентах вивчалось утримання та селективність розділу

*ВЕРХ - високоефективна рідинна хроматографія; ОФ, НФ, ІО - обернено-фазовий, нормально-фазовий, іонообмінний (стосовно до хроматографії); LTC₄, LTD₄, LTE₄ - лейкотриєни C₄, D₄, E₄; LTA₄-Me, LTC₄-Me, HETE-Me - метилові ефіри лейкотриєнів A₄, C₄, 5,8-дигідроксикозатетраєнової кислоти; GSH - відновлений глутатіон; GSSG - окислений глутатіон; для позначення аміноалкілфосфонових, аміноалкілфосфінової, аміноалкілфосфоністої кислот застосовуються позначення амінокарбонової кислоти з індексами "P", "PPH", "PH"; АФк - амінофосфорова кислота, ФП - фосфопептид.

наступних сполук - метил 8- форміл-5S,6S- епокси-7E-октаєноата (I), метил 5S,6S-епокси-11-оксо-7,9-ундекадієноата (II), метил 5S,6S-епокси-13-оксо-7,9,11-тридекатрієноата (III), LTA₄-Me (IV), LTC₄-Me (V), LTC₄ (VI), HETE-Me (VII), GSH (VIII), GSSG (IX), LTD₄ (X), LTE₄ (XI). Логарифм коефіцієнту утримання сполук лінійно зменшується при збільшенні концентрації метанолу в елюенті. У рамках сольвофобної теорії утримання сполук на гідрофобних поверхнях, був отриманий ряд параметрів взаємодії сорбатів з гідрофобною поверхнею сорбентів. Один з важливіших параметрів - площа взаємодії сорбата з поверхнею сорбента. Площина гідрофобного контакту пептидолейкотриєнів у значному ступені залежить від гідрофобності поверхні і у ряду LTC₄, LTD₄, LTE₄ змінюється незначно (Таб.1). Це може бути свідомством того, що з поверхнею взаємодіють однакові для всіх лейкотриєнів ділянки молекул.

Матеріал	ΔA нм ²		
	LTC ₄	LTD ₄	LTE ₄
Ultropac ODS-120T	2.44	2.13	1.99
Lichrosorb RP-18	1.23	1.26	1.36
Lichrosorb RP-8	1.62	1.55	1.36
Nucleosil C ₄	0.76	0.89	1.0

Таблиця 1.

Параметри взаємодії пептидолейкотриєнів з гідрофобними сорбентами.

При переході від LTA₄-Me (IV) до LTC₄-Me (V) змінення площини гідрофобного контакту з поверхнею на 0.75 нм² є величина, що приблизно дорівнює площині контакту з поверхнею глутатіону (0.93 нм²). Можна припустити, що вуглеводневий і пептидний блоки не зазнають значних конформаційних змін при утворенні LTC₄-Me і це приводить до адитивності площин контактів фрагментів з поверхнею. При переході від LTC₄-Me (V) до LTC₄ (VI) діється зменшення площини гідрофобного контакту на 0.21 нм², наслідком чого є те, що селективність розділу цієї пари сполук, а також LTA₄-Me та LTC₄-Me (V), підвищується при підвищенні концентрації метанолу в елюенті, тобто при зменшенні утримання. Наявність у LTC₄ і LTC₄-Me значно більшої площини гідрофобного контакту порівняно з LTA₄-Me та HETE-Me (на 0.5 - 0.8 нм²) приводить нас ще до одного висновку - спостерігається явище коли приєднання гідрофільного пептидного фрагменту не приводить до зменшення взаємодії сорбата з гідрофобною поверхнею, як цього слід було б очікувати, а навпаки збільшує його. Домінуючими факторами в цьому випадку є склад

елвента і орієнтація молекули відносно поверхні сорбенту.

Велими важливою характеристикою хроматографічного процесу є селективність розділу компонентів. Для вивчених сорбентів, при використанні елвентів з $pH \sim 7$, порядок виходу лейкотриєнів - $LTC_4 < LTD_4 < LTE_4$ залишається постійним і не залежить від використаного сорбенту. При використанні елвентів з $pH \leq 2.45$ порядок елювання лейкотриєнів залишається таким самим як при $pH 7$, але на сорбенті Ultropae ODS 120T послідовність елювання змінюється ($LTD_4 < LTC_4 < LTE_4$).

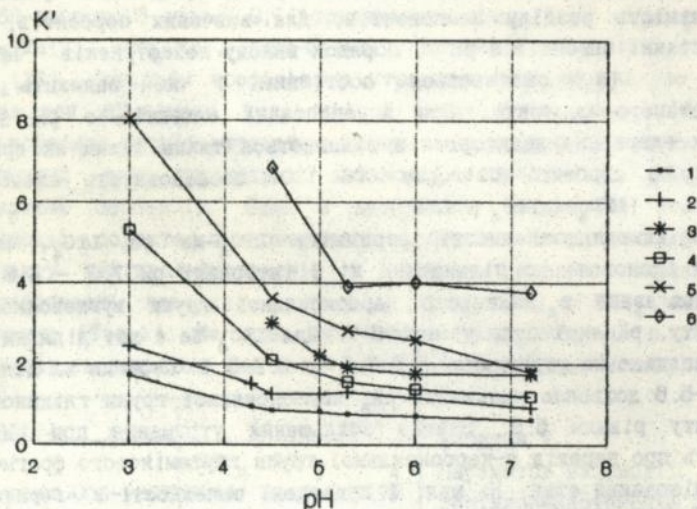
Порівнюючи залежності утримання LTC_4 -Ме та LTC_4 , можна зробити висновок, що підвищення k' в інтервалі $pH 7.3 - 4.8$ для LTC_4 пов'язане з наявністю карбоксильної групи вуглеводневого фрагменту, pK якої буде у межі 8-7. Для LTC_4 -Ме є дві ділянки, де pH не впливає на утримання: 5.8-7.5 та 3.8-5.4. Перегин на ділянці $pH 5.4-5.6$ дозволяє визначити pK_a карбоксильної групи гліцинового фрагменту рівним 5.5. Значне збільшення утримання при $pH < 4.5$ свідчить про перехід α -карбоксильної групи глутамінового фрагменту у неіонізований стан. На мал. 1 приведені залежності $k' = f(pH)$ для сорбента Separon SGX C18 при вмісті метанолу в елвенті 85 та 70%. Як видно, вони значно відрізняються, а ділянка pH оптимального розділу лейкотриєнів значно зрушується навіть при невеликій зміні вмісту органічного компоненту в елвенті.

При зміні концентрації іонів водню в елвенті можна визначити термодинамічне зміння енергії сорбції молекул сорбату, що знаходяться у різних ступенях іонізації: $\Delta(\Delta G_{\text{ср}}) = -RT \ln(k_0/k_i)$, де k_0 та k_i - коефіцієнти утримання різних іонізованих форм сорбату. Значення k_0 та k_i визначали при $pH 1.6$ та 7 , відповідно. Результати розрахунків приведені у таблиці 2.

Сорбент	$-\Delta(\Delta G)$, кДж/моль		
	LTC_4	LTD_4	LTE_4
Lichrosorb RP-8 70% MeOH	4.71	3.97	2.41
Nucleosil C ₄ 60% MeOH	3.42	2.87	1.54

Таблиця 2.
Зміна енергії сорбції пептидолейкотриєнів при зміні ступеня іонізації.

Як ми бачимо, зменшення концентрації метанолу на 10% веде до зміни різниці енергії сорбції в середньому на 1.1 кДж/моль.



Малюнок 1. Вплив рН рухомої фази на утримання пептидолейкотриєнів.

Колонка 3.3x150 мм, Separon SGX C18, 5 мкм; рухома фаза: водний розчин 0.01 М H_3PO_4 , 0.01 М $(NH_4)_2SO_4$ нейтралізований аміаком, метанол у концентрації 65% об. та 70% об.

Сполуки: 1 - LTC_4 (70% об. MeOH), 2 - LTD_4 (70% об. MeOH), 3 - LTE_4 (70% об. MeOH), 4 - LTC_4 (65% об. MeOH), 5 - LTD_4 (65% об. MeOH), 6 - LTE_4 (65% об. MeOH).

Зменшення $\Delta(\Delta G_{..})$ у ряду LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 може бути пояснено зменшенням дипольних моментів пептидолейкотриєнів. Підвищення концентрації іонів водню в рухомій фазі значно зменшує селективність розділення пептидолейкотриєнів, що в деяких випадках має позитивну роль. Найбільш повною перевагою зниження селективності розділу лейкотриєнів виявляється при використанні вискоєфективних колонок, наприклад Ultropac ODS-120T, та елюентів з $pH < 3$. В цьому випадку пептидолейкотриєни елюються компактною групою, так що відпадає необхідність в застосуванні градієнтного елювання.

Дуже актуальною проблемою в ОФ ВЕРХ лейкотриєнів є ефективність хроматографічного процесу. В порівнянні з нейтральними елюентами, ефективність хроматографування пептидолейкотриєнів у кислих елюентах значно підвищується для усіх сорбентів, окрім Liobhogorb RP-18. Так N_{eff} збільшується у 1.15, 1.1, 1.46 рази для LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 на сорбенті Ultropac ODS-120T, у 1.72, 1.72, 9.0 рази на октильному та у 5.5, 1.84, 2.9 рази на бутильному сорбентах. При переході від нейтральних до кислих елюентів відбувається значно більше збільшення ефективності на октильному та бутильному сорбентах ніж на октадецильному Ultropac ODS-120T. Таким чином, пониження pH елюентів, в ряді випадків, може бути засобом підвищення ефективності елювання пептидолейкотриєнів в умовах ОФ ВЕРХ.

Іонообмінна ВЕРХ лейкотриєнів. При хроматографуванні сполук на амінопропильних сорбентах та застосуванні елюентів, що забезпечують протонування аміногруп сорбенту, реалізується іонообмінний варіант рідинної хроматографії. Залежність коефіцієнту утримання лейкотриєнів від концентрації метанолу в елюенті має параболічну форму. Як видно, при низькому вмісті метанолу в елюенті значний вклад в утримання LTC_4 -Me та LTC_4 вносять гідрофобні взаємодії. При підвищенні концентрації метанолу в елюенті зменшується доля гідрофобних взаємодій, та у зв'язку з пониженням діелектричної проникності, зростає доля іонних, що в свою чергу приводить до зростання утримання. При концентрації метанолу більш 50% спостерігається значне підвищення ефективності елювання. У вивчених умовах, НЕТЕ практично не утримується, залежності відображають вплив концентрації метанолу в рухомій фазі на селективність відділення цих сполук. На прикладі LTC_4 -Me, LTC_4 , та НЕТЕ нами вивчається вплив pH елюенту на утримання в умовах ІО ВЕРХ. З пониженням pH від 7 до 2, загальне зміння утримання LTC_4 -Me та LTC_4

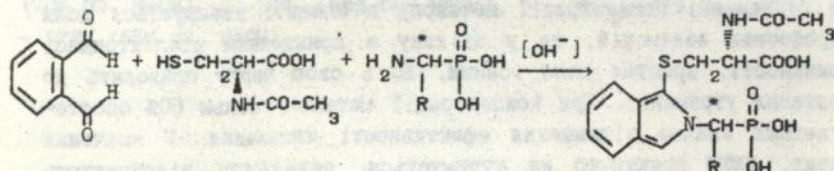
незначне, що є великою перевагою ІО ВЕРХ по відношенню до ОФ ВЕРХ.

Для вивчення іонообмінного процесу та вибору умов виділення LTC_4 -ме та LTC_4 ми вивчали вплив концентрації і типу протиіонів на утримання цих сполук. Вивчався вплив зміни концентрації нітрат- (50% MeOH, pH 3.4) та сульфат-іонів (85% MeOH, pH 3.7) на утримання. Знайдено, що логарифм коефіцієнта утримання є лінійною функцією логарифма активності протиіона у рухомій фазі, залежності добре описуються рівнянням $-\ln k' = D \cdot \ln a + B$. Таким чином, утримання лейкотриєнів добре описується в цих умовах як іонообмінний процес. Абсолютне значення D є відношенням зарядів елюваного та елюючого іонів. Усереднена по двох значеннях для LTC_4 -ме та LTC_4 величина дорівнює 0.93 та 1.1, відповідно, тобто в іонні взаємодії з сорбентом вступає одна карбоксильна група - глутамінового залишка глутатіону. При хроматографуванні пептидолейкотриєнів в розчинах $(NH_4)_2SO_4$, були одержані значення D рівні одиниці, тобто при pH=7 пептидолейкотриєни є двохзарядні аніони.

Значною перевагою іонообмінного варіанту, порівняно з ОФ ВЕРХ, є слабка залежність від pH елвенту, а також значно більша селективність розділу пептидолейкотриєнів та різноманітних гідрофобних продуктів.

Хроматографія α -амінофосфонових кислот та фосфонопептидів.

Попередколонуочна модифікація α -амінофосфонових кислот та енантіомерний аналіз за допомогою ОФ ВЕРХ. Для аналізу енантіомерної чистоти α -амінофосфонових кислот ми використовували реакцію амінокислоти з орто-фталевим альдегідом та N-ацетил-L-цистеїном. В лужному середовищі утворюються діастереомерні похідні ізоіндолу, які можливо розділити в умовах ОФ та ІО ВЕРХ:



Вивчалися слідуучі амінокислоти: Ala^P , Ala^{PH} , Ala^{PPh} , $\beta Me\beta Ala^P$, Val^P , Leu^P , Phe^P , $PhGly^P$. Особливості будови цих сполук вивчались нами за допомогою комп'ютерного моделювання. Знайдено, що структура з мінімальною енергією в своїй будові має плоский ізоіндолний

фрагмент, іонізовані карбоксильна та фосфонатна група максимально відокремлені. Можливо, що в конденсованій фазі ці особливості будови молекули будуть зберігатися. Ймовірно, що ізоіндольний фрагмент та алкільні групи амінокислот повинні вносити основний вклад в гідрофобні взаємодії з неполярними фазами.

Нами вивчався вплив концентрації метанолу в елюенті на утримання та селективність розділу діастереомерів ізоіндольних похідних Афк на різних октадецильних сорбентах. Селективність розділу діастереомерів похідних значно залежить від будови Афк. Максимальна селективність досягається для розділу похідних PhGly^P , що ймовірно пов'язано з наявністю фенільного замісника безпосередньо біля оптичного центру амінокислоти. Заміна одного гідроксилу на водень (похідні Ala^P та Ala^{PH}) приводить до зниження селективності розділу та зміну характеру концентраційної залежності – в останньому випадку селективність дещо зменшується з підвищенням утримання. Слід зауважити, що у випадку Ala^{PH} похідне D-ізомеру елюється першим, в той час як для останніх Афк порядок утримання похідних протилежний. Уведення, замість гідроксилу, фенільного замісника (Ala^{PPh}) приводить до значного зростання селективності розділу, порівняно до похідних Ala^P . При порівнянні селективності розділу пар похідних $\text{Leu}^P/\text{Val}^P$ та $\text{Phe}^P/\text{PhGly}^P$ знайдено, що значно більша селективність отримується для першої пари сполук, хоча обидві відрізняються на метиленову групу. Таким чином, адитивність вкладів в цьому випадку не спостерігається. Порядок зростання селективності розділу похідних у ряду амінофосфонових кислот – $\text{Phe}^P < \text{Ala}^P < \text{Val}^P < \text{Leu}^P < \text{PhGly}^P$ однаковий для колонок, заповнених сорбентами Separon SIX C18 та Europher 80-C18, однак для сорбенту Octadecyl polyol Si 100 є значна відміна.

При порівнянні хроматографічних властивостей ізоіндольних похідних Афк та їх карбонових аналогів було знайдено, що утримання похідних амінокарбонових кислот пропорційне їх гідрофобності та значно більше за фосфонових. Селективність розділу ізоіндольних похідних Val, Leu, та Ala також значно перевищує ці значення похідних фосфонових аналогів.

При синтезі Афк важливим є контроль оптичної чистоти їх ефірів. Нами досліджувався розділ похідних діетилових та діізопропилових ефірів Ala^P та Leu^P . Знайдено, що селективність розділу ізоіндольних похідних Ala^P значно перевищує селективність розділу ефірів. Для Leu^P селективності розділу похідних

кислоти і пропилового ефіру однакові, а етилового значно менша. Таким чином, для вивчених сполук, спостерігається зниження селективності розділу ізоіндольних похідних ефірів, особливо діетилових, порівняно до вільних Афк.

Застосований метод дериватизації і аналізу може бути використаний не тільки до амінокислот, а також до діпептидів. Нами досліджено розділ похідних діастереомерних пептидів L-Ala-L, D-Ala^P на колонках, заповнених сорбентами Separon SIX C18 та Octadecyl polyol Si 100. Знайдено, що на останній колонці, при використанні 25% метанолу та 75% 0.01 М фосфатного буфера, аналіз діастереомерного складу може бути проведений за 15 хвилин.

Попередколонічна модифікація амінофосфонових кислот та енантіомерний аналіз за допомогою аніоно-обмінної ВЕРХ. Діастереомерні похідні ізоіндолу є багатоосновними кислотами і можуть взаємодіяти з поверхнею аніонообмінного сорбенту. На амінопропильному сорбенті (Separon SIX NH₂) досліджувались хроматографічні властивості ізоіндольних похідних наступних амінофосфонових кислот: Ala^P, βMeβAla^P, Val^P, Leu^P, Phe^P, PhGly^P. Для найбільшого зниження гідрофобних взаємодій використовувався елвент, що містив 50% метанолу. З метою оптимізації умов розділу діастереомерів вивчався вплив концентрації фосфату амонію в елвенті на утримання та селективність розділу. Логарифм коефіцієнту утримання є лінійною функцією логарифма концентрації солі в елвенті. Утримання похідних зростає в ряду: βMeβAla^P < Val^P < Leu^P < Phe^P < Ala^P < PhGly^P. Таким чином, в цьому випадку, на відміну від ОФ ВЕРХ, немає зв'язку між утриманням і гідрофобністю або розміром сполук. Математична обробка результатів експериментів дозволяє апроксимувати залежності рівнянням типу: $\ln k' = b - p \cdot \ln C$, де C – концентрація солі в елвенті (мМ). Аналіз параметру p дозволяє зробити висновок, що середнє значення заряду хроматографованих сполук знаходиться в межах 2.3 – 2.7. Оскільки карбоксильна група має рК ~ 2.5, а також рК₁ фосфатної групи 1.5 – 2, можна зробити висновок, що фосфатна група іонізована частково в умовах експерименту (50% MeOH, рН 7). Таким чином, наявність великих концентрацій метанолу знижує і диференціє силу Афк.

При зростанні утримання діастереомерних похідних вивчених кислот, за винятком βMeβAla^P та Val^P, досягається селективність, достатня для повного розділу. Порядок елювання похідних такий самий як і в ОФ ВЕРХ – L-L-ізомери елюються першими. Знайдено, що

для ароматичних кислот Phe^{P} та PhGly^{P} , при зменшенні концентрації елюючого іона селективність розділу діастереомерних похідних ізоїндолу незначно підвищується. Селективність розділу похідних Leu^{P} підвищується при зменшенні концентрації від 100 до 50 мМ, досягаючи максимуму в межах 25 мМ. Для похідних Ala^{P} характерно різке збільшення селективності розділу при пониженні концентрації від 50 до 25 мМ. Оптимальна концентрація фосфату амонію для розділу похідних - 25 ± 5 мМ, в цьому випадку розділ найбільш селективний і коефіцієнти утримання знаходяться в межах 1.8 - 3.6.

Знайдені умови дають змогу проводити за допомогою ОФ та ІО ВЕРХ експресний аналіз енантіомерного складу АФк при ферментативному розщепленні рацематів під дією пеніцилінацилази.

Обернено-фазова хроматографія фосфонодипептидів. Вивчалися хроматографічні властивості наступних дипептидів: $\text{L-Ala-L,D-Ala}^{\text{P}}$ (I), $\text{L-Val-L,D-Ala}^{\text{P}}$ (II), $\text{L-Leu-L,D-Phe}^{\text{P}}$ (III), $\text{L-Phe-L,D-Leu}^{\text{P}}$ (IV), $\text{L-Leu-L,D-Phe}^{\text{P}}$ (V), $\text{Z-L-Phe-L,D-Leu}^{\text{P}}(\text{OEt})_2$ (VI), $\text{Z-L-Val-L,D-Ala}^{\text{P}}(\text{O}i\text{Pr})_2$ (VII), $\text{Boc-L-Leu-L,D-Phe}^{\text{P}}(\text{O}i\text{Pr})_2$ (VIII), $\text{Z-L-Ala-L,D-Ala}^{\text{P}}(\text{O}i\text{Pr})_2$ (IX).

Найбільш гідрофільна з вивчених сполук, ФП $\text{L-Ala-L,D-Ala}^{\text{P}}$, вельми слабо утримується в умовах ОФ ВЕРХ, навіть за відсутності органічного розчинника в еленті. Нами знайдено, що на колонці Separon SIX 018, при збільшенні концентрації $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в рухомій фазі з 1.5 до 3 М, підвищується як утримання L-L -ізомеру (від $k' = 1.47$ до 3.37), так і селективність розділу діастереомерів (від $\alpha = 2.17$ до 5.76). У випадку $\text{L-Val-L,D-Ala}^{\text{P}}$ гідрофобність сорбату підвищується і для вивчення утримання ми застосовували водно-метанольні розчини. При зменшенні концентрації MeOH від 10 до 0%, селективність розділу діастереомерів $\text{L-Val-L,D-Ala}^{\text{P}}$ збільшується від 1.55 до 2.18 (Octadecyl polyol Si 100). При подальшому підвищенні гідрофобності сорбатів (сполуки $\text{L-Leu-L,D-Phe}^{\text{P}}$ та $\text{L-Phe-L,D-Leu}^{\text{P}}$), селективність розділу збільшується таким чином, що досягається повне розділення діастереомерів (Octadecyl polyol Si 100, 40% MeOH , $\alpha = 1.85$ та 2.95, відповідно). Зміна амінокислотної послідовності ізомерних ФП (сполуки $\text{L-Leu-L D-Phe}^{\text{P}}$ та $\text{L-Phe-L,D-Leu}^{\text{P}}$) майже не впливає на утримання L-L -ізомерів, але пептид $\text{L-Phe-D-Leu}^{\text{P}}$ ($k' = 2.48$) утримується значно сильніше ніж ізомерний $\text{L-Leu-D-Phe}^{\text{P}}$ ($k' = 1.8$).

Порівнюючи хроматографічні властивості карбонових пептидів та їх фосфонових аналогів (сполуки L-Leu-L,D-Phe та $\text{L-Leu-L,D-Phe}^{\text{P}}$),

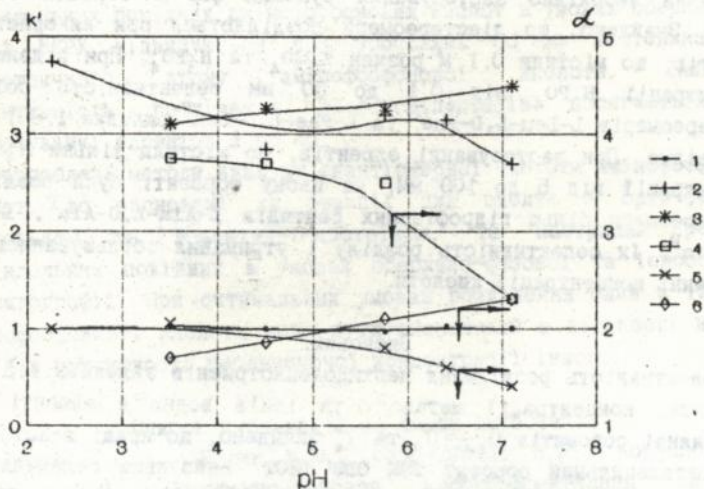
знайдено, що на сорбенті Separon SIX C18, при вмісті 40% MeOH в елюенті, L-Leu-L-Phe^P та L-Leu-L-Phe мають коефіцієнти утримання 2.86 та 3.29, а їх L-D-ізомери відповідно - 4.72 та 7.07. Таким чином, заміна карбоксильної групи на фосфонатну приводить до значного зменшення утримання і селективності розділу діастереомерів.

Оскільки ФП є іоногенними сполуками, вони можуть змінювати адсорбційні властивості в залежності від кислотності елюенту (Мал. 2). Їх утримання та селективність розділу діастереомерів значно збільшуються при зменшенні рН в межах 5 - 7, що відповідає значенню рK₂ дисоціації фосфонатної групи (рK₂ ~ 5-7). Завдяки цьому, використання елюентів з рН < 5 може підвищити навантаження на колонку при препаративному розділенні.

Захищені пептиди значно сильніше утримуються в умовах ОФ ВЕРХ. Однак збільшення гідрофобності супроводжується зменшенням селективності розділу діастереомерів. Розділити діастереомери було можливо тільки у випадку Z-L-Phe-L,D-Leu^{P(OEt)}₂. Оскільки захищені ФП мають велике синтетичне значення, для їх розділу ми застосували НФ варіант хроматографії на нітрильному та амінопропильному сорбентах. Усі вивчені сполуки (VI-IX) можуть бути розділені на обох типах сорбентів при застосуванні рухомої фази гексан-ізопропанол. В умовах НФ ВЕРХ L-L-ізомери утримуються сильніше ніж L-D-ізомери.

Аніонообмінна хроматографія фосфонопептидів. При хроматографуванні на амінопропильному сорбенті при використанні елюенту, що містить H₃PO₄, реалізується режим іонного обміну ФП. При підвищенні концентрації кислоти в рухомій фазі утримання пептидів зменшується, але селективність розділу діастереомерів практично не змінюється. Утримання пептидів на амінопропильному сорбенті збільшується в ряду: L-Ala-D-Ala^P < L-Val-D-Ala^P < L-Leu-D-Phe^P < L-Phe-D-Leu^P, а селективність розділу діастереомерів знаходиться в межах 1.2 - 1.4. Знайдено, що L-L-ізомери елюються першими в умовах АО ВЕРХ. Оптимальним складом елюенту є 0.1-10 мМ H₃PO₄ та 5% метанолу.

На відміну від ФП, селективність розділу карбонових аналогів (L-Leu-L,D-Phe) значно збільшується при зростанні концентрації кислоти, що може бути пояснено різницею значень рK карбоксильних груп L-L та L-D-пептидів.



Малюнок 2. Вплив рН елюенту на коефіцієнти утримання (k') L-L-ізомерів та селективність розділення (α) діастереомерів. Колонка 3.3x150 мм, Separon SIX C18, 5 мкм; рухома фаза: водний розчин 0.01 М H_3PO_4 , нейтралізований аміаком, - метанол (80:40 об). Сполуки: 1,4 - Val-Ala^P, 2,5 - Leu-Phe^P, 3,6 - L-Leu-D-Phe.

Катіонообмінна хроматографія фосфонопептидів. На фенілсульфонатному сорбенті фосфонопептиди L-Leu-L,D-Phe^P та L-Phe-L,D-Leu^P утримуються значно сильніше ніж на амінопропильному, і для їх елювання необхідно застосування рухомих фаз з більшою іонною силою. Знайдено, що діастереомери розділяються при використанні елюентів, що містять 0.1 М розчин K₂SO₄ та H₃PO₄. При підвищенні концентрації H₃PO₄ від 0.1 до 50 мМ селективність розділу діастереомерів L-Leu-L,D-Phe^P та L-Phe-L,D-Leu^P складає 1.8 і 2.2, відповідно. При застосуванні елюентів, що містять тільки H₃PO₄ в концентрації від 5 до 100 мМ, на цьому сорбенті були розділені діастереомери більш гідрофільних пептидів L-Ala-L,D-Ala^P, L-Val-L,D-Ala^P. Їх селективність розділу і утримання збільшувались при зменшенні концентрації кислоти.

Висновки.

1. Селективність розділення пептидолейкотриєнів залежить від типу сорбента, концентрації метанолу та іонів водню в елюенті. При порівнянні сорбентів C₁₈, C₈ та C₄ знайдено, що кращі властивості має октадецильний сорбент TSK ODS 120T. Найбільша селективність розділення лейкотриєнів досягається при застосуванні цього сорбенту та елюента, що містить 65 - 70% метанолу (pH = 7.1).
2. Пониження pH елюенту до 2 є методом підвищення ефективності елювання пептидолейкотриєнів. Ступінь підвищення ефективності елювання, в порівнянні з нейтральними елюентами, тим вище, чим менш гідрофобний сорбент використовувався для хроматографування. Максимальна ефективність елювання лейкотриєнів досягається на сорбенті TSK ODS 120T при використанні елюентів, що містять 70-75% метанолу (pH=2). За цих умов пептидолейкотриєни елюються компактної групою та відпадає необхідність в градієнтному елюванні.
3. Розроблені методи препаративного виділення лейкотриєнів з реакційних сумішей дозволяють стримувати ці сполуки зі ступенем ізомерної чистоти не менш 99%.
4. Розроблені високоселективні та чутливі методи визначення ультрамалих концентрацій лейкотриєну C₄ у біологічних об'єктах за допомогою обернено-фазової та іонообмінної ВЕРХ. Методи дозволяють визначати LTC₄ на рівні 2-3x10⁻¹¹ моля у зразку.
5. Знайдені оптимальні умови розділу та аналізу діастереомерів вільних та захищених фосфонодипептидів методами нормально-фазової,

обернено-фазової та іонообмінної хроматографії. Для розділення вільних фосфодіпептидів необхідне застосування обернено-фазової або іонообмінної хроматографії, тоді як захищені пептиди можна розділити переважно за допомогою нормально-фазової ВЕРХ.

6. Селективність розділу діастереомерів фосфодіпептидів та ізоіндольних похідних амінофосфонових кислот в умовах обернено-фазової ВЕРХ підвищується при зростанні об'єму замісника біля асиметричного атому амінофосфонової кислоти. Найбільша селективність розділення фосфодіпептидів досягається при застосуванні елюентів з $\text{pH} < 5$.

7. Розроблені методи аналізу енантіомерної чистоти амінофосфонових кислот, що засновані на реакції цих сполук з орто-фталевим альдегідом та N-ацетил-L-цистеїном, та наступним розділом ізоіндольних похідних в умовах обернено-фазової та іонообмінної хроматографії. При оптимальних умовах розділення один з ізомерів амінофосфонової кислоти може бути визначений в кількості не менш 0.5 % в присутності перевищуючої концентрації іншого.

Список публікацій за темою дисертації.

1. Галушко С.В., Белик М.Ю., Сорочинский А.Е., Корнилов А.М., Кухарь В.П. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография в синтезе лейкотриенов A_4 и C_4 . // Биооргани. химия, 1989, Т 15, N 7, с. 952-959.
2. Кухарь В.П., Галушко С.В., Белик М.Ю., Сорочинский А.Е., Корнилов А.М. Высокоэффективная жидкостная хроматография лейкотриенов. // Тез. докл. IV Всес. конф. "Синтез и исследование простагландинов". Минск 1989. с. 120-122.
3. Галушко С.В., Белик М.Ю., Сорочинский А.Е., Корнилов А.М., Кухарь В.П. Высокоэффективная жидкостная хроматография в синтезе лейкотриенов. Разделение изомеров метил-5S,6S-оксидо-11-оксоундекадиеноата. // Ж. аналит. хим., 1989, Т 44, Вып. 5, с. 938-941.
4. Галушко С.В., Белик М.Ю., Сорочинский А.Е., Корнилов А.М. Высокоэффективная жидкостная хроматография лейкотриена C_4 на аминопропильном сорбенте. // Биооргани. химия. 1990, Т 16, N 1, с. 113-117.
5. Галушко С.В., Белик М.Ю., Сорочинский А.Е., Корнилов А.М., Кухарь В.П. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография лейкотриенов. // Тез. докл. V Всес. симпоз. по мол. жидкостной хроматогр. Рига 1990. с. 163.

6. Галушко С.В., Белик М.Ю., Солоденко В.А., Кашева Т.Н., Кухарь В.П. Высокоэффективная жидкостная хроматография фосфонодипептидов. //Биоорганическая химия, 1990, Т 16, N 12, с. 1643-1646.
7. Galushko S.V., Belik M. Yu., Solodenko V.A., Kasheva T.N., Kukhar V.P. Normal- and reversed-phase high-performance liquid chromatography of some phosphonodipeptides. // J. Chromatography. 1991, 553, 143-147.
8. Galushko S.V., Belik M. Yu., Solodenko V.A., Kasheva T.N., Kukhar V.P. Ion-exchange HPLC of diastereoisomers of some phosphonodipeptides. // 8th Danube Symposium on Chromatography 1991, Abstract Mo- P-16 .
9. Galushko S.V., Belik M. Yu., Solodenko V.A., Kasheva T.N., Kukhar V.P. Ion-exchange high-performance liquid chromatography of diastereoisomers of some phosphonodipeptides. // J. Chromatography. 1992, 600, 79-81.
10. Solodenko V.A., Belik M.Y., Galushko S.V., Kukhar V.P., Kozlova E.V., Mironenko D.A., Svedas V.K. Enzymatic preparation of both L- and D-enantiomers of phosphonic and phosphonous analogues of alanine using penicillin acylase. // Tetrahedron: Asymmetry. 1993. V. 4, N 9, p. 1965-1968.
11. Galushko S.V., Belik M. Yu., Shishkina I. P., Solodenko V.A., Pojarkova L. N. Diastereoisomeric analysis of phosphonodi- and tripeptides by reversed phase HPLC. // International Symposium on analysis of peptides 1993, Abstracts, poster 4.

Підп. до друку. 12.05.94 Формат 60x84 $\frac{1}{2}$ Папір офс
Друк. офс. Умовн. друк. арк. 0,93 Обл.-вид. арк. 0,66 тир. 100
Зам. 4.2296

Київська книжкова друкарня наукової книги. Київ, Ретіна, 4.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

457177

AB 30.244