

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Факультет естественных наук
Кафедра: аналитической химии**

Дипломная работа

**ПРЕДСКАЗАНИЕ ОБЪЕМОВ УДЕРЖИВАНИЯ
И УФ-СПЕКТРОВ ПЕПТИДОВ
В ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ**

Кучкина Анна Юрьевна

Научный руководитель
к.х.н., Азарова Ирина Николаевна

СОДЕРЖАНИЕ

Условные обозначения и сокращения.....	3
1. Введение.....	4
2. Литературный обзор.....	6
2.1. Пептиды. Аминокислоты.....	6
2.2. Методы разделения пептидов.....	7
2.3. Обращенно-фазовая ВЭЖХ пептидов.....	8
2.3.1. Неподвижные фазы.....	8
2.3.2. Подвижные фазы.....	9
2.3.2.1. Органические растворители в составе подвижной фазы.....	9
2.3.2.2. Выбор рН подвижной фазы.....	9
2.3.2.3. Добавки-модификаторы в составе подвижной фазы.....	10
2.4. Методы детектирования пептидов.....	11
2.4.1. Детектирование по УФ-поглощению.....	11
2.4.2. Масс-спектрометрическое детектирование пептидов.....	13
2.5. Предсказание объемов удерживания и УФ спектров пептидов в ОФ ВЭЖХ.....	13
3. Экспериментальная часть.....	17
3.1. Материалы.....	17
3.2. Оборудование.....	17
3.3. Методы.....	18
3.3.1. Оценка погрешности приготовления растворов.....	18
3.3.2. Приготовление растворов.....	19
3.3.3. Контроль стабильности работы хроматографической системы.....	19
3.3.4. Проверка настройки монохроматора.....	20
3.3.5. Хроматографические методы.....	21
3.3.6. Методы обработки данных.....	22
3.3.7. Масс-спектрометрические методы.....	23
4. Результаты и обсуждение.....	24
4.1. Вычисление объемов удерживания пептидов известного аминокислотного состава для градиента концентрации ацетонитрила фиксированной формы.....	24
4.1.1. Определение свободного объема колонки.....	24
4.1.2. Вычисление коэффициентов удерживания структурных элементов пептидов.....	25
4.1.3. Линейная модель "состав - удерживание".....	26
4.1.4. Нелинейная модель "состав - удерживание".....	27
4.2. Метод предсказания объемов удерживания пептидов для градиентов произвольной формы.....	30

4.2.1. Исследование особенностей формирования градиента концентрации ацетонитрила в ПФ.....	33
4.2.2. Изучение зависимостей коэффициентов емкости аминокислот от концентрации ацетонитрила в ПФ.....	35
4.2.3. Расчет объемов удерживания аминокислот в градиентной ОФ ВЭЖХ.....	37
4.2.4. Вычисление объемов удерживания пептидов известного аминокислотного состава в градиентной ОФ ВЭЖХ.....	38
4.3. Вычисление УФ-спектров пептидов.....	39
4.4. Применение метода расчета объемов удерживания и УФ-спектров пептидов.	43
4.4.1. Фракционирование смесей пептидов.....	43
4.4.2. Исследование природы пептида, выделенного из мышечной ткани мышей.	45
5. Выводы.....	48
6. Благодарности.....	49
7. Литература	50
<i>Приложение 1.</i> Аминокислоты и их свойства.....	53
<i>Приложение 2.</i> Масс-спектры некоторых пептидов.....	55
<i>Приложение 3.</i> Экспериментально найденные и вычисленные объемы удерживания аминокислот (градиент G1).....	56
<i>Приложение 4.</i> Экспериментально найденные и вычисленные объемы удерживания аминокислот (градиент G2).....	57
<i>Приложение 5.</i> Экспериментально найденные и вычисленные объемы удерживания пептидов (градиент G1).....	58
<i>Приложение 6.</i> Экспериментально найденные и вычисленные объемы удерживания пептидов (градиент G2).....	59
<i>Приложение 7.</i> Экспериментально найденные и вычисленные объемы удерживания пептидов (градиент G3).....	60
<i>Приложение 8.</i> Хроматографические и спектральные параметры аминокислот и пептидов.....	61

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- Δ_{σ} – допустимая погрешность содержания примесей в основном веществе, %
 $\Delta_m^{взвеш.}$ – погрешность взвешивания, мг
 Δ_m – допустимая погрешность взвешивания, мг
 A_{λ} – оптическое поглощение раствора вещества при длине волны λ , е.о.п.
 a_i^{λ} – спектральные характеристики аминокислотных остатков для длины волны λ
 $a_{(N+C)}^{\lambda}$ – условная площадь пика концевых групп пептида при длине волны λ
 a_{AK}^{λ} – удельная площадь пика аминокислоты при длине волны λ
 $a_{пептид}^{\lambda}$ – спектральные характеристики пептидов как площади их хроматографических пиков при длине волны λ , $C=1$ Ммоль/л и объёме пробы 4 мкл
 $a_{ПС}^{\lambda}$ – удельное оптическое поглощение пептидной связи при длине волны λ
 a_M – молярное поглощение
 C_m – массовая концентрация, г/л
 C_M – молярная концентрация, моль/л
G1, G2, G3, G4 – обозначение заданных функций градиента концентрации ацетонитрила в подвижной фазе
 m – масса, г
 M – молярная масса вещества
 n_i – число аминокислотных остатков i в пептиде
 R_i – остаток аминокислоты
 R_{Si/S_0} – спектральное отношение (отношение площадей хроматографических пиков вещества на хроматограммах при длинах волн λ_i и λ_0)
 s_R – относительное стандартное отклонение
 S_{λ} – площадь хроматографического пика при длине волны детектирования λ , е.о.п. · мкл
 V – объем
 V_0 – свободный объем колонки, мкл
 V_R – объем удерживания вещества в колонке, мкл
 V_z – собственный объем хроматографа, мкл
 V_e – объем задержки градиента, мкл
 $Z_{(N+C)}$ – суммарная константа удерживания концевых групп пептида
 Z_i – константа удерживания остатка i -той аминокислоты в составе пептида
 δ_C – погрешность приготовления растворов, %
 δ_m – относительная погрешность определения массы вещества, %
 δ_{ω} – относительная погрешность определения массовой доли основного вещества, %
 λ – длина волны, нм
 ω – массовая доля основного вещества в образце, %
 k' – коэффициент емкости
 k'_0 – коэффициент емкости, экстраполированный к нулевому содержанию органического модификатора в ПФ
 K – константа распределения
 β – фазовое отношение хроматографической колонки
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием в УФ-диапазоне длин волн
МС – масс-спектрометрия
НФ – неподвижная фаза
ОФ – обращенная фаза; обращенно-фазовая
ПФ – подвижная фаза
С18 – неподвижная фаза (адсорбент) n -октадецилсиликагель
УФ – ультрафиолетовый
е.о.п. – единицы оптического поглощения
ТФУ – трифторуксусная кислота
 $A_{10\%}$ – асимметрия пика на уровне 10 % h
 h – высота пика

1. ВВЕДЕНИЕ

Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ), являясь более 30 лет важнейшим методом аналитической химии пептидов, в настоящее время продолжает активно развиваться и совершенствоваться. Это обусловлено появлением, с одной стороны, новых адсорбентов, подвижных фаз и детекторов, а с другой – благодаря возникновению научных задач, решение которых требует разработки специальных и совершенствования уже известных аналитических процедур.

В отношении новых хроматографических детекторов следует отметить, прежде всего, несколько типов масс-спектрометров (МС), которые применяются как в режиме *"off line"*, так и *"on line"*. Оба эти режима допускают применение только летучих подвижных фаз, причём режим *"on line"* требует минимизации ионной силы элюента, необходимой для достижения наивысшей чувствительности детектирования.

"Off line" МС-детектирование превращает ОФ ВЭЖХ в микропрепаративную двухстадийную процедуру, когда на первой стадии проводят фракционирование с регистрацией элюирующихся из колонки пептидов с помощью, главным образом, УФ-детектирования. Необходимость фракционирования подвижной фазы возродила интерес к исследованиям, связанным с возможностью предсказания времени (объема) удерживания пептидов на колонке в зависимости от структуры пептидов и режима элюирования. Кроме прикладного значения, работы по моделированию хроматографического поведения пептидов, безусловно, важны с точки зрения развития хроматографии как аналитического метода. В связи с этим, не менее актуальными в этом отношении представляются также исследования, направленные на предсказание УФ-спектров пептидов.

Важнейшей областью применения ОФ ВЭЖХ в аналитической химии пептидов в последние годы стало новое научное направление молекулярной биологии, возникшее после расшифровки геномов некоторых организмов, включая человека, и получившее название "протеомика". Главный вопрос протеомной задачи можно сформулировать следующим образом: "Синтезируется ли клеткой закодированный в геноме белок, или его ген является "молчащим"?".

Идентификация целевого белка, несмотря на то, что структура его известна из генома, на фоне тысяч разных белков клетки – задача очень сложная и прямым методом она, как правило, не решается. Одним из наиболее продуктивных является подход, получивший название "пептидомика", суть которого заключается в том, что сумму белков гидролизуют высокоспецифической протеазой (например, трипсином), и затем среди многих тысяч полученных пептидов ищут пептиды с известной структурой,

образовавшиеся в результате гидролиза целевого белка. Поиск таких пептидов осуществляется путем многостадийного (многомерного) разделения смеси на фракции с целью выделения целевых пептидов в чистом или достаточно обогащенном виде для МС-анализа, в результате которого устанавливается их молекулярная масса. Совпадение найденной массы с массой искомого пептида является достаточным доказательством того, что интересующий белок в клетке синтезируется.

Очевидно, что возможность предсказания хроматографического удерживания и УФ-спектров пептидов с известной структурой существенно облегчает их поиск в сложных смесях, требующих многостадийного фракционирования, т.к. позволяет проводить фракционирование целенаправленно, а не "вслепую", и, тем самым, значительно сокращает не только продолжительность самого протеомного анализа, но и, соответственно, уменьшает его трудоёмкость.

Целью данной работы являлось:

1) исследование хроматографического поведения аминокислот и пептидов и их УФ-спектров для построения модели, позволяющей предсказывать удерживание и УФ-спектры пептидов известного состава в градиентной ОФ ВЭЖХ с использованием летучей подвижной фазы, пригодной для прямого ввода выделенных фракций элюата в масс-спектрометр;

2) разработка метода расчета объемов удерживания и УФ-спектров пептидов в градиентной ОФ ВЭЖХ, основанного на экспериментально полученных характеристиках их структурных элементов.

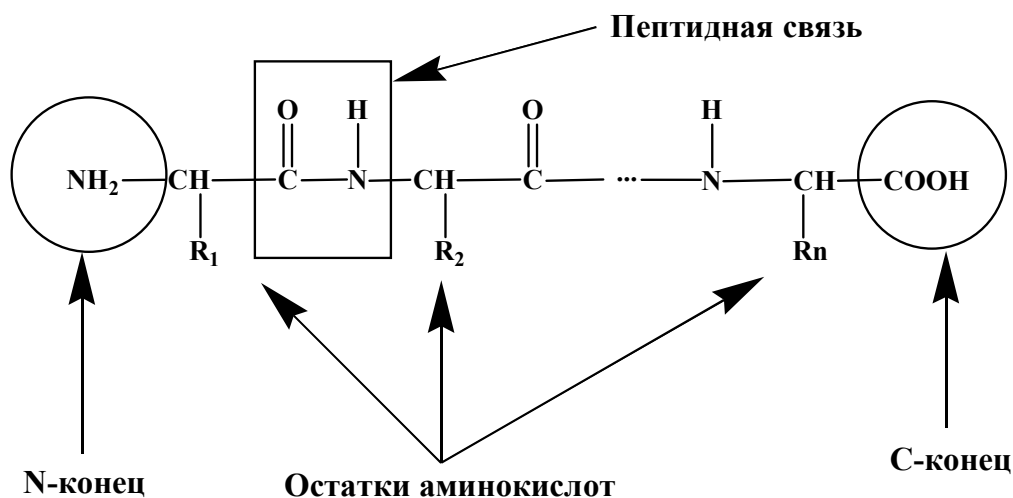
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Пептиды. Аминокислоты

В настоящее время большое количество исследований в области молекулярной биологии посвящено изучению свойств белков и пептидов, поскольку они представляют собой важнейший класс биологически активных веществ.

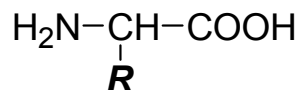
Белки – это биополимеры, построенные из остатков α -аминокислот, соединённых между собой пептидными связями (-CO - NH -).

К пептидам принято относить молекулы белковой природы с молекулярной массой не более 5000 [1]. Общую формулу пептида можно представить в следующем виде:



Свойства белков и пептидов во многом определяются свойствами аминокислот, входящих в их состав.

Аминокислоты - это любые органические кислоты, в состав молекул которых входит аминогруппа. Часто под этим названием подразумевают именно α -аминокислоты, т.к. они имеют важное биологическое значение. Структурные формулы и свойства 20-ти наиболее распространенных α -аминокислот приведены в *Приложении 1*. Общая структурная формула α -аминокислот имеет следующий вид:



Как видно из структурной формулы, аминокислоты (за исключением пролина) отличаются друг от друга только структурой боковой цепи R. Аминокислоты являются амфотерными соединениями, поскольку в состав их молекул входит как кислотная – карбоксильная группа, так и основная – аминогруппа. В сильнокислой среде карбоксильная группа преимущественно недиссоциирована, а аминогруппа протонирована. В сильнощелочной среде аминогруппа находится в виде свободного

основания, а карбоксильная группа – в виде карбоксилат-аниона. В кристаллическом же состоянии аминокислоты существуют в виде цвиттер-иона, где протон с карбоксильной группы перенесен на аминогруппу [2].

В зависимости от характера боковых цепей, аминокислоты подразделяются на две группы: аминокислоты с неполярными (гидрофобными) алифатическими или ароматическими R- группами и аминокислоты с полярными (гидрофильными) R- группами. К первой группе относят 8 аминокислот: аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, пролин, фенилаланин, триптофан. Семь аминокислот содержат в боковой цепи группировки, способные нести отрицательный или положительный заряд: аспарагиновая и глутаминовая кислоты при рН 7.0 заряжены отрицательно; лизин, аргинин, гистидин – основные аминокислоты, боковые цепи которых могут быть заряжены положительно; в щелочных условиях отрицательно заряженными могут быть боковые группы тирозина и цистеина [3].

2.2. Методы разделения пептидов

В настоящее время для разделения пептидов используют так называемые зональные методы разделения, суть которых заключается в том, что создается некоторая система, в которой компоненты смеси перемещаются с различными скоростями. Если в такую систему ввести разделяемую смесь в виде некоторой зоны, то по мере ее перемещения компоненты смеси, движущиеся с разными скоростями, будут формировать отдельные зоны, что позволяет получать фракции исследуемых веществ [4]. Кроме выделения, данные методы позволяют идентифицировать вещества, входящие в состав смеси, поскольку скорость перемещения каждого компонента в определенной системе разделения, при заданных внешних условиях, является физико-химической константой. В последние десятилетия электрофорез (в тонком слое и капиллярный, где разделение происходит за счет различной скорости перемещения компонентов в электрическом поле) и обращенно-фазовая ВЭЖХ (разделение осуществляется за счет различия коэффициентов распределения компонентов между подвижной и неподвижной фазами) являются основными методами разделения пептидов. Эти методы превосходят многие другие способы разделения пептидов (ионообменную (разделение по заряду), эксклюзионную (разделение по размеру) хроматографию, изоэлектрическое осаждение и др.) по разрешающей способности, эффективности разделения, скорости анализа.

К преимуществам ОФ ВЭЖХ по сравнению с методом капиллярного электрофореза можно отнести более высокую концентрационную чувствительность и воспроизводимость

результатов анализа, возможность масс-спектрометрического детектирования в режиме *on-line* [5].

2.3. Обращенно - фазовая ВЭЖХ пептидов

В настоящее время ОФ ВЭЖХ является важнейшим методом разделения пептидов. Это обусловлено тем, что данный метод характеризуется высокой скоростью разделения, воспроизводимостью результатов, селективностью и возможностью проведения препаративных разделений. Еще одним преимуществом ОФ ВЭЖХ является возможность сбора фракций в малом объеме летучих растворителей, что упрощает дальнейшее проведение масс-спектрометрического анализа. Большое разнообразие сорбентов с привитыми гидрофобными радикалами в сочетании с растворителями различной элюирующей силы позволяет изменять селективность хроматографической системы в очень широких пределах [6, 7]. Кроме того, данный метод позволяет предсказывать хроматографическое поведение пептидов [8-11].

Важно отметить, что успех разделения пептидов в ОФ ВЭЖХ во многом определяется правильным выбором неподвижной и подвижной фаз.

2.3.1. Неподвижные фазы

От правильного выбора неподвижной фазы (НФ) зависит селективность и разрешение при разделении [12]. В ВЭЖХ в качестве неподвижных неполярных фаз ("обращенных" фаз, ОФ) используются, как правило, адсорбенты, получаемые модификацией силикагеля различными производными хлорсиланов. Эти фазы не изменяют свой объем в органических растворителях и обладают высокой механической прочностью. ОФ могут отличаться друг от друга характеристиками матрицы - силикагеля и строением привитого радикала. К основным характеристикам силикагеля относятся: размер зерна (от 3 до 20 мкм), форма зерна (сферическая или неправильная), размер пор зерна (от 5 до 50 нм), удельная поверхность (от 10 до 600 м²/г). Наибольшее распространение получили следующие ОФ: С3 - (триметил- или диметилпропил-); С4-(*n*-бутил-); С6- (фенил-); С8- (*n*-октил-); С18 -(*n*-октадецил-); CN -(пропилнитрил-) и NH₂ - (-аминопропил-) [12]. При хроматографировании пептидов выбор обращенной фазы определяется размерами и гидрофобностью пептидов: для коротких, средних и гидрофильных пептидов преимущественно используют фазы С8 - С18, для крупных и гидрофобных пептидов С3 - С6. Как правило, для разделения крупных пептидов используют ОФ с размером пор 300 Å. Для небольших или гидрофильных пептидов

предпочтительнее использовать фазы с меньшим размером пор (60 – 120 Å). Диаметр частиц сорбента обычно составляет 5 мкм [13].

2.3.2. Подвижные фазы

Для оптимизации состава подвижной фазы в хроматографии пептидов основополагающее значение имеет правильный выбор рН, концентрации органического компонента и ионов-модификаторов, способных образовывать ионные пары с молекулами веществ - аналитов.

2.3.2.1. Органические растворители в составе подвижной фазы

В ОФ ВЭЖХ элюирующая сила растворителей возрастает с уменьшением их полярности. Элюотропный ряд, в котором растворители располагаются в порядке возрастания их элюирующей силы, выглядит следующим образом: вода - метанол - ацетонитрил - этанол - диоксан - тетрагидрофуран - 2-пропанол - 1-пропанол [12]. В настоящее время в ОФ хроматографии пептидов в качестве органических модификаторов наиболее часто используют ацетонитрил, метанол и 2-пропанол. Ацетонитрил, в большинстве случаев, является лучшим органическим модификатором при работе с пептидами. Он прозрачен в УФ-области до 200 нм, обладает низкой вязкостью, легколетуч, что позволяет, при необходимости, легко удалить его из собранной фракции элюата, характеризуется хорошей селективностью. При работе с гидрофобными пептидами лучше использовать менее полярный растворитель - 2-пропанол, который отличается большей элюирующей способностью по сравнению с ацетонитрилом. Хотя форма пиков и разрешение в этом случае хуже, элюирование достигается при более низких концентрациях органического модификатора, чем при введении в элюент ацетонитрила или метанола. При работе с гидрофильными пептидами часто используют более полярный, чем ацетонитрил, растворитель – метанол [12]. Концентрация органического растворителя в ОФ ВЭЖХ пептидов не превышает, как правило, 50 - 60%. Хроматографирование сложных смесей пептидов целесообразно проводить в градиентном режиме, по причине их разной полярности.

2.3.2.2. Выбор рН подвижной фазы

Рабочий диапазон рН для ОФ сорбентов на основе силикагеля составляет от 2 до 7. Это объясняется тем, что в растворах с рН больше 7 происходит растворение матрицы сорбента, а при рН ниже 2 образуются свободные силанольные группы в результате гидролитического отщепления привитых углеводородных радикалов. Для уменьшения

полярности пептидов и обеспечения их лучшего удерживания рН элюента должен находиться в диапазоне 2 - 3, т.к. при этих значениях рН карбоксильные группы боковых цепей остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот практически не диссоциируют [14,15].

2.3.2.3. Добавки–модификаторы в составе подвижной фазы

Так как разделение пептидов на ОФ проводят при рН 2 - 3, боковые цепи остатков аргинина, лизина и гистидина заряжены, поэтому пептиды, содержащие эти аминокислотные остатки, в режиме обычной ОФ ВЭЖХ будут плохо удерживаться. Для увеличения времени удерживания пептидов в состав подвижной фазы вводят ион-парные реагенты (противоионы), которые взаимодействуют с положительно заряженными боковыми группами остатков аргинина, лизина и гистидина, уменьшая при этом общую гидрофильность пептидов и увеличивая их удерживание на ОФ. В качестве ион-парных реагентов при разделении пептидов могут быть использованы отрицательно заряженные противоионы, как органические, так и неорганические, которые являются потенциально способными образовывать ионные пары с положительно заряженными группировками пептидов. Влияние каждого ион-парного реагента на удерживание различно. Авторами работы [16] были получены результаты, согласно которым время удерживания пептидов уменьшается с уменьшением гидрофобности противоиона. Следует отметить, что концентрацию ион-парных реагентов в подвижной фазе используют, как правило, низкую: 0.05 - 0.1%, что позволяет продлить "жизнь" колонки, не оказывая при этом особого влияния на ее эффективность [16].

Широкое применение в ОФ хроматографии пептидов находят алкилсульфоокислоты, являющиеся очень сильными ион-парными агентами. Их обычно используют при разделении малоудерживаемых пептидов, содержащих большое количество остатков аргинина, лизина и гистидина. К недостаткам этих ион-парных реагентов можно отнести их ограниченную растворимость в воде, низкую скорость установления равновесия с неподвижной фазой, невозможность использования градиентного элюирования. Кроме того, алкилсульфоокислоты склонны к образованию мицелл, что приводит к изменению механизма хроматографического процесса [7].

Ион-парным реагентом, позволяющим максимально реализовать возможности метода ОФ ВЭЖХ, является перхлорат лития. Перхлорат лития хорошо растворим в воде и в органических растворителях, "прозрачен" в УФ-области спектра, обладает хаотропными свойствами, что позволяет увеличить растворимость в воде и получить более узкие и симметричные пики пептидов, содержащих основные функциональные

группы. Высокая растворимость перхлората лития позволяет применять подвижные фазы с содержанием органического модификатора от 0 до 100 %. Существенным недостатком перхлората лития является его нелетучесть и, как следствие, несовместимость перхлорат-содержащих ПФ с масс - спектрометрическим детектором в режиме *on line* [17].

Применение фосфатных буферов позволяет получить хроматограммы смесей пептидов с хорошо разрешенными узкими пиками. Фосфатные буферы УФ-"прозрачны". Существенным недостатком является их нелетучесть.

Муравьиная кислота обеспечивает хорошее разделение, но ее применение ограничено сильным поглощением в УФ-области [12].

Наибольшее распространение в ОФ ВЭЖХ пептидов получили ПФ, содержащие трифторуксусную кислоту (ТФУ). Она легко удаляется из элюатов упариванием, хорошо растворяет пептиды, УФ-прозрачна в области коротких длин волн, что является большим преимуществом при хроматографировании сложных смесей [18].

2.4. Методы детектирования пептидов в ОФ ВЭЖХ

Детекторы для ВЭЖХ могут быть двух видов: регистрирующие общую характеристику подвижной фазы, например показатель преломления или электропроводность (в этом случае детектируемое вещество измеряется косвенно по изменению характеристики подвижной фазы); регистрирующие характеристику самого детектируемого вещества, например его УФ-поглощение, флуоресценцию. Детекторы, используемые в ВЭЖХ, должны обладать высокой чувствительностью, достаточным быстродействием, иметь широкий линейный динамический диапазон, позволять получать как качественную, так и количественную информацию о составе пробы, а также обладать стабильностью работы [19].

2.4.1. Детектирование по УФ-поглощению

ОФ ВЭЖХ с УФ детектированием является наиболее распространенным методом анализа пептидов. Это объясняется тем, что УФ-фотометрический детектор обладает достаточно высокой чувствительностью, относительно прост в аппаратном оформлении, доступен для большинства лабораторий. На сегодняшний день существует четыре основных вида УФ-детекторов:

1. УФ-детекторы с фиксированной длиной волны, которую выбирают с помощью специальных светофильтров;
2. УФ-детекторы с монохроматором, который позволяет устанавливать любую длину волны в своем диапазоне;

3. спектрофотометры с быстро автоматически перестраиваемым монохроматором, который позволяет осуществлять многоволновую (многоканальную) детекцию;
4. диодно-матричные детекторы (ДМД), позволяющие получать полную спектральную информацию в заданном диапазоне.

В отличие от детекторов 3-го типа, для ДМД характерен более высокий уровень флуктуационных шумов и значительный дрейф нулевой линии.

Среди многоканальных детекторов особо можно отметить прецизионный детектор хроматографов серии "Милихром", который обладает высокими метрологическими характеристиками [20]. Спектрофотометрический детектор хроматографа "Милихром А-02" позволяет регистрировать поглощение элюата одновременно на нескольких длинах волн и получать спектральную информацию в процессе анализа, что существенно повышает надежность идентификации пептидов.

УФ-спектр пептида в области 200 - 300 нм, складывается из поглощения пептидных связей, ароматических аминокислотных остатков и остатков метионина и аргинина. Поэтому поглощение пептида будет тем выше, чем больше УФ-поглощающих аминокислотных остатков он содержит.

При использовании УФ-детектора следует уделять особое внимание выбору растворителей. Они должны быть "прозрачны" в широкой области УФ-спектра и достаточно очищены, т.к. содержащиеся в них примеси могут поглощать в УФ-области, что приведет, при работе в градиентном режиме, к появлению "системных" пиков на хроматограмме и существенно затруднит идентификацию пептидов. Растворители, используемые в ОФ ВЭЖХ, имеют собственное поглощение при длинах волн короче 210 нм, что делает невозможным детектирование в более коротковолновой области и приводит к уменьшению чувствительности данного метода детекции пептидов, т.к. максимум поглощения пептидной связи наблюдается при 190 нм [21].

Чувствительность метода можно повысить, проводя предколоночную дериватизацию, т.е. вводя в молекулу пептида дополнительные хромофоры [22]. Следует отметить, что проведение предколоночной дериватизации значительно усложняет процедуру проведения хроматографического анализа, так как необходимо провести химическую реакцию со степенью превращения близкой к 100%, что требует тщательного предварительного изучения особенностей химического поведения реагентов и выбора оптимальных условий реакции. Кроме того, дериватизация усложняет процесс хроматографического разделения, так как в процессе реакции могут образовываться

изомеры, что приведет к тому, что компонент будет элюироваться несколькими отдельными пиками [12].

Следует отметить, что спектрофотометрическое детектирование является неразрушающим методом анализа, что очень важно при работе с биохимическими объектами.

2.4.2. Масс - спектрометрическое детектирование пептидов

Масс-спектрометрия в настоящее время является одним из наиболее информативных методов анализа пептидов. Данный метод детекции обладает очень высокой чувствительностью.

Так как пептиды являются термолабильными веществами, то для их ионизации используют наиболее мягкие способы: ионизацию электрораспылением (Electrospray Ionization, ESI) и ионизацию лазерной десорбцией в присутствии матрицы (Matrix - Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) [12,23].

К недостаткам этого метода следует отнести трудности, возникающие при вводе хроматографически выделенной пробы в ионный источник масс-анализатора. При этом предварительно необходимо удалить растворитель, что, в свою очередь, налагает ограничения на состав подвижной фазы. Кроме того, данный метод детекции является одним из самых дорогих.

2.5. Предсказание объемов удерживания и УФ-спектров пептидов в ОФ ВЭЖХ

Выше было отмечено, что метод ОФ ВЭЖХ позволяет предсказывать хроматографическое поведение пептидов. Идею о том, что хроматографическое поведение пептидов, содержащих менее 25 аминокислотных остатков, можно предсказать, зная их аминокислотный состав, впервые высказал Дж. Мик (J.Meek) [8]. Удерживание пептидов на обращенной фазе определяется гидрофобностью аминокислотных остатков, входящих в их состав. Аминокислоты с ароматической или большой алифатической цепью вносят основной вклад в удерживание. Исходя из вышесказанного, Мик предложил рассчитывать объемы удерживания пептидов на обращенной фазе как сумму вкладов остатков аминокислот, входящих в состав пептида. Им была предложена линейная (аддитивная) модель "состав-удерживание":

$$V_R = \sum Z_i + Z_{(N)} + Z_{(C)} + V_0, \quad (1)$$

где V_R – объем удерживания пептида; V_0 - свободный объем колонки; $Z_{(N)}$, $Z_{(C)}$ - вклады концевых групп (-NH₂ и COOH соответственно) пептида; Z_i - вклад i -той аминокислоты (константа удерживания).

Мик проводил хроматографирование 25 пептидов в условиях градиентной ОФ ВЭЖХ и, решая обратную задачу, вычислял константы удерживания аминокислот. Коэффициенты корреляции зависимости $V_R(\text{выч.}) = f(V_R(\text{эксп.}))$ составили 0.997 (при pH 2.1) и 0.999 (при pH 7.4). Несмотря на высокие коэффициенты корреляции, данная модель не имеет физического смысла, поскольку полученные таким образом константы удерживания аминокислот не отражают реальных различий в их гидрофобности и некоторые из вкладов даже имеют отрицательные значения. Кроме того, известно множество фактов, согласно которым с ростом числа аминокислотных остатков в пептиде поверхность его гидрофобного контакта с обращенной фазой, определяющая удерживание, увеличивается нелинейно.

Авторами работы [9] также было принято допущение, согласно которому объемы удерживания пептидов рассчитываются из суммы вкладов аминокислотных остатков. Для расчета объемов удерживания пептидов ими была предложена следующая модель:

$$V_R = A \cdot \ln (1 + \sum Z_i \cdot n_i) + B, \quad (2)$$

где Z_i - эмпирический параметр удерживания, который рассчитывали исходя из величин гидрофобности аминокислот; A и B константы для рассматриваемой хроматографической системы; n_i - число аминокислотных остатков i в пептиде.

Эта модель дает хорошую корреляцию между расчетными и экспериментальными объемами удерживания пептидов. Недостаток модели заключается в том, что она справедлива лишь для конкретной хроматографической системы (линейный градиент состава ПФ с заданной крутизной, фиксированная скорость потока, неподвижная фаза). Таким образом, применение этой модели весьма ограничено. Поэтому авторами рассматриваемой работы позднее была предложена другая модель, основанная на теории градиентной элюции, которая позволяет рассчитывать объемы удерживания пептидов для более широкого круга хроматографических систем. Приняв допущение, согласно которому доступная площадь гидрофобного контакта пептида с неподвижной фазой изменяется пропорционально его молекулярной массе в степени 2/3, авторы подобрали функцию для расчета объемов удерживания пептидов:

$$V_R = f(a \cdot \sum (Z_i \cdot n_i)^{2/3} + b / \sum (Z_i \cdot n_i) + c), \quad (3)$$

где a , b , c - константы, зависящие от свойств конкретной хроматографической системы, определялись экспериментально из данных по хроматографированию 15 выбранных для этой цели пептидов. Коэффициент корреляции зависимости $V_R(\text{выч.})=f(V_R(\text{эксп.}))$ составил 0.98.

Одним из недостатков цитируемой работы является, как и в работе [8], способ нахождения коэффициентов удерживания структурных элементов пептидов. Их определяли путем пересчета коэффициентов распределения аминокислот в системе "н-октанол – вода", что может лишь качественно описывать удерживание пептида на обращенной фазе, никак не отражая способность аминокислот образовывать ионные пары с анионами и катионами, входящими в состав подвижной фазы, не учитывают изменение степени диссоциации ионогенных групп аминокислот при увеличении концентрации органического растворителя в процессе градиентного элюирования. Кроме того, для расчета объемов удерживания, необходимо проводить вычисление констант a , b и c для конкретной хроматографической системы из предварительных экспериментов с модельными пептидами, что является весьма трудоемкой процедурой и ограничивает применение данного метода на практике.

В работе [24] вычисляли объемы удерживания и УФ-спектры пептидов с известной аминокислотной последовательностью, предварительно определив вклады аминокислот в вышеуказанные параметры. Величины этих вкладов находили экспериментально из хроматограмм растворов индивидуальных аминокислот, полученных при многоволновом фотометрическом детектировании в тех же условиях, в которых хроматографировались пептиды. Авторы работы предложили следующее уравнение для вычисления объемов удерживания пептидов:

$$V_R = 209 \cdot [\sum(Z_i) + Z_{(N+C)} + V_0]^{1/3} - 990, \quad (4)$$

где Z_i – коэффициент удерживания аминокислоты "i"; V_0 – свободный объем колонки; $Z_{(N+C)}$ – суммарная константа удерживания концевых групп пептида.

При вычислении УФ-спектров рассматривали спектр пептида как сумму спектров всех его структурных элементов.

Для проверки предложенного метода были хроматографированы 30 пептидов, и коэффициент корреляции между вычисленными и экспериментально найденными объемами удерживания составил 0.95. Предложенный в работе способ вычисления УФ-спектров пептидов также обладает удовлетворительной предсказательной силой.

В рассматриваемой работе в качестве элюентов использовали ацетонитрил, водный раствор перхлората лития и хлорной кислоты [0.2M LiClO₄ – 0.005M HClO₄]. Поскольку в

состав ПФ входит нелетучий компонент, это делает последующую прямую масс-спектрометрическую идентификацию пептидов весьма затруднительной. Кроме того, очевидным недостатком данного метода расчета объемов удерживания пептидов является возможность применения его лишь для градиента концентрации ацетонитрила определенной формы.

В работе Яндеры и Хурачека [25] описан метод, позволяющий для низкомолекулярного вещества предсказывать его объем удерживания в режиме градиентной хроматографии, получив в изократическом режиме зависимость объема удерживания вещества от концентрации более сильного элюента в подвижной фазе. Нам показалось целесообразным применить основы этого подхода для разработки метода расчета объемов удерживания линейных пептидов в градиентной ОФ ВЭЖХ, удовлетворяющего следующим требованиям:

1. ПФ должна содержать только летучие компоненты, что позволяет осуществлять прямой ввод выделенных фракций элюата в масс-спектрометр;
2. Метод должен позволять рассчитывать объемы удерживания пептидов для градиента концентрации органического растворителя в ПФ $C=C(I)$ произвольной формы.

4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Материалы

Для приготовления подвижных фаз для ОФ ВЭЖХ использовали ацетонитрил "Для ВЭЖХ, сорт 1", $A_{200}=0.02$ е.о.п. (НПК "Криохром", г. С.-Петербург); безводную трифторуксусную кислоту ("ICN Biomedicals", США). Дистиллированную воду дополнительно очищали методом твердофазной экстракции с использованием картриджей на основе октадецилсиликагеля "Bakerbond spe", № 7020-07 ("J.T. Baker Inc.", США).

Раствор для тестирования хроматографической системы (ЗАО "ЭкоНова", г. Новосибирск) имел следующий состав: бромид калия, уридин, кофеин, *m*-нитроанилин, *o*-нитроанилин. Все реактивы с массовой долей основного вещества не менее 98%.

Для исследования характеристик хроматографической системы (V_0 и V_e) использовали бромид калия "хч", нитрит натрия "хч", нитрат калия "хч"; уридин "хч".

В работе использовали аминокислоты с массовой долей основного вещества 99 % ("Serva", Германия) и образцы пептидов, которые были любезно предоставлены В.В. Самуковым (НПО "Вектор", г. Новосибирск), И.В. Назимовым (ИБХ РАН, г. Москва) и И.Ю. Нагаевым (ИМГ РАН, г. Москва).

3.2. Оборудование

ВЭЖХ проводили на хроматографе жидкостном микроколоночном "Милихром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", г. Новосибирск); колонка Ø2x75 мм с ОФ сорбентом ProntoSIL-120-5-C₁₈ AQ ("Bischoff Analysentechnik und Geräte GmbH", Германия). Эффективность колонки составляла не менее 5000 т.т.. Использовали весы аналитические электронные "Adventurer" ("Ohaus", Швейцария), допускаемая погрешность взвешивания ±0.2 мг; рН-метр "Анион-4100" (НПП "Инфраспек-Аналит", г. Новосибирск), допускаемая погрешность при измерении $pH \pm 0.03$; пипетка переменного объема 20÷200 мкл со сменными наконечниками "Ленпипет Колор" (100 мкл±1.5%) (ЗАО "ТермоЛабсистемс", г. С.-Петербург); колбы мерные (50 мл±0.1%, 100 мл±0.1%); стеклянные пробирки; устройство для сбора фракций элюата (ЗАО "ЭкоНова", г. Новосибирск).

3.3. Методы

3.3.1. Оценка погрешности приготовления растворов

При приготовлении растворов массовую (C_m) и молярную (C_M) концентрации вещества определяли соответственно по формулам:

$$C_m = \varpi \cdot m/V, \quad C_M = \varpi \cdot m/V \cdot Mr,$$

где ϖ - массовая доля основного вещества в препарате; m - масса препарата (г), V - объем раствора (мл), Mr – молярная масса вещества.

Погрешность приготовления контрольного раствора определяется погрешностью, обусловленной наличием примесей в препарате, погрешностью взвешивания, погрешностью используемой мерной посуды. Относительную погрешность определения массы вещества δ_m определяли по формуле:

$$\delta_m = \pm \Delta_m/m,$$

где Δ_m - допускаемая погрешность взвешивания (мг).

Допускаемая погрешность взвешивания для двух измерений $\Delta_m^{взвеш.}$ (пустого стаканчика и стаканчика с навеской):

$$\Delta_m^{взвеш.} = \sqrt{\Delta_{m1}^2 + \Delta_{m2}^2},$$

Относительная погрешность используемой мерной посуды δ_V :

$$\delta_V = \pm \Delta_V/V,$$

где Δ_V - допускаемая погрешность от номинальной вместимости мерной посуды (мл), V - объем используемого раствора (мл).

Относительная погрешность определения массовой доли основного вещества δ_ϖ в образце:

$$\delta_\varpi = \pm \Delta_\varpi/\varpi,$$

где Δ_ϖ - допускаемая погрешность содержания примесей в основном веществе (%).

Погрешность приготовления растворов δ_C (%):

$$\delta_C = \pm 100 \cdot \sqrt{\delta_m^2 + \delta_V^2 + \delta_\varpi^2}$$

3.3.2. Приготовление растворов

Раствор ТФУ (0.1 %): 100 мкл безводной трифторуксусной кислоты растворяли в 100 мл воды. После приготовления контролировали pH раствора; он составил 1.98 ± 0.03

Растворы фенилаланина, триптофана, тирозина, гистидина, метионина, цистеина в 0.1% ТФУ готовили с концентрацией 0.2 мг/мл. Растворы остальных аминокислот с концентрацией 1 мг/мл.

Растворы пептидов в 0.1 % ТФУ готовили с концентрацией от 0.1 до 2.0 мг/мл. Раствор для контроля стабильности работы хроматографической системы готовили следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл вносили по 25 мг *o*- и *m*-нитроанилинов, добавляли 5 мл ацетонитрила и перемешивали. Доводили раствор до метки дистиллированной водой. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносили точные навески: калия бромистого 20 мг, уридина 20 мг, кофеина 100 мг. Добавляли около 50 мл дистиллированной воды, нагревали до (35-40) °С и перемешивали до полного растворения. Раствор охлаждали до комнатной температуры, добавляли 10 мл раствора *o*- и *m*-нитроанилинов и доводили объем до метки дистиллированной водой. Раствор фильтровали через мембранный фильтр пористостью 0.45 мкм.

3.3.3. Контроль стабильности работы хроматографической системы

Контроль стабильности работы хроматографической системы проводили с использованием процедуры, регламентированной методикой [26]. Хроматографировали тестовый раствор, и из полученных хроматограмм вычисляли 14 параметров, каждый из которых контролирует определенный показатель хроматографической системы: V_R бромид-иона – свободный объем колонки; спектральное отношение S_{280}/S_{250} уридина – точность настройки детектора в диапазоне от 250 до 280 нм; спектральное отношение S_{260}/S_{280} кофеина – линейный диапазон детектора; спектральное отношение S_{260}/S_{230} *m*-нитроанилина – pH элюента А. По пику *o*-нитроанилина контролировали: V_R – отклонение градиента от заданной формы; спектральные отношения – точность настройки детектора в диапазоне от 210 до 300 нм; асимметрия пика $A_{10\%}$ – нарушения в упаковке колонки; S_{210} – точность дозирования образца; $\omega_{1/2}$ (ширины пика *o*-нитроанилина на полувысоте) – эффективность колонки. Периодическое измерение хроматографических и спектральных параметров тестового раствора позволило нам убедиться в высокой воспроизводимости работы используемой хроматографической системы. Результаты тестирования приведены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты тестирования хроматографической системы (n = 10, P=0.95)

Вещество	Параметр	Среднее значение параметра	s _R (%)
Бромид	V_R , мкл	150	0.5
Уридин	S_{280}/S_{250}	0.55	1.6
Кофеин	S_{260}/S_{280}	0.72	0.8
м-Нитроанилин	S_{260}/S_{230}	0.79	0.8
о-Нитроанилин	V_R , мкл	1489	0.2
	S_{220}/S_{210}	1.71	0.7
	S_{230}/S_{210}	1.76	0.7
	S_{240}/S_{210}	1.11	0.7
	S_{260}/S_{210}	0.58	0.9
	S_{250}/S_{210}	0.40	1.4
	S_{280}/S_{210}	0.59	0.8
	S_{300}/S_{210}	0.32	1.5
	$A_{10\%}$	1.05	0.0
	S_{210} , е.о.п.·мкл	25	2.3
$\omega_{1/2}$, мкл	23	1	

3.3.4. Проверка настройки монохроматора

Для проверки правильности установки длины волны и настройки монохроматора записывали спектр полистирольной пленки. Рабочую кювету заменили имитатором кюветы с пленкой из полистирола. Последовательно записывали спектр нулевой линии и спектр полистирола, меняя положение рычага. Далее сравнивали спектральное отношение полистирола A_{260}/A_{262} , полученное на данном хроматографе (серийный № 140) со спектральным отношением полистирола A_{260}/A_{262} , полученным на эталонном приборе (серийный № 109). Сравнение спектральных отношений полистирола приведено в таблице 2.

Таблица 2. Сравнение спектральных отношений полистирола (n = 5, P=0.95).

Номер прибора	S_{260}/S_{262}	s _r (%)
109	0.995	0.0
140	0.994	0.0

Исходя из полученных данных, мы сделали вывод, что монохроматор хроматографа №140 настроен в соответствии с руководством по эксплуатации [27].

3.3.5. Хроматографические методы

ВЭЖХ анализ аминокислот проводили в следующих условиях:

Изократический режим:

элюент А: (2, 5, 8, 10, 15, 20, 25) % ацетонитрила в 0.1 % водной трифторуксусной кислоте;

элюент Б: (2, 5, 8, 10, 15, 20, 25) % ацетонитрила в 0.1 % водной трифторуксусной кислоте;

элюирование: 50% "Б";

скорость потока: 100 мкл/мин;

температура колонки: 40°C;

детекция: при 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм, $\tau = 0,18$ с;

объем пробы: 4 мкл.

ВЭЖХ-анализ аминокислот и пептидов в градиентном режиме проводили в следующих условиях:

элюент А: 0.1 % трифторуксусная кислота в воде;

элюент Б: ацетонитрил;

линейные градиенты: 4000 мкл от 5 до 100% Б (G1); 3200 мкл от 5 до 50 % Б (G2);

1600 мкл от 5 до 25 % Б, от 25 % до 50 % Б до 2200 мкл, 50 % Б до 3200 мкл (G3); 1500 мкл от 5 до 100% Б (G4);

скорость потока: 100 мкл/мин;

температура колонки: 40°C;

детекция: при 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм, $\tau = 0.18$ с;

объем пробы: 4 мкл.

Число параллельных измерений составило не менее 2, для каждой аминокислоты и пептида. Различие в экспериментально полученных объемах удерживания вещества i было не более нескольких мкл.

Препаративную хроматографию проводили в следующих условиях:

Градиентный режим:

элюент А: 0.1 % трифторуксусная кислота в воде;

элюент Б: ацетонитрил;

линейный градиент: 40 мин от 5 до 100% Б;

скорость потока: 100 мкл/мин;

температура колонки: 40°C;

детекция: при 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм, $\tau = 0,18$ с;

объем пробы: 4 мкл.

Объем задержки начала градиента определяли в следующих условиях:

режим псевдохроматографии: колонка заменена на капилляр ($d = 0.5$ мм, $l = 140$ мм), рабочее давление 3 МПа обеспечивали с помощью хроматографической колонки $\varnothing 2 \times 75$ мм, заполненной сорбентом с размером частиц 5 мкм, подключенной к выходному отверстию кюветы детектора;

элюент А: 0.4 мМ раствор уридина в воде;

элюент Б: ацетонитрил;

линейные градиенты: 500 мкл от 5 до 100% Б; 1000 мкл от 5 до 100% Б; 2000 мкл от 5 до 100% Б; 3000 мкл от 5 до 100% Б; 4000 мкл от 5 до 100% Б; 3200 мкл от 5 до 50% Б; 1000 мкл от 0 до 100% Б;

скорость потока: 50, 100, 200 мкл/мин;

температура: комнатная;

детекция: при 260 и 300 нм, $\tau = 0.34$ с.

Определение свободного объема колонки проводили в следующих условиях:

изократический режим (50% "Б");

элюент А: 5 % ацетонитрила в 0.1 % водной трифторуксусной кислоте;

элюент Б: 5 % ацетонитрила в 0.1 % водной трифторуксусной кислоте;

скорость потока: 100 мкл/мин;

температура колонки: 40°C;

детекция: при 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм, $\tau = 0.18$ с;

объем пробы: 4 мкл.

3.3.6. Методы обработки данных

Обработку хроматограмм проводили с помощью программы "Мультихром" (ЗАО "Амперсенд", г. Москва). Для вычисления V_R , площадей хроматографических пиков пептидов при детектировании на 8 длинах волн (S_λ) и графического представления хроматограмм пептидов в условиях фиксированного градиента концентрации ацетонитрила использовали программу "ХРОМ-П" (ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", г. Новосибирск). Расчет объемов удерживания аминокислот и пептидов для градиентов произвольной формы проводили с помощью программы "Mathcad, ver. 11.a" ("Mathsoft Engineering & Education, Inc"). Линеаризацию кривой, приведенной на рисунке 1, проводили с помощью программы "Microsoft Excel" ("Microsoft Corporation", 1985-2001).

Оценку метрологических характеристик используемого хроматографического метода выполняли согласно [28].

3.3.7. Масс-спектрометрические методы

Подготовка образцов пептидов для масс-спектрометрии проводилась следующим образом: на мишени смешивали по 0.5 мкл раствора образца в 0.1 % ТФУ и раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты ("Aldrich", США; 10 мг/мл в смеси [0.5 % ТФУ в воде : ацетонитрил] = (80:20), и полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на тандемном MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре "Ultraflex II BRUKER" (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd). Масс-спектры получены в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных масс составила 0.02 %. Точность измерения масс фрагментов составила 1 Да.

Анализ был выполнен М.В. Серебряковой (НИИ физико-химической медицины РАМН, г. Москва).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Вычисление объемов удерживания пептидов известного аминокислотного состава для градиента концентрации ацетонитрила фиксированной формы

Метод предсказания объемов удерживания пептидов известного аминокислотного состава для градиента фиксированной формы, предлагаемый нами, базируется на следующем основном допущении: объем удерживания пептида равен сумме коэффициентов удерживания его структурных элементов.

Согласно формуле (1), для предсказания объемов удерживания пептидов необходимо определить свободный объем колонки (V_0) и коэффициенты удерживания аминокислотных остатков и концевых групп.

4.1.1. Определение свободного объема колонки

Свободный объем колонки (V_0) – это часть объема колонки, не занятая сорбентом (объем пустот) [29]. Как правило, свободный объем колонки определяют, используя несорбируемое вещество, так называемый маркер свободного объема. В этом случае V_0 будет равен объему элюента, вытекшему из колонки за время пребывания в ней несорбируемого вещества.

В качестве маркеров свободного объема наиболее часто используют бромид-, нитрат-, и нитрит-ионы [30]. Эти вещества не удерживаются на ОФ и поглощают в области УФ-спектра. Определение свободного объема колонки проводили в условиях, указанных в разделе 3. Результаты эксперимента приведены в таблице 3.

Таблица 3. Определение свободного объема колонки ($n = 5$, $P=0.95$).

Маркер свободного объема	V_0 (ср.знач.), мкл	s_r (%)
Br^-	147	0.3
NO_2^-	149	0.0
NO_3^-	150	0.3

Полученные для разных веществ-маркеров значения свободного объема колонки отличаются незначительно.

Во всех дальнейших вычислениях мы принимали $V_0 = 150$ мкл.

4.1.2. Вычисление коэффициентов удерживания структурных элементов пептидов

Исходные хроматографические данные, необходимые для вычисления вкладов (коэффициентов удерживания) аминокислот, получали из хроматограмм этих аминокислот в условиях (градиента концентрации ацетонитрила в ПФ фиксированной формы G1), указанных в разделе 3. Коэффициенты удерживания остатков аминокислот вычисляли по уравнению:

$$Z_i = V_{Ri} - V_0 - Z_{(N+C)}, \quad (5)$$

где V_{Ri} – объем удерживания аминокислоты "i"; V_0 – свободный объем колонки; $Z_{(N+C)}$ – суммарная константа удерживания концевых групп пептида.

$Z_{(N+C)}$ вычисляли по уравнению:

$$Z_{(N+C)} = V_R(G) - [V_R(GGG) - V_R(GG)] - V_0, \quad (6)$$

где $V_R(G)$ – объем удерживания глицина, мкл; $V_R(GG)$ и $V_R(GGG)$ объемы удерживания пептидов GG и GGG.

В используемых нами хроматографических условиях $V_R(GG) = V_R(GGG)$, поэтому уравнение (6) преобразуется к следующему виду:

$$Z_{(N+C)} = V_R(G) - V_0 \quad (7)$$

Сумму коэффициентов удерживания концевых групп $[(-NH_2) + (-CONH_2)]$, присутствующих в некоторых пептидах, считали равной сумме коэффициентов удерживания групп $[(-NH_2) + (-COOH)]$. В нашей хроматографической системе, суммарный вклад концевых групп в удерживание пептида составил 23 мкл.

Хроматографические данные и вычисленные константы удерживания структурных элементов пептидов приведены в таблице 4.

Таблица 4. Объемы удерживания аминокислот. Константы удерживания структурных элементов пептидов.

Аминокисл. остаток	V_R , мкл	Z_i , мкл	Аминокисл. остаток	V_R , мкл	Z_i , мкл
N	169	0	A	184	11
S	172	0	R	190	17
G	173	0	P	197	24
Q	173	0	V	291	118
D	174	1	M	331	158
H	181	8	Y	578	405
T	181	8	I	586	413
E	183	10	L	622	449
K	183	10	F	753	580
C	183	10	W	917	744

4.1.3. Линейная модель "состав – удерживание"

Для проверки предсказательной силы линейной модели [8], мы вычислили и определили экспериментально объемы удерживания 35 пептидов, структуры которых приведены в таблице 5. Подлинность пептидов была подтверждена масс-спектрометрически в условиях, указанных в разделе 3. В качестве примера, масс-спектры некоторых пептидов приведены в Приложении 2.

Пептиды хроматографировали в тех же условиях, что и аминокислоты (раздел 3, градиент G1).

Расчетные и экспериментально полученные объемы удерживания 35 пептидов приведены в таблице 5. Сравнение экспериментально найденных и вычисленных объемов удерживания пептидов показано на рисунке 1.

Как видно из полученных данных, линейная модель дает удовлетворительные результаты лишь для относительно гидрофильных пептидов; для гидрофобных пептидов вычисленные значения оказываются заметно выше экспериментальных, что может быть связано, в частности, с нелинейным увеличением площади гидрофобного контакта с ростом молекулярной массы пептида. Подобные результаты были получены в работе [24].

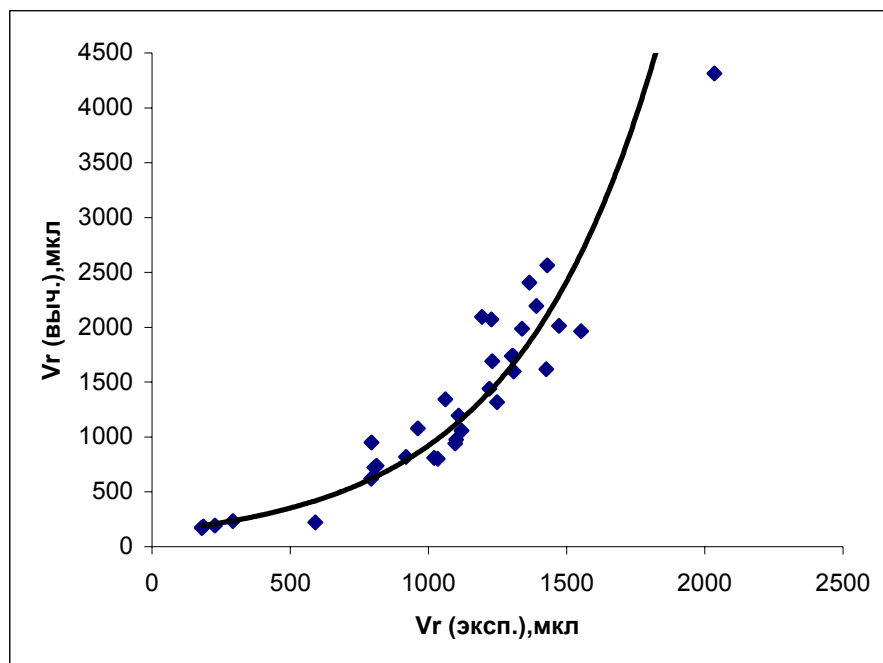


Рис. 1. Сравнение экспериментально найденных и вычисленных объемов удерживания пептидов. Вычисление значений V_R проводили по уравнению (1).

4.1.4. Нелинейная модель "состав – удерживание"

Линеаризация кривой, приведенной на рисунке 1, дает уравнение:

$$V_R = 173 \cdot [\sum(Z_i) + Z_{(N+C)} + V_0]^{1/3} - 785 \quad (8)$$

Сравнение вычисленных по уравнению (8) и найденных экспериментально объемов удерживания для 35 пептидов показано в таблице 5 и на рисунке 2. Коэффициент корреляции зависимости $V_R(\text{выч.}) = f(V_R(\text{эксп.}))$ составил 0.96.

Из полученных данных видно, что описываемый метод вычисления объемов удерживания пептидов известного состава в условиях градиентной ОФ ВЭЖХ обладает удовлетворительной предсказательной силой (позволяет предсказывать объемы удерживания пептидов с точностью ± 200 мкл) и может быть полезен при проведении исследований, связанных с разделением смесей пептидов. Предложенный алгоритм нахождения констант удерживания структурных элементов пептидов позволяет определять эти параметры и для других подобных хроматографических систем. Аналогичным образом могут быть получены константы удерживания и для химических производных аминокислот.

Таблица 5. Экспериментально найденные и вычисленные объемы удерживания пептидов

Пептид		V_R , мкл		
		Эксперимент	Вычислено	
№	Структура			Лин. модель
1	GG	180	173	180
2	GGG	180	173	180
3	AS	186	184	200
4	GRGDS	228	191	212
5	TKPR	292	232	279
6	PGP	591	221	262
7	GL	793	622	693
8	WAGGDASGE	794	950	917
9	RKDVI	804	724	770
10	MY	812	736	779
11	EHFPGP	919	819	835
12	KPVGKKRRPVKVYP	962	1078	991
13	HFPGP	1020	809	829
14	FPGP	1033	801	823
15	WYGGDASGE	1061	1344	1126
16	WAGGDA	1097	940	911
17	MEHFPGP	1100	977	933
18	NCMLDY	1109	1196	1053
19	WVGGDASGE	1120	1057	979
20	SYSMEHFRWG	1194	2095	1431
21	RPPGFSPFR	1220	1439	1170
22	YGGFLRKYPK	1227	2073	1423
23	MEHFRWG	1231	1690	1278
24	YGGFM	1248	1316	1113
25	RVYIHPF	1301	1738	1297
26	DRVYIHPF	1306	1739	1297
27	YAFGYPS-NH ₂	1308	1598	1240
28	QATVGDINTERPGMLDFTGK	1338	1989	1393
29	ELYENKPRRPYIL	1365	2406	1535
30	DRVYIHPFHL	1391	2196	1466
31	YAGFL	1426	1618	1248
32	YGGFLRRIRPKLK	1430	2565	1585
33	RPKPQQFFGLM-NH ₂	1472	2015	1402
34	PQQFFGLM-NH ₂	1552	1964	1384
35	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	2034	4314	2034

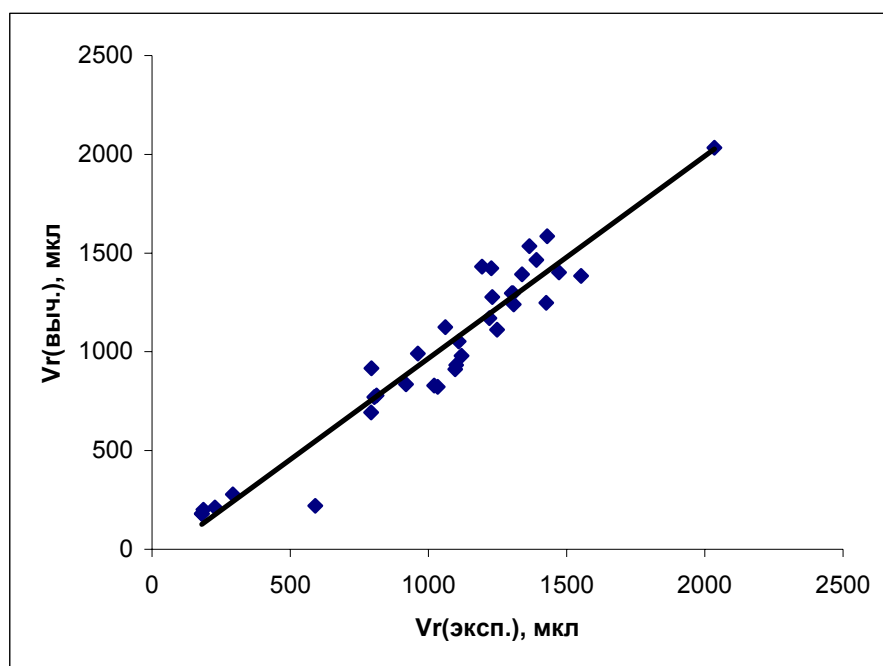


Рис. 2. Сравнение экспериментально найденных и вычисленных объемов удерживания пептидов. Вычисление значений V_R проводили по уравнению (8).

На рисунке 3 приведены экспериментальная и вычисленная хроматограммы модельной смеси 11 пептидов.

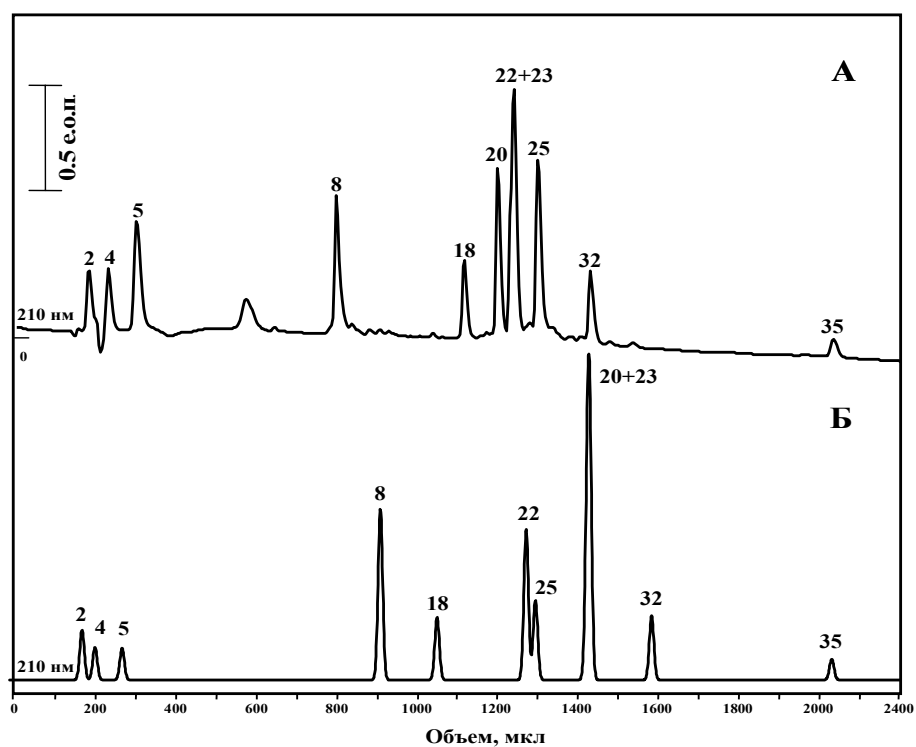


Рис. 3. Экспериментальная (А) и вычисленная (Б) хроматограммы смеси 11 пептидов. Номера пептидов в соответствии с таблицей 5.

Существенным недостатком, ограничивающим применимость на практике данного метода расчета объемов удерживания пептидов, является его связь с конкретными условиями хроматографического разделения, в частности с формой задаваемого градиента. Поэтому в развитие этого метода был разработан метод вычисления V_R линейных пептидов в градиентной ОФ ВЭЖХ для градиентов концентрации ацетонитрила произвольной формы.

4.2. Метод предсказания объемов удерживания линейных пептидов для градиентов произвольной формы

При дальнейшей разработке метода предсказания объемов удерживания линейных пептидов мы исходили из следующих допущений:

- удерживание пептида определяется только набором входящих в его состав аминокислот, независимо от их взаимного расположения;
- пептид может удерживаться в неподвижной фазе множеством способов: любым частичным набором его аминокислот, включая его удерживание хотя бы даже одной аминокислотой. Поскольку описать такой механизм адсорбции очень сложно, то, абстрагируясь от механизма удерживания, мы рассматриваем только процесс передвижения пептида по колонке (вероятность нахождения пептида в ПФ);
- количество аминокислотных остатков в пептиде не превышает 20-25;
- остатки аминокислот могут свободно вращаться вокруг полипептидной цепи и не взаимодействуют друг с другом;
- фактор удерживания i -той аминокислоты определяется эмпирическим уравнением $k'_i = k'_{0(i)} \cdot 10^{-u_i \cdot C}$ [25], где константы $k'_{0(i)}$ и u_i находятся экспериментально.

Предложенный нами метод расчета объемов удерживания пептидов базируется на основных положениях теории жидкостной хроматографии.

В хроматографии для описания удерживания вещества принято оперировать понятием коэффициента емкости (k'). В условиях изократического элюирования коэффициент емкости может быть вычислен по формуле (9):

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad (9)$$

Уравнение (9) может быть записано в следующей форме:

$$V_0 = \frac{V_R}{1 + k'} \quad (10)$$

Коэффициент емкости k' связан с константой распределения K через фазовое отношение колонки:

$$k' = K \cdot \beta \quad (11)$$

Константа распределения - это отношение концентрации вещества C в неподвижной (НФ) и подвижной (ПФ) фазах:

$$K = \frac{C_{НФ}}{C_{ПФ}} \quad (12)$$

Фазовое отношение определяют как отношение объема НФ в колонке $V_{НФ}$ к объему подвижной фазы $V_{ПФ}$:

$$\beta = \frac{V_{НФ}}{V_{ПФ}} \quad (13)$$

Таким образом коэффициент емкости можно также определить как отношение количества вещества в НФ ($Q_{НФ}$) к количеству вещества в ПФ ($Q_{ПФ}$). Так как вещество может находиться либо в ПФ, либо в НФ, то k' также равен отношению вероятности нахождения молекулы вещества в НФ ($P_{НФ}$) к вероятности нахождения вещества в ПФ ($P_{ПФ}$):

$$k' = \frac{Q_{НФ}}{Q_{ПФ}} = \frac{P_{НФ}}{P_{ПФ}} \quad (14)$$

Очевидно, что сумма вероятностей нахождения вещества в подвижной и неподвижной фазах равна единице:

$$P_{НФ} + P_{ПФ} = 1 \quad (15)$$

Объединяя уравнения (14) и (15) получаем:

$$P_{ПФ} = \frac{1}{1 + k'} \quad (16)$$

Таким образом, в случае изократического элюирования уравнение (10) может быть записано в следующем виде:

$$V_0 = \int_0^{V_R} P_{ПФ} dV \quad (17)$$

Авторами работы [25] было предложено уравнение, описывающее зависимость коэффициента емкости от концентрации более сильного элюента в ПФ, в условиях изократической ОФ ВЭЖХ:

$$k' = f(C) = k'_0 \cdot 10^{-uC}, \quad (18)$$

где k'_0 и u - константы для данной хроматографической системы. k'_0 представляет собой коэффициент емкости, экстраполированный к нулевой концентрации органического растворителя в ПФ.

Так как в случае градиентного элюирования изменение концентрации более сильного элюента (элюента "Б") определяется формой градиента, уравнение (18) может быть записано в следующем виде:

$$k' = f(C) = k'_0 \cdot 10^{-uC(V)}, \quad (19)$$

где $C(V)$ - функция градиента. Для линейного градиента эта функция имеет вид $C=a+b \cdot V$, где C - концентрация растворителя "Б" в элюенте, %; V - объем элюирования, мкл; a - концентрация растворителя "Б" в начале градиента, %; b - крутизна градиента (% на мкл). В случае криволинейного градиента, в целях упрощения расчета, функция $C=f(V)$ может быть аппроксимирована близкой по форме кусочно-линейной функцией.

Таким образом, объем удерживания низкомолекулярного вещества в условиях градиентного элюирования может быть вычислен по формуле:

$$V_0 = \int_0^{V_R} \frac{dV}{1 + k'(C(V))} \quad (20)$$

При построении модели, описывающей удерживание высокомолекулярных веществ на ОФ (в нашем случае линейных пептидов), необходимо учитывать вероятность одновременного нахождения всех структурных элементов молекулы в ПФ. Для пептидов, учитывая перечисленные выше приближения, вероятность нахождения молекулы в подвижной фазе может быть выражена как произведение вероятностей нахождения в ПФ всех его структурных элементов (аминокислотных остатков):

$$P_{ПФ(пептид)} = \prod_{i=1}^N P_{ПФ(i)}, \quad (21)$$

где N - количество аминокислот в составе пептида.

В этом случае уравнение (20) примет следующий вид:

$$V_0 = \int_0^{V_R} \frac{dV}{\prod_{i=1}^N [1 + k'_i(C(V))]} \quad (22)$$

Полученное уравнение (22) может быть решено методом численного интегрирования.

Таким образом, для математического описания хроматографического поведения относительно коротких линейных пептидов в градиентной ОФ ВЭЖХ необходимо:

- определить свободный объем колонки (см. раздел 4.1.1.);
- изучить зависимости удерживания аминокислот от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе и определить константы k'_0 и u ;
- исследовать особенности формирования градиента концентрации ацетонитрила в ПФ в используемой хроматографической системе.

4.2.1. Исследование особенностей формирования градиента концентрации ацетонитрила в ПФ

В хроматографе "Милихром А-02" формирование градиента производится двумя шприцевыми насосами (рис. 4) по заданной программе.

Хроматограф "Милихром А-02", как и большинство хроматографов, имеет собственный объем (V_z), равный объему между местом, где происходит смешивание элюентов для формирования ПФ заданного состава, и верхней частью колонки. Задержка градиента (V_e) соответствует так называемому эффективному объему хроматографа, который может оказаться заметно больше собственного объема прибора, что бывает обусловлено особенностями гидравлической системы хроматографа.

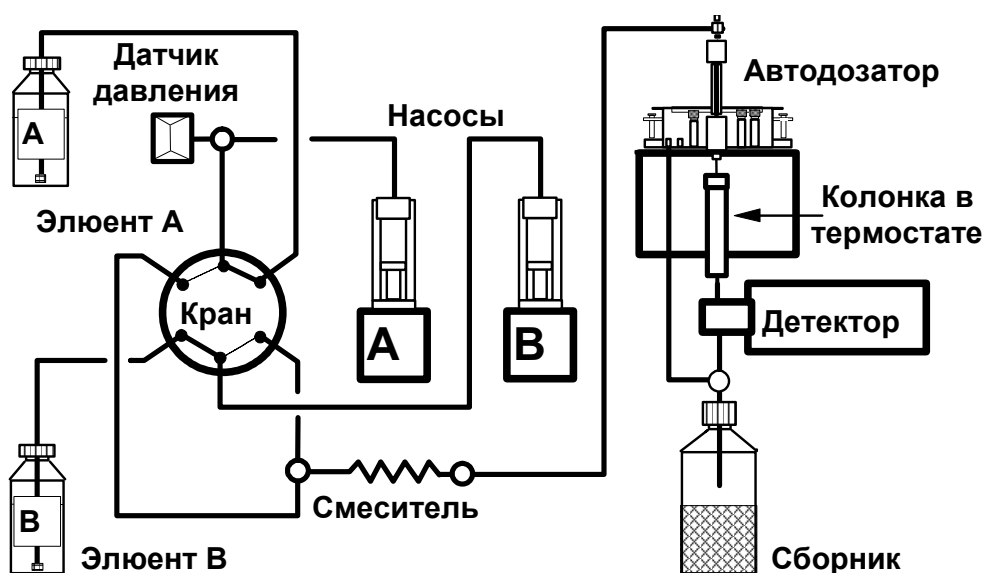


Рис. 4. Схема хроматографа "Милихром А-02".

Для исследования особенностей формирования градиента нами был проведен эксперимент в условиях, указанных в разделе 3. На рисунке 5 приведена "хроматограмма", из которой видно, что наклонный линейный участок градиента ацетонитрила в ПФ состава $H_2O:MeCN$ достаточно эффективно обрабатывается насосами хроматографа. В начале хроматограммы наблюдается изократическая "ступень", соответствующая так называемой задержке градиента [31], которая связана с конструктивными особенностями прибора. Таким образом, реальный градиент оказывается сдвинутым во времени относительно заданного. Задержка градиента для используемой нами хроматографической системы составила 460 мкл. В это время в колонку поступает ПФ того состава, с которого начинается градиент, и которой проводилась регенерация колонки перед анализом. Это значение задержки начала градиента V_e мы использовали в расчетах.

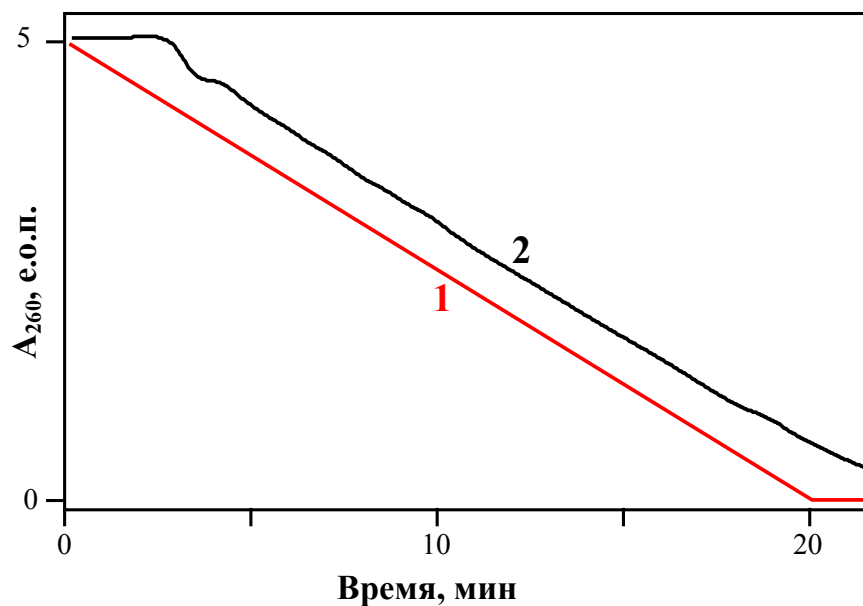


Рис.5. Отклонение реального градиента от программируемого. 1 - заданная форма градиента (насос "А"); 2 - реальная форма градиента.

4.2.2. Изучение зависимостей коэффициентов емкости аминокислот от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе

Исходные хроматографические данные, необходимые для изучения зависимости удерживания аминокислот от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе, получали из хроматограмм 20 аминокислот в изократических условиях, указанных в разделе 3. Коэффициенты емкости аминокислот вычисляли по уравнению (9). Изучение зависимостей коэффициентов емкости аминокислот от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе проводили, используя уравнение (18).

Для 20 аминокислот были построены графики в координатах $\lg k' - C$. В качестве примера на рисунке 6 приведены графики зависимости логарифмов коэффициентов емкости триптофана, фенилаланина, тирозина от концентрации ацетонитрила в ПФ. Для каждой аминокислоты было получено уравнение вида $\lg k' = \lg k'_0 - uC$ (величины достоверности аппроксимации составили не менее 0.99), и рассчитаны константы k'_0 и u , которые приведены в таблице 7.

Таблица 7. Значения констант k'_0 и u для аминокислот.

Аминокислота	k'_0	$u \cdot 10^2$	Аминокислота	k'_0	$u \cdot 10^2$
N	0.12	3.70	A	0.24	4.08
S	0.13	3.40	R	0.33	5.05
D	0.14	3.49	P	0.32	4.13
Q	0.19	3.59	V	1.34	4.40
G	0.13	2.52	M	2.38	5.99
H	0.24	5.08	Y	5.67	8.86
E	0.24	3.91	I	5.52	7.40
C	0.29	4.29	L	5.66	7.01
T	0.24	4.93	F	13.35	7.58
K	0.23	4.56	W	16.20	8.27

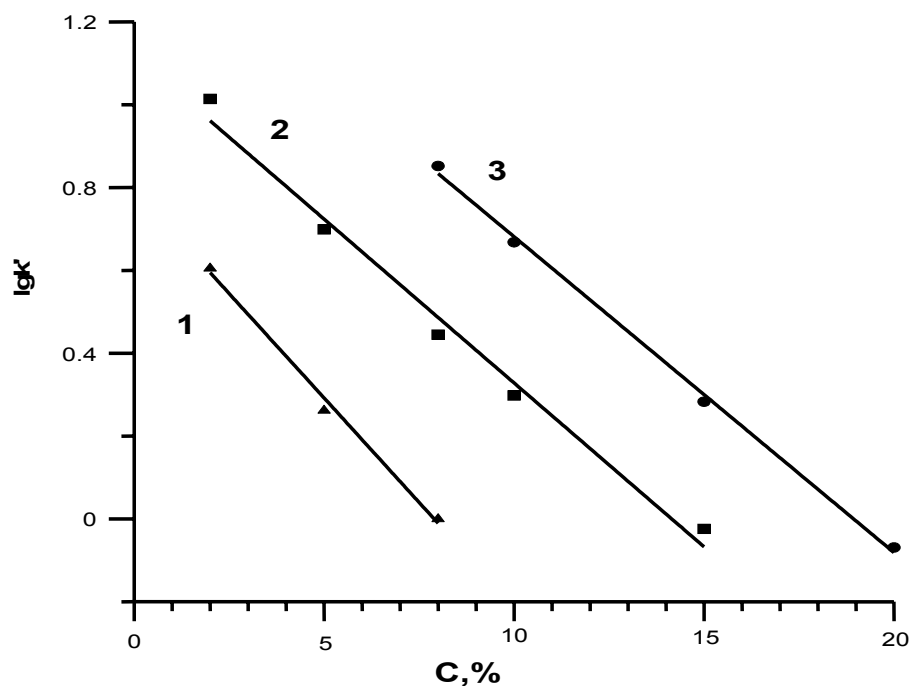


Рис. 6. Зависимости логарифмов коэффициентов емкости аминокислот от концентрации ацетонитрила в ПФ (1 - тирозин; 2 - фенилаланин; 3 - триптофан).

Из рисунка 6 видно, что $\lg k'$ в рассматриваемом диапазоне концентраций линейно зависит от концентрации ацетонитрила в ПФ. Отсюда можно сделать вывод, что удерживание аминокислот на ОФ происходит по распределительному механизму.

4.2.3. Расчет объемов удерживания аминокислот в градиентной ОФ ВЭЖХ

Так как аминокислоты являются структурными элементами пептидов, мы сочли целесообразным применить разработанный нами метод расчета объемов удерживания к аминокислотам, что в случае получения удовлетворительных результатов дает основания использовать его для предсказания хроматографического поведения пептидов.

Как указано в разделе 3, хроматографирование аминокислот проводили в разных градиентах. Экспериментальные и вычисленные значения объемов удерживания аминокислот для градиентов G1 и G2 приведены в *Приложениях 3,4*. Сравнение экспериментальных и расчетных данных показано на рис. 7,8.

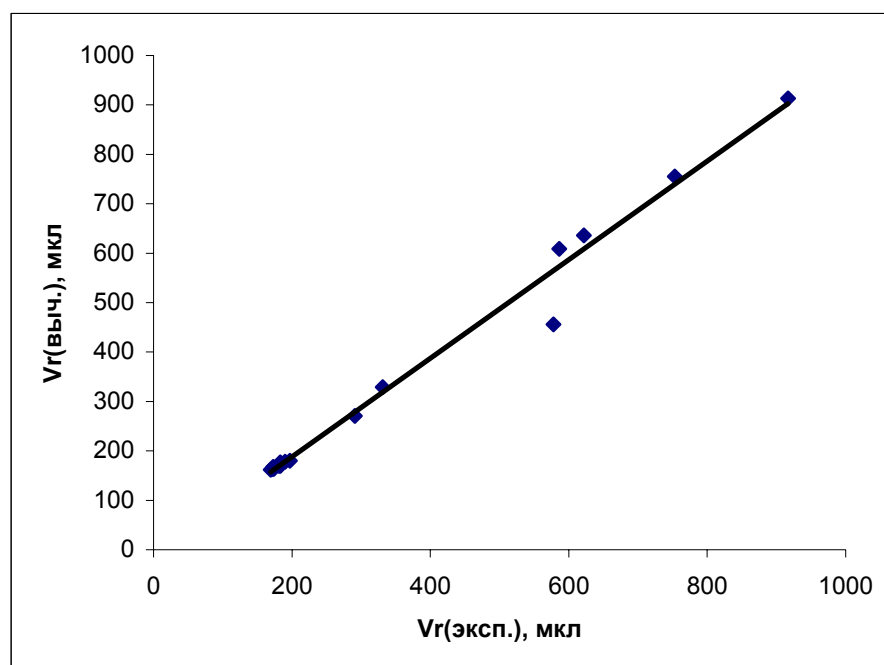


Рис. 7. Сравнение экспериментально найденных и вычисленных объемов удерживания аминокислот для градиента G1. Вычисление значений V_R проводили по уравнению (22).

Коэффициент корреляции зависимости $V_R(\text{выч.})=f(V_R(\text{эксп.}))$ в обоих случаях составил 0.99.

Из приведенных результатов видно, что предложенный метод расчета объемов удерживания веществ обладает удовлетворительной предсказательной силой в случае расчета объемов удерживания низкомолекулярных соединений, в нашем случае аминокислот.

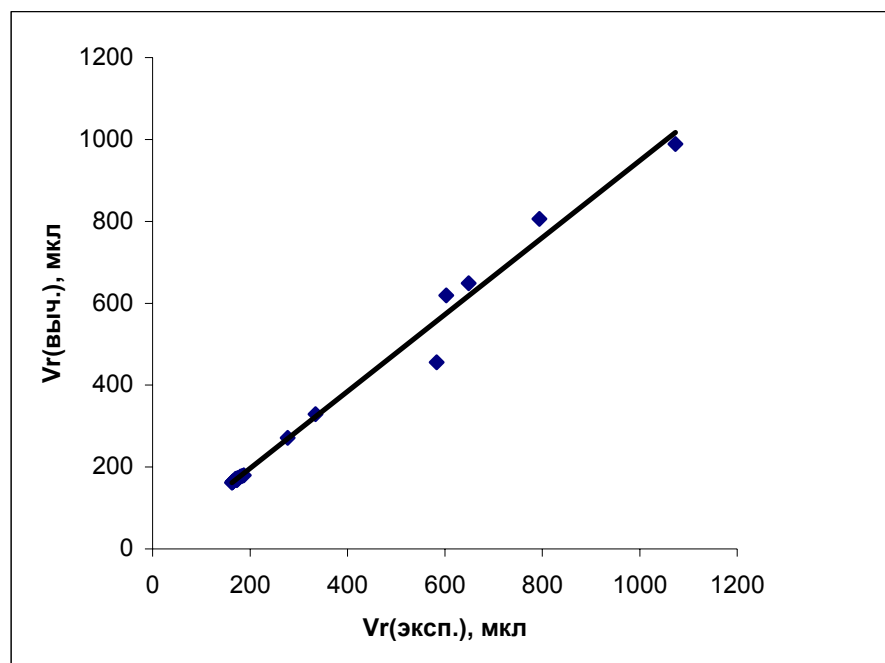


Рис. 8. Сравнение экспериментально найденных и вычисленных объемов удерживания аминокислот для градиента G2. Вычисление значений V_R проводили по уравнению (22).

4.2.4. Вычисление объемов удерживания пептидов известного аминокислотного состава в градиентной ОФ ВЭЖХ

Хроматографирование 35 пептидов, структуры которых приведены в таблице 5, проводили в градиентах концентрации ацетонитрила различной формы. Подробно условия анализа указаны в главе 3. Объемы удерживания пептидов вычисляли по уравнению (22).

Экспериментальные и вычисленные значения объемов удерживания пептидов для градиентов G1, G2 и G3 приведены в *Приложениях 5-7*. Сравнение экспериментальных и расчетных данных показано на рис. 9-11.

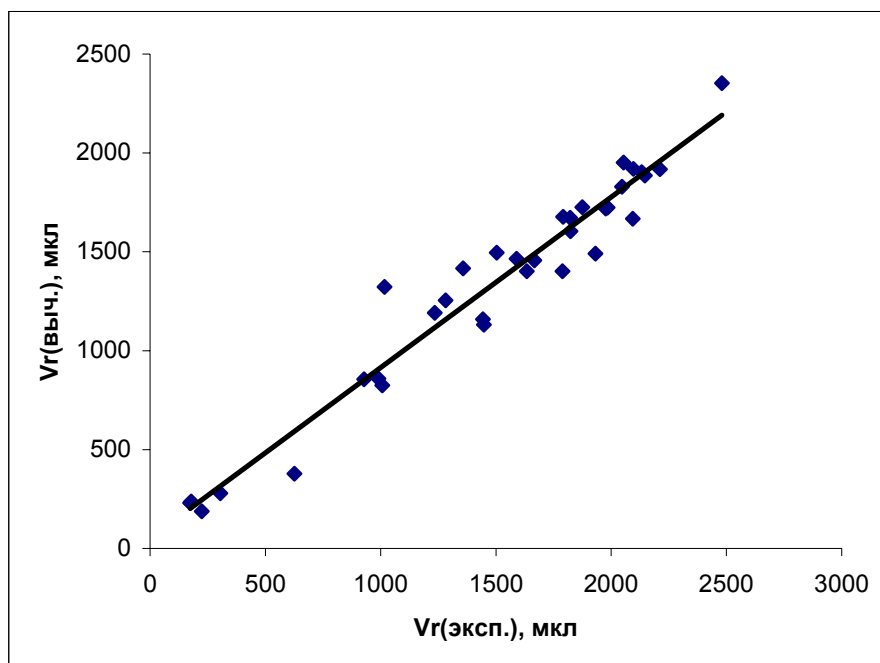


Рис. 11. Сравнение экспериментально найденных и вычисленных объемов удерживания пептидов (градиент G3).

Для используемых нами градиентов (G1, G2, G3) коэффициенты корреляции зависимости $V_R(\text{выч.})=f(V_R(\text{эсп.}))$ составили 0.96.

Из полученных данных видно, что разработанный метод вычисления объемов удерживания пептидов известного состава для градиентов произвольной формы в ОФ ВЭЖХ позволяет с приемлемой точностью (± 250 мкл) прогнозировать удерживание коротких (содержащих не более 25 аминокислотных остатков) линейных пептидов. Разработанный метод расчета позволяет существенно упростить как процедуру выбора условий хроматографического анализа, так и процедуру фракционирования сложных образцов перед последующей масс-спектрометрической идентификацией пептидов.

4.3. Вычисление УФ-спектров пептидов

Кроме вычисления объемов удерживания, представляет интерес получение спектральной информации. Использование спектральной информации в ВЭЖХ с УФ-детекцией многократно повышает надежность идентификации вещества.

При вычислении УФ-спектров пептидов мы исходили из предположения, что спектр пептида равен сумме спектров всех его структурных элементов. Это допущение верно при условии, что между структурными элементами пептидов, являющимися хромофорами, нет взаимодействий [32].

В Приложении 8 приведены исходные хроматографические и спектральные данные для 20 аминокислот и пептидов GGG и GG, которые использовали при расчете спектральных характеристик пептидов.

Спектральные характеристики пептидов как площади их хроматографических пиков при $C=1\text{мМ}$ и объеме пробы 4 мкл вычисляли по уравнению:

$$a_{\text{пептид}}^{\lambda} = a_{(N+C)}^{\lambda} + (N-1) \cdot a_{\text{ПС}}^{\lambda} + \sum a_i^{\lambda}, \quad (23)$$

где N – общее число аминокислотных остатков в пептиде, $a_{(N+C)}^{\lambda}$ – условная площадь пика концевых групп пептида, $a_{\text{ПС}}^{\lambda}$ – удельное поглощение пептидной связи при длине волны λ , a_i^{λ} – спектральные характеристики аминокислотных остатков для длины волны λ . Величины, входящие в уравнение (23), были получены следующим образом.

В качестве опорной была выбрана длина волны 210 нм. Величину $a_{(N+C)}^{210}$ считали равной a_{Leu}^{210} , т.к группы $-\text{NH}_2$ и COOH являются единственными хромофорами Leu в диапазоне длин волн 210-300 нм.

Удельное поглощение пептидной связи ($a_{\text{ПС}}^{210}$) вычисляли как разность удельных поглощений пептидов GGG и GG:

$$a_{\text{ПС}}^{210} = a_{\text{GGG}}^{210} - a_{\text{GG}}^{210} \quad (24)$$

Удельные спектральные характеристики структурных элементов пептидов при длине волны $\lambda=210$ нм (a_i^{210}) вычисляли как площади их хроматографических пиков для раствора с концентрацией 1мМ и объема пробы 4 мкл по уравнению:

$$a_i^{210} = a_{\text{АК}}^{210} - a_{(N+C)}^{210}, \quad (25)$$

где $a_{\text{АК}}^{210}$ – площадь пика аминокислоты.

Спектральные характеристики для длины волны λ вычисляли по уравнению:

$$a_i^{\lambda} = a_i^{210} \cdot (S_{\lambda}/S_{210}), \quad (26)$$

где S_{λ}/S_{210} – спектральные отношения аминокислот и пептидов GG и GGG, представляющие собой отношения площадей пиков при длинах волн λ к площади пика при $\lambda = 210$ нм.

Сравнение спектральных отношений пептидов, полученных из хроматограмм с использованием выбранной нами ПФ, с данными работы [24], где использовали ПФ состава $[0.2 \text{ М LiClO}_4 \text{ в } 0.005 \text{ М водной HClO}_4]$: ацетонитрил, показало, что значимых

отличий УФ-спектров не наблюдается. Поскольку в используемой нами хроматографической системе корректному вычислению спектральных отношений мешали "системные" пики [33], удельные спектральные коэффициенты структурных элементов пептидов (см. табл. 8) были взяты из работы [24].

Таблица 8. Спектральные коэффициенты (е.о.п.· мкл) поглощающих УФ-излучение структурных элементов пептидов как площади хроматографических пиков при С=1мМ и объеме пробы 4 мкл [24].

$\lambda, \text{нм}$	W	F	Y	H	C	M	R	Q	N	E	D	(N+C)	ПС
210	99.38	30.03	21.72	20.93	1.55	5.81	1.28	0.59	0.44	0.12	0.05	0.23	3.22
220	134.76	6.75	29.23	14.61	0.70	2.37	0.03	0.25	0.18	0.08	0.03	0.12	0.86
230	37.61	0.23	21.34	2.44	0.32	0.64	0	0.07	0.05	0.03	0.01	0.04	0.22
240	8.56	0.23	2.16	0.05	0.09	0.12	0	0.02	0.01	0.01	0	0.01	0.03
250	9.26	0.48	0.99	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0
260	15.74	0.64	2.35	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
280	22.91	0.03	4.86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	1.99	0.03	0.18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

В таблице 9 приведено сравнение вычисленных спектральных отношений S_{λ}/S_{210} для 35 пептидов с соответствующими величинами, полученными экспериментально. Экспериментально полученные и вычисленные спектральные отношения пептидов достаточно хорошо согласуются между собой. В большинстве случаев различия составляют не более ± 0.06 (Согласно [26], абсолютная погрешность экспериментального определения спектральных отношений составляет 0.03). Для некоторых пептидов наблюдаются более заметные различия отдельных предсказанных и экспериментальных спектральных отношений. Причины этих различий могут быть связаны с конформационными эффектами и требуют дополнительных исследований.

Таблица 9. Экспериментальные и вычисленные спектральные отношения пептидов.

Пептид	Значение	Спектральные отношения S_{λ}/S_{210} для длин волн λ (нм):						
		220	230	240	250	260	280	300
1	Эксп.	0.28	0.08	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Выч.	0.28	0.08	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
2	Эксп.	0.28	0.07	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Выч.	0.27	0.07	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
3	Эксп.	0.28	0.08	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Выч.	0.31	0.10	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
4	Эксп.	0.25	0.06	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Выч.	0.32	0.11	0.03	0.01	0.01	0.00	0.00
5	Эксп.	0.24	0.06	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Выч.	0.38	0.12	0.03	0.01	0.00	0.00	0.00
6	Эксп.	0.31	0.06	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Выч.	0.27	0.07	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
7	Эксп.	0.28	0.08	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Выч.	0.32	0.10	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
8	Эксп.	1.13	0.31	0.07	0.07	0.13	0.18	0.02
	Выч.	1.07	0.35	0.08	0.07	0.11	0.18	0.02
9	Эксп.	0.79	0.52	0.07	0.02	0.04	0.10	0.00
	Выч.	0.86	0.57	0.06	0.03	0.06	0.12	0.00
10	Эксп.	1.05	0.72	0.07	0.03	0.08	0.16	0.01
	Выч.	0.94	0.70	0.10	0.03	0.06	0.14	0.00
11	Эксп.	0.51	0.12	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00
	Выч.	0.38	0.06	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
12	Эксп.	0.61	0.37	0.04	0.01	0.04	0.07	0.00
	Выч.	0.52	0.28	0.05	0.01	0.01	0.03	0.00
13	Эксп.	0.45	0.10	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
	Выч.	0.38	0.06	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
14	Эксп.	0.35	0.09	0.04	0.03	0.03	0.02	0.02
	Выч.	0.24	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
15	Эксп.	1.16	0.41	0.07	0.07	0.12	0.19	0.01
	Выч.	1.07	0.40	0.10	0.06	0.11	0.18	0.01
16	Эксп.	1.20	0.33	0.08	0.08	0.14	0.20	0.02
	Выч.	1.22	0.35	0.08	0.09	0.14	0.18	0.04
17	Эксп.	0.47	0.12	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
	Выч.	0.38	0.06	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
18	Эксп.	0.80	0.51	0.06	0.02	0.05	0.11	0.00
	Выч.	0.64	0.43	0.07	0.02	0.03	0.07	0.00
19	Эксп.	1.13	0.31	0.07	0.07	0.13	0.18	0.02
	Выч.	1.07	0.33	0.07	0.07	0.11	0.17	0.02
20	Эксп.	0.94	0.31	0.05	0.05	0.09	0.13	0.01
	Выч.	0.93	0.47	0.08	0.04	0.07	0.12	0.01
21	Эксп.	0.23	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
	Выч.	0.39	0.09	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00
22	Эксп.	0.70	0.43	0.05	0.02	0.05	0.09	0.00
	Выч.	0.65	0.43	0.07	0.02	0.03	0.07	0.00

Таблица 9. Продолжение.

Пептид	Значение	Спектральные отношения S_{λ}/S_{210} для длин волн λ (нм):						
		220	230	240	250	260	280	300
23	Эксп.	0.93	0.24	0.05	0.06	0.09	0.13	0.01
	Выч.	0.93	0.39	0.07	0.05	0.08	0.12	0.02
24	Эксп.	0.59	0.33	0.04	0.02	0.04	0.07	0.00
	Выч.	0.64	0.38	0.06	0.02	0.04	0.07	0.00
25	Эксп.	0.60	0.27	0.03	0.02	0.03	0.05	0.00
	Выч.	0.45	0.21	0.06	0.04	0.06	0.09	0.02
26	Эксп.	0.59	0.26	0.03	0.02	0.03	0.05	0.00
	Выч.	0.58	0.30	0.05	0.01	0.02	0.04	0.00
27	Эксп.	0.71	0.46	0.07	0.02	0.04	0.08	0.00
	Выч.	0.74	0.46	0.05	0.03	0.06	0.10	0.00
28	Эксп.	0.26	0.05	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00
	Выч.	0.36	0.11	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00
29	Эксп.	0.81	0.53	0.06	0.02	0.05	0.11	0.00
	Выч.	0.64	0.42	0.07	0.01	0.02	0.07	0.00
30	Эксп.	0.59	0.23	0.02	0.01	0.02	0.04	0.00
	Выч.	0.61	0.23	0.04	0.01	0.02	0.03	0.00
31	Эксп.	0.61	0.35	0.04	0.02	0.05	0.08	0.00
	Выч.	0.64	0.39	0.05	0.02	0.04	0.00	0.00
32	Эксп.	0.49	0.26	0.03	0.02	0.03	0.05	0.00
	Выч.	0.51	0.27	0.04	0.01	0.02	0.04	0.00
33	Эксп.	0.25	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
	Выч.	0.39	0.10	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00
34	Эксп.	0.25	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
	Выч.	0.36	0.08	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00
35	Эксп.	0.85	0.24	0.05	0.05	0.09	0.12	0.01
	Выч.	0.82	0.39	0.06	0.03	0.05	0.10	0.01

Примеры, иллюстрирующие возможность применения разработанного нами метода расчета объемов удерживания и УФ-спектров пептидов для практических целей, приведены в разделе 4.4.

4.4. Применение метода расчета объемов удерживания и УФ-спектров пептидов

4.4.1. Фракционирование смесей пептидов

Фракционирование сложных смесей пептидов проводят в условиях градиентной ОФ ВЭЖХ. Очевидно, что выбор оптимальных условий анализа, в частности формы градиента, позволяет добиться наилучшего разделения смеси.

На рисунках 12 и 13 показаны хроматограммы модельной смеси шести пептидов, записанные в градиентах концентрации ацетонитрила в ПФ разной крутизны.

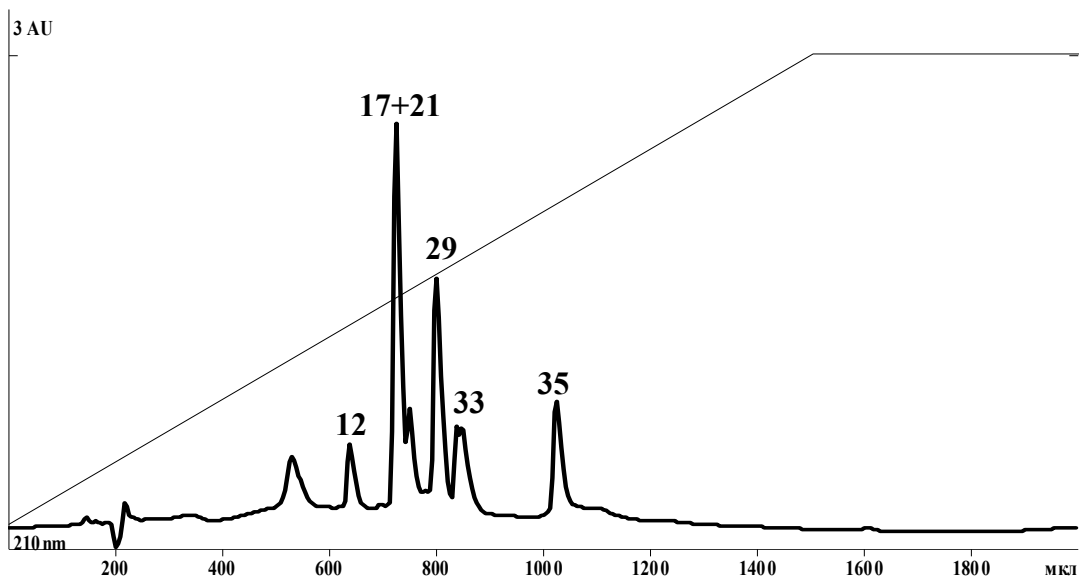


Рис. 12. Хроматограмма смеси 6 пептидов, записанная в условиях градиента G4 (см. раздел 3).

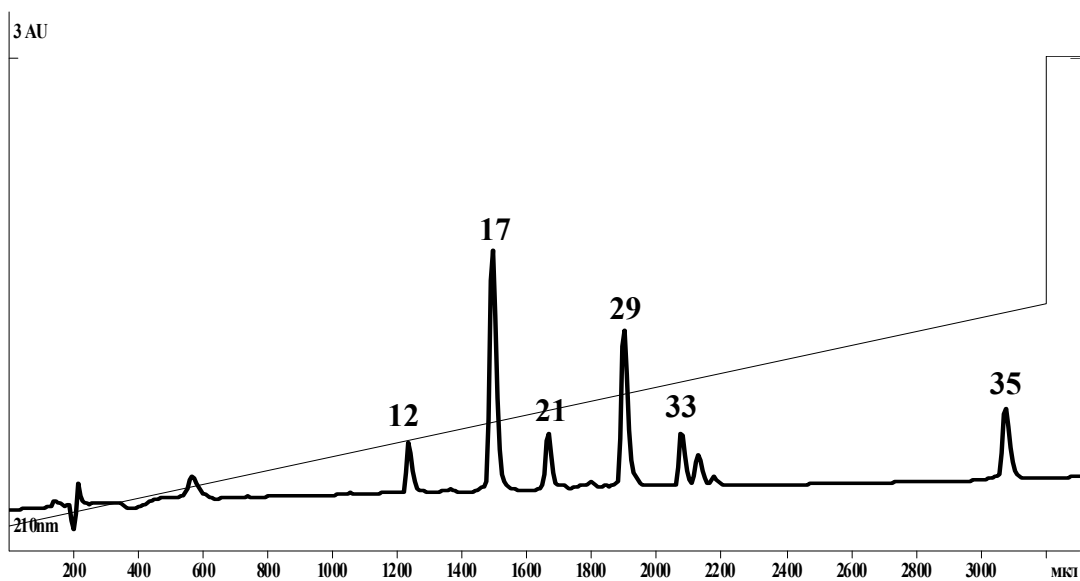


Рис. 13. Хроматограмма смеси 6 пептидов, записанная в условиях градиента G2 (см. раздел 3).

Видно, что в более пологом градиенте G2 достигается лучшее разделение компонентов смеси, что также отражают расчетные величины V_R (табл. 10). Таким образом, варьируя форму градиента, можно обеспечивать требуемое разделение смесей пептидов и, с учетом расчетных значений объемов удерживания для градиента выбранной

формы, выделять фракции, содержащие индивидуальные пептиды или обогащенные по отношению к искомым пептидам.

Таблица 10. Вычисленные значения объемов удерживания пептидов модельной смеси для разных форм градиента концентрации ацетонитрила в ПФ (G4 и G2).

№	Структура пептида	V_R (выч.), мкл	
		градиент G4	градиент G2
12	KPVGKKRRPVKVYP	879	1342
17	MEHFPGP	835	1350
21	RPPGFSPFR	913	1527
29	ELYENKPRRPYIL	925	1909
33	RPKPQQFFGLM-NH ₂	964	1874
35	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	1055	2607

4.4.2. Исследование природы пептида, выделенного из мышечной ткани мышей

Из мышечной ткани мышей сотрудниками Новосибирского института клинической иммунологии был выделен пептид, который влияет на пролиферацию стволовых клеток. Структура пептида, после секвенирования по Эдману [3], была предварительно установлена как WQPXX....

Для более точной идентификации пептида, было необходимо провести масс-спектрометрический анализ. Исследование выделенного пептида методом масс-спектрометрии было невозможно, так как аналит был сильно загрязнен примесями. Для очистки пептида от примесей использовали метод ОФ ВЭЖХ. Анализ проводили в условиях градиента G1, указанных в разделе 3. Поскольку, согласно предполагаемой структуре аналита, основным хромофором в его молекуле является остаток триптофана, мы смогли оценить концентрацию исследуемого вещества в образце, которая составила 0.6 Ммоль/л. Пептид был получен в препаративных количествах путем пяти повторных хроматографий, при которых отбирали фракцию элюата, соответствующую наиболее чистой части пика (начиная и заканчивая в точках, соответствующих $\approx 10\%$ от высоты пика).

На рисунке 14 приведена хроматограмма исследуемого образца.

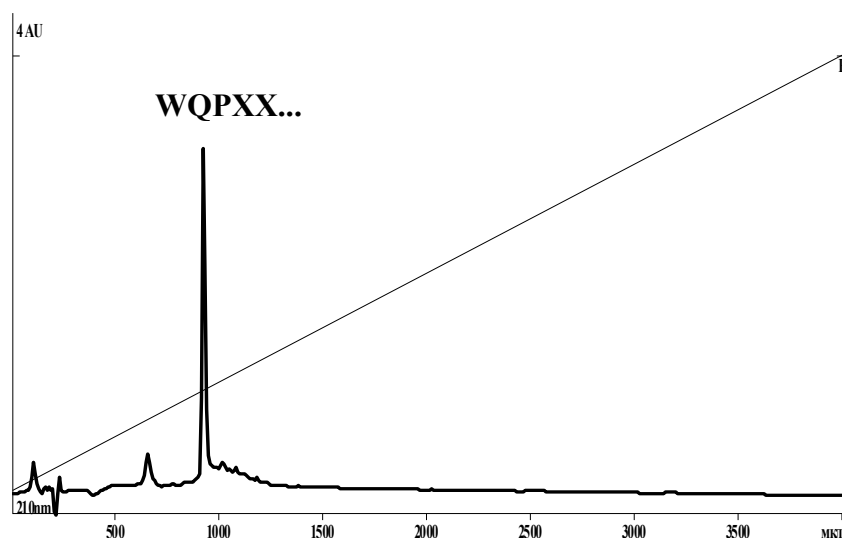


Рис. 14. Хроматограмма образца, выделенного из мышечной ткани мышей (условия градиента G1).

Так как в ходе ВЭЖХ-анализа был препаративно выделен очищенный от примесей образец, стало возможным проведение масс-спектрометрического анализа, который показал, что исследуемый аналит является аминокислотой (W). На рисунке 15 приведен масс-спектр аналита (А) и, для сравнения, масс-спектр триптофана (Б).

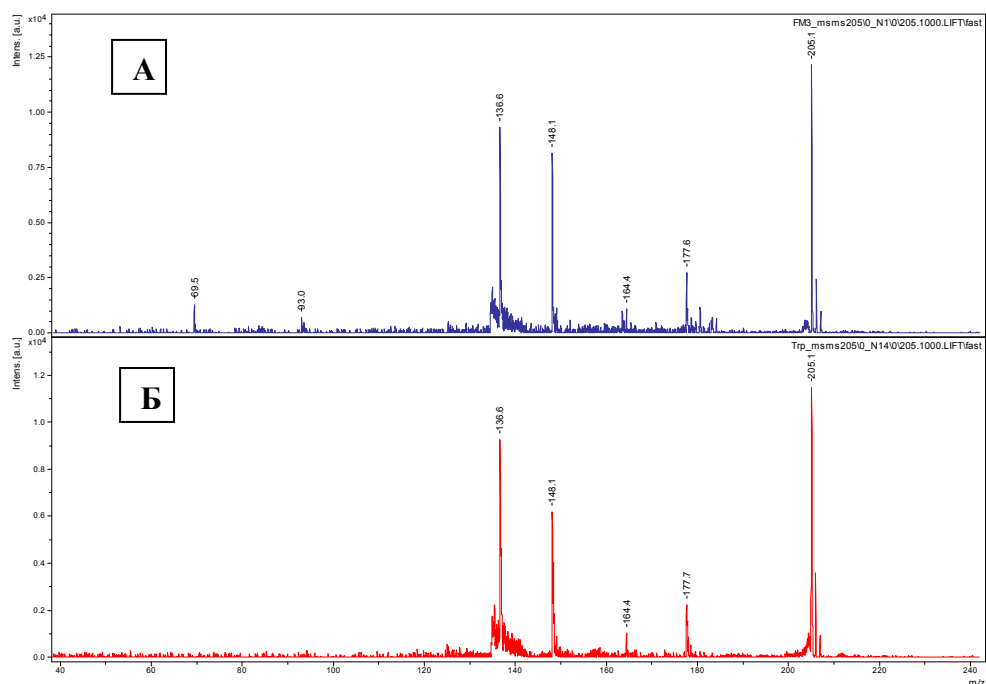


Рис.15. Масс-спектры: (А) - исследуемое вещество; (Б) - триптофан.

Следует отметить, что предлагаемый нами метод расчета объемов удерживания и УФ-спектров пептидов не обладает предсказательной силой в отношении структур пептидов. Так, данному пику на хроматограмме (см. рис. 14) можно приписать несколько структур (W, WQP, WQ, WP), которые не будут заметно отличаться по объемам удерживания и спектральным отношениям (см. табл. 11). Но, следует специально отметить,

что в таких случаях получаются ложноположительные результаты, (вещество не выпадает из рассмотрения), которые предполагают использование в дальнейшем традиционных методов определения структуры пептидов (например, масс-спектрометрия, секвенирование по Эдману).

Таблица 11. Вычисленные значения объемов удерживания и спектральных отношений пептидов WQ, WP, WQP в сравнении с объемами удерживания и спектральными отношениями триптофана и исследуемого образца.

Пептид	Расчет	V _R , мкл	Спектральные отношения S _λ /S ₂₁₀ для длин волн λ (нм):						
			220	230	240	250	260	280	300
WQP	Расчет	910	1.28	0.36	0.08	0.09	0.15	0.21	0.02
WP		910	1.32	0.37	0.08	0.09	0.15	0.22	0.02
WQ		896	1.31	0.37	0.08	0.09	0.15	0.21	0.02
W	Эксперимент	917	1.29	0.36	0.08	0.09	0.15	0.23	0.02
WQPXX...		924	1.10	0.31	0.08	0.09	0.14	0.19	0.02

5. ВЫВОДЫ

1. Разработан метод, позволяющий предсказывать объемы удерживания линейных пептидов известного состава в режиме градиентной ОФ ВЭЖХ с использованием летучей подвижной фазы состава [элюент А: 0.1% водный раствор трифторуксусной кислоты; Элюент Б: ацетонитрил], пригодной для прямого ввода выделенных фракций элюата в масс-спектрометр.

2. Для указанных хроматографических условий показана применимость метода расчета оптического поглощения пептидов, основанного на суммировании спектральных характеристик их структурных фрагментов.

3. Методы расчета объемов удерживания и УФ-спектров апробированы для 35 пептидов. Коэффициент корреляции вычисленных объемов удерживания с соответствующими экспериментальными величинами составил 0.96. Расхождение вычисленных и экспериментально полученных спектральных отношений S_{λ}/S_{210} составило не более 0.06.

4. Разработанный метод расчета объемов удерживания и УФ-спектров пептидов может быть использован в биохимических исследованиях, связанных с разделением смесей пептидов и их идентификацией. Широкое применение метод может найти в области протеомных исследований.

6. БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность В.В. Самукову (НПО "Вектор", г.Новосибирск), И.В. Назимову (ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г.Москва), И.Ю. Нагаеву (ИМГ РАН, г.Москва) за любезно предоставленные образцы пептидов; Е.Л. Гольдбергу (Лимнологический институт СО РАН, г.Иркутск) за помощь в проведении расчетов; М.В. Серебряковой (НИИ физико-химической медицины РАМН, г.Москва) за проведение масс-спектрометрического анализа пептидов.

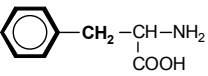
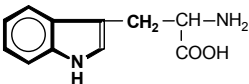
7. ЛИТЕРАТУРА

1. Ленинджер, А. Биохимия: Пер. с англ. - М.: Мир, 1974. - 956 с.
2. Резников, В.А., Штейнгарц, В.Д. Аминокислоты.-Новосибирск: НГУ, 1999.- С. 22.
3. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия. -М.: Просвещение, 1987. - 815 с.
4. Кнорре, Д.Г., Мызина, С.Д. Биологическая химия.- М.: Высшая школа, 1998.- 478 с.
5. Руководство по капиллярному электрофорезу: Научный совет Российской академии наук по хроматографии.- М., 1996. - 231 с.
6. Meek, J.L., Rossetti, Z.L. Factors affecting retention and resolution of peptides in high - performance liquid chromatography // J. of Chromatogr. - 1981. - №211. - P.15-28.
7. Схунмакерс, П. Оптимизация селективности в хроматографии.- М.: Мир, 1989. С.399
8. Meek, J.L. Prediction of peptide retention times in high - pressure liquid chromatography on the basis of amino acid composition // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1980. - №. 77. - P.1632-1636.
9. Sakamoto, Y., Kawakami, N., Sasagawa, T. Prediction of peptide retention times // J. of Chromatogr. - 1988. - №. 442. - P. 69-79.
10. Sasagawa, T., Okuyama, T., Teller, D.C. Prediction of peptide retention times in reversed – phase high performance liquid chromatography during linear gradient elution // J. of Chromatogr. - 1982. - №. 240. - P. 329-340.
11. Browne, C.A., Bennet, H.P.J., Solomon, S. The isolation of peptides by high performance liquid chromatography using predicted elution positions // Anal. Biochem. - 1982. -№.124.- P.201-208.
12. Лотшпайх, Ф.,Хеншен, А. Аминокислоты, пептиды, белки. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии (под ред. Хеншен А.): Пер. с англ.- М.: Мир, 1988.- С. 48, 216.
13. Schoneich, C., Kwok, S.K., Wilson, G.S. Separation and analysis of peptides and proteins // Anal. Chem. - 1993. - № 65. - P.67 - 84.
14. Bosch, E., Espinosa, S., Roses, M. Variation of pK values of acids and pH values of buffers in acetonitrile – water mobile phases // J. of Chromatogr. - 1998. - №. 824. - P. 137-146.

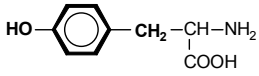
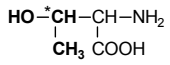
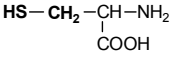
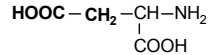
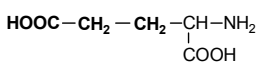
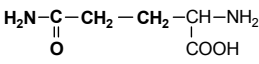
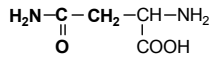
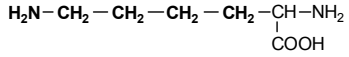
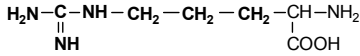
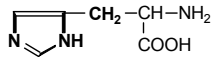
15. Barbosa, J., Sanz – Nebot, V., Toro, I. Optimization of mobile phase for separation of peptides by high – performance liquid chromatography // J. of Chromatogr. - 1996. - №. 725. - P. 249-260.
16. D. Guo, C. T. Mant, R. S. Hodges. Effects of ion - pairing reagents on the prediction of peptide retention in reversed - phase high - performance liquid chromatography // J. of Chromatogr. - 1987. - № 386. - С.205 - 222.
17. Теория и практика хроматографии. Применение в нефтехимии, Самара, июль 2005 г.: Тез. докл. Всероссийской конф. – Самара, 2005. – 37 с.
18. Chen, Y., Mehok, A.R., Mant, C.T., Hodges, R.S. Optimum concentration of trifluoroacetic acid for reversed-phase liquid chromatography of peptides revisited // J. of Chromatogr. - 2004. № 1043. - С. 9 - 18.
19. Стыскин, Е.Л., Ициксон, Л.Б., Брауде, Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. - М.: Химия, 1986. - С.149-155.
20. Varan, G.I., Grachev, M.A., Komarova, N.I., Perelroyzen, M.P. Micro-column liquid chromatography with multi-wave-length photometric detection // J. of Chromatogr. - 1983. № 264. - С. 69 - 90.
21. Демченко, А.П. УФ - спектроскопия и структура белков. - Киев: Наукова думка, 1981.- С. 25-38
22. Lemaire, S., Dumont, M., Nolet, S. Sensitive method of detection, quantitation and purification of peptides using pre - column derivatization with phenyl isothiocyanate // J. of Chromatogr. - 1988. - №425. - P.77-86.
23. Geng, M., Ji, J., Regnier, F. E. Signature – peptide approach to detecting proteins in complex mixtures. // J. of Chromatogr. - 2000. - №. 870. - P. 295-313.
24. Азарова, И.Н., Барам, Г.И., Гольдберг, Е. Л. Предсказание объемов удерживания и УФ спектров пептидов в обращенно - фазовой ВЭЖХ. // Биоорганическая химия.- 2006.- т. 32. - №1. - С. 56-63.
25. Jandera, P., Churacek, J. Gradient elution in column liquid chromatography. - Amsterdam: Elsevier, 1985. - 510 с.
26. Массовая концентрация УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. №ФР.1.31.2003.00950. Иркутск. 2003.
27. Руководство по эксплуатации Э 426. 100.00.00. РЭ "Хроматограф жидкостный микроколоночный "МИЛИХРОМ А-02" ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова". Новосибирск. 2003 г.

28. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. - Введ. 23.04.02.- Москва: Изд-во стандартов, 2002. - 23 с.
29. Хроматография. Основные понятия. Терминология: сб. научно- нормативной терминологии. / Рос. акад. наук, Научный совет по хроматографии. - Вып. 114. - М.: 1997. - 47 с.
30. Rimmer, C.A., Simmons, C.R., Dorsey, J.G. The measurement and meaning of void volumes in reversed-phase liquid chromatography // J. of Chromatogr.- 2002. - №. 965. - P.219-232.
31. Schellinger, A.P., Carr, P.W. A practical approach to transferring linear gradient elution methods // J. of Chromatogr. - 2005. - №. 1077. - P.110-119.
32. Zhao, Q., Sannier, F., Garreau, I., Lecoeur, C., Piot, J. M. Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with second-order derivative spectroscopy for the quantitation of atomic amino acids in peptides: application to hemorphins // J. of Chromatogr. - 1996. - №. 723. - P.35-41.
33. Stuart, W. Ghost peaks in reversed-phase gradient HPLC: a review and update // J. of Chromatogr. - 2004. - №. 1052. - P.1-11.
34. Справочник биохимика / Досон, Р., Эллиот, Д., Эллиот, У., Джонс, К.; Пер. с англ. - М.: Мир, 1991. - С. 11-37.

Аминокислоты и их свойства.

Название аминокислоты	Код	Структурная формула	pK _a [34]			λ _{max} , нм	a _M [21]
			(-COOH)	(-NH ₂)	(-R)		
Глицин	G	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	2.35	9.78			
Аланин	A	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	2.35	9.87			
Валин	V	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3 \text{ COOH} \end{array}$	2.29	9.74			
Лейцин	L	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3 \text{ COOH} \end{array}$	2.33	9.74			
Изолейцин	I	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3 \text{ COOH} \end{array}$	2.32	9.76			
Пролин	P	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{HC}-\text{NH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	1.95	10.64			
Фенилаланин	F		2.20	9.31		210 257	13000 195
Метионин	M	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2$ COOH	2.13	9.28		210	1500
Триптофан	W		2.46	9.41		210 280	20000 5600
Серин	S	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2$ COOH	2.19	9.21			

Аминокислоты и их свойства. Продолжение.

Название аминокислоты	Код	Структурная формула	pK _a [34]			λ _{max} , нм	a _M [21]
			(-COOH)	(-NH ₂)	(-R)		
Тирозин	Y		2.20	9.21	10.46	210 280	8000 1200
Треонин	T		2.09	9.10			
Цистеин	C		1.92	10.70	8.37		
Аспарагиновая кислота	D		1.99	9.90	3.36		
Глутаминовая кислота	E		2.10	10.47	4.07		
Глутамин	Q		2.17	9.13			
Аспарагин	N		2.14	8.72			
Лизин	K		2.16	9.06	10.54		
Аргинин	R		1.82	8.99	12.48		
Гистидин	H		1.80	9.33	6.04	210	5000

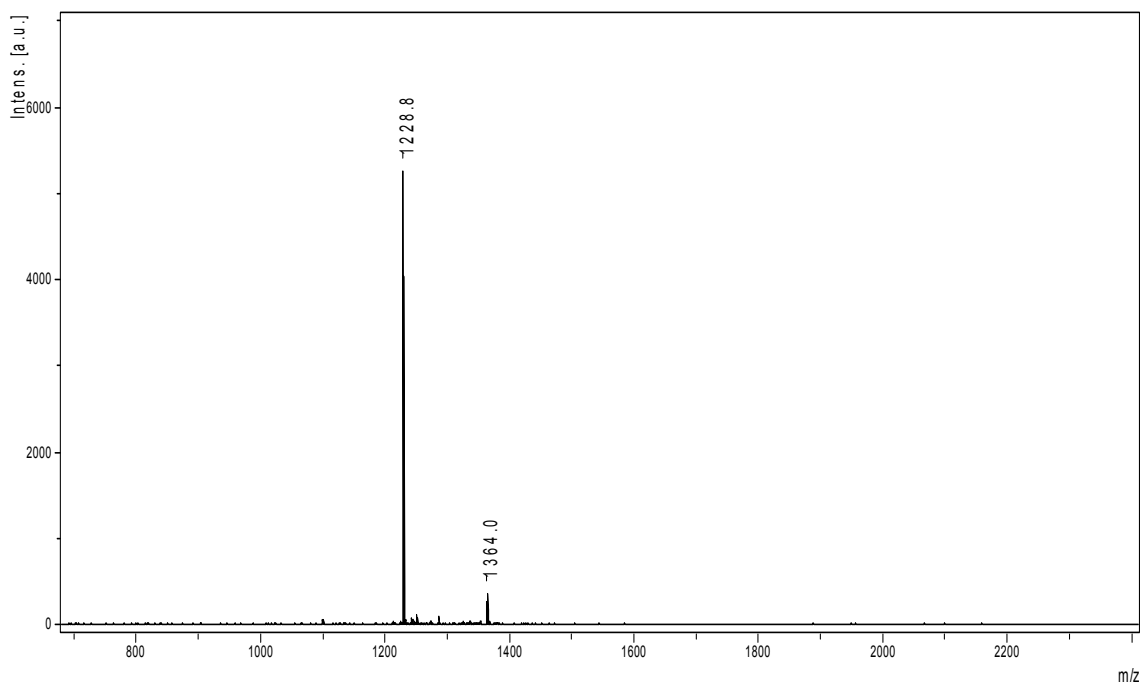


Рис. 1. Масс-спектр пептида №22 (YGGFLRKYPK).

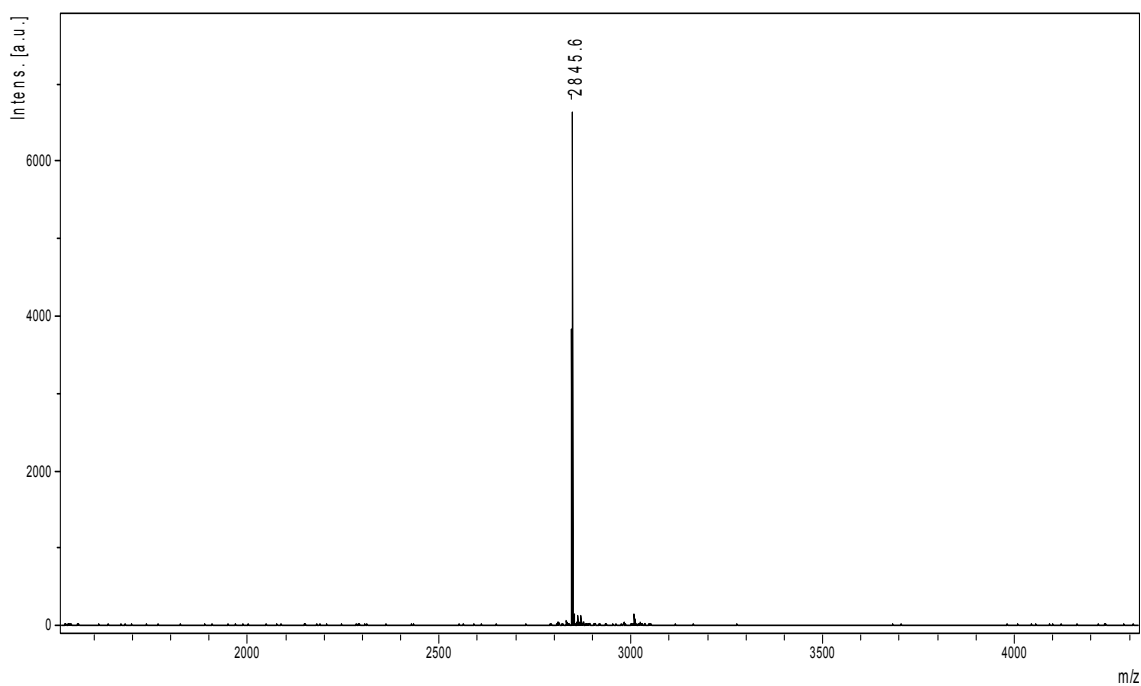


Рис. 2. Масс-спектр пептида №35 (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ)

Экспериментально найденные и вычисленные объемы удерживания аминокислот (градиент G1).

Аминокислота	Код	V_R (эксп.), мкл	V_R (выч.), мкл
Аспарагин	N	169	162
Серин	S	172	163
Глицин	G	173	165
Глутамин	Q	173	168
Аспарагиновая кислота	D	174	164
Гистидин	E	181	170
Треонин	T	181	171
Глутаминовая кислота	E	183	173
Лизин	K	183	170
Цистеин	C	183	177
Аланин	A	184	172
Аргинин	R	190	178
Пролин	P	197	180
Валин	V	291	271
Метионин	M	331	329
Тирозин	Y	578	456
Изолейцин	I	586	609
Лейцин	L	622	636
Фенилаланин	F	753	755
Триптофан	W	917	913

Экспериментально найденные и вычисленные объемы удерживания аминокислот (градиент G2).

Аминокислота	Код	V_R (эксп.), мкл	V_R (выч.), мкл
Аспарагин	N	163	162
Серин	S	164	163
Глицин	G	165	165
Аспарагиновая кислота	Q	165	164
Треонин	D	170	171
Гистидин	E	172	170
Глутамин	T	173	168
Глутаминовая кислота	E	174	173
Лизин	K	174	170
Аланин	C	175	172
Цистеин	A	180	177
Аргинин	R	184	178
Пролин	P	187	180
Валин	V	277	271
Метионин	M	334	329
Тирозин	Y	583	456
Изолейцин	I	603	619
Лейцин	L	649	649
Фенилаланин	F	794	806
Триптофан	W	1073	989

Экспериментально найденные и вычисленные объёмы удерживания пептидов (градиент G1).

№	Пептид	V _R (эксп.),	V _R (выч.), мкл
1	GG	180	230
2	GGG	180	230
3	AS	186	237
4	GRGDS	228	187
5	TKPR	292	279
6	PGP	591	378
7	GL	793	827
8	WAGGDASGE	794	1057
9	RKDVY	804	734
10	MY	812	792
11	EHFPGP	919	1035
12	KPVGKKRRPVKVYP	962	1068
13	HFPGP	1020	1019
14	FPGP	1033	1008
15	WYGGDASGE	1061	1141
16	WAGGDA	1097	1041
17	MEHFPGP	1100	1154
18	NCMLDY	1109	1171
19	WVGGDASGE	1120	1135
20	SYSMEHFRWG	1194	1245
21	RPPGFSPFR	1220	1227
22	YGGFLRKYPK	1227	1299
23	MEHFRWG	1231	1251
24	YGGFM	1248	1113
25	RVYIHPF	1301	1318
26	DRVYIHPF	1306	1311
27	YAFGYPS-NH ₂	1308	1166
28	QATVGDINTERPGMLDFTGK	1338	1398
29	ELYENKPRRPYIL	1365	1503
30	DRVYIHPFHL	1391	1480
31	YAGFL	1426	1304
32	YGGFLRRIRPKLK	1430	1464
33	RPKPQQFFGLM-NH ₂	1472	1456
34	PQQFFGLM-NH ₂	1552	1490
35	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-	2034	1981

Экспериментально найденные и вычисленные объемы удерживания пептидов (градиент G2).

№	Пептид	V _R (эксп.),	V _R (выч.), мкл
1	GG	173	230
2	GGG	174	230
3	AS	179	237
4	GRGDS	224	187
5	TKPR	303	279
6	PGP	618	378
7	GL	916	850
8	WAGGDASGE	972	1269
9	RKDVI	965	808
10	MY	988	846
11	EHFPGP	1162	1159
12	KPVGKKRRPVKVYP	1261	1342
13	HFPGP	1353	1130
14	FPGP	1357	1107
15	WYGGDASGE	1411	1420
16	WAGGDA	1218	1213
17	MEHFPGP	1494	1350
18	NCMLDY	1543	1396
19	WVGGDASGE	1485	1397
20	SYSMEHFRWG	1650	1657
21	RPPGFSPFR	1665	1527
22	YGGFLRKYPK	1733	1652
23	MEHFRWG	1720	1623
24	YGGFM	1671	1340
25	RVYIHPF	1790	1640
26	DRVYIHPF	1836	1638
27	YAFGYPS-NH ₂	1720	1421
28	QATVGDINTERPGMLDFTGK	1896	1853
29	ELYENKPRRPYIL	1911	1909
30	DRVYIHPFHL	1991	1881
31	YAGFL	1960	1589
32	YGGFLRRIRPKLK	2058	1911
33	RPKPQQFFGLM-NH ₂	2110	1874
34	PQQFFGLM-NH ₂	2256	1887
35	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-	3074	2607

Экспериментально найденные и вычисленные объёмы удерживания пептидов (градиент G3).

№	Пептид	V _R (эксп.),	V _R (выч.), мкл
1	GG	174	230
2	GGG	176	230
3	AS	179	237
4	GRGDS	225	187
5	TKPR	305	279
6	PGP	627	378
7	GL	928	855
8	WAGGDASGE	1017	1323
9	RKDVY	1008	825
10	MY	991	858
11	EHFPGP	1234	1191
12	KPVGKKRRPVKVYP	1358	1417
13	HFPGP	1444	1159
14	FPGP	1448	1133
15	WYGGDASGE	1503	1496
16	WAGGDA	1282	1255
17	MEHFPGP	1634	1402
18	NCMLDY	1667	1457
19	WVGGDASGE	1589	1466
20	SYSMEHFRWG	1792	1677
21	RPPGFSPFR	1824	1605
22	YGGFLRKYPK	1875	1725
23	MEHFRWG	1822	1672
24	YGGFM	1789	1402
25	RVYIHPF	1984	1723
26	DRVYIHPF	1976	1720
27	YAFGYPS-NH ₂	1932	1491
28	QATVGDINTERPGMLDFTGK	2047	1829
29	ELYENKPRRPYIL	2054	1951
30	DRVYIHPFHL	2096	1919
31	YAGFL	2094	1667
32	YGGFLRRIRPKLK	2132	1904
33	RPKPQQFFGLM-NH ₂	2146	1885
34	PQQFFGLM-NH ₂	2211	1918
35	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-	2481	2353

Хроматографические и спектральные параметры аминокислот и пептидов

Вещество	Спектральные отношения S_{λ}/S_{210} для длин волн λ (нм):							S_{210} , е.о.п. МКЛ ($C=1$ Моль/л, объем пробы 4 МКЛ)
	220	230	240	250	260	280	300	
Аспарагин	0.43	0.14	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.84
Серин	0.47	0.17	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20
Аспарагиновая кислота	0.50	0.18	0.04	0.02	0.01	0.01	0.01	0.28
Глутамин	0.42	0.14	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.73
Глицин	0.42	0.13	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27
Гистидин	0.66	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	20.03
Глутаминовая кислота	0.53	0.19	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00	0.35
Цистеин	0.45	0.19	0.06	0.01	0.00	0.00	0.00	1.40
Треонин	0.51	0.19	0.04	0.01	0.01	0.01	0.00	0.24
Лизин	0.43	0.14	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.21
Аланин	0.48	0.17	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16
Аргинин	0.13	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	1.60
Пролин	0.37	0.13	0.04	0.01	0.00	0.00	0.01	0.14
Валин	0.49	0.18	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20
Метионин	0.40	0.12	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	6.39
Тирозин	1.36	1.01	0.11	0.04	0.09	0.22	0.00	22.74
Изолейцин	0.50	0.19	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00	0.22
Лейцин	0.48	0.17	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.21
Фенилаланин	0.20	0.01	0.01	0.02	0.02	0.00	0.00	28.6
Триптофан	1.29	0.36	0.08	0.09	0.15	0.23	0.02	90.74
GG	0.28	0.08	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	2.87
GGG	0.28	0.07	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	6.78