

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОРДЕНА ЛЕНИНА СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
НОВОСИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

На правах рукописи

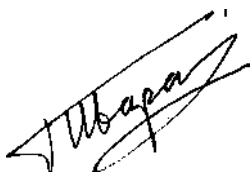
БАРАМ Григорий Иосифович

УДК 543.544:57.088.3

СОЗДАНИЕ МЕТОДА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ МИКРОКОЛОНОЧНОЙ
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ХИМИИ
БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

02.00.10 - биоорганическая химия, химия природных
и физиологически-активных веществ

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата
химических наук



Научный руководитель:
доктор химических наук
М.А. Грачев

Новосибирск - 1986

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
I. ВВЕДЕНИЕ.	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	9
2.1. Обращенные фазы.	II
- обращенные фазы для ВЭЖХ пептидов и белков	I3
2.2. Подвижная фаза в ОФ ВЭЖХ белков и пептидов	I4
- органические растворители в составе подвижной фазы	I5
- выбор pH подвижной фазы.	I7
- ионные взаимодействия в подвижной фазе.	I8
- ионная сила подвижной фазы	20
2.3. Структура полипептидов и их удерживание на ОФ.	2I
- модель Мика.	22
- модель стехиометрического вытеснения	25
- влияние структуры белка на его хроматографическое поведение.	28
- ОФ ВЭЖХ биологически активных полипептидов	30
2.4. Детектирование белков и пептидов в ОФ ВЭЖХ	3I
- детектирование по УФ-поглощению.	3I
- флуориметрическое детектирование	33
- электрохимическое детектирование	34
- масс-спектрометрия пептидов.	35
- другие способы детектирования полипептидов	36
2.5. Проблемы оптимизации ОФ ВЭЖХ белков и пептидов	37
- скорость подвижной фазы.	39
- градиент концентрации органического растворителя	40
- температура колонки.	42
- потери белка на ОФ колонках.	43
- нагрузка на колонку в ОФ ВЭЖХ полипептидов	45

- практика использования ОФ ВЭЖХ белков и пептидов	46
2.6. Заключение	49
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.	53
3.1. Материалы.	53
3.2. Упаковка микроколонок для ВЭЖХ	54
3.3. Очистка РНКазы	55
3.4. Окисление РНКазы надмуравьиной кислотой.	56
3.5. Карбоксиметилирование РНКазы	56
3.6. Реакция РНКазы с алкилирующими реагентами.	57
3.7. Триптический гидролиз белков	57
3.8. Кислотный гидролиз триптического пептида РНКазы	58
3.9. Получение ДНС-аминокислот.	58
3.10. Получение ФТК-аминокислот	58
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	59
4.1. Разработка метода высокoeffективной жидкостной микроколоночной хроматографии.	59
- выбор масштаба хроматографии	59
- устройство ввода пробы в колонку	61
- конструкция хроматографической микроколоники.	64
- градиентное элюирование.	68
- некоторые возможности разработанного метода МК ВЭЖХ.	70
4.2. Микроколоночная ОФ ВЭЖХ пептидов.. . . .	77
- выбор неподвижной фазы	77
- выбор органического растворителя	80
- ширина пика и скорость элюции.	80
- нагрузка на колонку.	82
- продолжительность градиента.	82

4.3. Аффинная модификация рибонуклеазы	86
- окисление РНКазы.	87
- восстановление РНКазы	89
- карбоксиметилирование восстановленной РНКазы.	89
- ОФ ВЭЖХ РНКазы при нейтральном рН	89
- кинетика гидролиза аффинного реагента	93
- модификация РНКазы реагентом $ClRCH_2NHd(pCpT)$	93
- разделение триптических пептидов КМ-РНКазы.	96
- модификация РНКазы реагентом $ClRCH_2NHd(pTpA)$	96
4.4. Установление аминокислотной последовательности некоторых триптических пептидов белка оболочки вируса клещевого энцефалита	I03
- триптический гидролиз белка Е	I03
- выделение триптических пептидов белка Е	I05
- секвенирование триптических пептидов белка Е.	I09
5. ВЫВОДЫ	II3
6. УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.	II4
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	II5

I. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) стала одним из важнейших методов химии. Быстрый прогресс ВЭЖХ связан, с одной стороны, с развитием теории жидкостной хроматографии, а с другой - с тем, что промышленностью освоено производство жидкостных хроматографов и мелкодисперсных адсорбентов. Особое место занимает ВЭЖХ в физико-химической биологии, в частности, в химии белка, где она служит не только для анализа, но и для микропрепаративного выделения чистых веществ из сложных смесей.

Техника ВЭЖХ непрерывно усовершенствуется. Одной из важнейших тенденций является миниатюризация оборудования. В отношении обычной (низкоэффективной) жидкостной хроматографии этот подход был впервые реализован в 50-60-х годах (1-4) и существенно продвинут в работах Сандахчиева и др. (5,6). В дальнейшем микроколоночную жидкостную хроматографию удалось сочетать с многоволновой фотометрической детекцией (7) и разработать ряд методов разделения объектов биоорганической химии. В момент начала настоящей работы, в 1978 г., представлялось весьма актуальным повысить эффективность микроколоночной жидкостной хроматографии до уровня обычной ВЭЖХ и разработать для реализации этого метода такую жидкостную систему (насос, устройство ввода пробы, колонку), которая могла бы войти в состав микроколоночного жидкостного хроматографа, пригодного для использования в различных областях науки и практики.

Основные преимущества микроколоночной жидкостной хроматографии - повышение чувствительности анализов; снижение требований к чистоте растворителей; упрощение методики выделения веществ из элюатов - представлялось наиболее интересным приложить к химии

белка. Большие возможности здесь открывала и техника многоволновой детекции.

Из четырех главных разновидностей ВЭЖХ - ионообменная, эксклюзионная, прямо- и обращенно-фазовая - последняя обладает особой универсальностью и дает наиболее широкие возможности разделения близких по свойствам объектов. В отличие от ионообменной, эксклюзионной и прямофазной хроматографии, для которых имеются признанные теории (8-II), обращенно-фазовая хроматография белков и пептидов такой теории пока не имеет, а в многочисленных посвященных ей обзорах (например, I2, I3) рассматривается по существу лишь набор разрозненных наблюдений. Отсутствие систематического экспериментального материала во многом связано с весьма ограниченным набором доступных белков и пептидов, а также с широким диапазоном их индивидуальных свойств. Задача систематического исследования поведения белков и пептидов при обращенно-фазовой ВЭЖХ представлялась весьма актуальной. Благодаря тому, что микроколоночная жидкостная хроматография дала существенную экономию как анализируемых веществ, так и адсорбентов и элюентов, накопление такого систематического материала оказалось возможным.

Наконец, актуальной нам представлялась задача приложения разработанных методов к реальным исследованиям в химии белка. Важными проблемами химии белка являются разработка методов аффинной химической модификации, а также расшифровки первичной структуры и предшествующего таким работам выделения чистых пептидов из полученных действием протеиназ гидролизатов.

Цель и задачи исследования. Целью работы было создание метода высокоэффективной микроколоночной жидкостной хроматографии и разработка применений этого метода в биоорганической химии, в частности, в химии белков и пептидов. Полученные результаты пред-

полагалось использовать при создании промышленного микроколоночного жидкостного хроматографа, при исследовании панкреатической рибонуклеазы методом аффинной модификации, при изучении белка оболочки вируса клещевого энцефалита.

Научная новизна. Разработан метод микроколоночной ВЭЖХ, масштаб которого в целом приблизительно в 10 раз меньше общепринятой техники: размер стандартной колонки для прямо- и обращенно-фазовой хроматографии $\varnothing 2 \times 62$ мм; эффективность колонки 5000-6000 теоретических тарелок; расход элюента на одно разделение около 2 мл; время анализа 10-20 мин; рабочее давление до 5 МПа; объем пробы 1-2 мкл. Созданный метод реализован в хроматографе "Милихром", внедренном в промышленное производство.

Показана применимость метода микроколоночной ВЭЖХ в разработанном варианте для решения широкого круга аналитических задач в сочетании с техникой многоволновой детекции.

Исследована обращенно-фазовая микроколоночная ВЭЖХ белков и пептидов. Получены количественные зависимости эффективности разделения от нагрузки на колонку, формы градиента, скорости потока элюента, состава элюента. Эти данные позволяют прогнозировать результаты разделения по начальным условиям. Оказалось, что высокомолекулярные пептиды можно успешно разделять при необычно больших нагрузках (до 5 мг на грамм адсорбента).

Методом обращенно-фазовой микроколоночной ВЭЖХ с многоволновой детекцией идентифицирован аффинно модифицируемый пептид в рибонуклеазе. Выделены индивидуальные триптические пептиды белка оболочки вируса клещевого энцефалита; структура полученных пептидов была расшифрована в совместной работе с И.В.Назимовым и В.В.Шемякиным и по данным А.Г.Плетнева и др. оказалась соответствующей структуре генома вируса.

Практическая значимость результатов работы. Разработанный метод микроколоночной ВЭЖХ реализован в промышленно выпускаемом в ПО "Научприбор" (г.Орел) хроматографе "Милихром". Хроматографы используются как для научных исследований, так и ^в качестве средства контроля в промышленности.

Исследования в области микроколоночной обращенно-фазовой ВЭЖХ пептидов представляют практический интерес для работ, связанных с изучением структур белков. Локализация гена белка оболочки вируса клещевого энцефалита в геноме вируса является одним из этапов создания генно-инженерных вакцин.

Публикации и апробации работы. Основные результаты работы опубликованы в 9 печатных работах. Материалы работы докладывались на Втором и Третьем Всесоюзных симпозиумах по жидкостной хроматографии (Звенигород, 1983; Рига, 1984), на Первой Всесоюзной конференции по применению хроматографии в биологии и медицине (Москва, 1983), на Международной школе Всемирной организации здравоохранения по применению биохимических микрометодов в исследовании патогенов тропических болезней (Новосибирск, 1981), на Пятом Международном Дунайском симпозиуме по хроматографии (Ялта, 1985).

Результаты работы вошли в состав коллективного труда "Создание метода микроколоночной жидкостной хроматографии, разработка и организация производства микроколоночного жидкостного хроматографа "Милихром" ("Обь-4)", удостоенного Государственной премии СССР в области техники за 1985 год.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обращенно-фазовая ВЭЖХ белков и пептидов.

В настоящее время обращенно-фазовая (ОФ) ВЭЖХ среди ^рдугих методов жидкостной колоночной хроматографии занимает лидирующее положение. Анализ литературы показывает, что в 1980 году на ОФ ВЭЖХ приходилось 65% всех разделений в химических и биологических исследованиях (10), и ее доля растет. Особенно это заметно в химии пептидов, где ОФ ВЭЖХ стала, по существу, основным методом разделения. Большие успехи достигнуты также в ОФ хроматографии белков. Основные причины популярности метода заключаются в его уникальной разрешающей способности, в высокой скорости разделения, в высокой чувствительности и хорошей воспроизводимости, в доступности адсорбентов и хроматографической аппаратуры. Первые работы по ОФ ВЭЖХ белков и пептидов (далее "полипептиды") появились немногим более 10 лет назад, но уже сейчас библиография превышает 500 названий. Опубликован ряд обзоров (12-18). ОФ ВЭЖХ применяется в химии белков и пептидов для решения самых разнообразных задач. В таблице I мы приводим ряд наиболее характерных приложений, где ОФ ВЭЖХ выступает в качестве основного метода.

Следует особо отметить те области применения ОФ ВЭЖХ, в которых она играет ключевую роль. Так, сочетание ОФ ВЭЖХ пептидов с флуориметрической (75,79), спектрофотометрической (80,81), электрохимической (41,80) или масс-спектрометрической (82-84) детекцией позволяет достичь рекордной чувствительности анализа, составляющей несколько пикомолей вещества в пробе. Далее, используя ОФ ВЭЖХ как метод выделения и очистки пептидов перед их секвенированием (37,76,77,85-87) и для разделения фенилизотиогидантоинов аминокислот, с помощью современной аппаратуры (77,

Таблица I.

Примеры использования ОФ ВЭЖХ в химии белков и пептидов.

Цель работы	Литература
Разделение пептидных гормонов	19-41
Выделение нейропептидов из тканей	30,33,41,42
Разделение фосфопептидов	43
Выделение йодированных (^{125}I) пептидов	29,31,40
Разделение рибосомальных белков	44,45,46
Выделение интерферонов	47
Выделение и очистка ферментов	35-37,48-57
Выделение гидрофобных вирусных белков	58-60
Определение мест аффинной модификации в белках	43,61
Исследование гликопротеинов	62-64
Разделение гистонов	65
Выделение моноклональных иммуноглобулинов	50
Разделение гемсодержащих белков	35,36,51-54,66,67
Пептидное картирование белков	43,47,62-64,68-78

88,89) можно определить первичную структуру 20-30-членных пептидов, взятых в количестве нескольких десятков пикомолей, и это открывает широкие перспективы перед биоорганической химией и генной инженерией (90). И, наконец, ОФ хроматография является высокопроизводительным препаративным методом очистки синтетических пептидов, а также белков и пептидов, получаемых генно-инженерными методами (14,25,47,90).

2.1. Обращенные фазы.

В ВЭЖХ в качестве неподвижных неполярных фаз или "обращенных" фаз (ОФ) используются, как правило, адсорбенты, получаемые модификацией силикагеля различными производными хлорсиланов (91, 92,93). Эти фазы не изменяют свой объем в органических растворителях и обладают высокой механической прочностью. Низкая прочность не позволяет применять в ВЭЖХ гидрофобные фазы на основе целлюлозы или декстрана, но они вполне пригодны для осуществления разделений методом "гидрофобной" хроматографии (94-96). ОФ на основе полистирола (65,97,98) или поливинилового спирта (67) заметно набухают в органических растворителях и, видимо, в силу этого не обеспечивают достаточной эффективности. По сравнению с силикагельными неподвижными фазами, они более устойчивы в кислых и щелочных средах.

В настоящее время коммерчески доступны около десяти типов ОФ на основе силикагеля. Их производят более 50 фирм (91,92). Эти фазы отличаются друг от друга характеристиками матрицы-силикагеля и строением привитого радикала. Наибольшее распространение получили ОФ, кратко обозначаемые как: СЗ-(триметил- или диметилпропил-); С4-(н-бутил-); С6-(фенил-); С8-(н-октил-); С18-(н-октадецил-); СN-(пропилнитрил-) и NH₂(-аминопропил-). 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). Способ синтеза ОФ, тип привитого радикала и характеристики силикагеля определяют, в конечном итоге, количество связанного углерода (от I до 20%), которое, в свою очередь, определяет емкость фазы. В общем случае, чем больше содержание углерода, тем больше емкость ОФ (92,93).

Следует отметить, что перечисленные характеристики фаз, сообщаемые обычно фирмами-изготовителями, не являются достаточными для обобщения литературного материала, повторения опубликованных методик, а нередко и для интерпретации собственных результатов. Прежде всего это заметно в ОФ ВЭЖХ белков и пептидов. Хроматографическое поведение пептидов и, в особенности, белков, во многом зависит от таких "неявных" параметров фазы, как: количество незкранированных силанольных групп, распределение пор по размерам, наличие в силикагеле примесей ионов тяжелых металлов, структура углеводородного слоя на поверхности силикагеля. Отсутствие этих данных стимулирует появление большого числа работ, посвященных сравнительному анализу хроматографических свойств адсорбентов - однотипных ОФ, производимых разными фирмами (26, 35, 38, 49, 52, 66, 76, 99-101). Ценность этих исследований невысока, так как в основном изучаются не физико-химические свойства адсорбентов, а определяется корреляция между хроматографическими свойствами и фирменным названием фазы. Очевидно, что эта корреляция не может быть надежной - любое сделанное фирмой "малозначительное" изменение технологии получения фазы без изменения ее названия даст реально новый адсорбент.

В связи с этим большое значение приобретают работы по изучению химии поверхности фаз. В первую очередь к ним следует отнести

ти исследования ОФ методом ядерно-магнитного резонанса на ядрах ^{29}Si и ^{13}C , который позволяет объективно измерять количество алкильных радикалов на поверхности силикагеля, количество свободных силанольных групп, структуру углеводородного слоя (I02, I03). Для контроля качества ОФ могут применяться и другие способы, например, основанные на исследовании хроматографического поведения определенных веществ. Хорошим тестом на присутствие ионов тяжелых металлов является бензиламин, который сильно удерживается ими даже в кислой среде (I04). Неэкранированные силанольные группы могут быть выявлены пробой на адсорбцию метилового красного в бензоле (92). Общий недостаток этих методов - получение лишь качественной оценки, хотя не видно принципиальных трудностей для разработки на их основе количественного анализа.

Обращенные фазы для ВЭЖХ пептидов и белков. До начала 80-х годов ОФ ВЭЖХ полипептидов проводили на коммерческих фазах общего назначения, получаемых на основе силикагеля с размерами пор 5-15 нм. Наиболее популярными были фазы С8 и С18. Систематическое изучение ОФ ВЭЖХ в применении к белкам и пептидам началось несколько лет назад и в первую очередь коснулось исследования влияния пор силикагеля и длины привитого радикала на эффективность разделения полипептидов в зависимости от их молекулярной массы (35, 50, 53, 100, I05-I07). В качестве основных результатов исследований отметим следующие:

- макропористые фазы (30-50 нм) более предпочтительны для белков с молекулярной массой более 15000, так как они обеспечивают больший выход и большую емкость;
- разделение коротких пептидов лучше проводить на фазах с порами 8-15 нм как более емких и селективных;

- макропористые фазы СЗ-С6 максимально селективны для белков и дают наибольший процент выхода;
- фазы С8-С18 оптимальны для разделения коротких и средних пептидов.

Данные, полученные разными авторами, не всегда хорошо согласуются друг с другом. Причина этого связана, видимо, с недостаточно полной информацией о структуре поверхности используемых ОФ, с индивидуальными свойствами белков и пептидов, взятых в качестве объектов исследования, а также с конкретными различиями в условиях проведения хроматографических экспериментов. В большинстве работ особое внимание обращается на влияние незэкранированных силанольных групп, наличие которых приводит к искажению формы хроматографического пика и, довольно часто, к необратимой адсорбции материала, особенно, когда речь идет о сильноосновных белках и пептидах (67,76,108).

Прогресс в области ОФ ВЭЖХ полипептидов привел к тому, что многие фирмы-производители хроматографической аппаратуры и адсорбентов начали выпускать ОФ и готовые колонки, предназначенные специально для разделения белков и пептидов. Это обстоятельство, безусловно, способствует дальнейшему развитию метода и его стандартизации.

2.2. Подвижная фаза в ОФ ВЭЖХ белков и пептидов.

Успех разделения белков и пептидов на ОФ во многом определяется правильным выбором подвижной фазы. В общем случае в состав подвижной фазы входят: вода и органический растворитель; соли слабых кислот или оснований, обеспечивающие буферную емкость элюента при заданном значении рН; нейтральные соли; ион-парные компоненты. К подвижной фазе предъявляются следующие требования:

- низкая вязкость, обеспечивающая достаточную проницаемость ко-

- лонки и скорость массообмена;
- хорошая растворяющая способность по отношению ко всем веществам пробы и компонентов элюента;
- инертность по отношению к материалам, из которых изготовлена колонка и элементы жидкостной схемы;
- максимальное отношение сигнал/шум при детектировании элюата;
- инертность по отношению к неподвижной фазе;
- оптимальная эффективность и селективность колонки, а также максимальный выход разделяемых веществ.

Проблема оптимизации состава подвижной фазы в ВЭЖХ низкомолекулярных соединений решается довольно успешно путем использования известных элюотропных рядов и введения в состав элюента определенных компонентов с учетом индивидуальных свойств разделяемых веществ. В случае разделения таких полифункциональных веществ, как белки и пептиды, традиционные методы выбора состава подвижной фазы становятся малоприменимыми, так как они не учитывают структурных изменений, происходящих с макромолекулами в ходе хроматографии. Поскольку закономерности удерживания полипептидов на ОФ не имеют в настоящее время удовлетворительного количественного описания, оптимизация состава подвижной фазы проводится, как правило, эмпирическим путем с привлечением физико-химических представлений о поведении полипептидных молекул в растворе.

Органические растворители в составе подвижной фазы. ОФ хроматография по своему механизму относится к распределительной хроматографии, и полярность подвижной фазы определяет коэффициент распределения вещества пробы между подвижной и неподвижной фазами, что, в свою очередь, определяет параметры удерживания. В ОФ хроматографии более полярные подвижные фазы обладают мень-

шей элюирующей силой. Самым слабым элюентом является вода и для обеспечения достаточной элюирующей силы в воду добавляют определенное количество менее полярного органического растворителя. При этом, как и вообще в ОФ хроматографии, для полипептидов характерна обратно пропорциональная линейная зависимость $\log k'$ (k' - коэффициент емкости) от концентрации органического растворителя (34,66,109). Иногда в области высоких концентраций органического растворителя наблюдается возрастание k' с ростом концентрации этого растворителя, что объясняют удерживанием пептида на силанольных группах (остаточных) по прямо-фазному механизму (109).

Из растворителей, имеющих относительно низкую вязкость и полностью смешивающихся с водой (110), в ОФ ВЭЖХ полипептидов чаще используют метанол, ацетонитрил, 1- и 2-пропанола. Известно несколько элюотропных рядов, где растворители располагаются в порядке возрастания их элюирующей силы. Наиболее полный из них выглядит следующим образом: вода - метанол - ацетонитрил - этанол - диоксан - тетрагидрофуран - 2-пропанол - 1-пропанол (85). Следует отметить, что элюотропный ряд, предлагаемый Херном (13): вода - метанол - этанол - 1-пропанол - 2-пропанол - ацетонитрил - тетрагидрофуран - не соответствует подавляющему большинству литературных данных.

Концентрация органического растворителя в ОФ ВЭЖХ белков и пептидов не превышает, как правило, 50-60%, но иногда при работе с гидрофобными белками применяют безводные элюенты, например, смеси метанола с ацетонитрилом (111). Такие белки хроматографируют также в градиенте ацетонитрила в 60% муравьиной кислоте (54, 58-60). Необычным растворителем можно назвать 2-метоксиэтанол, обладающий свойствами слабого неионного детергента. Небольшие

добавки его (до 10%) дают хорошие результаты при разделении некоторых белков (36). Белки, в отличие от пептидов, более чувствительны к типу органического растворителя, так как последний обладает определенным денатурирующим действием, а разрушение высших структур белков часто вызывает выпадение их в осадок. Поэтому для разделения белков преимущественно используют подвижные фазы с "сильным" растворителем (1- или 2-пропанол), которые содержат относительно больше воды, и очень редко применяют водно-метанольные элюенты (66).

Из общих соображений, по аналогии с обычной ОФ ВЭЖХ, органические растворители по отношению к полипептидам должны проявлять разную селективность, что весьма важно для практических целей. Известны отдельные (не систематические) исследования в этом направлении (23,46,66).

Выбор pH подвижной фазы. Диапазон значений pH подвижной фазы при ОФ хроматографии на силикатных адсорбентах ограничен диапазоном 2-8 (92). В растворах с pH больше 8 происходит заметное растворение матрицы. Так, при pH 11 (20°) срок службы колонки не превышает 20-30 часов (112). В кислых растворах с pH ниже 2 наблюдается гидролитическое отщепление углеводородных радикалов и образование свободных силанольных групп. Даже при pH 2 эффективность колонок по отношению к некоторым пептидам падает вдвое уже через 150-180 циклов разделения (52), хотя по отношению к другим пептидам эффективность иногда сохраняется и через 300 циклов (35). Эти различия объясняются, очевидно, индивидуальными свойствами пептидов, которые определяют их чувствительность к силанольным группам. Главным образом, чувствительность к силанолам связана с наличием в структуре основных аминокислотных остатков *Lys*, *Arg*, *His*, и взаимодействие носит ионообменный характер.

От величины рН элюента зависит селективность ОФ. Зависимость обусловлена изменением степени диссоциации аминокислотных остатков *Asp, Glu, His, Cys, Tyr* и концевых амино- и карбоксильных групп, рК которых находятся в диапазоне 2-9 (38). Ионизация какой-либо ионогенной группы приводит (при прочих равных условиях) к уменьшению удерживания. Возможность изменять селективность путем изменения рН подвижной фазы используется на практике для разделения сложных смесей пептидов. В этих случаях сначала, например, проводят разделение при рН 6-8, а затем рехроматографируют негомогенные пики при рН 2-3 (77,87).

Для поддержания заданного значения рН подвижной фазы вблизи нейтрального обычно применяют соли ортофосфорной или уксусной кислот, концентрация которых составляет 0,005-0,05 М. Ацетаты несколько предпочтительней в силу их лучшей растворимости в водноорганических элюентах. "Удобной" солью является бикарбонат аммония, который проявляет буферные свойства при рН около 8 и может быть легко удален из элюата упариванием или лиофилизацией (77). Учитывая сродство полипептидов к неэкранированным силаноллам, разделение этих веществ чаще проводят при рН 2-3, т.е. ниже рК силанольных групп, равного 3,5-4,0 (17). С этой целью в состав подвижной фазы вводят кислоты (ортофосфорная, серная, уксусная, трифторуксусная). Необходимо отметить, что при работе с белками кислые подвижные фазы используются в абсолютном большинстве случаев. При нейтральных рН белки часто дают множественные пики или вообще не элюируются, что объясняют их агрегацией и сложными конформационными превращениями (13).

Ионпарные взаимодействия в подвижной фазе. Ионы, входящие в состав подвижной фазы, взаимодействуют и ионизированными аминокислотными остатками полипептидов, изменяют их гидрофобность и

вливают, таким образом, на удерживание. В присутствии неорганических (гидрофильных) ионов удерживание белков и пептидов уменьшается (II3). К таким ионам относятся катионы Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ и анионы минеральных кислот - ортофосфорной, серной, хлорной, соляной. Обратный эффект наблюдается при введении в подвижную фазу органических гидрофобных ионов, причем, чем больше их гидрофобность, тем сильнее удерживание пептида или белка (30,39,42,II3, II4). Данное обстоятельство позволяет, меняя тип ионов, изменять селективность в довольно широких пределах и на одной колонке за несколько циклов разделять близкие по структуре полипептиды (30, 39).

Наиболее распространенным ионпарным агентом в ОФ ВЭЖХ полипептидов является трифторуксусная кислота (I3,85,II5). Она легко удаляется из элюатов упариванием, хорошо растворяет белки и пептиды, не мешает детектированию по поглощению УФ-излучения в области коротких длин волн. Концентрацию трифторуксусной кислоты выбирают обычно 0,01 М (рН 2), но иногда, как в случае разделения гистонов (сильноосновных белков), ее концентрацию желательнее увеличить до 0,03 М. Определенный интерес представляет другая летучая кислота - гептафтормасляная. Ее анион более гидрофобен, чем трифторацетат, и он сильнее экранирует положительно заряженные аминокислотные остатки (см. табл. 2). Еще более сильным ионпарными агентами являются алкилсульфо кислоты, которые используются при разделении аномально богатых *Lys* и *Arg* малоудерживаемых пептидов. К ним относятся: гептансульфокислота (68), тетрадецилсульфат (26), додецилсульфат (24), пентансульфонат и камфорасульфат (I08). Из ионпарных агентов катионного типа применяют обычно соли триалкиламмония (2I,I09,II4) или тетраалкиламмониевые соли (24). Кроме выполнения ионпарных функций, триалкиламмо-

ний уменьшает влияние открытых силанолов, с которыми он образует при pH ниже 3 труднорастворимые соединения.

Увеличение удерживания в присутствии ионпарного агента наблюдается при его концентрации до 0,010-0,015 M. Дальнейшее повышение концентрации приводит к уменьшению удерживания (13). Ионпарные агенты с длинными алкильными радикалами (например, додецилсульфат натрия) в низких концентрациях органического растворителя, входящего в состав подвижной фазы, в результате собственной адсорбции превращают ОФ в ионообменник, и это может привести к потере вещества пробы (13).

Ионная сила подвижной фазы. Ионная сила подвижной фазы в ОФ ВЭЖХ полипептидов играет весьма важную роль. В первую очередь она определяет силу ионообменных взаимодействий положительно заряженных групп полипептида с открытыми силанолами силикагеля, а также концентрацию ионных пар, образующихся в подвижной фазе. Введение нейтральных солей в состав элюента (концентрация 0,05-0,10 M) для ряда белков и пептидов существенно увеличивает эффективность и снижает удерживание (27,28,38,50). Особенно это заметно при нейтральном pH, когда количество ионизованных силанолов максимально (19). По отношению к белкам влияние ионной силы обусловлено высаливающим действием нейтральных солей. Это свойство нейтральных солей используется в гидрофобной хроматографии (18,116). В ОФ хроматографии высаливание белка может привести к его потере на колонке.

В качестве нейтральных солей применяют перхлорат натрия (27, 28,38), сульфат натрия (27), хлорид натрия (19,50). Весьма подходящей нейтральной солью, не обладающей буферной емкостью и хорошо растворимой во многих органических растворителях, является перхлорат лития (117). Еще одно преимущество литиевой соли зак-

лючается в том, что силикат лития очень плохо растворим и таким образом достигается дополнительная экранировка силанолов и продлевается срок службы колонки в результате меньшей растворимости матрицы в подвижной фазе. При работе с белками во избежание их высаливания необходимо выбирать нейтральную соль с наименьшей высаливающей способностью. Для этого можно пользоваться рядами, в которых анионы и катионы расположены в порядке возрастания их высаливающего действия: анионы (- роданид - йодид - перхлорат - нитрат - бромид - хлорид - ацетат - сульфат - фосфат); катионы (- аммоний - рубидий - калий - натрий - цезий - литий - магний - кальций - барий) (118).

При ОФ хроматографии некоторых белков с целью сохранения их биологической активности в состав подвижной фазы иногда вводят специальные добавки. Так для выделения Ca^{2+} -связывающего белка на фенилалкильной ОФ в элюент добавляли комплексон - 0,002 М этиленгликоль-бис(β -аминоэтиловый эфир)*N,N,N',N'*-тетрауксусной кислоты (72); очистку трипсина проводили в присутствии 0,002 М хлористого кальция (49).

2.3. Структура полипептидов и их удерживание на ОФ.

Связь между структурой пептидов и их удерживанием на ОФ была замечена уже в ранних работах по ОФ ВЭЖХ этих соединений. Так, в работе (119) авторы показали, что удерживание пептидов качественно определяется растворимостью в воде аминокислот, входящих в состав пептидов. Удерживание увеличивается с увеличением содержания плохо растворимых аминокислот. Кроме того, оказалось, что вклад С-концевой аминокислоты в удерживание пептида больше, чем N-концевой. Последний вывод был сделан из сравнения времен удерживания дипептидов-позиционных изомеров типа A_1-A_2 и A_2-A_1 . Аналогичный результат получен в работе (99), где исследовалось удерж-

живание 54 дипептидов на пяти коммерческих фазах. Эксперименты проводили в изократическом варианте ВЭЖХ при pH 6,5 и на основании данных по удерживанию позиционных изомеров $Ala-X$ и $X-Ala$ (всего 44 дипептида) аминокислоты X были систематизированы в ряды для всех пяти ОФ в порядке возрастания вклада в удерживание. Сравнение этих рядов для двух однотипных ОФ (С18) показывает, что порядок расположения аминокислот в ряду во многом зависит от индивидуальных свойств конкретного адсорбента. В особенности это касается аминокислот *Lys*, *His* и *Tyr*. Различия объясняют разной степенью экранирования силанолов на поверхности фазы (*Arg*-содержащие пептиды не исследовались).

Модель Мика. Количественный подход к предсказанию удерживания пептидов на ОФ по их аминокислотному составу впервые был сделан Миком (38). Его модель основана на двух предположениях. Во-первых, в пептидах, не имеющих вторичной структуры, все аминокислотные остатки участвуют в адсорбции, каждый такой остаток характеризуется своим коэффициентом удерживания и удерживание пептида равно сумме коэффициентов удерживания входящих в его состав аминокислот (независимо от их взаимного расположения). Во-вторых, первое предположение должно быть справедливо и для градиентной элюции. Это было экспериментально доказано Миком на примере градиентной элюции (линейный градиент) ди-, три-, тетра- и пентафенилаланинов. Их времена удерживания оказались линейно связанными с количеством остатков фенилаланинов в пептиде и равнялись сумме коэффициентов удерживания соответствующего числа этих остатков.

Для нахождения коэффициентов удерживания всех аминокислотных остатков и концевых amino- и карбоксильной групп Мик определил в "стандартных" условиях градиентной элюции времена удержи-

вания 25 модельных пептидов разной длины. Затем методом регрессионного анализа он нашел сами коэффициенты как слагаемые, сумма которых составляла время удерживания каждого пептида (минус время элюции неудерживаемого вещества). Конечный коэффициент корреляции был лучше 0,997 как для рН 2,1, так и для рН 7,4.

Несмотря на то, что коэффициенты удерживания получены для "стандартной" градиентной элюции, т.е. для строго определенных условий, Мик обсуждает возможность их использования и при других условиях разделения, вводя некоторые поправки. Можно отметить, что данные по удерживанию пептидов на четырех разных коммерческих ОФ достаточно хорошо совпадают между собой и это, вероятно, связано с высокой ионной силой элюента (0,1 М перхлорат натрия).

В последующих работах корреляционный метод был успешно использован для определения коэффициентов удерживания аминокислотных остатков в элюентах другого состава как в изократическом (28,120), так и в градиентном (42,68) режимах. Эти данные позволяют количественно оценить влияние различных компонентов подвижной фазы на удерживание пептидов известного состава, что важно при решении практических задач разделения путем прогнозирования изменения селективности. Такой подход уже реализован в некоторых работах (42,77,87), и для иллюстрации возможности метода мы приводим в таблице 2 коэффициенты удерживания аминокислотных остатков при градиентной элюции (вода - ацетонитрил) для элюентов разного состава. Во всех случаях использовался линейный градиент ацетонитрила в воде, элюенты I и II содержали 0,1 М перхлорат натрия. Кроме этого в состав элюентов входили: I - 0,005 М фосфат калия (рН 7,4); II - 0,1% ортофосфорная кислота (рН 2,1); III - 0,1% трифторуксусная кислота (рН 2,0); IV - 0,13% гептафтормасляная кислота (рН 2,0).

Таблица 2.

Коэффициенты удерживания аминокислотных остатков
(I, II - сс.(38), III, IV - сс. (42)).

Аминокислотный остаток		I	II	III	IV
Trp	W	14,9	18,1	16,3	17,8
Phe	F	13,2	13,9	19,2	14,7
Ile	I	13,9	11,8	6,6	11,0
Leu	L	8,8	10,0	20,0	15,0
Tyr	Y	6,1	8,2	5,9	3,8
Met	M	4,8	7,1	5,6	4,1
Val	V	2,7	3,3	3,5	2,1
Pro	P	6,1	8,0	5,1	5,6
Thr	T	2,7	1,5	0,8	1,1
Arg	R	0,8	-4,5	-3,6	3,2
Ala	A	0,5	-0,1	7,3	3,9
Gly	G	0,0	-0,5	-1,2	-2,3
His	H	-3,5	0,8	-2,1	2,0
Cys	C	-6,8	-2,2	-9,2	-14,3
Lys	K	0,1	-3,2	-3,7	-2,5
Ser	S	1,2	-3,7	-4,1	-3,5
Asn	N	0,8	-1,6	-5,7	-2,8
Gln	Q	-4,8	-2,5	-0,3	1,8
Asp	D	-8,2	-2,8	-2,9	-2,8
Glu	E	-16,9	-7,5	-7,1	-7,5
NH ₂ -группа		2,4	-0,4	4,2	4,2
COOH-группа		-3,0	6,9	2,4	2,4

Вычисление удерживания пептидов оказывается полезным и при структурных исследованиях белков и пептидов. В работе (68) дезамидированные триптические пептиды гормона роста человека были найдены по меньшему времени удерживания по сравнению с расчетным. Таким же способом были выявлены гликозилированные бромциановые фрагменты β -2-гликопротеина I (гликозилирование уменьшает гидрофобность пептида) (62). Гидрофобность пептидов уменьшается также при фосфорилировании серина (63) или окислении цистеина до сульфоновой кислоты (72). Она увеличивается при йодировании тирозина (29,31,40) или удлинении боковой цепи аминокислотного остатка на метиленовую группу (например, при замене аргинина на гомоаргинин (23)).

Модель Мика является, по существу, эмпирическим подходом к описанию удерживания полипептидов на ОФ. Она не затрагивает ни термодинамику, ни кинетику, ни химизм самого процесса. С другой стороны, более строгие в этом смысле теории обладают малой предсказательной силой, так как требуют знания специальных труднодоступных констант и не всегда хорошо согласуются с экспериментальными данными (34,113). Тем не менее, некоторые работы представляют интерес для понимания механизма удерживания белков и пептидов, и на одной из них мы остановимся подробнее.

Модель стехиометрического вытеснения. Важнейшей особенностью ОФ хроматографии полипептидов является очень резкая зависимость величины коэффициента емкости (K') от концентрации органического растворителя (C), входящего в состав подвижной фазы (21,34,66,109). Это свойство связано с полимерной структурой молекул, так как зависимость K' от C тем более резкая, чем выше молекулярная масса полипептида, т.е. чем длиннее полимер (66,109). Именно поэтому практически невозможно хроматографировать белки и высоко-

молекулярные пептиды в изократическом режиме - они элюируются в слишком узком диапазоне концентраций органического растворителя. Когда же все-таки удастся подобрать концентрацию растворителя, при которой материал элюируется не в свободном объеме колонки, то наблюдается крайне низкая эффективность (13,22,27,28,66). В этом кроется основная причина, почему в ОФ ВЭЖХ белков используют, главным образом, градиентное элюирование.

Такое anomальное поведение полипептидов хорошо описывается в рамках модели стехиометрического вытеснения, которую предложили Генг и Ренье (54). В основе модели лежат несколько предположений, основным из которых является то, что для полимерной молекулы характерно многоточечное взаимодействие с неподвижной фазой (в отличие от одноточечной адсорбции малой молекулы) и ее десорбция происходит при воздействии на нее определенного (стехиометрического) числа молекул растворителя (Z). Для k' было получено уравнение:

$$\log k' = -Z \log C + \log I \quad (1)$$

где I - константа, отражающая сродство полипептида к неподвижной фазе. По характеру зависимости k' от C это уравнение отличается от "классического" уравнения распределительной хроматографии (121,122):

$$\log k' = -n C + \log k_0 \quad (2)$$

где n и k_0 - константы. Справедливость уравнения (2) была ранее показана на примере ряда пептидов и цитохроме C (34,66), но различия уравнений (1) и (2) Генг и Ренье не обсуждают. Уравнение (1) проверялось ими экспериментально по 10 пептидам и белкам с молекулярной массой (M) от 3335 до 44000. Подвижная фаза состояла из воды, изопропанола и 60-88% муравьиной кислоты, которая обеспечивала денатурирующие условия. Коэффициенты корреля-

ции для вычисляемых величин Z и I оказались лучше 0,99. Z действительно было прямо пропорционально молекулярной массе полипептидов, т.е. количеству возможных точек контакта молекулы с неподвижной фазой, и численно равно $0,001 M$. В аналогичных исследованиях в неденатурирующих условиях для водно-ацетонитрильного элюента независимо получено $Z = 0,48 M^{0,44}$ (55) и $Z = 2,99 M^{0,21}$ (34). Различия двух последних уравнений объясняют топографическими особенностями поверхности неподвижных фаз, которые использовали в этих сериях экспериментов (34). Зависимости Z и I от концентрации кислоты, природы органического растворителя, концентрации ионпарного агента носят индивидуальный характер для каждого полипептида и не имеют простой интерпретации (54).

Главный вывод, который можно сделать из рассмотренной модели - увеличение крутизны зависимости k' от C с ростом молекулярного веса полипептида - позволяет объяснить еще одну важную особенность, присущую ОФ ВЭЖХ белков. Для белков экспериментально показано, что эффективность их разделения относительно мало зависит от длины хроматографической колонки (52, 100, 106). Действительно, при крутой зависимости k' от C молекула полипептида может находиться практически только в двух состояниях - либо в адсорбированном (неподвижном), либо в растворенном, когда она движется с фронтом элюента. Именно это явление визуально наблюдали Буссоло и Гант (51), изучая удерживание окрашенных белков в стеклянной колонке с ОФ. Такой механизм хроматографии позволяет использовать для разделения полипептидов очень короткие колонки, и длина колонки будет определять не сколько эффективность разделения, сколько допустимую нагрузку (100). Сравнение между собой 10 коммерческих колонок показывает, что уменьшение длины колонки почти в десять раз приводит к снижению ее "пиковой ем-

кости" (см. стр. 38) по цитохрому С менее, чем в полтора раза (52).

Влияние структуры белка на его хроматографическое поведение.

Выше мы рассмотрели две модели, в какой-то степени объясняющие механизм удерживания пептидов и неструктурированных белков на ОФ, но эти модели мало применимы к нативным белкам, которые имеют совершенно определенные пространственные структуры. Вопрос, вынесенный в заголовок данного раздела, является наименее изученным в ОФ хроматографии белков и, видимо, самым трудным. Причин тому много. С одной стороны, высшие структуры белка однозначно определяют форму его поверхности, а тем самым развитость контакта с неподвижной и подвижной фазами; природа "открытых" аминокислотных остатков определяет силу взаимодействия с фазами. С другой стороны, такие факторы как состав подвижной фазы и природа адсорбента сами оказывают влияние на структуру белка, и это влияние в условиях ОФ хроматографии весьма значительно. Такое "нелинейное" взаимодействие пока не имеет удовлетворительного количественного описания, обладающего предсказательной силой, но сама ОФ хроматография уже сейчас может выступать в роли метода, позволяющего получать информацию о структуре белка. К этому выводу пришли, например, Кохен с сотр. (56) при исследовании конформационных превращений панкреатической рибонуклеазы А в условиях ОФ ВЭЖХ, когда она элюируется в виде широкого асимметричного пика. Меняя температуру, нагрузку и тип кислоты, они определяли степень денатурации по отношению УФ-поглощений A_{288}/A_{254} , различного для нативной и денатурированной форм. Элюция с разными скоростями позволила оценить кинетику процесса денатурации. Аналогичное кинетическое исследование провели Херн с сотр. (57) на примере трипсина, который в их условиях элюировался несколь-

кими пиками (в зависимости от скорости элюции), и каждому пику они ставили в соответствие определенную конформацию. Уширение пиков в результате конформационных переходов в процессе элюции иногда наблюдается и с короткими пептидами. Так, в работе (73) уширение пика октапептида объясняется авторами цис-транс-изомерией связи Thr-Pro.

Возвращаясь к модели стехиометрического вытеснения, можно предположить, что в силу линейной зависимости Z от молекулярной массы полипептидов в денатурирующих условиях ОФ ВЭЖХ со временем станет вполне конкурентноспособной по отношению к гель-проникающей хроматографии при определении молекулярного веса белков и больших пептидов. В рамках представлений о многоточечном механизме адсорбции полимерной молекулы становится возможной оценка числа расположенных на поверхности глобулы белка мест связывания с поверхностью неподвижной фазы. Число мест связывания зависит от размера белковой глобулы, от природы поверхностных аминокислотных остатков, от лигандной плотности неподвижной фазы, от ее пористости. В приближении сферической формы молекулы белка диаметр глобулы с достаточной точностью оценивается по уравнению:

$$\varnothing \approx 0,16 \sqrt[3]{M} \quad (3)$$

где \varnothing в нм (123). Из данных по удерживанию сывороточного альбумина быка ($M=66500$, $\varnothing \approx 6,5$ нм) на ОФ СВ (лигандная плотность равна $2,9$ мкмоль/м²) число точек взаимодействия альбумина с ОФ составило 44 (100). Эта характеристика полипептида в определенной степени является объективным критерием его гидрофобности в условиях элюции.

Вывод о высокой чувствительности ОФ ВЭЖХ по отношению к пространственной структуре полипептидов экспериментально подтверждается разделением очень близких по составу белков и пеп-

тидов: цитохромов (66) и инсулинов (27,28) из разных источников, являющихся ближайшими гомологами; позиционных изомеров пептидов (99,119); оптических изомеров пептидов (13,23) и др.

ОФ ВЭЖХ биологически активных полипептидов. Вопрос сохранения биологической активности пептидов и белков особенно важен для препаративных работ. Что касается коротких пептидов, то они, как правило, после ОФ хроматографии не изменяют своей активности по отношению к антителам или специфическим рецепторам. Это объясняется прежде всего устойчивостью всех ковалентных связей в условиях хроматографии и отсутствием устойчивой вторичной структуры. Сложнее обстоит дело с большими пептидами и особенно с ферментами, имеющими сложную пространственную структуру. Органический растворитель элюента, гидрофобные лиганды неподвижной фазы, остаточные силанолы на ее поверхности, низкое значение pH, при котором обычно хроматографируют белки - все перечисленные факторы в той или иной мере разрушают вторичную и третичную структуры белка. Сохранение биологической активности или ее восстановление в данном случае полностью зависит от устойчивости конкретной структуры к денатурирующему воздействию или способности молекулы возвращаться к нативной конформации. Бóльшей устойчивостью обладают полипептиды с относительно высоким содержанием дисульфидных связей (инсулин, рибонуклеаза, лизоцим, сычужинный альбумин и др.). Мы не нашли в литературе данных по ОФ хроматографии белков, имеющих четвертичную структуру. Можно предположить, что в условиях ОФ ВЭЖХ четвертичная структура неустойчива, и белки будут диссоциировать на субъединицы.

Поскольку конформационные переходы в белках происходят не мгновенно, степень денатурации зависит от продолжительности процесса разделения. Это было убедительно показано на примере рибо-

нуклеазы А (56) и трипсина (57). Скорость денатурации может зависеть от типа органического растворителя элюента. Так, через час инкубации трипсина при pH 2 в 50% ацетонитриле наблюдали сохранение 70% ферментативной активности, но замена ацетонитрила на метанол вызвала инактивацию лишь на 1-2% (49). Температурная зависимость денатурации в ОФ хроматографии носит сложный характер, проявляется в виде множественных пиков и изменении времени удерживания (67). Для сохранения активности фермента из элюата необходимо быстро удалить органический растворитель и, если это требуется, нейтрализовать раствор. Альтернативный способ сохранения активности - использование стабилизатора. Хорошим стабилизатором является, например, глицерин, который добавляется до концентрации 15% (48).

В заключение этого раздела нужно добавить, что практически все объекты исследований, перечисленные в таблице I, после ОФ хроматографии в той или иной степени свою биологическую активность сохраняли.

2.4. Детектирование белков и пептидов в ОФ ВЭЖХ.

Детектирование по УФ-поглощению. Этот способ в ОФ ВЭЖХ белков и пептидов применяется в подавляющем большинстве случаев. Он проще других в аппаратном отношении, не требует проведения дополнительных химических реакций, универсален, достаточно чувствителен. УФ-спектр полипептида в области 200-300 нм складывается из поглощения пептидных связей, ароматических аминокислотных остатков, а также остатков Met и Arg (124). Собственное поглощение органических растворителей, используемых в ОФ хроматографии, практически не позволяет проводить детектирование при длинах волн короче 210 нм (110), что несколько ограничивает чувствительность метода, так как максимум поглощения пептидной связи наблюдается

при 190 нм (124). Тем не менее, даже при длине волны 210 нм молярное поглощение a_M пептидной связи равно 2000 (124), и это дает возможность достигать по дипептиду предел обнаружения не хуже 100 пикомолей. Очевидно, что с ростом молекулярного веса пептида (увеличения его длины) чувствительность в мольном выражении будет пропорционально увеличиваться. Аминокислотные остатки Trp, Phe, Tyr, His, Met имеют a_M при 210 нм соответственно 20000, 13000, 8000, 5000 и 1500 (124). Пептиды, в состав которых они входят, обнаруживаются, таким образом, еще легче. Кроме того, Trp и Tyr заметно поглощают при 280 нм (a_M равны соответственно 5600 и 1200). Это дает возможность регистрировать полипептиды, содержащие данные аминокислоты, в более длинноволновой области спектра, что существенно снижает требования к чистоте компонентов подвижной фазы, определяющих ее "прозрачность". Чувствительность детектирования таких полипептидов будет зависеть от количества Trp и Tyr, входящих в их состав. Для обычных белков она в 15-30 раз хуже, чем при детектировании на 210 нм (85, 124).

Увеличить чувствительность детектирования в длинноволновой области спектра, где уровень шумов обычно ниже, можно путем введения в молекулу пептида дополнительных хромофоров. Чаще для этой используют предколоночную дериватизацию по аминокруппам. Удобными реагентами являются: диметиламиноазобензолизотиоцианат (a_M при 436 нм около 15000) (81); 2-фтор-3,5-динитробензойная кислота (a_M при 260 нм 18000 и при 357 нм 10500) (80). Последний реагент позволяет селективно модифицировать концевую аминокруппу пептида, не затрагивая ϵ -аминокруппу Lys, и в меньшей степени уменьшает растворимость пептида в воде.

Некоторые спектрофотометрические детекторы дают возможность фотометрировать элюат при нескольких длинах волн одновременно, и

это существенно увеличивает объем получаемой информации. Так, например, фотометрирование при 210 и 280 нм выявляет наличие в молекуле пептида остатков *Trp* и *Tyr* (по A_{280}) при сохранении высокой чувствительности по A_{210} (77). Отношение A_{280}/A_{210} (спектральное отношение) для каждого гомогенного пика является постоянной и характерной величиной, дополняющей традиционные характеристики хроматографического пика - время удерживания, амплитуду, ширину (или площадь) пика. По изменению спектрального отношения могут быть зарегистрированы конформационные переходы в белках, сопровождающиеся изменением УФ-спектра. Например, для нативной формы панкреатической рибонуклеазы A_{288}/A_{254} при pH 2 равно 1,01, тогда как для денатурированного белка оно составляет 0,86 (56).

Флуориметрическое детектирование. Флуориметрия в ОФ ВЭЖХ полипептидов используется реже, чем УФ-фотометрия, так как требует дериватизации анализируемого материала. Прямое флуориметрирование возможно лишь для полипептидов, содержащих *Trp* и *Tyr*, причем чувствительность определения уступает УФ-фотометрии, особенно для *Tyr*-содержащих пептидов (35,79). В прямом определении возбуждение флуоресценции проводят обычно при 220 нм, а регистрируют при 330 нм. Высокая селективность по отношению к *Trp* и *Tyr* не имеет заметного преимущества перед двухволновым фотометрированием (210 и 280 нм), о котором говорилось выше.

Для получения высокой чувствительности при флуориметрическом детектировании пептидный материал подвергают послеколоночной дериватизации прямо в потоке или по фракциям. Предколоночная дериватизация практически не используется, так как дериваты пептидов плохо растворимы в воде. Одним из наиболее популярных модификаторов является о-фталевый альдегид, который дает производные

по аминокруппам пептида (главным образом по ϵ -аминогруппе *Lys*) (75,79). При возбуждении флуоресценции на 340 нм и регистрации излучения на 450 нм по многим пептидам достигается чувствительность около 10 пикомолей (76,79). Большую чувствительность получают дериватизацией белков и пептидов флуорескамином непосредственно в потоке после колонки (47,75), для чего в элюент вводят формиат или ацетат пиридина или натрия в концентрации 0,5-1,0 М.

Следует отметить, что флуоресцирующие производные пептидов нестабильны и храниться не могут. По своей сути флуоресцентное детектирование с дериватизацией - разрушающий метод анализа.

✧ Электрохимическое детектирование. Электрохимические детекторы, несмотря на свою простоту, не нашли пока широкого применения в ОФ ВЭЖХ полипептидов. Тем не менее, они заслуживают внимания, так как обеспечивают рекордную чувствительность, высокую селективность и легко могут быть адаптированы к микроколоночной хроматографии. Прямое детектирование возможно только для пептидов, содержащих легко окисляемую аминокислоту (*Trp*, *Tyr* или *Cys*). Для таких пептидов, разделяемых на колонке $\emptyset 0,1 \times 150$ мм в градиенте концентрации ацетонитрила (от 15 до 30%) в 0,2% трифторуксусной кислоте при потенциале +1,2 В, предел обнаружения составил около 10^{-14} моля (41). Детектирование при высоком потенциале накладывает дополнительные требования на чистоту компонентов подвижной фазы, так как различные микропримеси значительно увеличивают уровень шумов. Снизить потенциал детектирования позволяет предколоночная дериватизация по аминокруппам с помощью 3,6-динитро-о-фталевого ангидрида (80). Потенциал -0,24 В в этом случае обеспечивает выигрыш в чувствительности по сравнению с фотометрией при 210 нм более, чем в 500 раз. Очевидно, что детектирование пептидов в виде дериватов делает метод более общим.

Электрохимическое детектирование, естественно, разрушает пептиды.

Масс-спектрометрия пептидов. Масс-спектрометрию без преувеличения можно назвать самым информативным методом инструментального анализа. Ценность его по отношению к пептидам заключается прежде всего в том, что он позволяет получать сведения о последовательности аминокислот (82,83,84). Чувствительность метода весьма высока - несколько десятков пикомолей вещества. Принципиальным ограничением является молекулярный вес пептидов. Большинство современных масс-спектрометров имеют верхний предел по молекулярной массе однозарядных ионов 1500-2000 (точность определения больших масс 0,1-1). Пептиды - относительно лабильные соединения, и при работе с ними используют мягкие способы ионизации: полевая десорбция, бомбардировка быстрыми атомами. Особые проблемы возникают с вводом хроматографического элюата в ионный источник масс-спектрометра, так как для этого приходится удалять растворитель - подвижную фазу. Специально разработанные транспортные устройства, в которых элюат подается на движущуюся ленту или проволоку и там испаряется перед вводом в ионный источник (125), из-за своей сложности не находят широкого применения. Более перспективным является сочетание микроколоночной ОФ ВЭЖХ с масс-спектрометрией (126). В этом случае объем элюата резко сокращается, и он может прямо вводиться в ионный источник. Известно несколько систем микроколоночный жидкостный хроматограф - масс-спектрометр и, в частности, с масс-спектрометром, в котором ионизация осуществляется методом ЭРИАД (Экстракция Растворенных Ионов при Атмосферном Давлении) (127,128). Главное преимущество ЭРИАД заключается в том, что по сравнению с другими методами ионизации он дает наименее фрагментированные спектры с высоким выходом молекулярного иона. Используя типичные для пептидной хи-

мии способы расщепления молекулы и определяя массы продуктов расщепления, можно быстро и с малым расходом материала расшифровывать структуры пептидов (82,84,129). В тех случаях, когда масс-спектрометр работает не в режиме регистрации фиксированной массы (или нескольких масс), а в режиме записи масс-спектра, прямая стыковка хроматографа с обычным масс-спектрометром нецелесообразна, так как время записи масс-спектра даже с применением компьютера составляет несколько секунд. В современной ОФ ВЭЖХ это время соизмеримо с временем выхода хроматографического пика, а запись масс-спектра при изменяющейся концентрации вещества приводит к различным артефактам. Приходится соответственно уменьшать скорость элюции и, таким образом, значительно затягивать продолжительность анализа (127). Именно поэтому масс-спектрометрию используют, как правило, для анализа отдельных фракций, и ОФ ВЭЖХ является удобным способом подготовки материала. Особенно это касается микроколоночной ОФ ВЭЖХ, когда концентрация вещества в элюате высокая, а объем фракции мал.

Другие способы детектирования полипептидов. Вероятно, практически все известные методы детектирования хроматографических элюатов в той или иной степени могут быть использованы для регистрации полипептидов, но интерес представляют лишь те, которые обеспечивают высокую чувствительность или селективность. Постоянно разрабатываются способы, основанные на пред- или послеколоночной дериватизации пептидов. Одним из них является детектирование по содержанию дисульфидных связей (70), который заключается в следующем: в элюат добавляют сульфит натрия и он разрывает дисульфид с образованием остатков цистеина и сульфоцистеина; затем добавляют динатриевую соль 2-нитро-5-тиобензойной кислоты. Она превращает цистеин в сульфоцистеин, и при этом выделяется экви-

валентное количество 2-нитро-5-тиобензойной кислоты, которая фотометрируется при 410 нм. Предел детектирования составил около 5 пикомолей панкреатической рибонуклеазы А. Вся процедура проводилась автоматически с помощью специальной аппаратуры.

Объем получаемой информации существенно увеличивается при использовании сразу нескольких способов детектирования. Это достигается обычно последовательным соединением детекторов, причем детекторы разрушающего действия ставят последними. В ОФ ВЭЖХ белков и пептидов чаще всего применяют сочетание УФ-фотометрии с детектированием по радиоактивности (35, 40, 61, 64). При последовательном соединении детекторов возникают определенные трудности, связанные с необходимостью минимизации объемов соединительных капилляров и измерительных ячеек для уменьшения внеколоночного размывания хроматографической полосы.

2.5. Проблемы оптимизации ОФ ВЭЖХ белков и пептидов.

Оптимизация хроматографического разделения является, пожалуй, самой трудной задачей, с которой сталкивается исследователь, использующий этот метод. Приходится учитывать очень большое число параметров, определяющих всю процедуру разделения, и полный перебор их комбинаций осуществить практически невозможно. Более того, даже сам выбор критерия оптимизации - продолжительность разделения или чувствительность анализа, качество разделения или его экономичность (расход растворителей, адсорбента и пр.) - связан с определенными трудностями, так как эти критерии часто взаимно исключают друг друга. Для решения оптимизационных задач, очевидно, необходима некая теоретическая модель, в рамках которой можно было бы предсказывать поведение системы при изменении тех или иных параметров.

В области ОФ ВЭЖХ белков и пептидов такая модель, обладаю-

шая удовлетворительной предсказательной силой, появилась только в 1985 году (55, I30). Являясь по сути полуэмпирической, она, тем не менее, хорошо объясняет множество разрозненных фактов, которые часто не поддавались интерпретации. Важнейшее ее достоинство - описание поведения хроматографической системы в режиме градиентной элюции, т.е. наиболее характерном для ОФ ВЭЖХ полипептидов. Оптимизационная модель не включает в себя в явном виде химическую сторону удерживания (свойства адсорбента, состав подвижной фазы, аминокислотный состав и структуру полипептида), которую мы уже рассмотрели достаточно подробно. Она позволяет вычислять только ширину пика (и производные от нее параметры - пиковую емкость колонки и относительную высоту пика) как функцию от таких экспериментальных условий, как размеры колонки, крутизна градиента, скорость элюции, молекулярный вес полипептида. Модель была проверена для водно-ацетонитрильных элюентов с трифторацетатом морфолина (рН 2,2) на колонках Ø6,2 x 80 мм с ОФ С8 (5 мкм; поры 15 нм) при 40° по полипептидам с молекулярной массой 300-20000 и показала хорошее соответствие между теорией и экспериментом (I30). ОФ С4 с порами 30 нм расширяет диапазон молекулярных масс до 80000 (55). Основной характеристикой хроматографической системы в оптимизационной модели является пиковая емкость (*peak capacity*, PC) колонки, в отличие от принятой характеристики системы при изократической элюции - эффективности колонки. Величина пиковой емкости при градиентном элюировании вычисляется как:

$$PC = \frac{F \cdot t_g}{4\sigma} \quad (4)$$

где F - скорость подвижной фазы, t_g - продолжительность градиента, σ - дисперсия хроматографического пика (55). PC численно равна общему количеству пиков на хроматограмме (с дисперсией σ),

когда коэффициент разделения соседних пиков равен 1. σ вычисляются как функция от экспериментальных условий и молекулярной массы полипептида. Математическое выражение для σ (оно очень громоздкое и поэтому мы его не приводим) содержит в себе также три эмпирических параметра, характеризующие отклонение системы от "идеальной". Они определяются экспериментально для конкретных подвижной и неподвижной фаз (55). Рассмотрим теперь основные выводы, следующие из оптимизационной модели, и их соответствие литературным данным.

Скорость подвижной фазы. Влияние этого параметра на РС колонки объясняется в терминах диффузии и связано с молекулярной массой макромолекулы. Так, для указанных выше колонок максимальная РС, вычисленная для полимеров с $M=10^3$ и $M=10^4$ при элюировании в линейном градиенте концентрации ацетонитрила, достигается соответственно при скоростях элюции 2,5 и 0,25 мл/мин·см² (130). Чем выше молекулярная масса полимера, тем резче зависимость РС от скорости элюции и тем выше максимальное значение РС. Если РС_{макс} для полимера с $M=10^3$ составляет 120, то для $M=10^4$ она равна 310. При скорости потока 5 мл/мин·см² в обоих случаях РС=100. Анализ зависимостей РС колонки от скорости потока и молекулярной массы хорошо объясняет хроматографический "артефакт", который состоит в том, что эффективность разделения полипептидов мало зависит от длины колонки, т.е. от ее эффективности, определенной по низкомолекулярному веществу (52, 100, 106). Это действительно так, когда на длинной колонке разделение полипептидов проводят за то же время, что и на короткой, соответственно увеличив линейную скорость подвижной фазы (другими словами, не в оптимальных условиях). Эффект отсутствия влияния длины колонки на качество разделения тем заметнее, чем больше молекулярная масса полимера. При сохранении

линейной скорости потока, соответствующей $PC_{\text{макс}}$, удлинение колонки сопровождается возрастанием PC близким к пропорциональному, но при этом, конечно, пропорционально увеличивается и время разделения ($I30$). Сравнение вычисленных и экспериментально найденных значений PC по лизоциму и триптическим пептидам цитохрома C для 10 разных по размерам колонок с различными коммерческими фазами показывает их хорошее совпадение (52), что подтверждает практическую полезность предложенной модели.

Градиент концентрации органического растворителя. Третьим экспериментальным параметром после молекулярной массы и скорости подвижной фазы, рассматриваемым в рамках оптимизационной модели, является продолжительность градиента, т.е. время, за которое концентрация органического растворителя достигает заданного конечного значения. Иногда применяют другой способ описания градиента, выражая его через скорость возрастания концентрации как $\%B/\text{мин}$, где B - органический растворитель в бинарной подвижной фазе. Изменение концентрации B во времени может осуществляться по разным законам, но, поскольку оптимизационная модель оперирует лишь линейным градиентом, мы далее под термином "градиент" будем иметь в виду только его.

Продолжительность градиента t_g , как и скорость подвижной фазы, определяет PC колонки в зависимости от молекулярной массы полипептида. Влияние t_g на PC тем больше, чем выше M . Вычисленные значения $PC_{\text{макс}}$ для полипептидов с $M=10^3$ и $M=10^4$ в "стандартных условиях" - колонка $\emptyset 6,2 \times 80$ мм, градиент ацетонитрила от 5 до 60% - соответствуют t_g , равным 100 и 1000 мин ($I30$). Поскольку на практике ОФ ВЭЖХ белков проводят обычно за 30-60 мин, то $PC_{\text{макс}}$ колонки не достигают, и реальная PC примерно в три раза меньше $PC_{\text{макс}}$. Этот вывод был убедительно доказан эксперимен-

тальной проверкой по пяти белкам в интервале молекулярных масс 12000-80000 (52). Зависимость РС колонки от М полимера может обсуждаться в рамках модели стехиометрического вытеснения (54, 100).

Таким образом, скорость подвижной фазы и продолжительность градиента наряду с "химическими" экспериментальными параметрами - тип и свойства ОФ, состав элюента - должны и могут активно учитываться при оптимизации хроматографической системы. Подход к этому, в первом приближении, найден. По мнению авторов оптимизационной системы, есть все предпосылки для того, чтобы из полуэмпирической она стала теоретически строгой (55). Важным практическим результатом, вытекающим из данной модели, явилась методика оптимизации, заключающаяся в сочетании расчетных методов с минимальным числом предварительных экспериментов (130). Кроме того, с ее помощью показано, что для рутинной ОФ ВЭЖХ полипептидов, когда время разделения не должно превышать 20-40 мин, оптимальной будет колонка длиной около 80 мм (50, 130). Диаметр колонки, определяющий при фиксированной ее длине объем хроматографической полосы, должен составлять 6-7 мм при использовании традиционного детектора - УФ-фотометра - с объемом измерительной ячейки 8 мкл. Для повышения чувствительности диаметр колонки необходимо уменьшить с одновременным уменьшением объема ячейки детектора (130). Что касается адсорбента, то оптимальной ОФ является фаза с зернением 5 мкм и пористостью 15 нм для полимеров с М до 20000 и с порами 30-50 нм для белков с М до 100000 (130). Мелкозернистые адсорбенты (менее 5 мкм) несущественно повышают РС колонки, но значительно увеличивают ее гидродинамическое сопротивление. Нежелательно применять ОФ с зернением крупнее 5 мкм, так как это приводит к уменьшению оптимальной скорости элюции, которое в случае макромолекул особенно заметно из-за их медленной диффузии

(130). В заключение можно отметить, что основные выводы оптимизационной модели, по крайней мере качественно, хорошо согласуются с большинством экспериментальных данных, опубликованных ранее по ОФ ВЭЖХ белков и пептидов.

Температура колонки. Влияние температуры колонки в ОФ ВЭЖХ полипептидов изучено относительно мало. Как правило, температура при разделении равна 20-25° (комнатная), но в ряде случаев ее поднимают до 40-60° (35,36,50,56,66,67,130). Поскольку с повышением температуры гидрофобные взаимодействия усиливаются, казалось бы, время удерживания должно возрастать. Однако, практика ОФ ВЭЖХ пептидов показывает обратное (13). Уменьшение удерживания объясняют ослаблением взаимодействия с силанолами и возрастанием силы элюента в результате усиления взаимодействия молекул органического растворителя с гидрофобной поверхностью адсорбента (13). Повышение температуры улучшает массообмен и, в свою очередь, приводит к увеличению эффективности, но селективность при этом может уменьшиться (13). В ОФ ВЭЖХ белков влияние температуры на их хроматографическое поведение носит сложный характер (56,67), и даже в денатурирующих условиях не имеет простой интерпретации (54). Оно связано, главным образом, со структурными изменениями белков, проявляется в виде раздвоения пиков, каждому из которых соответствует своя конформация молекулы, зависит от состава подвижной фазы и типа адсорбента, от скорости элюции и продолжительности градиента (56,67). Иногда индивидуальный характер температурной зависимости удерживания позволяет улучшать селективность колонки (50). В условиях изократической элюции для цитохромов С было показано, что температура в интервале 25-65° довольно слабо влияет на их k' и максимальное удерживание наблюдается при 35-45° (66). В ОФ ВЭЖХ повышение температуры до 40-60°

часто используют для снижения вязкости элюента и понижения, тем самым, давления на входе колонки. Однако, при хроматографии белков и пептидов на коротких колонках при относительно малой линейной скорости потока даже для элюентов, содержащих пропанол, входное давление редко превышает 5 МПа и снижение его нецелесообразно. Особенно это касается хроматографов с обычными насосами, которые при низких давлениях заметно пульсируют, что отражается на стабильности нулевой линии детектора.

Потери белка на ОФ колонках. Этому вопросу в литературе уделяется довольно много внимания, но причины потери белка на колонках до сих пор окончательно не выяснены. Напротив, в ОФ ВЭЖХ пептидов выход материала, как правило, количественный. Исключением являются лишь те случаи, когда пептиды содержат относительно много положительно заряженных аминокислотных остатков, а силанолы неподвижной фазы недостаточно экранированы (76). Что касается белков, то их выход зависит от многих причин, определяется индивидуальными свойствами и колеблется от 100% до полной потери. Наблюдается некоторая корреляция между размерами пор адсорбента и молекулярной массой белков - пористость 30-50 нм предпочтительнее для высокомолекулярных белков (52, 53, 55, 100). Интересно, что "геометрические" соображения не объясняют количественный выход каталазы ($M=240000$) и ферритина ($M=450000$) при хроматографии на фазе с порами 10 нм (36). Оценка диаметров глобул этих белков (в приближении правильной сферы) по уравнению 3 дает соответственно 10 и 12 нм. Нам представляется вероятным, что в данном случае каталаза и ферритин хроматографируются в исключенном объеме, и адсорбция происходит только на внешней поверхности неподвижной фазы.

Обращает на себя внимание эффект "памяти" колонки, обнару-

женный для овальбумина (100). После насыщения (однократного) ОФ колонки овальбумином последний каждый раз элюировался в виде нормального пика в течение 12 градиентных циклов. Авторы объясняют это явление наличием разных по силе мест связывания белка. Не исключено, что эффект связан с широким распределением пористости неподвижной фазы. В этом случае молекулы белка, проникшие в узкие поры, по-видимому не успевали по стерическим причинам диффундировать наружу, выпадали в осадок при высокой концентрации органического растворителя и выходили из зерна лишь в следующих циклах.

Сравнение разных типов ОФ от С1 до С22 показывает, что больший выход достигается на фазах С3 или С4 (35,50,107). Это объясняют тем, что менее гидрофобные ОФ характеризуются меньшим удерживанием, т.е. белки элюируются при меньших концентрациях органического растворителя, и тем самым снижается опасность выпадения их в осадок. Однако, длина углеводородного радикала не является единственным определяющим фактором. Так, целый ряд белков с М от 5400 до 450000 успешно хроматографировали на фазе С18 без существенной потери (36,37,45,59,66).

Выход белка зависит и от параметров градиентного элюирования - скорости потока и крутизны градиента. Неожиданный результат получен в работе (50). При хроматографии рибонуклеазы А, альбумина и овальбумина на ОФ С3 (поры 30 нм) уменьшение скорости потока с 1 до 0,25 мл/мин вызвало уменьшение выхода этих белков соответственно с 94 до 79%, с 87 до 70% и с 78 до 4% (крутизна градиента была равна 1%/мл). Уменьшение крутизны градиента с 1%/мл до 0,25%/мл (скорость потока 0,5 мл/мин) сопровождалось уменьшением выхода белков с 80 до 63% для альбумина и с 46 до 11% для овальбумина. Выход рибонуклеазы повысился с 79 до 83%.

Мы не будем останавливаться здесь на обсуждении влияния состава элюента на выход белка, так как этот вопрос рассматривался в разделе 2.2. Отметим лишь, что оптимизация системы по выходу белка является комплексной задачей, требующей учета всех химических и нехимических факторов, и решается она пока, в основном, эмпирическим путем.

Нагрузка на колонку в ОФ ВЭЖХ полипептидов. Влияние нагрузки на эффективность разделения определяет препаративные возможности метода. В аналитической хроматографии этот вопрос имеет значение в плане необходимого уменьшения объема колонки до максимального отношения вес пробы/вес адсорбента с сохранением достаточной эффективности. При таком условии, очевидно, амплитуда хроматографического пика будет наибольшей, т.е. будет достигнута максимальная чувствительность.

В ОФ ВЭЖХ низкомолекулярных соединений эффективность колонки начинает линейно падать при нагрузках больше 1-10 мкг/г адсорбента (131). Эту величину можно считать допустимой нагрузкой и условно назвать границей между аналитической и препаративной хроматографией. Для белков она значительно выше и составляет примерно 1 мг/г адсорбента (45,100). Пептиды, видимо, характеризуются некоей промежуточной величиной. При нагрузках, больше чем 1 мг/г, эффективность колонки линейно уменьшается. Это было показано на примере сывороточного альбумина и овальбумина (100). Возможность работы с высокими нагрузками в случае пептидов и особенно белков является важным условием с точки зрения микроколоночной хроматографии. Использование ее существенно облегчает детектирование за счет увеличения отношения сигнал/шум, и это начинает успешно применяться на практике (41,77,87). Причина высокой допустимой нагрузки, по нашим данным, не исследована. Она лишь

качественно обсуждается в рамках представлений о многоточечном связывании макромолекул с поверхностью неподвижной фазы (54,100).

Предельная нагрузка для ОФ по овальбумину составляет около 30 мг/г и мало зависит от длины углеводородного радикала фазы (107). Отметим, что некоторые адсорбенты, используемые в гидрофобной хроматографии, обеспечивают в несколько раз большую емкость - по гемоглобину 140-210 мг/г, - и она зависит от типа ионпарного агента (116). Высокая предельная емкость ОФ - важное ее свойство, позволяющее на обычных колонках быстро концентрировать довольно большие количества белка, удаляя при этом несорбируемые на ОФ компоненты раствора (соли, сахарозу, мочевины и пр.).

Практика использования ОФ ВЭЖХ белков и пептидов. В зависимости от поставленной задачи хроматографию обычно делят на аналитическую и препаративную. Как та, так и другая в определенной мере могут быть оптимизированы по различным критериям, и целый ряд таких критериев для них является общим. К таким критериям можно отнести экономичность, трудоемкость, продолжительность по времени, универсальность и др. Конечная цель и выбранные критерии определяют стратегию использования ОФ ВЭЖХ и ее место среди других методов разделения. За время существования ОФ ВЭЖХ по отношению к белкам и пептидам были найдены некие границы применимости этого метода, разработаны практические приемы ее использования, многие из которых носят общий характер. К таким, например, относятся:

- градиентное элюирование для белков (изократическая элюция целесообразна лишь для коротких пептидов);
- изменение селективности путем изменения рН подвижной фазы и введения ионпарных агентов;
- применение коротких колонок для разделения белков.

На всех этих вопросах мы уже более или менее подробно останавливались, и сейчас нам представляется интересным рассмотреть, как с помощью ОФ ВЭЖХ решаются некоторые конкретные задачи.

Высокая разрешающая способность ОФ ВЭЖХ дает возможность выделять индивидуальные пептиды из природных источников или гидролизатов белков, не привлекая для этого другие методы разделения. Так из гипофиза крысы выделили две основные формы кортикотропина (30). Выделение включало в себя: гомогенизацию гипофиза в 1 М соляной кислоте; удаление кислоты и концентрирование пептидов на маленькой колонке с ОФ; ОФ ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте; рехроматографию в градиенте ацетонитрила с 0,13% гептафтормасляной кислоты. В этом случае оказалось достаточным провести одну рехроматографию с другим ионпарным агентом, чтобы в результате изменения селективности получить гомогенные продукты. В этом смысле перфторкарбоновые кислоты весьма полезны - меняя их, можно варьировать селективность в широком диапазоне (39).

Так же успешно с помощью всего двух хроматографий были получены триптические пептиды рецептора трансферрина (77) и Na^+, K^+ -зависимой АТФазы (87). Селективность при рехроматографии изменяли изменением рН подвижной фазы. Первую хроматографию проводили при нейтральном рН, вторую - при рН 2 (0,1% трифторуксусная кислота). Разделения делали в градиенте ацетонитрила. Конечной целью работ являлось секвенирование пептидов, и использование на второй стадии ОФ ВЭЖХ в летучем элюенте позволило избежать дополнительной процедуры выделения пептидов. Трифторуксусная кислота выгодно отличается в этом плане от других летучих кислот. Муравьиная кислота, например, при секвенировании приводит к артефактам (86). ОФ ВЭЖХ в настоящее время - общепринятый способ

подготовки пептидов и белков для секвенирования (37, 71, 76-78, 86, 87).

Еще одна иллюстрация использования двух хроматографий для полного разделения сложной смеси - выделение рибосомальных белков (46). В этом случае первую хроматографию проводили на ОФ С18 в градиенте 2-пропанола (рН 2), а вторую - на ОФ С3 в градиенте ацетонитрила (рН 2), т.е. изменяли селективность изменением органического растворителя и типа стационарной фазы.

При выделении белков перед ОФ ВЭЖХ иногда прибегают к грубому фракционированию. Так, для получения интерферонов из культуры клеток перед ОФ хроматографией проводили гель-фильтрацию (47), после чего интерфероны последовательно хроматографировали на различных ОФ при рН 7,5 и 4,0. Всего было выделено 8 биологически активных белков с молекулярными массами от 17600 до 26000. Предварительная гель-фильтрация может быть полезна также при очистке средних по размеру белков (24), бромциановых фрагментов белков (74).

Для разделения сложнейших смесей большие перспективы имеют многоколоночные системы с последовательным соединением колонок, где ОФ ВЭЖХ используют на последней стадии. Джеймс и Беннетт (80) применили для выделения пептидов из мозга следующую процедуру: концентрирование на ОФ; фракционирование пептидов на кислые, основные и нейтральные на ионообменниках; разделение каждой фракции методом ОФ ВЭЖХ. Такахашаи с сотр. (78) триптический гидролизат легкой цепи человеческого иммуноглобулина D разделяли сначала на катионообменнике (ВЭЖХ), а затем каждый пик или группу пиков рехроматографировали ОФ ВЭЖХ, после чего пептиды секвенировали. В другой работе они разделили триптический гидролизат церулоплазмينا человека на анионообменнике в режиме градиентной

ВЭЖХ на 10 фракций (по времени) и каждую фракцию подвергли ОФ ВЭЖХ (71). Всю процедуру проводили в автоматическом варианте на специально разработанной аппаратуре. Хроматограф обеспечивал хорошую воспроизводимость, а его производительность составила несколько сотен пиков разделенных пептидов за 16 часов. Аналогичное устройство для автоматического разделения белков было предложено ранее Копацевичем и Ренье (132). В настоящее время подобная автоматизированная система производится, например, фирмой Фармация (Швеция).

2.6. Заключение.

Анализ литературных данных показывает, что ОФ ВЭЖХ белков и пептидов к настоящему времени выделилась в самостоятельную область хроматографии. Причины выделения связаны со специфическим строением этих соединений. С одной стороны, молекулы полипептидов состоят всего из 20 аминокислотных остатков, что существенно упрощает подход к описанию их хроматографического поведения. Так, разработана эмпирическая модель, позволяющая предсказывать удерживание неструктурированных пептидов на основании аддитивности вкладов аминокислотных остатков в удерживание. Поскольку такие пептиды составляют огромный класс соединений, то сам факт количественного описания их хроматографического поведения является в хроматографии беспрецедентным случаем. С другой стороны, белки и пептиды представляют собой полимеры, и классические теории хроматографии, разработанные для низкомолекулярных веществ, без учета этого обстоятельства использоваться быть не могут. Зависимость хроматографических свойств полипептидов от их молекулярного веса нашла отражение, по крайней мере, в двух эмпирических моделях, обладающих удовлетворительной предсказательной силой. В их основе лежат представления о многоточечном взаимодействии по-

лимерной молекулы с поверхностью неподвижной фазы. И, наконец, последнее, что выделяет ОФ ВЭЖХ полипептидов, это наличие у них определенной пространственной структуры. Вторичная и третичная структуры полипептидов (главным образом белков) характеризуют поверхность контакта молекулы с адсорбентом, силу этого взаимодействия. В свою очередь, в условиях ОФ хроматографии сама структура претерпевает значительные изменения. Данный процесс сложен, и может только приблизительно интерпретироваться в терминах физической химии макромолекул. В настоящее время теория ОФ хроматографии нативных белков практически отсутствует. Тем не менее, ОФ ВЭЖХ для разделения белков используется довольно успешно.

Специфическое строение полипептидов позволяет наряду с детекторами общего назначения применять селективные детектирующие системы, основанные на регистрации их дериватов. Все большее распространение получает многопараметровое детектирование, которое сочетает в себе высокую чувствительность с высокой селективностью, а также дает возможность получать некоторую информацию о структуре. В совокупности с химическими и ферментативными методами расщепления полипептидов ОФ ВЭЖХ становится основным методом расшифровки их первичной структуры.

В процессе развития ОФ ВЭЖХ белков и пептидов были сформулированы главные требования, предъявляемые к адсорбентам и составу подвижной фазы. Разработан ряд приемов прогнозируемого изменения селективности разделения путем изменения свойств ОФ и состава элюента. На практике они позволяют разделять очень сложные смеси пептидов, и возможности ОФ ВЭЖХ в этом отношении, видимо, больше, чем, например, электрофореза. Пептидное картирование белков с помощью ОФ ВЭЖХ находит все большее применение в структурных исследованиях. По сравнению с другими методами разделения ОФ

ВЭЖХ является, пожалуй, самым быстрым и экономичным способом выделения гомогенных полипептидов в препаративном количестве.

На основании литературных данных, как экспериментальных, так и теоретических, к основным особенностям ОФ ВЭЖХ белков и пептидов можно отнести следующие:

- необходимость градиентного элюирования;
- применение ОФ с пористостью более 10 нм;
- для осуществления 30-40 минутных разделений длина колонки может не превышать 50-100 мм;
- допустимая нагрузка на адсорбент в несколько десятков раз выше, чем в случае низкомолекулярных соединений;
- лучшее разделение достигается, как правило, при pH 2.

Все эти особенности должны учитываться при разработке специализированных хроматографов, с помощью которых можно в полной мере реализовать возможности ОФ ВЭЖХ по отношению к белкам и пептидам. Очевидно, что оптимальным будет тот хроматограф, который соответствует необходимому масштабу работ.

В химии белка большой объем работ падает на изучение его первичной структуры. Существует целый комплекс методов, позволяющих проводить эти исследования с количеством материала, не превышающим 10^{-8} - 10^{-10} моля, и для данных целей это количество определяет необходимый масштаб. Можно легко показать, что большинство высокоэффективных хроматографов общего назначения, предназначенных для работы с колонками объемом 3-6 мл (объем измерительной ячейки детектора 8 мкл, плунжерные насосы большой производительности) этому масштабу не соответствуют. Они оптимальны для работ с 10^{-6} - 10^{-7} молями полипептида, так как допустимая нагрузка составляет около 100 наномоль/г. Использование этих колонок для работы с 10^{-9} моля полипептида имеет несколько недостат-

ков:

- низкое отношение сигнал/шум, что требует особой чистоты всех компонентов подвижной фазы;
- низкая концентрация вещества в элюате, что часто приводит к его потерям в результате адсорбции на стенках лабораторной посуды;
- повышенный расход растворителей и адсорбентов (последнее связано с относительно малым сроком службы колонки при рН 2).

Понятно, что перечисленные недостатки устраняются уменьшением объема хроматографической колонки с соответствующим изменением аппаратного оформления. Эта проблема является комплексной. Даже к настоящему времени известно лишь несколько работ по микроколоночной ОФ ВЭЖХ белков и пептидов, они носят частный характер, и поэтому исследования в данном направлении представлялись нам актуальными.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Материалы

Хроматографические материалы. Для микроколоночной хроматографии использовали силикагель *Silasorb 600* (Силасорб 600) (Chemapol, ЧССР) и обращенные фазы: *Nucleosil 5 C₈* и *C₁₈* (Нуклеосил C₈ и C₁₈) (*Macherey-Nagel*, ФРГ); *Lichrosorb RP8* и *RP18* (Лихросорб C₈ и C₁₈) (*Merk*, ФРГ); *Servachrom Si100=Polyol RP8* (Сервахром C₈) (*Serva*, ФРГ). Пористый микросферический силикагель с фазой C₁₈ (ПМСС-C₁₈) синтезирован Ю.И.Чумаковым и Х.Ф.Умеровой и образцы №61 и №62 были любезно нам предоставлены. Для препаративной гельфильтрации РНКазы использовали Сефадекс Г-25 (тонкий) (*Pharmacia*, Швеция). Для препаративной ионообменной хроматографии РНКазы использовали КМ-целлюлозу CM-52 (*Whatman*, Англия). Для очистки РНКазы от ионов хлора использовали *Dowex 2 X 8* (100-200 меш) (*Serva*, ФРГ).

Пептиды и белки. Брадикинин (*Reanal*, ВНР), инсулин быка (*Serva*, ФРГ), панкреатическая рибонуклеаза А (РНКазы) (Ленинградское ПО мясной промышленности, г.Ленинград), ТРСК-трипсин (*Sigma*, США), карбоксиметилированная В-цепь инсулина быка (*Serva*, ФРГ). Белок Е оболочки вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) был выделен и любезно предоставлен Е.К.Прессманом.

Реагенты для химической модификации РНКазы. 4-(*N*-2-хлорэтил-*N*-метиламино)-бензиламидные производные динуклеотидов $CClRCH_2NHd(pCpT)$ и $CClRCH_2NHd(pTpA)$ были синтезированы и любезно предоставлены В.Н.Буневой. β-меркаптоэтанол (*Merk*, ФРГ), моноиодуксусная кислота (*Reanal*, ВНР).

Реагенты для химической модификации аминокислот и аминокислоты. I-диметиламинонафталин-5-сульфонилхлорид (ДНС-хлорид) (*Merk*, ФРГ), фенилизотиоцианат (ФИТЦ) (*Pierce*, США). Для иден-

тификации производных аминокислот на хроматограммах использовали наборы ДНС-аминокислот (*Serva*, ФРГ) и фенилтиогидантоиновых (ФТГ) производных аминокислот (*Pierce*, США). Для синтеза фенилтиокарбомаильных (ФТК) производных аминокислот использовали стандартную смесь аминокислот *Hamilton Type H* (*Hamilton*, США).

Очистку триэтиламина от первичных и вторичных аминов производили перегонкой над нингидрином (*Chemapol*, ЧССР).

Органические растворители и другие компоненты элюентов.

Ацетонитрил для ВЭЖХ (*Merk*, ФРГ), трифторуксусная кислота (ТФУ) (*Pierce*, США), трис-(оксиметил)-аминометан (Трис) (*Merk*, ФРГ), 2-пропанол, мочеви́на, перхлорат лития и однозамещенный фосфат калия квалификации "осч".

Все остальные химические реактивы имели квалификацию не ниже "хч".

3.2. Упаковка микроколонок для ВЭЖХ.

Упаковку микроколонок проводили широко используемым суспензионным методом (10, 126) в нашей модификации. Перед упаковкой адсорбенты тщательно освобождали от субмикронных частиц путем отстаивания 2-3% ацетоновой суспензии с последующей декантацией надосадочного слоя. Эту процедуру проводили до тех пор, пока супернатант не становился визуально прозрачным и граница оседающей суспензии не становилась резкой. После такой подготовки адсорбента суспензию разбавляли ацетоном до концентрации 10 мг/мл. Суспензию получали путем встряхивания герметично закрытой стеклянной бутылки в течение 2-4 мин. Ультразвуковую обработку не применяли. Размер частиц адсорбента контролировали с помощью микроскопа при увеличении X400 с мерной сеткой (шаг 1 мкм).

Установка для упаковки колонок состояла из однократного насоса плунжерного типа ММС с головкой 2С (г.Брно, ЧССР) и резер-

вуара для суспензии ($\varnothing 8 \times 400$ мм), изготовленного из нержавеющей стали. Резервуар был соединен с насосом капилляром из нержавеющей стали ($\varnothing 0,5 \times 1000$ мм). В линию высокого давления через T-образное соединение был установлен манометр на максимальное давление 40 МПа.

Упаковку колонок производили "снизу вверх", вытесняя суспензию адсорбента из резервуара в колонку со скоростью 2,8-3,2 мл/мин (для 5 мкм адсорбентов). В случае силикагеля суспензию вытесняли ацетоном, в случае ОФ-адсорбента - метанолом. Упаковку прекращали после прокачивания через колонку 50-60 мл растворителя. Давление в конце упаковки составляло 20-40 МПа.

3.3. Очистка РНКазы.

Очистку РНКазы проводили по методу Таборски (133). 450 мг РНКазы растворяли в 3 мл 1 М Трис-НСI (рН 8,1), наносили на колонку с Сефадексом Г-25 ($\varnothing 16 \times 290$ мм) и элюировали 0,05 М Трис-НСI (рН 8,1) со скоростью 0,4 мл/мин. УФ-поглощение элюата регистрировали с помощью детектора хроматографа "Милихром". РНКазы элюировались в исключенном объеме.

Пик РНКазы разбавляли в три раза водой (до 30 мл) и наносили на колонку с КМ-целлюлозой ($\varnothing 9,5 \times 190$ мм). Промывали колонку 0,005 М Трис-НСI (рН 8,1). Элюцию проводили со скоростью 0,4 мл/мин. Элюент: линейный градиент хлористого натрия от 0 до 0,1 М в 0,005 М Трис-НСI (рН 8,1). Объем градиента составлял 300 мл.

Для концентрирования пик РНКазы разбавляли в 4 раза водой и наносили на колонку с КМ-целлюлозой ($\varnothing 9 \times 12$ мм) со скоростью 0,5 мл/мин и затем элюировали 0,3 М хлористым натрием.

Обессоливание РНКазы проводили на колонке с Сефадексом Г-25, уравновешанной 0,01 М бикарбонатом аммония (рН 8). Сушили РНКазу лиофилизацией. Выход составил 95 мг. Поглощение 1% раствора

РНказы при 280 нм (рН 8) было равно 7,22, что соответствует содержанию основного вещества 99% (по данным из работы (I34)

$$A_{1\%}^{280 \text{ нм}} = 7,3).$$

3.4. Окисление РНказы надмуравьиной кислотой.

Очистка РНказы от следов ионов хлора. 180 мкл раствора РНказы, содержащие 10 мг РНказы, наносили на колонку с Dowex 2 X 8 в ацетатной форме (Ø9 x 50 мм) и элюировали РНказу 0,01 М уксусной кислотой со скоростью 0,2 мл/мин. Элюат, содержащий РНказу, сушили лиофилизацией. Выход составил 8,3 мг.

Окисление РНказы (I35). 8 мг РНказы, очищенной от ионов хлора, растворяли в 200 мкл 99% муравьиной кислоте и охлаждали до 0°. Смешивали 20 мкл 30% перекиси водорода с 380 мкл 99% муравьиной кислоты, выдерживали 2 часа при 22°, а затем 30 мин при 0°. Оба раствора сливали вместе и выдерживали при 0° 2,5 часа. Во время реакции отбирали аликвоты по 5 мкл, разбавляли их водой в 50 раз и замораживали. После окончания реакции аликвоты анализировали (рис. I5).

3.5. Карбоксиметилирование РНказы.

Восстановление РНказы. 20 мг РНказы растворяли в 2 мл 7 М мочевины и доводили рН раствора до 8,5 добавлением 10 М КОН. К полученному раствору добавляли 10 мкл β-меркаптоэтанола и выдерживали смесь при 25° 4-5 часов. Во время реакции отбирали аликвоты по 2 мкл, которые разбавляли в 10 раз 1% ТФУ и анализировали (рис. I7).

Карбоксиметилирование восстановленной РНказы. 140 мг йодуксусной кислоты растворяли в 1 мл 7 М мочевины и добавляли 10 М КОН до рН 7. Полученный раствор приливали по 200 мкл к раствору восстановленной РНказы, нейтрализуя выделяющуюся йодистоводородную кислоту 1 М КОН.

Данная методика карбоксиметилирования является нашей модификацией методики, описанной в (136).

Карбоксиметилированную РНКазу очищали на колонке с Сефадексом Г-25 ($\Phi 16 \times 110$ мм). Элюировали 0,05 М бикарбонатом аммония (рН 8,2) со скоростью 0,4 мл/мин.

3.6. Реакция РНКазы с алкилирующими реагентами.

Реакцию проводили в 0,3 М хлориде натрия при рН 8,0 в течение 7-8 часов при 40° . В реакции с $C\ell RCH_2NHd(pCpT)$ концентрация РНКазы составляла $2,2 \cdot 10^{-3}$ М, а реагента - $1,05 \cdot 10^{-2}$ М. В реакции с $C\ell RCH_2NHd(pTpA)$ концентрация РНКазы была $3,74 \cdot 10^{-3}$, а реагента - $6,36 \cdot 10^{-3}$ М.

Реакционные смеси обессоливали на колонке с Сефадексом Г-25 ($\Phi 16 \times 200$ мм). Элюировали со скоростью 0,4 мл/мин 0,005 М Трис-НСІ (рН 8,0).

Разделение продуктов реакции и концентрирование проводили на колонках с КМ-целлюлозой по п.3.3.

Карбоксиметилирование алкилированной РНКазы проводили по п.3.5.

3.7. Триптический гидролиз белков.

Гидролиз КМ-РНКазы. К 200 мкл раствора КМ-РНКазы (3 мг/мл) в 0,05 М бикарбонате аммония добавляли 10 мкл раствора трипсина (1 мг/мл) в 0,1% ТФУ. Реакцию проводили 12-15 часов при 37° . Гидролиз алкилированной РНКазы проводили также.

Гидролиз белка Е оболочки ВКЭ. Гидролиз проводили трипсином, очищенным по методу Титани с сотр. (49) (см. рис. 29). К 4,9 мг белка Е, растворенном в 2,9 мл 0,1 М хлорид натрия-0,02 М Трис-НСІ (рН 8)-0,001 М ЭДТА-1% Тритон Х100 добавляли 100 мкл элюата после ОФ ВЭЖХ, содержащих 100 мкг трипсина. Гидролиз вели при 37° . Через 16 часов добавляли еще 100 мкг трипсина и вели

гидролиз еще 8 часов. Очистку трипсина проводили непосредственно перед гидролизом, так как в хроматографическом элюате он быстро инактивируется (49).

3.8. Кислотный гидролиз триптического пептида KM-PHказы

Около 4 наномолей триптического пептида KM-PHказы выделяли методом ОФ ВЭЖХ (пептид (*))₀ на рис. 27В), упаривали досуха током аргона в стеклянной ампуле, растворяли в 50 мкл 6 М HCl и ампулу запаивали. Гидролиз вели 24 часа при 105°. Затем ампулу вскрывали и упаривали HCl струей аргона, осадок растворяли в 50 мкл воды и снова упаривали.

3.9. Получение ДНС-аминокислот.

Гидролизат пептида (см. п. 3.8) растворяли в 100 мкл 0,04 М карбоната натрия, добавляли 50 мкл 0,008 М ДНС-хлорида в ацетонитриле и выдерживали в темноте 30 мин при 40°. Реакционную смесь разбавляли в два раза 0,1 М Трис-ацетатом (pH 7,7) и 5 мкл хроматографировали (см. рис. 28). Данная методика является нашей модификацией методики Левиной и Назимова (137).

3.10. Получение ФТК-аминокислот.

Получение ФТК-аминокислот проводили по методу Хейнриксона и Мередита (138). 10 мкл раствора 18-ти аминокислот (Hamilton Type H), содержащих по 25 наномолей каждой аминокислоты, упаривали досуха струей аргона в полипропиленовой пробирке на 1,5 мл. Осадок растворяли в 100 мкл буферного раствора (ацетонитрил-пиридин-триэтиламин-вода=10:5:2:3), упаривали досуха и опять растворяли в 100 мкл этого раствора. Добавляли 5 мкл фенилизотиоцианата и выдерживали при 22° 5 мин. Упаривали растворитель струей аргона и отгоняли ФИТЦ в вакууме (0,01 мм рт ст) в течение 10 мин. Осадок ФТК-аминокислот растворяли в 250 мкл 0,05 М ацетата аммония в 50% метаноле и 3 мкл хроматографировали при 60° (см. рис. 36).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Разработка метода высокоэффективной жидкостной микроколоночной хроматографии.

Выбор масштаба хроматографии. К моменту начала настоящей работы, в 1978 году, в микроколоночной жидкостной хроматографии использовались, как правило, "мягкие" адсорбенты ионообменного типа (I-6), которые, несмотря на малый размер зерна (5-15 мкм), не могли обеспечить высокую эффективность колонки. Первые попытки применения "твердых" микрочернистых адсорбентов в микроколоночной хроматографии также не дали желаемого результата - эффективность микроколонок не превышала 500-700 теоретических тарелок (т.т.) (I39), тогда как эффективность "стандартных" колонок Ø4,6 x 250 мм достигала 20000 т.т. Тем не менее, известные преимущества микроколоночной хроматографии - высокая чувствительность и экономичность - оказались мощным стимулом для продолжения работ в этом направлении. Проблема эффективности микроколонок была решена в работах ряда лабораторий, в том числе и нашей в конце 70-х годов. Сейчас микроколоночная ВЭЖХ является общепринятым методом, о чем свидетельствует целый ряд обзоров и монографий (I26, I40-I43).

Одной из целей данной работы являлось создание метода МС ВЭЖХ, пригодного для рутинных исследований, обеспечивающего высокие аналитические характеристики и не требующего дорогостоящей аппаратуры. В начале разработки требовалось задать коэффициент миниатюризации. Он был выбран из следующих соображений. Анализ литературы показывает, что для проведения большинства разделений достаточна эффективность колонки 5000-7000 т.т. (I44-I47). При этом для вещества с $k' = 10$ пиковая емкость такой колонки составляет около 50 пиков (I48). С другой стороны, современные методы упаковки колонок позволяют получать для адсорбентов

зернением 5 мкм (адсорбенты с размером зерна 3 мкм используются в ВЭЖХ относительно редко) ВЭТТ = 10-15 мкм. Отсюда следует, что длина колонки, пригодной для рутинных анализов, должна быть 50-100 мм.

Объем колонки выбирали из необходимости сохранения ее эффективности для малоудерживаемого вещества ($k' = 1$) с учетом размывания хроматографической полосы в кювете детектора. В качестве детектора использовали двухлучевой микроспектрофотометр (диапазон длин волн 190-360 нм) с Z-образной кюветой объемом 1,8 мл ($\emptyset 1,2 \times 1,6$ мм), разработанный и изготовленный при участии автора в Сибирском отделении АН СССР. Динамический объем кюветы определяли экспериментально (рис. 1). Дисперсия кюветы вместе с входным капилляром (σ_k) оказалась равной 0,3-0,5 мл. Допуская, что вклад σ_k в дисперсию хроматографического пика не должен превышать 10% (т.е. дисперсия пика σ_n вещества с $k' = 1$ должна быть больше 4 мл), вычисляли минимально возможный объем колонки (V_k) с $N = 5000$ т.т. по уравнению (149):

$$V_k = \frac{1,3 \cdot \sigma_n \sqrt{N}}{1 + k'} \quad (5)$$

где $\sigma_n = V_0 \cdot N^{-\frac{1}{2}} \cdot (1 + k')$ и $V_0 = 0,75 \cdot V_k$ - свободный объем колонки (для адсорбентов с 75%-ой пористостью). При данных значениях параметров $V_k \approx 0,2$ мл, что соответствует колонке с размерами $\emptyset 2 \times 62$ мм (капилляры из нержавеющей стали $\emptyset 2$ мм выпускаются промышленностью). Такая колонка была взята нами в качестве основной колонки хроматографа. По сравнению со "стандартной" колонкой, применяемой в ВЭЖХ ($\emptyset 4,6 \times 250$ мм), ее объем меньше в 20 раз, и это дало нам основание назвать ее "микроколонкой". Очевидно, что подобная классификация носит условный характер.

Для адсорбентов с зернением 5 мкм оптимальная линейная ско-

рость потока в зависимости от вязкости подвижной фазы равна 20-50 мкл/мин·мм² (I45, I50), и при диаметре колонки 2 мм объемная скорость потока равна соответственно 60-150 мкл/мин. Для обеспечения таких скоростей потока насос должен развивать давление на входе колонки длиной 60 мм с 5 мкм адсорбентом 2-4 МПа (I45, I50). С учетом этих требований в Сибирском отделении АН СССР был разработан насос шприцевого типа с диапазоном скоростей 2-600 мкл/мин и предельным давлением 5 МПа. Шприц насоса выполнен из стекла, фторопласта, тантала и нержавеющей стали. Его объем равен 2,5 мл, что позволяет хроматографировать в изократическом режиме на колонке объемом 200 мкл вещества с $k' \leq 15$.

Устройство ввода пробы в колонку. В МК ВЭЖХ к устройству ввода пробы предъявляются особенно строгие требования, так как реализовать высокую эффективность микроколонок можно лишь при условии минимизации предколоночного размывания пробы, объем которой должен составлять в изократической хроматографии 1-5 мкл для колонки объемом 200 мкл (I49). Из многих известных способов ввода пробы мы остановились на способе, применявшемся ранее в низкоэффективной микроколоночной хроматографии с насосами шприцевого типа (5,6, I39). Суть этого, так называемого капиллярного способа, заключается в том, что проба забирается в капилляр насосом хроматографа, после чего капилляр соединяется со входом колонки и проба вводится в колонку потоком элюента. Данный способ ввода пробы имеет следующие преимущества:

- проба вводится непосредственно в колонку без каких-либо промежуточных капилляров;
- в колонку может быть введена вся проба, что не достигается в инжекторах петлевого и шприцевого типа;
- объем пробы в определенных пределах может быть произвольным,

что невозможно при использовании инжекторов с петлей фиксированного объема;

- конструкция устройства ввода пробы не требует высокой точности при изготовлении, является простой и дешевой.

Сравнение "капиллярного" способа ввода пробы с шприцевым и с вводом с помощью крана можно найти также в работе (151).

Единственный, пожалуй, недостаток капиллярного способа ввода пробы в нашем случае - необходимость остановки потока элюента. Остановка потока ведет к тому, что в хроматографии при повышенном давлении в начале элюции, пока давление не достигло рабочего, скорость подачи элюента всегда меньше номинальной, что, в конечном итоге, приводит к увеличению времен выхода пиков. Для веществ с малыми k' может наблюдаться артефактное увеличение площади пика, искажение его формы. Однако, указанный недостаток налагает ограничение на применение капиллярного способа ввода пробы только в эксклюзионной хроматографии при высоком давлении, когда искажение формы выходной кривой недопустимо, например, при вычислении молекулярно-массового распределения (10). В практической адсорбционной, распределительной и ионообменной хроматографии, где не требуется определения значения k' с высокой точностью, преимущества капиллярного способа ввода пробы реализуются в полной мере.

Точность и воспроизводимость дозирования пробы при капиллярном вводе определяется внутренним диаметром капилляра и характеристиками насоса. В разработанном нами устройстве внутренний диаметр капилляра составлял 0,2-0,3 мм при длине 20-50 мм (рис. 2). Шприц насоса - прецизионная стеклянная трубка с внутренним диаметром $9 \pm 0,01$ мм. Приводом шприца служил шаговый двигатель, и выталкиваемый (или забираемый) объем, соответству-

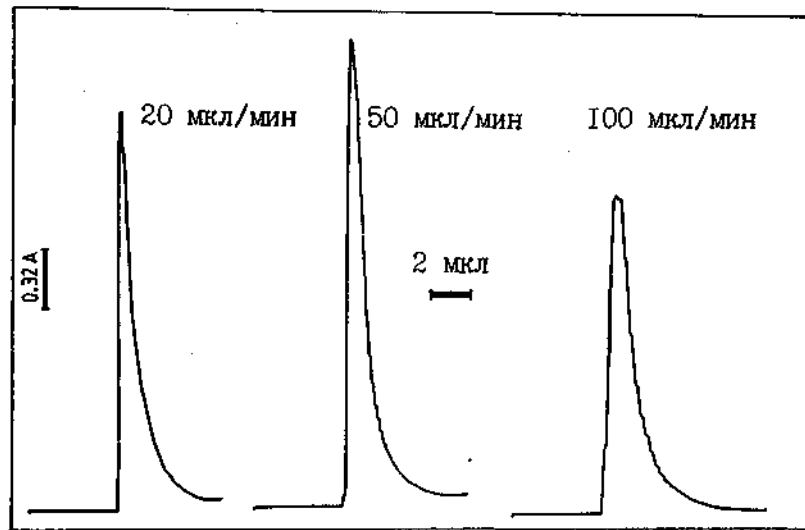


Рис. 1. Определение динамического объема кюветы детектора. В поток растворителя (метанол) на входе входного капилляра кюветы вводили 0,1 мкл раствора п-нитроанилина в метаноле. Здесь представлены результаты фотометрирования при разных скоростях потока.

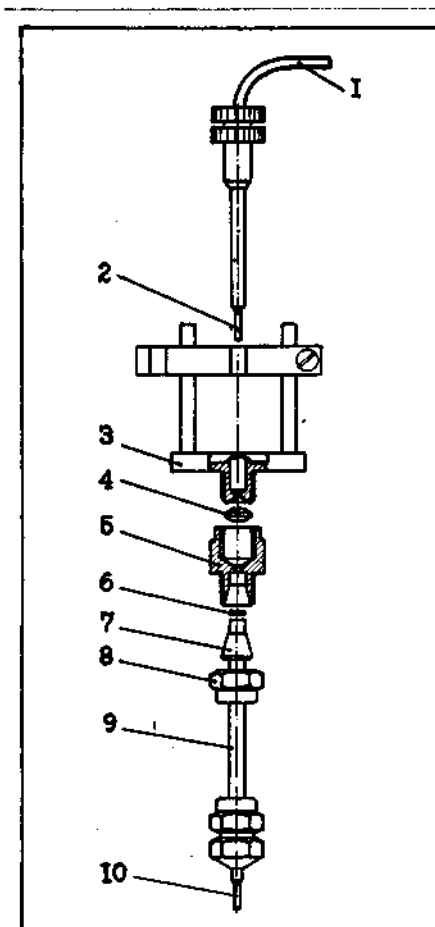


Рис. 2. Колонка из нержавеющей стали и устройство ввода пробы. 1 - капилляр из фторопласта (к насосу), 2 - стальной капилляр внутренним диаметром 0,2-0,3 мм, 3 - запорный винт, 4 - фторопластовое уплотняющее кольцо, 5 - корпус устройства ввода пробы, 6 - верхний фильтр, 7 - конус, 8 - гайка, 9 - корпус колонки, 10 - выходной капилляр внутренним диаметром 0,3 мм.

ющий одному шагу, равнялся 0,04 мкл. Устройство ввода пробы обеспечивало воспроизводимость дозирования пробы объемом 2 мкл со средним квадратичным отклонением 2% из 10 экспериментов (рис.4). Для проб большего объема воспроизводимость была выше.

Соединение колонки с насосом выполняли фторопластовым капилляром $\varnothing 1 \times 250$ мм с толщиной стенки 0,5 мм. Предельное давление 5 МПа при заглушенном выходном отверстии капилляра достигалось после подачи 20-25 мкл элюента. Это связано, в основном, с упругостью соединительного капилляра. Для колонок объемом 200 мкл такой "разгон" насоса вполне допустим.

Конструкция хроматографической микроколонки. Разработанная нами конструкция микроколонки показана на рис. 2. Колонка представляет собой отрезок трубки из нержавеющей стали длиной 62 мм. Внутренний диаметр трубки 2 мм, внешний - 3 мм. Фильтры, удерживающие адсорбент, изготавливали из пористой фольги толщиной 0,1 мм и размером пор 2-3 мкм (нержавеющая сталь; производство металлургического завода г.Выксы, Горьковская область). Их диаметр был равен 3 мм. Герметизация обоих концов колонки осуществлялась с помощью известных конических уплотнителей, которые обеспечивали также плотный прижим фильтров к торцам колонки. Верхняя часть колонки соединялась непосредственно с устройством ввода пробы, состоящего из корпуса иглы 5, иглы 2, уплотнителя 4 и винта со сквозным отверстием (рис.3). В рабочем положении игла 5 устанавливалась непосредственно на верхний фильтр колонки. Такая конструкция колонки обеспечивала возможность ее многократной переупаковки с хорошей воспроизводимостью (для одной партии адсорбента), позволяла достигать давления до 60 МПа. Эффективность колонок, упакованных по п. 3.2, для целого ряда использованных нами адсорбентов составляла 2000-5000 т.т., что соответст-

вует ~~приведенной~~ ВЭТТ=2,5-4,0 d_p , где d_p - диаметр частицы адсорбента (см. рис. 3, табл. 3 и 4). Полировка внутренних стенок колонки абразивными порошками уменьшала приведенную ВЭТТ до 2,0-2,2 (для микросферических адсорбентов), и эффективность колонок по веществам с $k' = 0,8-1,2$ достигала 6000 т.т., что в несколько раз лучше, чем в случае микроколонок, изготовленных из фторопластового капилляра (I39, I52). Проверка эффективности всей хроматографической системы (устройство ввода пробы - колонка - детектор) по трем нитроанилинам (k' равны соответственно 0,7; 1,8 и 3,5) представлена на рис. 3. Из нее следует, что вклад экстраколоночного размывания в уширение полосы вещества с $k' \geq 1$ пренебрежимо мал и коэффициент симметрии близок к 1.

Таким образом, разработанная нами конструкция высокоэффективной колонки с устройством ввода пробы обеспечивает практически предельную удельную эффективность, достигаемую в ВЭЖХ в настоящее время (приведенная ВЭТТ=2,0-2,2), а вся хроматографическая система является оптимальной. Это означает, что дальнейшее уменьшение объема колонки при сохранении ее эффективности или увеличение эффективности при сохранении объема колонки возможно лишь при соответствующем уменьшении объема измерительной ячейки детектора - многоволнового УФ-фотометра. В противном случае станет заметным экстраколоночное размывание хроматографической полосы. Данная хроматографическая система была реализована в хроматографе "Обь-4" ("Милихром"), выпускающемся теперь серийно в ПО "Науч-прибор" (г.Орел). Общий вид хроматографа показан на схеме I. Отличительной его особенностью является возможность детектирования элюата при нескольких длинах волн. Пример двухволновой детекции приведен на рис. 5. Необычный вид хроматограммы связан с тем, что перо самописца при медленной скорости движения диаграммной

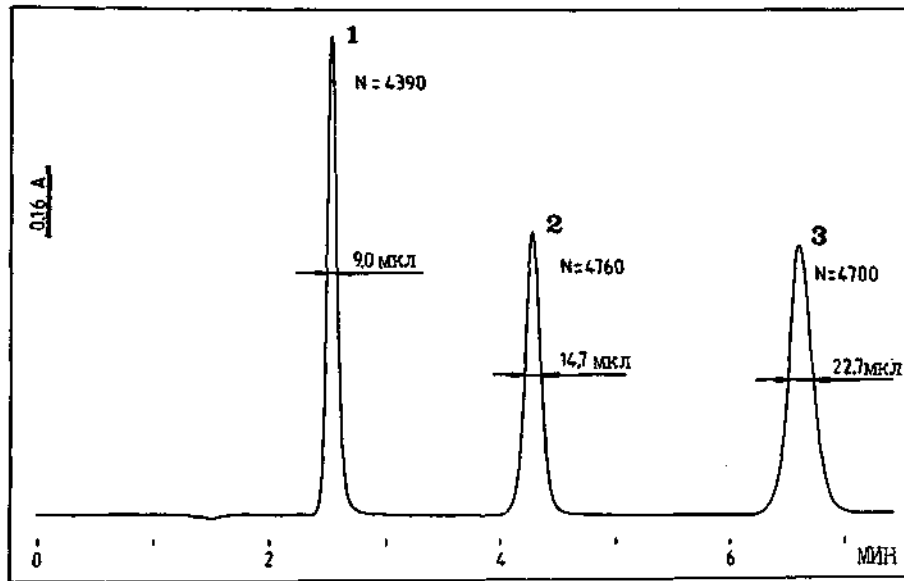


Рис. 3. Определение эффективности микроколонки. Разделение смеси нитроанилинов (1 - орто-, 2 - мета-, 3 - пара-нитроанилин). Колонка $\varnothing 2 \times 62$ мм, Силасорб 600 (5 мкм). Образец: 1 мкл (по 1 мкг каждого компонента). Элюент: гептан - хлороформ - 2-пропанол (70:22:8). Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор: 290 нм.

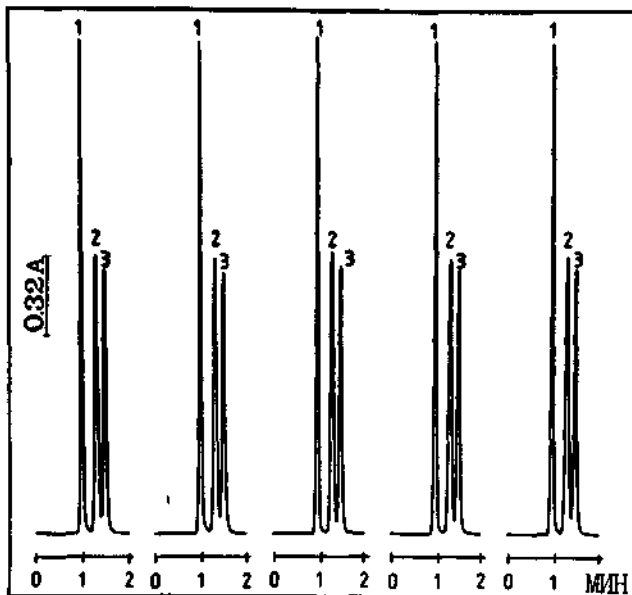


Рис. 4. Иллюстрация воспроизводимости дозирования образца. Пять повторных разделений смеси трех нитроанилинов (1 - орто-, 2 - мета-, 3 - пара-). Образец 2 мкл (по 2 мкг каждого компонента). Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Силасорб 600 (5 мкм). Элюент: хлороформ. Скорость потока: 200 мкл/мин. Детектор: 290 нм.

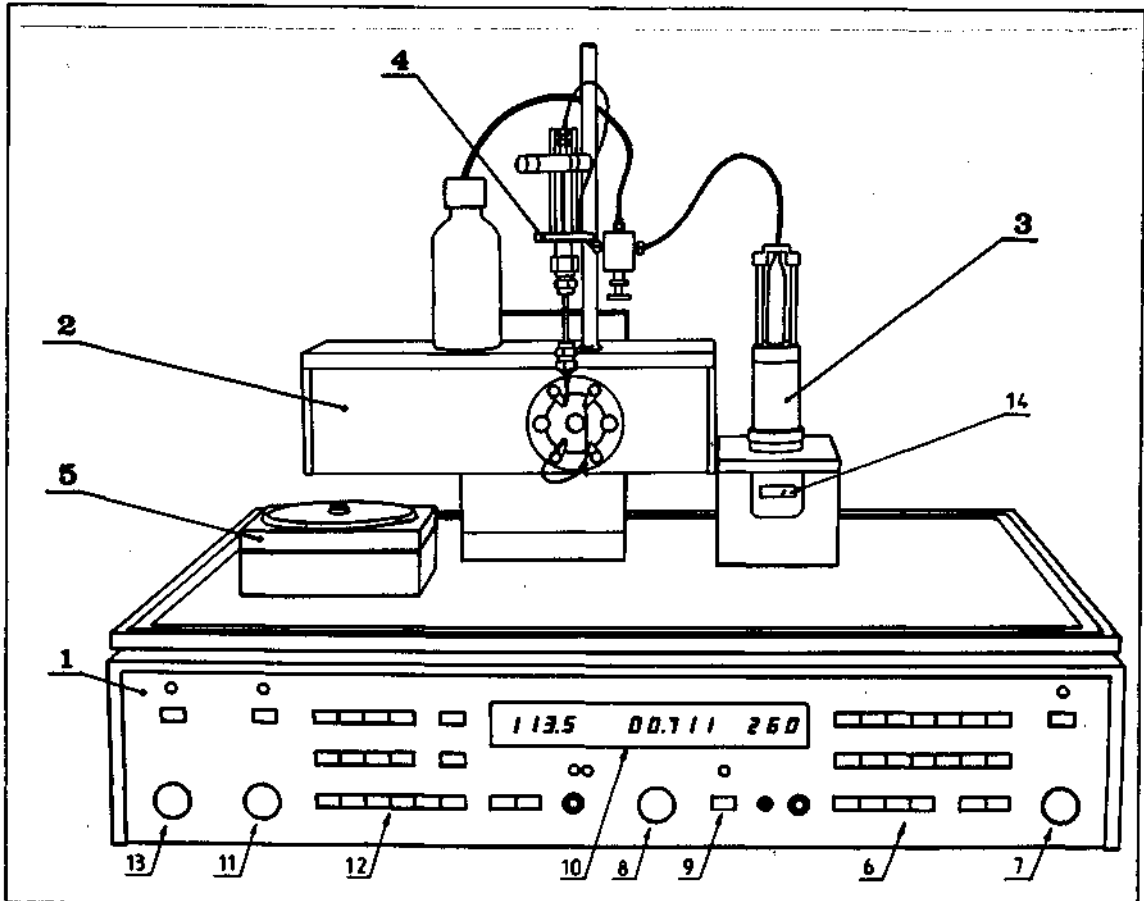


Схема I. Общий вид хроматографа "Милихром" ("Обь-4").

I - электронный блок, 2 - оптический блок, 3 - насос, 4 - колонка с устройством ввода образца, 5 - коллектор фракций, 6 - панель управления монохроматором, 7 - переключатель времени интегрирования, 8 - переключатель шкалы самописца, 9 - выключатель "вычитания шкал", 10 - цифровой индикатор: слева направо - индикатор расхода элюента, индикатор оптической плотности, индикатор длины волны, 11 - переключатель скорости потока, 12 - панель управления насосом, 13 - переключатель объема фракций, 14 - индикатор давления.

ленты полностью заштриховывает пространство между профилями элюции при двух выбранных длинах волн. Время переключения длин волн в данном случае составляло 0,6 сек.

Градиентное элюирование. Для осуществления разделений в режиме градиентной элюции с помощью одного насоса шприцевого типа нами применялся известный способ, заключающийся в использовании преформированного градиента концентрации (5,6,139). В нашей модификации этого метода градиент концентрации "сильного" компонента элюента формировали непосредственно в шприце насоса путем последовательного набора в шприц порций раствора с разными концентрациями. Первым набирается наиболее концентрированный раствор, последним - самый разбавленный. Так как растворы отличаются друг от друга плотностью, то в вертикально расположенном шприце смешивание их происходит очень медленно из-за малой скорости диффузии молекул в растворе. При формировании градиента с возрастающей концентрацией соли (ионный обмен) насос хроматографа должен находиться в положении, показанном на схеме I. При формировании градиента возрастающей концентрации органического растворителя (более легкого, чем вода) в воде насос устанавливается в перевернутом положении на специальном кронштейне.

Форма градиента, приготовленного в шприце насоса, зависит от количества и объема отдельных ступеней. На рис.6 приведены данные эксперимента по формированию градиента, близкого к линейному. В этом случае его формировали из 10 ступеней по 200 мкл (рис. 6А). Такой способ приготовления градиента обеспечивает очень высокую воспроизводимость, о чем свидетельствует рис. 6В, где друг на друга наложены профили двух градиентов, причем первый был выдавлен из шприца сразу же после формирования, а второй - через 15 мин. Некоторое отклонение формы градиента от линейной

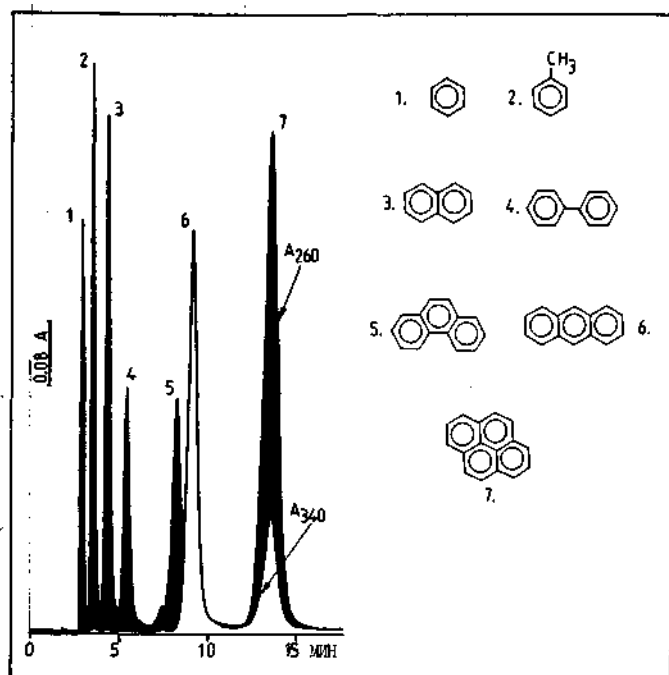


Рис. 5. ОФ хроматография ароматических углеводородов. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-С18. Элюент: метанол - вода (80:20). Скорость потока: 100 мкл/мин. Детектор: 260 и 340 нм. Образец: 0,5-5 мкг каждого компонента в 2 мкл метанола.

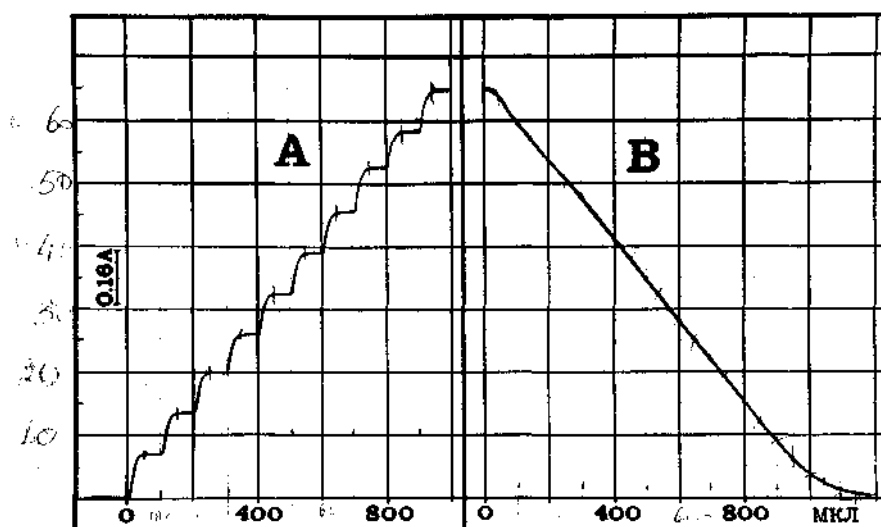


Рис. 6. Воспроизводимость формирования градиента концентрации. А - последовательный набор в шприц насоса порций по 100 мкл светопоглощающего раствора через кювету детектора. Концентрация раствора от порции к порции увеличивается. В - кривая, полученная при прокачивании сформированного градиента через кювету со скоростью 200 мкл/мин. Приведены результаты двух опытов - кривые полностью совпадают. Градиент готовили из двух растворов - водный раствор уридина и 60% водный метанол в пропорциях 9:1, ..., 0:10.

в практической хроматографии не имеет большого значения, так как в первую очередь необходима его воспроизводимость. При формировании градиента более крупными ступенями (6 ступен^{ей} через 20% по 300 мкл) его форма отличается от линейной в большей степени, но воспроизводимость сохраняется (кривые I и II на рис. 7). Форма градиента незначительно зависит от вязкости элюента - градиенты ацетонитрила и 2-пропанола весьма похожи (кривые I и III на рис. 7). Следует отметить, что в этих экспериментах профили градиентов по УФ-поглощению регистрировались непосредственно на выходе насоса. Очевидно, что хроматографическая колонка должна их сгладить и волнообразного изменения нулевой линии детектора в результате поглощения растворителя во время хроматографии наблюдаться не будет. Это подтверждается на практике (см., например, рис. 9).

Формирование градиента в хроматографе "Миличром" осуществляется полуавтоматически с помощью наборного поля управления насосом (поз. I2 на схеме I), где перед набором каждой ступени градиента устанавливается ее объем. Когда заданный объем наберется в шприц, насос автоматически остановится. Такой способ формирования градиента обеспечивает высокую воспроизводимость времен удерживания. Их отклонение от среднего не превышает $\pm 1\%$ (см. рис.9).

Некоторые возможности разработанного метода МК ВЭЖХ. Мы не будем останавливаться на перечислении всех возможностей и преимуществ микроколоночной хроматографии. Это достаточно полно сделано в соответствующих обзорах и монографиях (I26, I40-I43). Коснемся лишь тех, которые присущи нашей модификации метода.

Во-первых, это относительно короткие колонки, не требующие высоких рабочих давлений даже для адсорбентов с зернением 5 мкм. Если в конце 70-х годов сокращение длины колонки в 4-5 раз воспринималось многими как шаг назад, то в настоящее время практи-

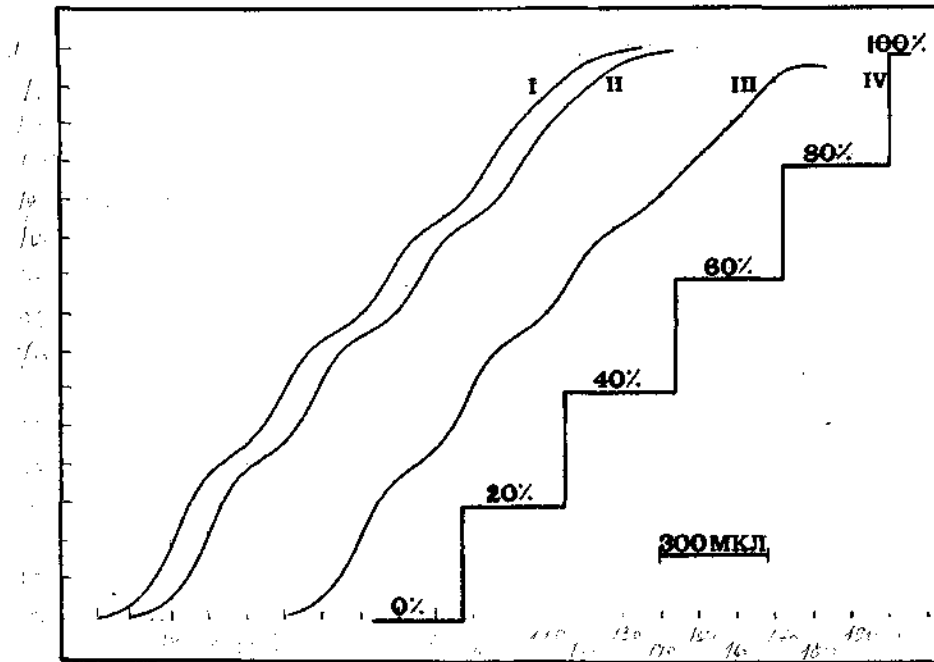


Рис. 7. Воспроизводимость формирования градиента концентрации. I - градиент ацетонитрила, пропущенный через кювету детектора сразу после формирования в шприце насоса. II - то же через 15 мин после формирования. III - градиент 2-пропанола. Градиенты формировали из 6-ти растворов, начиная с порции "100%", как показано на IV. Для регистрации формы градиентов по УФ-поглощению в органические растворители предварительно добавили около 1% ацетона. Порции с соответствующими концентрациями (как на IV) готовили смешиванием растворителей с водой. Скорость набора порций в шприц была 600 мкл/мин. Скорость прокачивания через кювету детектора 200 мкл/мин.

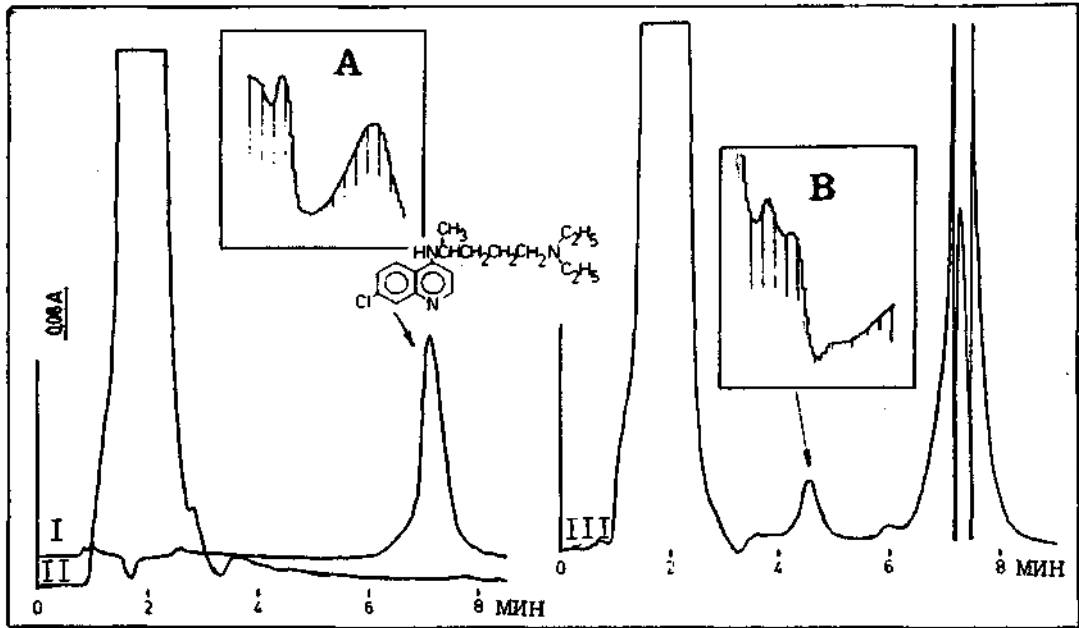
чески все фирмы-производители хроматографического оборудования наряду с длинными колонками выпускают колонки длиной 50-100 мм. Произошла определенная специализация ВЭЖХ, явившаяся результатом осмысления задач, стоящих перед аналитической химией. Избыточная эффективность колонки экономически не выгодна, так как увеличивает стоимость разделения за счет дополнительных расходов растворителей и адсорбентов, требует применения дорогих насосов высокого давления с большой производительностью. Развитие теории хроматографии и химии адсорбентов приводит к тому, что исследователь все чаще достигает необходимого разделения не путем наращивания эффективности колонки за счет ее длины, а путем изменения ее селективности в результате подбора оптимальных условий разделения. Хроматография на коротких колонках получила даже свое название - быстрая эффективная жидкостная хроматография. Конечно, все сказанное выше не относится к тем случаям, когда необходимо разделять смеси, состоящие из многих десятков компонентов и эффективность колонки является решающим фактором. Тем не менее, большинство практических задач решаются на колонках с эффективностью около 5000 т.т., что при использовании 3-5 мкм адсорбентов эквивалентно колонкам длиной 50 мм.

Второе, это ограничение объема колонки. В нашем случае он равен 200 мкл и определяется объемом кюветы детектора. Однако, известны хроматографические системы с колонками, объем которых во много раз меньше, а некоторые из этих систем выпускаются промышленностью (I43), но, если не гнаться за рекордами, то хроматографы с колонками, имеющими объем менее 100 мкл, представляются нам малопригодными для рутинной работы. Они обладают весьма невысокими метрологическими характеристиками, так как требуют манипулирования с объемами, измеряющимися порой нанолитрами, кон-

струкции их сложны, а точность изготовления отдельных узлов должна быть предельно высокой. Использование таких хроматографов оправдано лишь в тех случаях, когда вещества для анализа чрезвычайно мало.

Важнейшее преимущество коротких колонок - относительная простота их упаковки. Расход адсорбента на колонку объемом 200 мкл составляет всего 180-200 мг, что в 20 раз меньше по сравнению с колонкой $\varnothing 4,6 \times 250$ мм ("стандартная" в ВЭЖХ колонка). Это позволяет исследователю иногда проводить разделение в таких условиях, при которых колонка приходит в негодность довольно быстро. Примером такого анализа является определение хлорохина (противомаларийное лекарство) в моче крысы с целью изучения его метаболизма и установления скорости его выведения из организма (рис. 8). В данном случае пришлось использовать сильнощелочной элюент, содержащий 1% триэтиламина, так как хлорохин обладает высоким сродством к силанольным группам неподвижной фазы. В этих условиях эффективность колонки уменьшалась вдвое уже через 10 анализов, после чего колонку переупаковывали. Таким образом, с 5 г адсорбента удалось сделать около 250 анализов. Для проведения этой работы на "стандартной" колонке потребовалось бы 100 г адсорбента.

Второй пример - использование разработанного нами совместно с А.Г.Другановым хроматографического метода для контроля промышленного производства гиббереллина A_3 (рис. 10). Содержание A_3 в культуральной жидкости и в отходах производства определяли непосредственно хроматографией на хроматографе "Милихром" без какой-либо предварительной подготовки пробы. Это исключало ошибку, связанную с возможными потерями A_3 в процессе подготовки пробы, но приводило к тому, что после проведения 50-70 анализов колон-



- Рис. 8. Определение содержания хлорохина (противомаларийное лекарство) в моче крысы. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-С18. Элюент: метанол - вода - триэтиламин (80:19:1). Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор: 250 нм.
- I - стандарт хлорохина (1 мкг в 1 мкл метанола).
- II - 20 мкл мочи крысы, не получавшей хлорохин.
- III - 20 мкл мочи крысы, собранной в течении 4 час после введения 7 мг хлорохина.
- A - УФ-спектр хлорохина, записанный в диапазоне длин волн 240-360 нм с остановкой потока во время выхода пика.
- B - УФ-спектр неизвестного вещества - возможно, метаболита хлорохина.

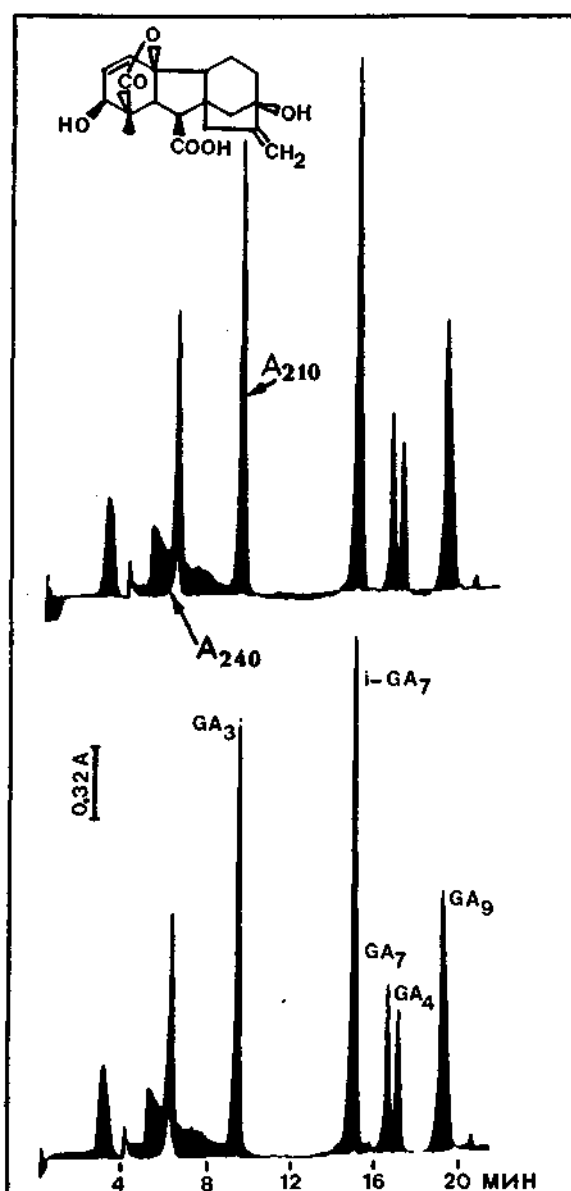


Рис. 9. Иллюстрация воспроизводимости градиентной элюции на примере двух последовательных разделений стандартной смеси гиббереллиновых кислот. Колонка: Ø2 x 62 мм, Нуклеосил 5-С18. Элюент: линейный градиент концентрации метанола в 0,01 М Трис-ацетате (рН 7,8) от 10 до 70%. Скорость потока: 50 мкл/мин. Детектор: 210 и 240 нм. Приведена структура гиббереллина А₃. Проба 2 мкл (1 мг/мл каждого компонента в воде).

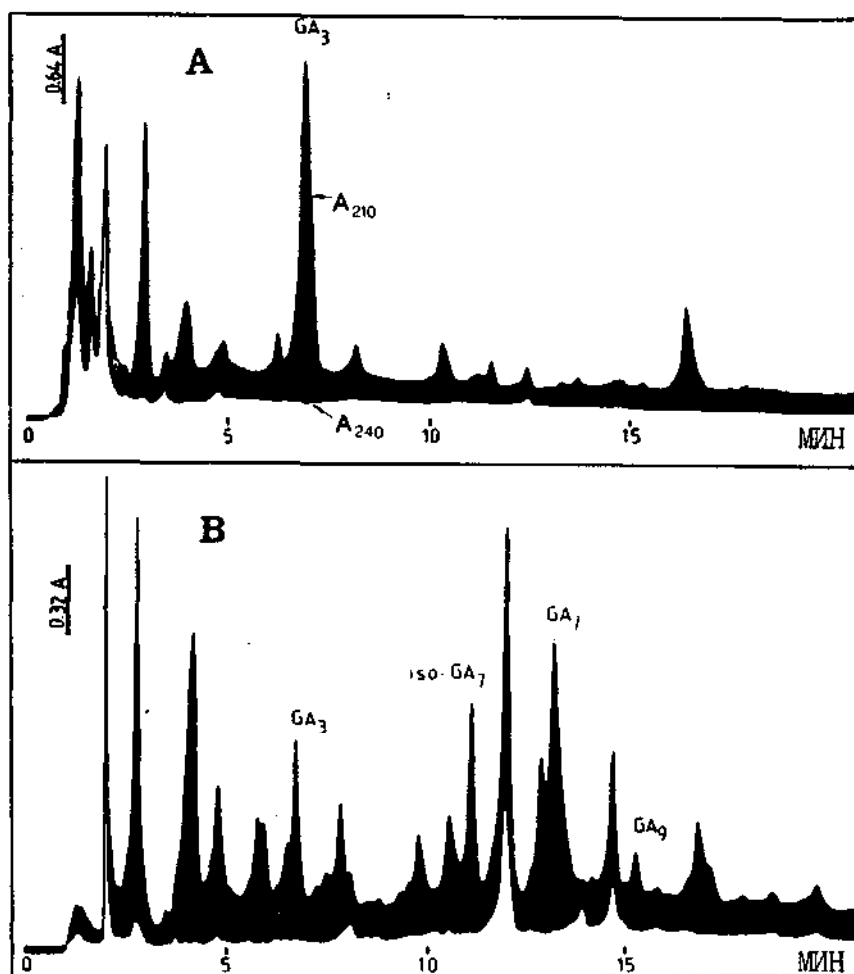


Рис. 10. Хроматографический контроль гиббереллинового производства. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-С18. Элюент: линейный градиент метанола в 0,05 М Трис-ацетате (рН 8,0) от 10 до 60%. Скорость потока: 50 мкл/мин. Детектор: 210 и 240 нм.
 А - 10 мкл культуральной жидкости микроорганизма-производителя гиббереллинов.
 В - отходы микробиологического производства гиббереллина A_3 (20 мкл).

ку приходилось переупаковывать. Как и в случае с хлорохином, такой подход оказался экономически весьма выгодным.

4.2. Микроколоночная ОФ ВЭЖХ пептидов.

Выбор неподвижной фазы. Вопрос пригодности конкретной ОФ для разделения пептидов в начале 80-х годов, когда была начата наша работа, оставался открытым. Первые специализированные ОФ появились лишь в 1985 году. Мы начали наши исследования с практической проверки нескольких ОФ общего назначения с целью выяснения возможности их использования для хроматографии пептидов. Известные нам свойства этих ОФ перечислены в табл. 3. Все 7 ОФ были упакованы в одинаковые колонки ($\varnothing 2 \times 62$ мм), и колонки были охарактеризованы по нескольким веществам. Результаты этих экспериментов приведены в табл. 4. По нафталину определяли эффективность упаковки N и относительную емкость колонки, мерой которой является время удерживания нафталина. По удерживанию п-нитроанилина в условиях его хроматографии на силикагеле полуколичественно судили о наличии неэкранированных силанольных групп. Для этого п-нитроанилин хроматографировали в условиях прямофазной хроматографии (в неполярном элюенте), когда адсорбции на обращенной фазе не происходит. Наблюдаемое удерживание связано только с адсорбцией на неэкранированном силикагеле и оно, очевидно, пропорционально количеству силанольных групп.

Наилучшим в этом отношении оказался адсорбент ПМСС-С18 (№62). Пептиды брадикинин ($M=1059$) и инсулин быка ($M=6300$) хроматографировали в линейном градиенте метанола в 0,1% ТФУ. Результаты показали, что удерживание пептидов не всегда коррелирует с емкостью колонки (например, для колонок с Лихросорбом С8 и С18 и Сервахромом С8), и сильное удерживание на них не объясняется взаимодействием пептидов с силанолами (наименее экранированный

адсорбент ПМСС-С18 (№61) не обладает сильным удерживанием). Кроме этого выяснилось, что нет строгой корреляции между эффективностью колонки, определенной по нафталину (низкомолекулярному инертному веществу) и пиковой емкостью колонок, найденной для пептидов. Эти данные соответствуют многочисленным наблюдениям других авторов (см. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) и лишней раз свидетельствуют о том, что сообщаемые фирмами-изготовителями характеристики ОФ не являются исчерпывающими. Для дальнейшей работы с пептидами мы выбрали ОФ Нуклеосил С18 и ПМСС-С18 (№62).

Таблица 3.

Некоторые свойства используемых адсорбентов (ОФ).

Название ОФ	Форма частиц	Размер частиц, мкм	Размер пор, нм	Площадь поверхн. м ² /г	Содержание С вес. %	Экраниров. силан.
Нуклеосил С18	сф.	5	10	300	14	+
Нуклеосил С8	сф.	6	10	300	9	-
Лихросорб С18	нр.	6	10	150	22	?
Лихросорб С8	нр.	6	10	250	?	?
Сервахром С8	нр.	6	10	?	14	?
ПМСС-С18 (№61)	сф.	8	15	?	10	-
ПМСС-С18 (№62)	сф.	8	15	?	10	+

сф. - частицы сферической формы;

нр. - частицы нерегулярной формы.

Таблица 4.

Параметры колонок Ø2 x 62 мм с ОФ.

Название ОФ	Нафталин		п-Нитро-анилин T_R , мин	Брадикинин		Инсулин	
	N , т.т.	T_R , мин		T_R , мин	РС, пик.	T_R , мин	РС, пик.
Нуклеосил С18	4820	5,7	5,0	10,1	84	12,4	91
Нуклеосил С8	3260	3,5	8,8	9,3	69	11,5	74
Лихросорб С18	3020	5,4	4,0	11,1	36	14,1	22
Лихросорб С8	3180	3,7	4,1	14,5	16	-	-
Сервахром С8	2900	3,7	4,9	11,0	42	13,3	32
ПМСС-С18 (№61)	1960	3,1	10,6	8,9	59	11,7	65
ПМСС-С18 (№62)	2100	2,8	2,4	7,9	56	10,5	62

N - эффективность колонки, вычисленная по уравнению $N = 5,54 \left(\frac{T_R}{\sigma_{h/2}} \right)^2$ где T_R - время удерживания нафталина, $\sigma_{h/2}$ - ширина пика на половине его высоты. Элюент - 80% метанол; скорость элюции - 100 мкл/мин; проба - 2 мкл 0,005 М раствора в метаноле; детектор - 260 нм.

T_R п-нитроанилина в подвижной фазе гептан - 2-пропанол (6:1). Скорость элюции - 200 мкл/мин; проба - 2 мкл (1 мг/мл в элюенте); детектор - 350 нм.

T_R брадикинина и инсулина в градиентной хроматографии. Градиент метанола в 0,1% ТФУ от 0 до 100% за 20 мин; скорость элюции - 100 мкл/мин; проба - 8 мкл (по 0,5 мг/мл в 0,1% ТФУ); детектор - 210 нм.

РС - пиковая емкость колонки по уравнению (4).

Первый адсорбент обеспечивал наибольшую пиковую емкость колонки, второй содержал наименьшее количество открытых силанолов.

Выбор органического растворителя. Результаты по исследованию влияния природы органического растворителя на хроматографическое поведение пептидов представлены в табл. 5. Для сравнения в качестве низкомолекулярного вещества был взят фенилаланин. Наши данные качественно подтверждают справедливость элюотропного ряда, предложенного в работе (85), и не соответствуют ряду Херна (13). Природа органического растворителя мало влияет на пиковую емкость колонки и на ее селективность по отношению к паре брадикинин-инсулин. Наиболее подходящим для этих объектов является ацетонитрил, который обладает наименьшей вязкостью и наиболее прозрачен в УФ-области (110).

Ширина пика и скорость элюции. Известный факт аномальной зависимости эффективности разделения пептидов от скорости элюции был проверен нами на двух колонках в диапазоне скоростей от 5 до 200 мкл/мин. Результаты приведены на рис. II. Необходимо отметить, что при малых скоростях потока пиковая емкость колонки для пептидов почти в два раза выше, чем для фенилаланина. Зависимость ширины пика от скорости потока имеет характер, близкий к линейному, и наклон линии тем больше, чем выше молекулярная масса пептида. Из последних работ по ОФ ВЭЖХ пептидов, выполненных уже после того, как наши экспериментальные данные были получены, следует, что максимальная пиковая емкость колонки для пептидов с $M=1000$ должна достигаться при скоростях элюции около $2,5 \text{ мл/мин} \cdot \text{см}^2$ или около 75 мкл/мин в нашем случае (130). Однако, мы этот максимум не наблюдаем. Причина может быть связана с тем, что наши адсорбенты имели более мелкие поры и, кроме того, мы хроматографию проводили при 22° , а не при 40° , как в цитируемой работе.

Таблица 5.

Влияние природы органического растворителя
на хроматографическое поведение пептидов и
фенилаланина.

Органический растворитель	Фенилаланин		Брадикинин		Инсулин		α
	T_R , мин	PC, пик.	T_R , мин.	PC, пик.	T_R , мин.	PC, пик.	
Метанол	5,10	43	9,40	50	12,35	59	1,31
Ацетонитрил	4,20	71	6,30	56	7,35	67	1,36
Этанол	4,20	67	7,10	63	9,10	53	1,28
2-Пропанол	3,55	77	5,05	59	6,70	71	1,33

$$\alpha = \frac{T_R \text{ инсулина}}{T_R \text{ брадикинина}} - \text{коэффициент селективности.}$$

Эксперименты выполняли на колонке $\varnothing 2 \times 62$ мм с ПМСС-С18 (№62).
Элюент - линейный градиент органического растворителя в 0,1%
ТФУ продолжительностью 17 мин; скорость потока - 100 мкл/мин;
проба - 8 мкл (раствор в 0,1% ТФУ: фенилаланин 0,14 мг/мл, бра-
дикинин и инсулин по 0,36 мг/мл); детектор - 210 нм.
Пиковую емкость колонки вычисляли по уравнению (4).

Вероятно, максимальная пиковая емкость наших колонок должна лежать в области еще меньших скоростей потока.

Нагрузка на колонку. Результаты по исследованию влияния нагрузки на колонку на ширину пиков пептидов представлены на рис. 12. Эксперименты выполняли в градиентном режиме. Предварительно была сделана проверка влияния объема пробы на ширину пиков брадикинина и инсулина. Было показано, что при вводе 1 мкг пептида в объеме 1 или 100 мкл ширины пиков совпадают. Это свойство ОФ использовалось нами в дальнейшем для концентрирования пептидов из водных растворов, а в данном исследовании позволило изменять нагрузку на колонку путем изменения только объема пробы. Как следует из рис. 12, влияние нагрузки на эффективность колонки для фенилаланина начинается с нагрузки 1 мкг, для брадикинина - с 10 мкг, для инсулина - со 100 мкг. Полученные данные хорошо иллюстрируют препаративные возможности микроколонок по отношению к пептидам и качественно соответствуют наблюдениям других авторов (45, 100). Количественные данные для пептидов нам в литературе найти не удалось.

Продолжительность градиента. Влияние продолжительности линейного градиента (крутизны градиента) на пиковую емкость колонки для пептидов и фенилаланина показано на рис. 13. Кривые построены по данным из 7-ми разделений, 3 из которых приведены на рис. 14. Для инсулина максимальная пиковая емкость колонки не была достигнута. Как следует из работы (130), она должна наблюдаться в градиенте, продолжительность которого составляет около 500 мин.

В заключение этого раздела можно сказать, что полученные нами данные по ОФ ВЭЖХ пептидов позволили в дальнейшем проводить их разделения, в зависимости от целей исследования, в условиях,

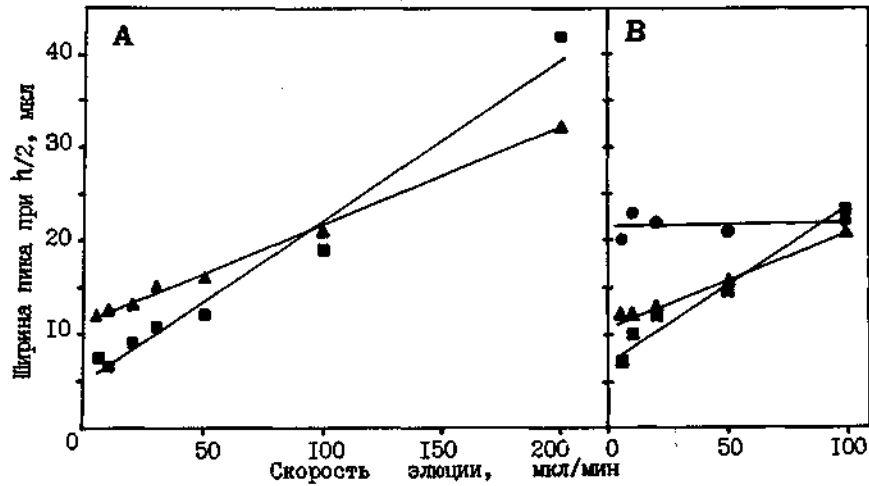


Рис. 11. Зависимость ширины пика от скорости элюции. Элюент: градиент ацетонитрила в 0,1% ТФУ от 0 до 100% (2000 мкл). Проба: 8 мкл (по 4 мкг каждого вещества). (●) - фенилаланин, (▲) - брадикинин, (■) - инсулин. Детектор: 210 нм. Колонки: Ø2 x 62 мм, А - ПМСС-С18 (№62), В - Нуклеосил 5-С18.

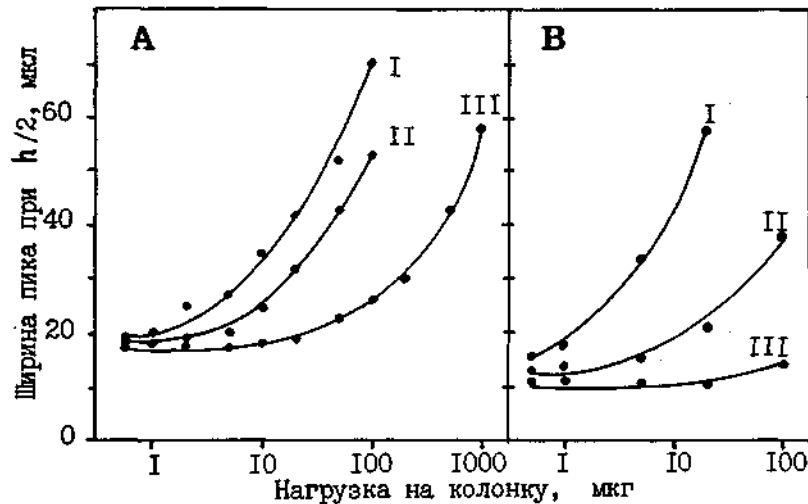


Рис. 12. Зависимость ширины пика от нагрузки на колонку. Колонки: Ø2 x 62 мм, А - ПМСС-С18 (№62), В - Нуклеосил 5-С18. Элюент: линейный градиент ацетонитрила в 0,1% ТФУ от 0 до 100% (2000). Скорость потока 100 мл/мин. Пробы: 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500 и 1000 мкл. Контрольный раствор: по 1 мг/мл фенилаланина (I), брадикинина (II) и инсулина (III) в 0,1% ТФУ. Длина волны и шкала детектора в зависимости от величины пробы.

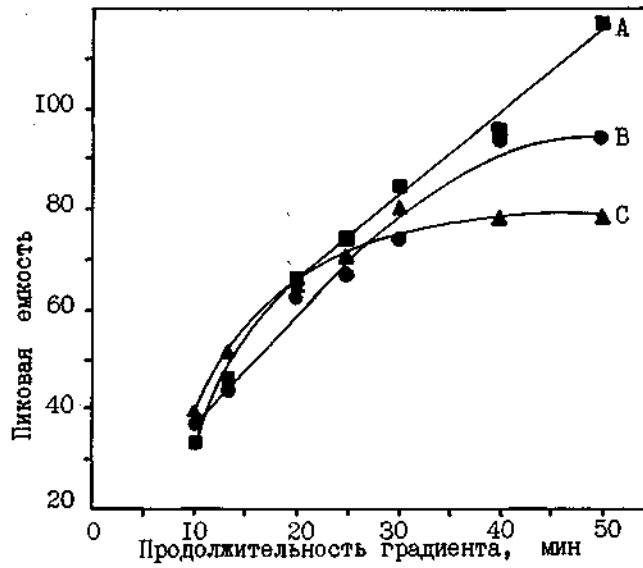


Рис. 13. Зависимость пиковой емкости колонки от продолжительности градиента. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, ПМСС-С18. Скорость потока 100 мкл/мин. Проба 6 мкл (по 3 мкг фенилаланина \blacktriangle , брадикинина \bullet и инсулина \blacksquare). Детектор 210 нм, шкала 12,8 А. Элюент: линейный градиент ацетонитрила в 0,1% ТФУ от 0 до 100% за указанное время.

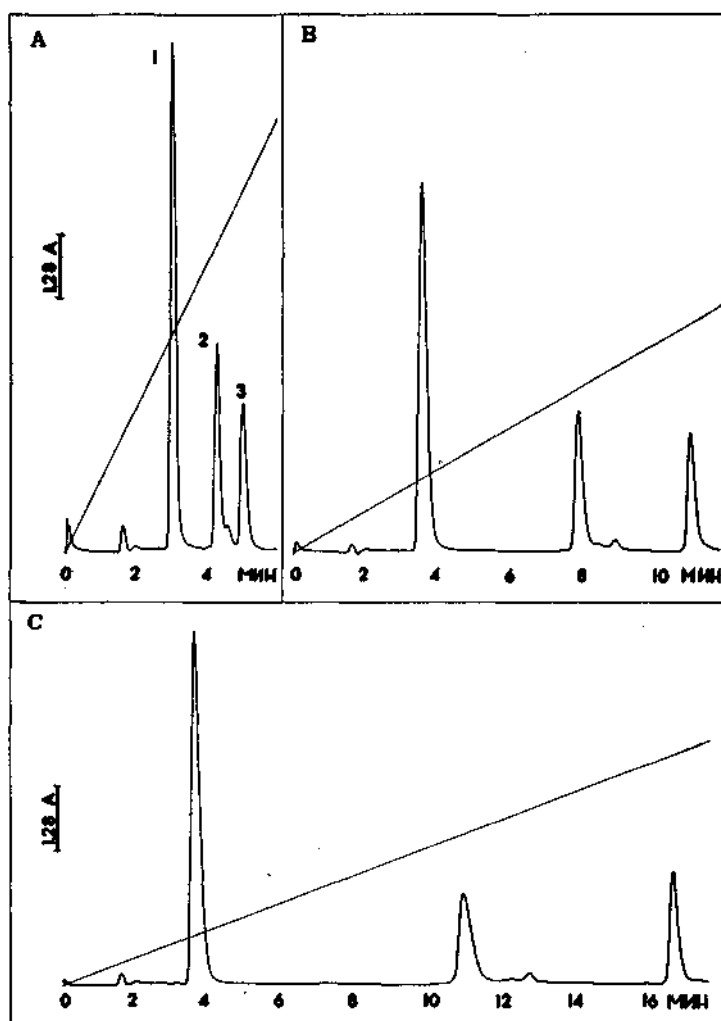


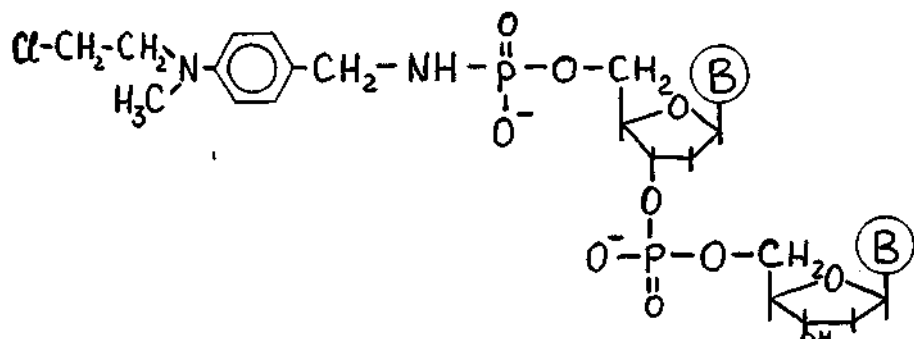
Рис. 14. Разделения смеси фенилаланина (1), брадикинина (2) и инсулина (3) в градиентах разной продолжительности. Условия как на рис. 13. Продолжительности градиентов: А - 10 мин; В - 30 мин и С - 50 мин.

близких к оптимальным.

4.3. Аффинная модификация рибонуклеазы.

Метод аффинной модификации широко используется при изучении строения ферментов и других биологически активных белков. Конечным этапом таких исследований является, как правило, нахождение места модификации - участка пептидной цепи или конкретной аминокислоты. В общем виде всю работу можно разбить на следующие этапы: проведение реакции белка с аффинным реагентом; разделение продуктов реакции; гидролиз модифицированного белка до пептидов; разделение гидролизата и выделение модифицированных пептидов; секвенирование пептидов или определение их аминокислотной последовательности по аминокислотному составу для белков с известной первичной структурой. Именно по такому плану мы определяли места модификации панкреатической рибонуклеазы А (РНКаза) алкилирующим реагентом, в состав которого входил дезоксирибодинуклеотид, играющий роль "адреса" и обеспечивающий аффинность. Работа проводилась совместно с В.Н.Буневой.

Дезоксирибодинуклеотид был выбран в качестве адреса потому, что он является структурным аналогом рибодинуклеотида - естественного субстрата РНКаза, но гидролизываться ферментом не может. Структурная формула реагента выглядит следующим образом:



Вывод о том, что алкилирующие бензиламида динуклеотидов являются для РНКаза истинными аффинными реагентами был сделан В.Н.Буневой на основании изучения кинетики инактивации РНКаза. Эти ре-

агенты удобны для изучения топографии фермента, поскольку имеют хорошие хромофоры (гетероциклические основания) и образуют стабильные продукты модификации (алкилирования).

Известно, что азотистые иприты вступают в реакции алкилирования после образования циклических этилениммониевых катионов и сопряженного с этим процессом образования ионов хлора (153). В молекуле белка алкилироваться могут концевые амино- и карбоксильные группы, боковые радикалы аминокислот Asp, Glu, Lys, His, Tyr, Cys.

Поскольку целью работы являлось определение места аффинной модификации РНКазы, а для этого необходимо было выделить модифицированные формы РНКазы и подвергнуть их гидролизу до пептидов, нам пришлось исследовать некоторые хроматографические свойства РНКазы, разработать методику триптического гидролиза, пригодную для гидролиза модифицированной РНКазы, исследовать реакционную способность аффинных реагентов.

Окисление РНКазы. Окисление РНКазы как способ разрушения $-S-S-$ мостиков - часто используемый прием, предшествующий ферментативному гидролизу белка до пептидов. Прямое хроматографическое изучение этой реакции (рис. 15) показало, что реакция идет через образования множества промежуточных продуктов и практически полностью заканчивается за 40 мин (рис. 16). Однако, несмотря на то, что пик окисленной РНКазы на рис. 15 (т. 90 мин) выглядит вполне гомогенным, электрофорез в полиакриламидном геле (по данным С.Зеленина) выявил значительную гетерогенность препарата. Это заставило нас отказаться от разрушения дисульфидных связей окислением надмуравьиной кислотой и использовать более сложную двухстадийную процедуру - восстановление РНКазы β -меркаптоэтанолом с последующим карбоксиметилированием цистеинов.

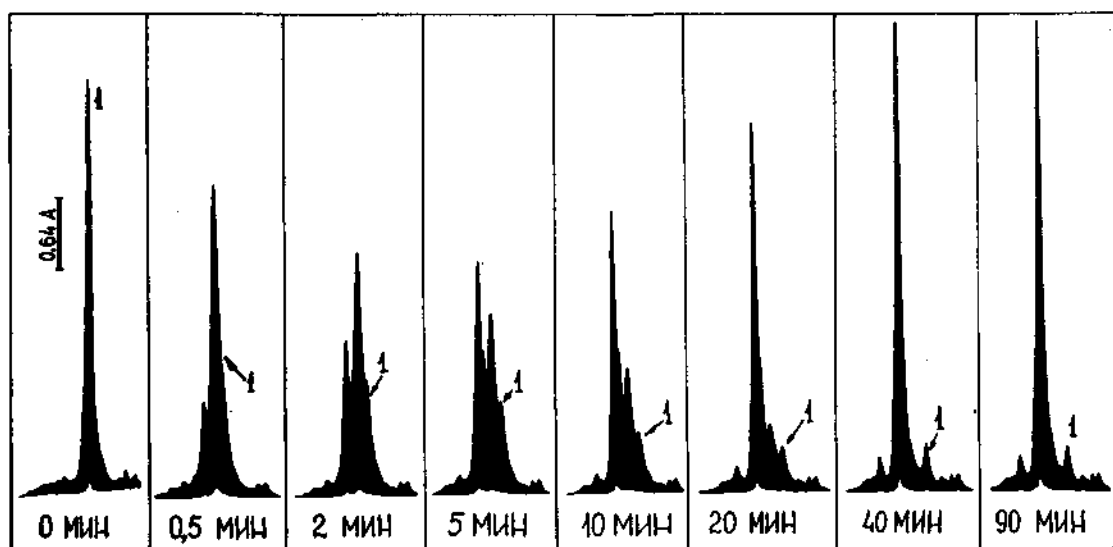


Рис. 15. Окисление РНК-азы - фрагменты хроматограмм реакционной смеси через указанный промежуток времени от начала реакции. Для анализа 5 мкл реакционной смеси разбавляли в 50 раз водой. Объем пробы: 50 мкл. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-С18. Скорость потока 100 мкл/мин. Элюент: линейный градиент ацетонитрила в 0,1% ТФУ от 0 до 50%. Детектор 210 и 280 нм. I - пик РНК-азы.

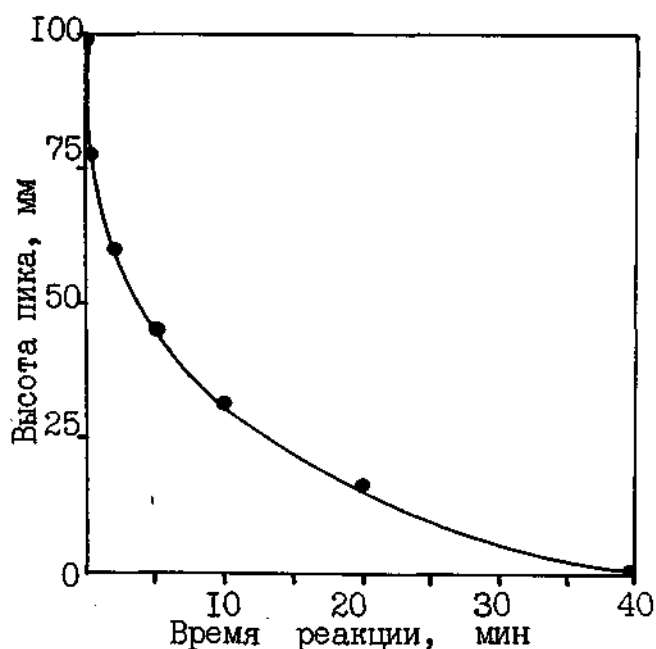


Рис. 16. Кинетика окисления РНК-азы при 0° . Высота пика РНК-азы из хроматограмм на рис. 15.

Восстановление РНКазы. Восстановление РНКазы β -меркаптоэтанолом - один из самых мягких способов разрушения $-S-S-$ мостиков, не затрагивающий, в отличие от окисления надмуравьиной кислотой, других аминокислот (I36). Хроматографическое изучение реакции (рис. 17 и 18) показало, что при комнатной температуре она проходит на 90% за 3 часа. Интересно, что мы не наблюдали каких-либо промежуточных продуктов, как было в случае реакции окисления. Вероятно, восстановление РНКазы β -меркаптоэтанолом является таким процессом, когда первый из четырех $-S-S-$ мостиков разравывается медленно, а остальные три значительно быстрее.

Карбоксиметилирование восстановленной РНКазы. Карбоксиметилирование цистеинов монохлоруксусной кислотой необходимо для предотвращения образования внутри- и межмолекулярных $-S-S-$ связей. Реакция при 30° количественно проходит за 10-15 мин (рис. 19). Анализ полученной КМ-РНКазы методом ОФ ВЭЖХ (рис. 20) показывает, что ширина пика зависит от ионной силы элюента, что может быть следствием образования какой-то пространственной структуры. Этот эффект наблюдался только при нейтральном рН в бессолево́м градиенте (рис. 20А). При рН 2 (0,1% ТФУ) пик КМ-РНКазы при комнатной температуре был таким же узким, как на рис. 20В.

ОФ ВЭЖХ РНКазы при нейтральном рН. Это исследование проводилось с целью выяснения возможности выделения продуктов аффинной модификации РНКазы методом ОФ хроматографии. Необходимость осуществления разделения при нейтральном рН была связана с тем, что в кислой среде фосфамидная связь в аффинном реагенте неустойчива. Однако, нам не удалось найти условия ОФ хроматографии, при которых РНКазы хроматографировались бы в виде узкого пика (рис. 21). О том, что мы имели дело не с гетерогенным препаратом, свидетельствует рехроматография заштрихованной части пика РНКазы (рис.

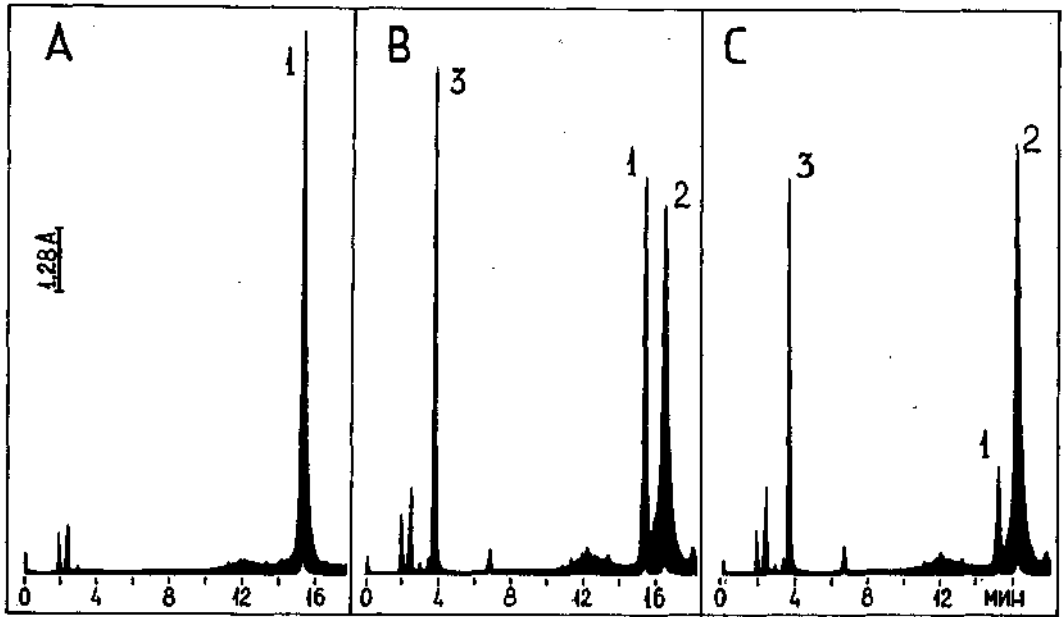


Рис. 17. Восстановление РНК-азы меркаптоэтанолом - хроматограммы реакционных смесей через 0, 5 и 60 мин после начала реакции. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-С18. Элюент: линейный градиент ацетонитрила в 0,1% ТФУ от 0 до 50%. Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор: 210 и 280 нм. Для анализа реакцию смесь разбавляли в 10 раз 1% ТФУ. Объем пробы 5 мкл (40 мкг РНК-азы). 1 - РНК-аза, 2 - восстановленная РНК-аза, 3 - β -меркаптоэтанол.

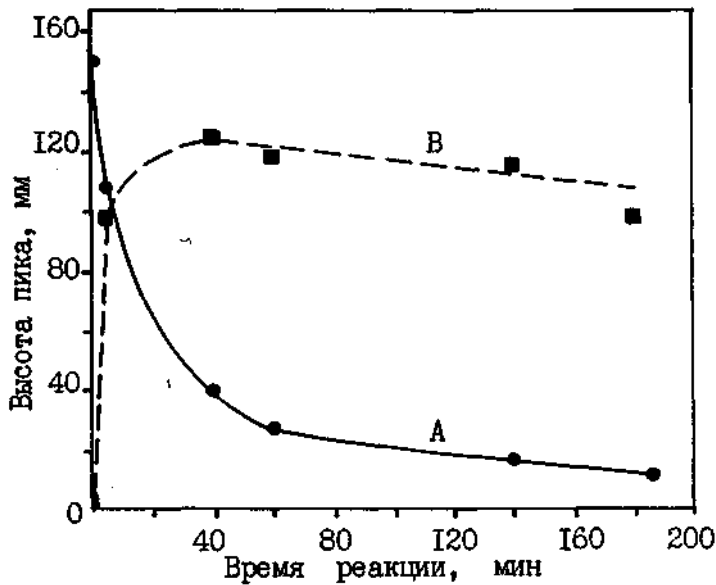


Рис. 18. Кинетика восстановления РНК-азы β -меркаптоэтанолом при 25° . А - РНК-аза, В - восстановленная РНК-аза. Высоты пиков брали из хроматограмм как на рис. 17.

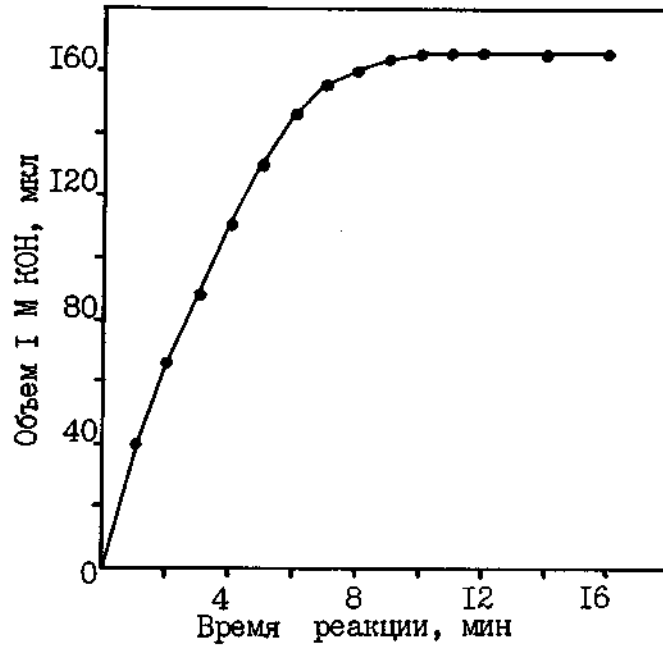


Рис. 19. Кинетика карбоксиметилирования восстановленной РНК-азы при 30° и pH 7,0-7,2. Раствор КОН в реакцию смесь подавали насосом хроматографа "Милихром".

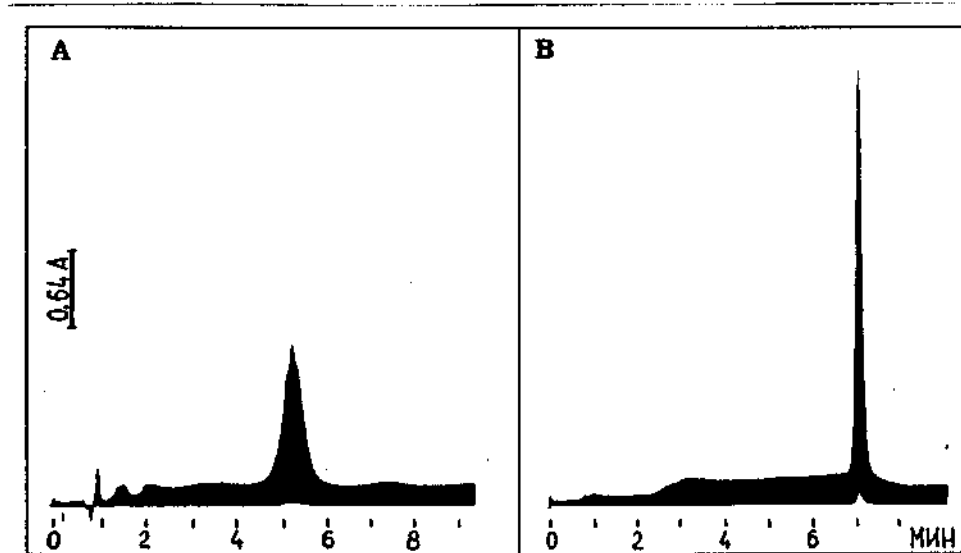


Рис. 20. Хроматография КМ-РНК-азы при pH 7. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-С18. Элюент: линейный градиент ацетонитрила от 0 до 50% в 0,01 М Трис-ТФУ, pH 7,2. Скорость потока 200 мкл/мин. Проба 8 мкл (8 мкг). Детектор 210 и 260 нм. В - элюент с 0,1 М перхлоратом лития.

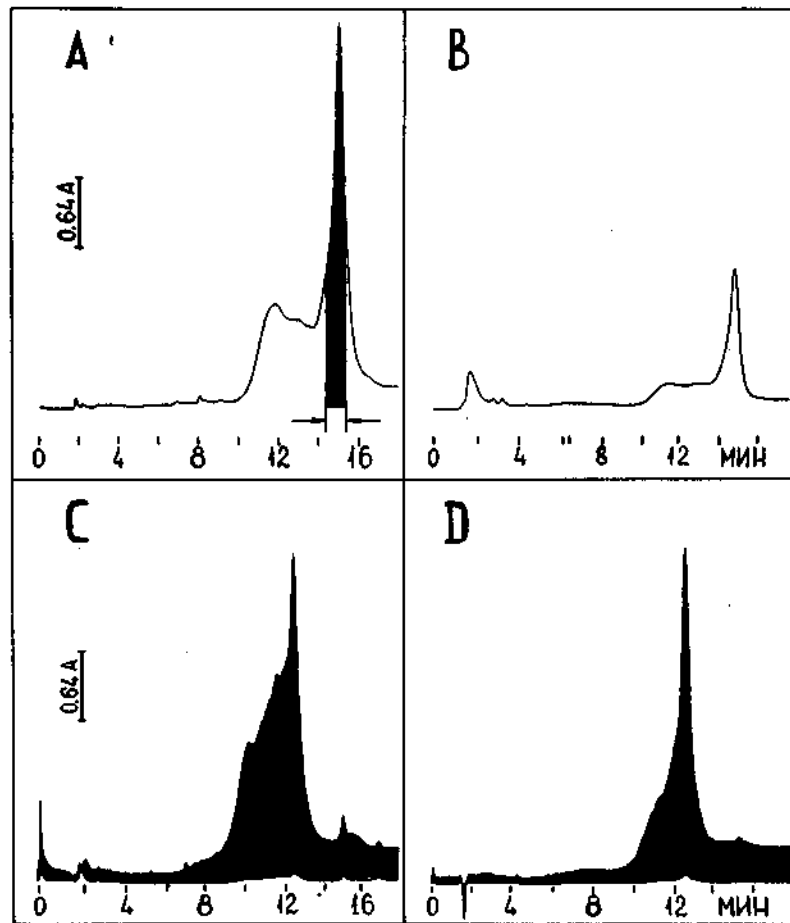


Рис. 21. Хроматография РНК-азы при рН 7. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-С18. Скорость потока 100 мл/мин. Детектор 220 и 260 нм. Проба 50 мкл (100 мкг). А - линейный градиент ацетонитрила от 0 до 50% в 0,01 М Трис-ТФУ (рН 7) - 0,1 М перхорат лития. В - рехроматография заштрихованной части пика на рис. 21А. С-линейный градиент ацетонитрила от 0 до 45% в 0,1 М фосфате калия, рН 7. D - то же с добавлением 3,5 М мочевины.

21 А и В), давая такую же, но только "уменьшенную" картину. Причина аномального хроматографического поведения РНКазы на ОФ колонках была позже исследована в работе (56) и объяснена конформационными переходами РНКазы, которые она претерпевает в условиях ОФ ВЭЖХ. Поскольку конформеры обладают разной подвижностью, они проявляются в виде множественных пиков.

Кинетика гидролиза аффинного реагента. Кинетику гидролиза реагента изучали в описанных условиях (153) методом ОФ ВЭЖХ. Так как гидролиз сопровождается выделением HCl, реакционная смесь содержала соль слабого основания (Трис) в качестве буфера. В цитируемой работе концентрация Трис была в два раза меньше (0,05 М). Авторы не наблюдали образования продукта алкилирования Трис, хотя концентрация его непротонированной формы при pH 7 составляет около 0,005 М (pK Трис около 8,2), что более, чем на 4 порядка превышает концентрацию ионов гидроксила. Этот результат был нами проверен, и мы показали, что алкилирование Трис происходит (рис. 22 и 23). Разделение продуктов реакции проводили при pH 2, но, так как время анализа составляло всего 6 мин, заметного гидролиза фосфамидной связи мы не наблюдали. По нашим данным, 50%-ный гидролиз фосфамидной связи при pH 2 (25°) проходит за 30 мин. В дальнейшем модификацию РНКазы проводили в отсутствие какого-либо буфера, используя буферные свойства самой РНКазы.

Модификация РНКазы реагентом $\text{ClRCH}_2\text{NHd}(\text{pCpT})$.

Реакцию проводили при pH 7 в безбуферном растворе (см. п.3.6) и исследовали методом ОФ ВЭЖХ (рис. 24). Разделение проводили при 7° для уменьшения скорости гидролиза фосфамидной связи в кислой среде. Оращает на себя внимание тот факт, что РНКазы элюируется при 7° в виде уширенного асимметричного пика (пик 2 на рис. 24А), тогда как при комнатной температуре пик узкий и симметричный

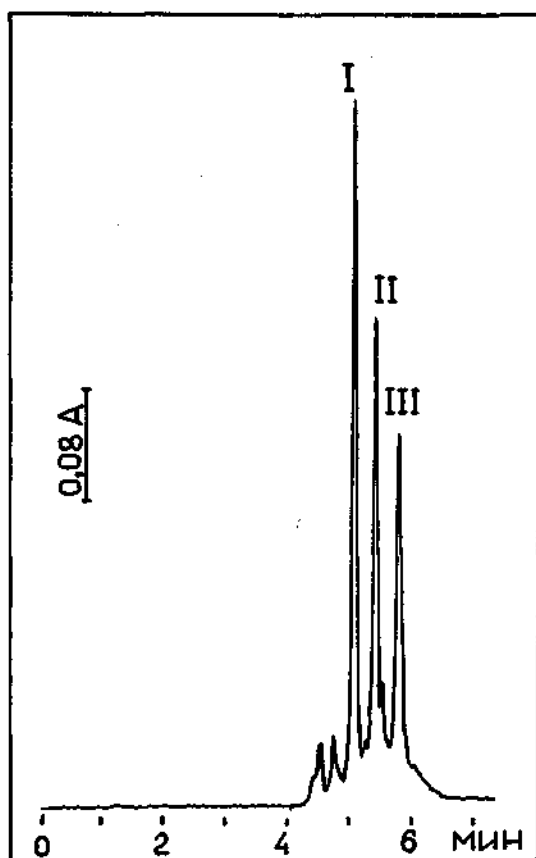


Рис. 22. Гидролиз $ClRCH_2NHd(pCpT)$ в 0,1 М Трис-НСI (рН 7) - хроматограмма реакционной смеси через 90 мин после начала реакции. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-СI8. Элюент: градиент ацетонитрила в 0,1% ТФУ от 0 до 50%. Скорость потока 200 мкл/мин. Для анализа реакционную смесь разбавлял в 2 раза 1% ТФУ. Проба 10 мкл (4 мкг). Детектор 260 нм.
 I - $OH-RCH_2NHd(pCpT)$
 II - Трис- $RCH_2NHd(pCpT)$
 III - $ClRCH_2NHd(pCpT)$

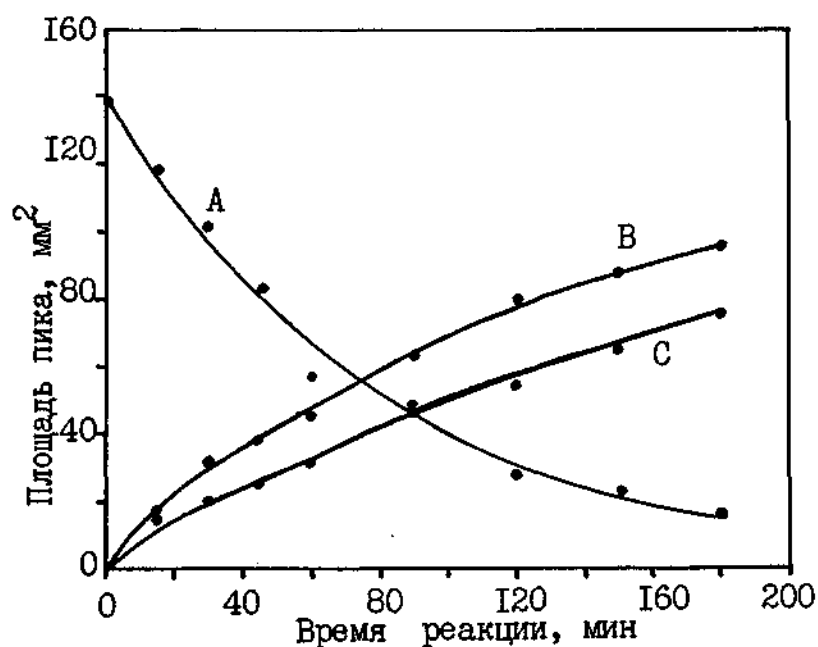


Рис. 23. Кинетика гидролиза $ClRCH_2NHd(pCpT)$ в 0,1 М Трис-НСI (рН 7) при 40° . А, В и С соответствуют III, I и II на рис. 22.

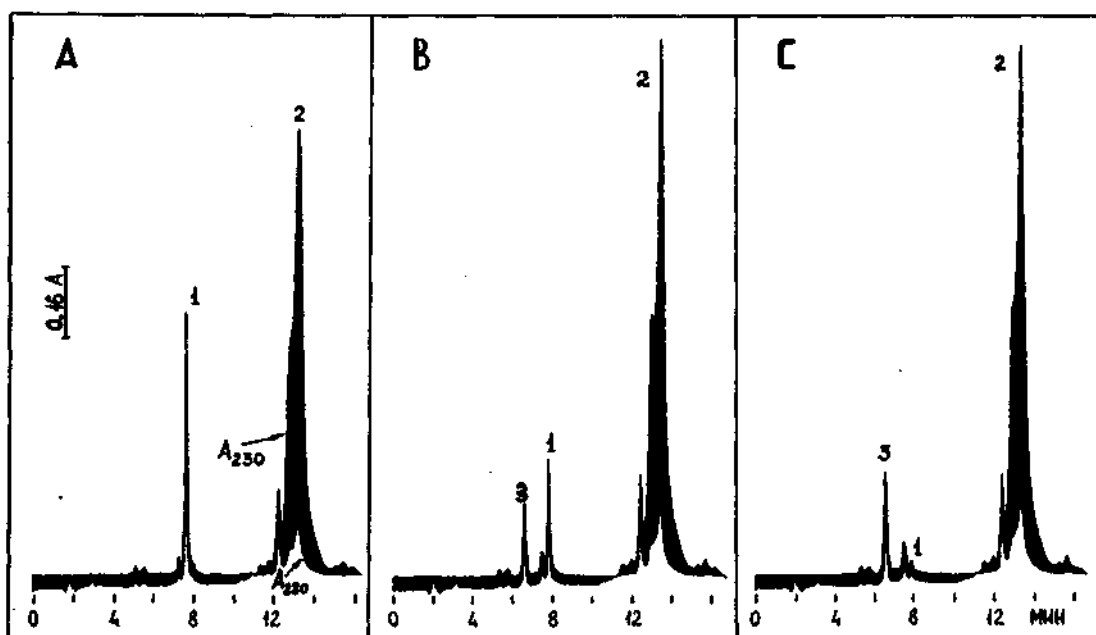


Рис. 24. Алкилирование РНК-азы $\text{ClRCH}_2\text{NHd}(\rho\text{C}\rho\text{T})$ - хроматограммы реакционной смеси через А - 0, В - 60 и С - 280 мин после начала реакции. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-С18. Скорость потока 100 мкл/мин. Элюент: градиент ацетонитрила в 0,1% ТФУ от 0 до 50%. Температура 7° . Детектор 230 и 280 нм. Для анализа реакционную смесь разбавляли в 10 раз 0,1% ТФУ (0°). Проба 12 мкл.
 1 - $\text{ClRCH}_2\text{NHd}(\rho\text{C}\rho\text{T})$.
 2 - немодифицированная и модифицированная РНК-аза.
 3 - $\text{OH-RCH}_2\text{NHd}(\rho\text{C}\rho\text{T})$.

(например, на рис. 17А). Модифицированную и немодифицированную РНКазу нам разделить не удалось. О том, что модификация происходит, свидетельствует увеличение поглощения при 280 нм в пике 2 (как следствие присоединения реагента к белку) и неэквивалентное образование продукта гидролиза реагента (пик 3). Скорость накопления этого продукта такая же, как и в отсутствие РНКазы (рис. 23), т.е. РНКазы не влияет на механизм гидролиза. Каких-либо других низкомолекулярных продуктов реакции мы не обнаружили.

Разделение триптических пептидов КМ-РНКазы. Принимая во внимание нестабильность фосфамидной связи в реагенте в кислой среде, мы исследовали возможность разделения триптических пептидов методом ОФ ВЭЖХ в нейтральной среде (рис. 25 В и С). Результаты показали, что селективность колонки при рН 7 значительно хуже, а добавление в элюент перхлората лития (рис. 25 С) картину существенно не меняет. В дальнейшем разделение триптических пептидов модифицированной РНКазы проводили в 0,1% ТФУ, а время разделения уменьшили до 15 мин (рис. 27).

Модификация РНКазы реагентом $C\ell RCH_2NHd(pTpA)$. Этот реагент был взят нами для препаративного выделения модифицированной РНКазы. По данным В.Н.Буневой он имеет в 10 раз более высокую константу связывания с РНКазой, чем производное динуклеотида $d(pCpT)$. В реакции с РНКазой реагент брали в избытке по отношению к РНКазе (1,8). Реакционную смесь после обессоливания разделяли на колонке с КМ-целлюлозой (рис. 26). Пики 1, 2, 3 и 4 идентифицировали как мономодифицированные продукты реакции на основании анализа спектральных отношений A_{280}/A_{260} , которые для этих пиков соответственно равны 0,48, 0,44, 0,52 и 0,42. РНКазы имеет $A_{280}/A_{260}=1,72$ (пик 5). Уменьшение спектрального отношения связано с присоединением к молекуле белка остатка реагента. Мономо-

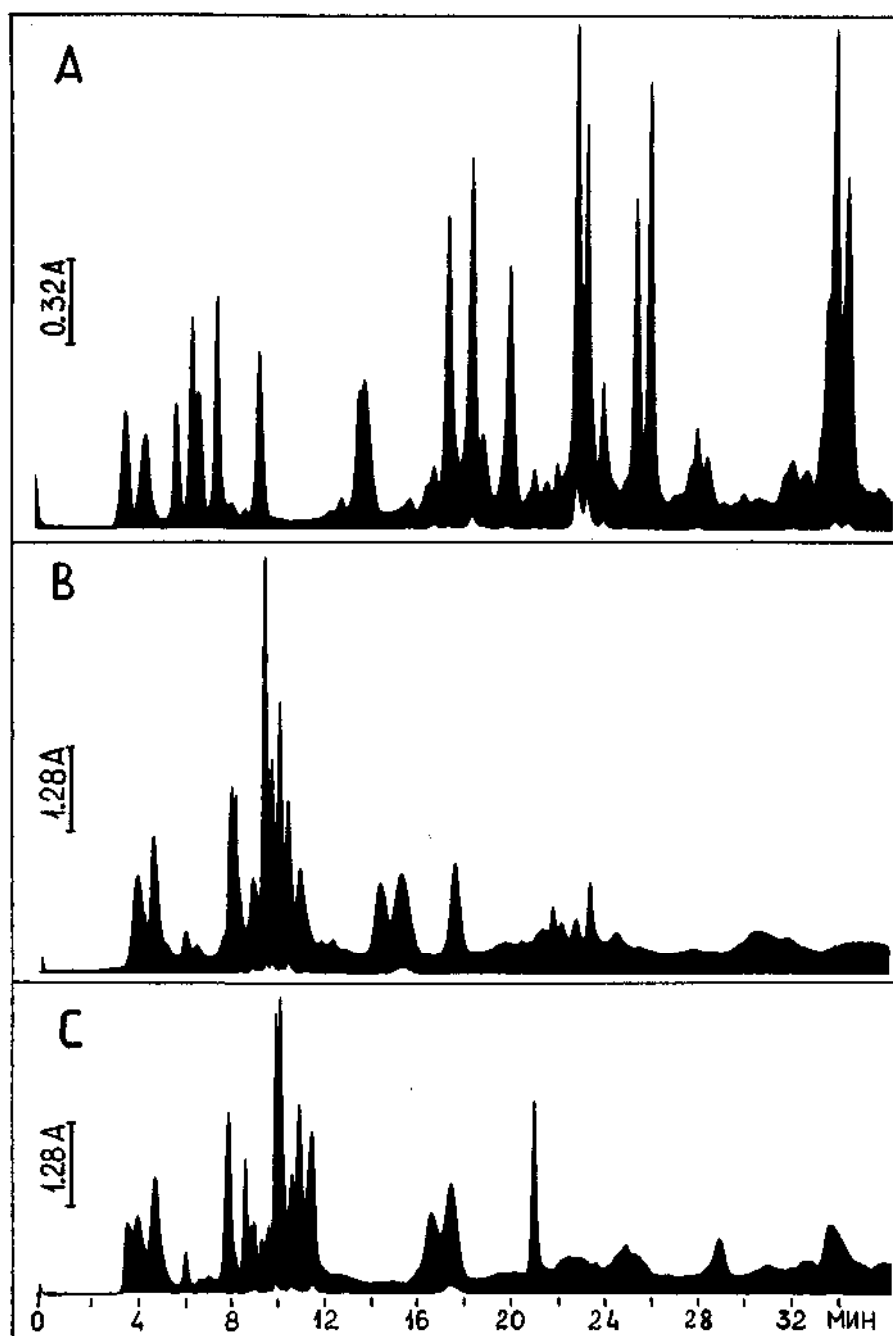


Рис. 25. Разделение триптического гидролизата КМ-РНК-азы. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-С18. Скорость потока 50 мкл/мин. Детектор 210 и 280 нм. Проба 50 мкл. Линейный градиент ацетонитрила от 0 до 50%: А - в 0,1% ТФУ; В - в 0,01 М Трис-ТФУ, рН 7; С - в 0,01 М Трис-ТФУ, рН 7 - 0,1 М перхлорат лития.

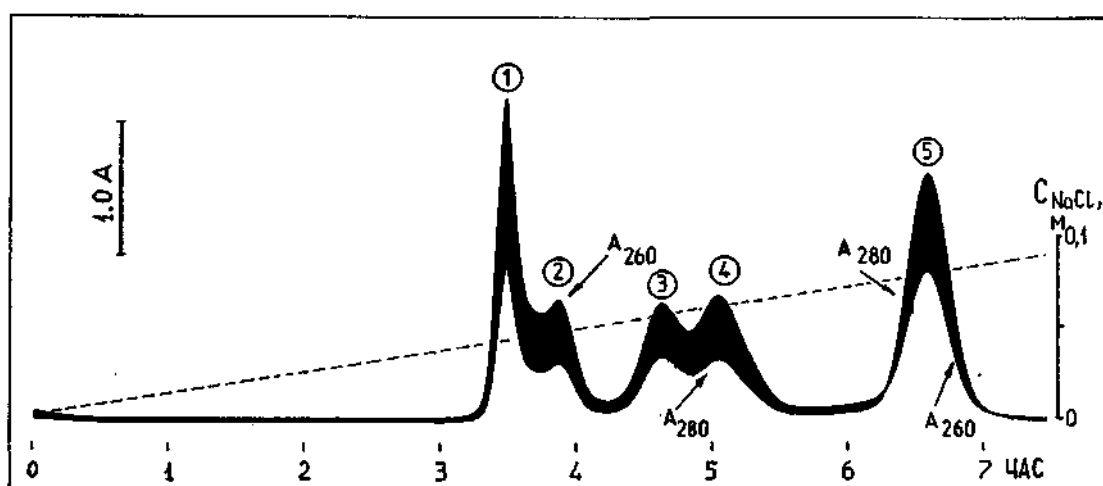


Рис. 26. Разделение продуктов реакции РНК-азы с $C\epsilon RCH_2NHd(pTpA)$. Колонка: $\varnothing 9 \times 190$ мм, катионообменник CM-52. Элюент: градиент хлористого натрия в 0,005 М Трис-НСI, рН 8. Скорость потока 0,4 мл/мин. Образец 20 мл. Детектор 260 и 280 нм. 1-4 - моно-модифицированные продукты, 5 - непрореагировавшая РНК-аза.

дифицированные продукты обладают меньшим по сравнению с РНКазой удерживанием, так как отрицательно заряженные нуклеотидные фосфаты частично компенсируют общий положительный заряд белковой молекулы. Из работы (154) известно, что РНКазы, несущая два остатка реагента с суммарным зарядом -4 , на КМ-целлюлозе не удерживается.

Множественная модификация РНКазы наблюдалась ранее в работе (154), и она проявлялась лишь в реакции с низкоаффинными реагентами. Так, реакция с 6-хлорпурином давала 5 продуктов, с 6-хлорпуринрибозидом - 3 продукта, а с 6-хлорпуринрибозид-5'-фосфатом - только один основной продукт модификации. Высокоселективную модификацию в реакции с последним реагентом объясняли наличием фосфата, который специфично связывается с РНКазой. Однако, это объяснение явно не удовлетворяет нашему случаю, когда аффинность реагента за счет использования в качестве "адреса" динуклеотида, казалось бы, должна быть еще выше.

Прежде, чем определять места модификации РНКазы, предстояло выяснить, являются ли продукты модификации, соответствующие пикам I-4, индивидуальными веществами, или они представляют собой наборы разных продуктов с одинаковыми эффективными зарядами. Для этого продукт реакции, соответствующий пику I (рис. 26) был восстановлен β -меркаптоэтанолом, карбоксиметилирован и подвергнут триптическому гидролизу. Продукты гидролиза разделяли методом ОФ ВЭЖХ (рис. 27А). Сравнение с пептидной картой немодифицированной РНКазы (рис. 27В) показывает, что модификация прошла преимущественно по одному участку молекулы белка, и остаток реагента присоединен к пептиду (*), о чем говорит заметное поглощение при 260 нм. Наличие остатка реагента в ряде "минорных" пептидов связано, видимо, с присутствием небольшого количества другого про-

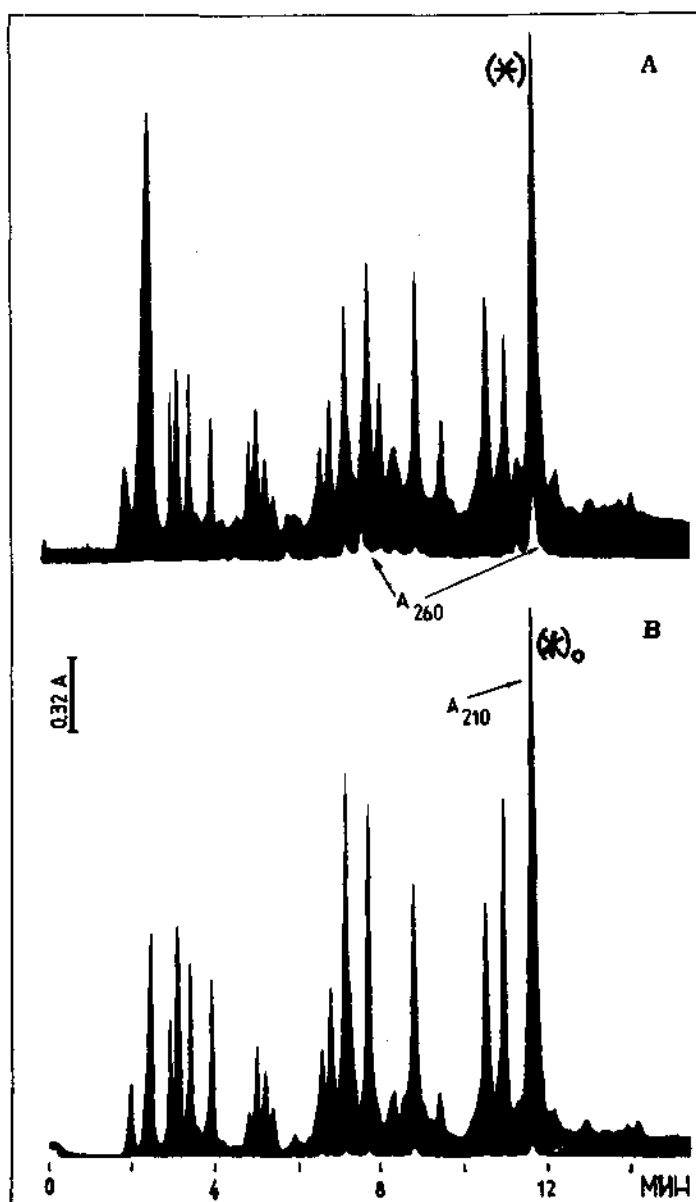


Рис. 27. Разделение триптических гидролизатов модифицированной (А) и немодифицированной (В) КМ-РНК-азы. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-С18. Элюент: градиент ацетонитрила в 0,1% ТФУ от 0 до 50%. Скорость потока 100 мкл/мин. Проба 50 мкл. Пик (*) - основной пептид, содержащий в своем составе присоединенный динуклеотид d(pTrA).

дукта модификации (из пика 2 на рис. 26, который не полностью отделен от пика I) и с частичным гидролизом пептида (✱) под действием примесных протеаз, содержащихся в препарате трипсина, который не подвергался дополнительной очистке (см. рис. 29). Чтобы установить, какой именно пептид РНКазы содержит в своем составе остаток реагента, соответствующий немодифицированный триптический пептид (✱) гидролизовали до аминокислот, превращали аминокислоты в УФ-поглощающие производные (ДНС-производные) и разделяли их методом ОФ ВЭЖХ. Модифицированный пептид подвергать такой обработке было нецелесообразно, так как в условиях кислотного гидролиза (6 М HCl, 105°, 24 часа) остаток реагента должен был отщепиться, и образующиеся из него вещества исказили бы хроматограмму ДНС-аминокислот. Поскольку последовательность аминокислот в РНКазе известна (155), качественный аминокислотный состав триптического пептида, следующий из хроматограммы ДНС-аминокислот (рис. 28), где стрелками показаны отсутствующие аминокислоты, однозначно определил, что этим пептидом является пептид His₁₀₅ - Val₁₂₄, т.е. С-концевой пептид РНКазы.

Аминокислотные остатки, по которым возможно присоединение реагента - His₁₀₅, Glu₁₁₁, Tyr₁₁₅, His₁₁₉, Asp₁₂₁ и Val₁₂₄ (С-концевая аминокислота, несущая COOH-группу). Принимая во внимание тот факт, что остатки His₁₁₉ и Asp₁₂₁ входят в состав активного центра фермента (154), а модифицированная РНКазы по данным В.Н.Буневой проявляет ферментативную активность по отношению к полиурициловой кислоте и 2,3-циклофосфату цитидина, эти аминокислоты как места возможной модификации следует, видимо, исключить.

Точная локализация места присоединения реагента нами не проводилась, и мы не знаем, прошла ли модификация по одному амино-

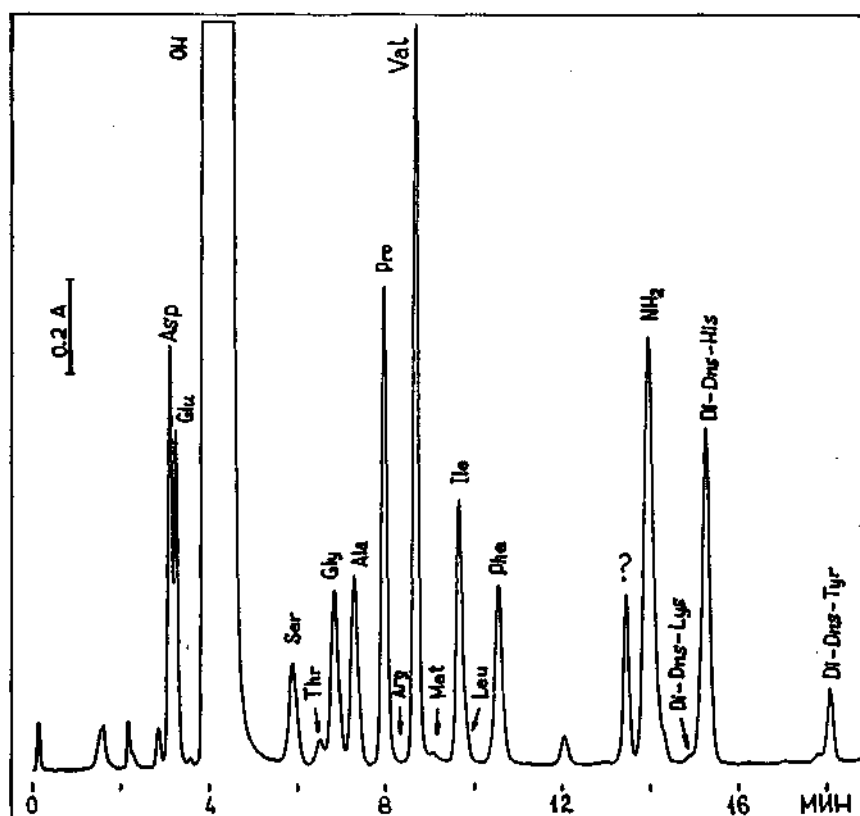


Рис. 28. Разделение ДНС-производных аминокислот пептида (×)₀ после его гидролиза в 6 N HCl при 105° (24 часа). Колонка: Ø2 x 62 мм, Нуклеосил 5-С18. Элюент: градиент ацетонитрила от 10 до 50% в 0,01 M Трис-ТФУ, рН 7,2. Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор 254 нм. Проба 5 мкл.

кислотному остатку С-концевого триптического пептида РНКазы, или на рис. 27А в пике (Ж) мы видим набор мономодифицированных пептидов, которые имеют близкие времена удерживания.

Выявленная в настоящей работе множественность форм РНКазы, аффинно модифицированной одной молекулой реагента, была неожиданной и поставила ряд общих вопросов, касающихся идеологии самого метода. В нашем Институте это явление сейчас исследуется В.Н.Буневой и др. с привлечением химической кинетики. До окончания этого этапа точная локализация аминокислотного остатка, присоединяющего реагент C^2RCH_2NHd (рТрА), представлялась нецелесообразной, поскольку не исключено, что в будущем придется изменить и структуру реагента, и условия реакции.

Таким образом, на примере изучения аффинной модификации РНКазы мы показали применимость метода микроколоночной ОФ ВЭЖХ для структурных исследований белков. Его сочетание с многоволновой детекцией существенно расширяет аналитические возможности метода.

4.4. Установление аминокислотной последовательности некоторых триптических пептидов белка оболочки ВКЭ.

Целью данного исследования являлось частичное секвенирование белка оболочки (Е) ВКЭ, необходимое для локализации его гена в геноме ВКЭ, структура которого устанавливалась в нашем Институте одновременно с настоящим исследованием (156).

Триптический гидролиз белка Е. Для того, чтобы избежать образования большого числа коротких пептидов при гидролизе белка трипсином, который обычно содержит некоторое количество других протеаз (главным образом, химотрипсин), трипсин был предварительно очищен методом ОФ ВЭЖХ по (49), а качество его очистки было проверено по гидролизу В-цепи инсулина (рис. 29). Очищенный трип-

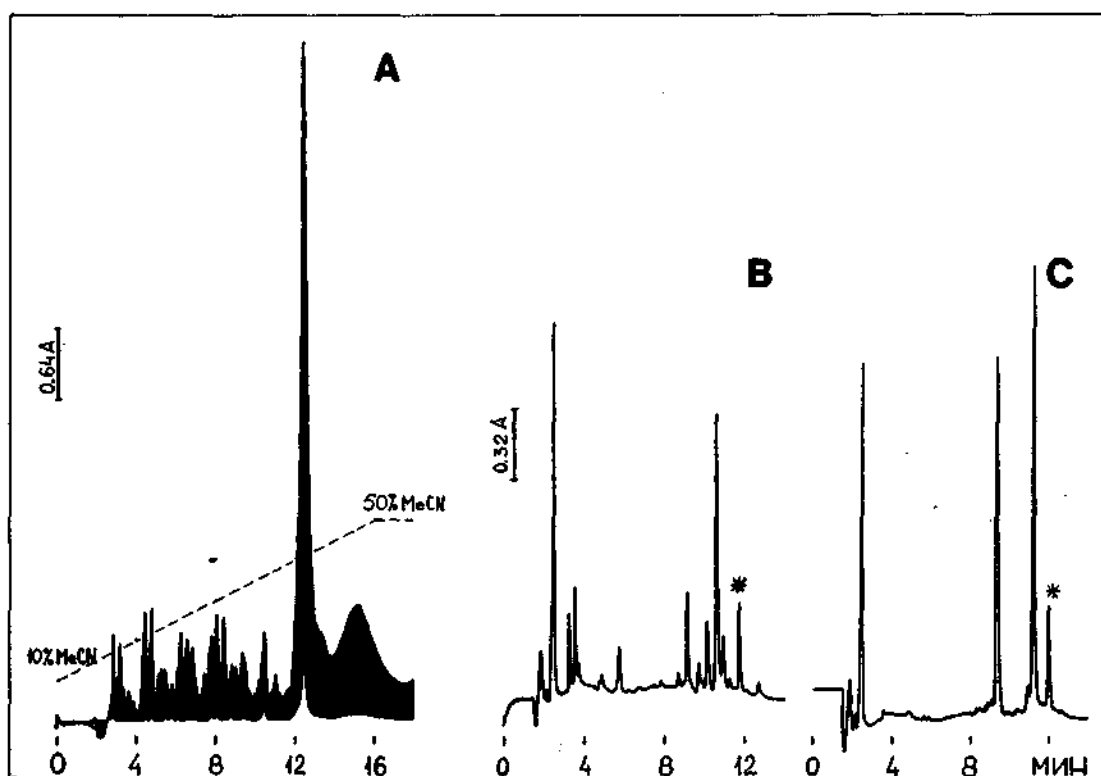


Рис. 29. Очистка трипсина методом ОФ ВЭЖХ. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-С18. Элюент: градиент ацетонитрила от 10 до 50% в 0,1% ТФУ. Скорость потока 100 мкл/мин.

А - очистка 200 мкг ТРСК-трипсина (*Sigma*, США); образец 200 мкл; детектор 210 и 280 нм.

В - продукты гидролиза В-цепи инсулина неочищенным трипсином; детектор 210 нм.

С - продукты гидролиза В-цепи инсулина очищенным трипсином.

(*) - неидентифицированная примесь в препарате В-цепи инсулина.

син действительно давал только два продукта гидролиза, которые соответствуют, очевидно, пептидам $\text{Phe}_1 - \text{Arg}_{23}$ и $\text{Gly}_{24} - \text{Lys}_{29}$ (I57). Исходный трипсин, хотя он и обработан ингибитором протеаз, разрушал В-цепь инсулина с образованием большого числа продуктов (см. рис. 29В).

Гидролиз белка Е проводили в 1% Тритоне XI00 (см. п. 3.7). Это была вынужденная мера, так как в отсутствие детергента белок выпадал в осадок, который не гидролизовался трипсином.

Выделение триптических пептидов белка Е. Триптический гидролизат хроматографировали на ОФ колонке в градиенте ацетонитрила в 0,1% ТФУ (рис. 30) и собирали фракцию пептидов с временем удерживания от 8 до 18 мин. После 18-той мин элюировались в основном компоненты детергента и небольшая часть пептидов. Весь гидролизат был расхроматографирован за 12 раз. Указанные фракции объединяли. После удаления из объединенной фракции пептидов ацетонитрила, оставшийся объем (около 6 мл) был нанесен на ту же колонку, и пептиды элюировали 50% ацетонитрилом в объеме 200 мкл. Ацетонитрил опять удаляли (упаривание струей аргона), раствор наносили на колонку с ОФ и элюировали пептиды линейным градиентом ацетонитрила в 0,1% ТФУ (рис. 31). Весь элюат был разделен на 10 фракций. Каждую фракцию рехроматографировали при нейтральном рН (пример разделения одной из фракций показан на рис. 32), главные пики опять хроматографировали при рН 2 (рис. 33). Последние хроматографии проводили с детекцией при трех длинах волн для определения спектральных отношений A_{220}/A_{210} и A_{280}/A_{210} , которые позволяют сделать вывод о наличии в пептидах остатков триптофана и тирозина, а в некоторых случаях также фенилаланина и гистидина.

В результате описанной процедуры было выделено 25 чистых

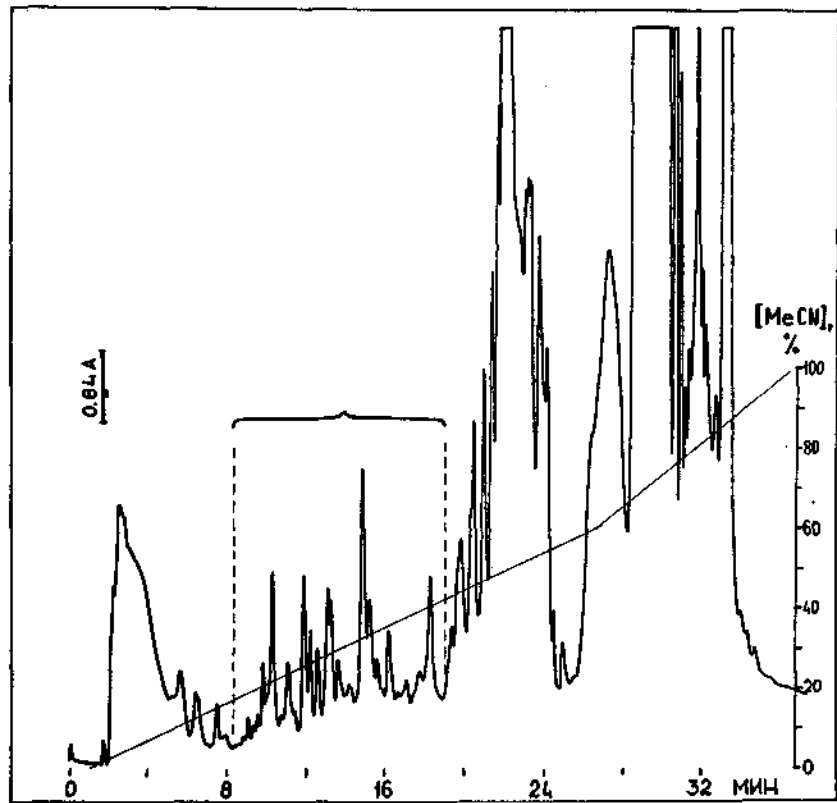


Рис. 30. Разделение продуктов триптического гидролиза белка Е ВКЭ. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-С18. Элюент: градиент ацетонитрила в 0,1% ТФУ. Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор 210 нм. Проба 250 мкл (400 мкг гидролизата белка).

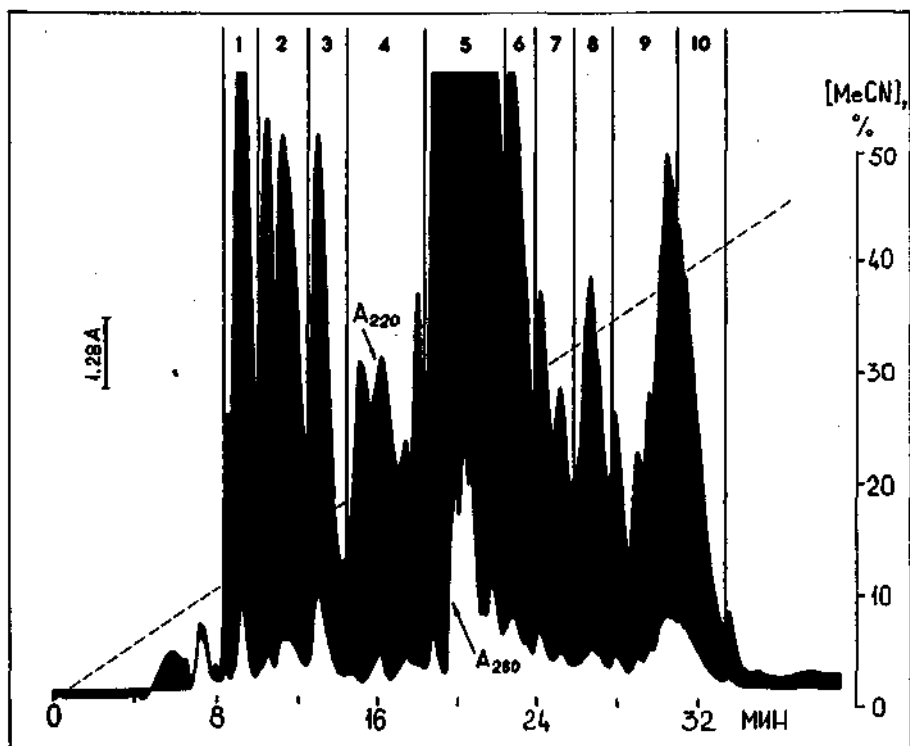


Рис. 31. Фракционирование триптических пептидов белка Е ВКЭ. Колонка: Ø2 x 62 мм, Нуклеосил 5-С18. Элюент: градиент ацетонитрила в 0,1% ТФУ. Скорость потока 50 мкл/мин. Проба 100 мкл (гидролизат 5 мг белка).

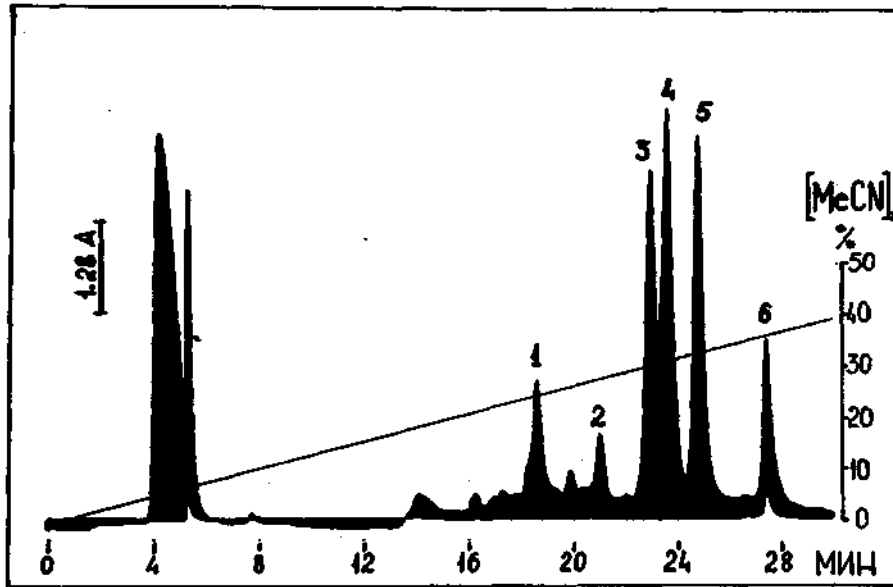


Рис. 32. Разделение триптических пептидов белка Е ВКЭ (фракция 8 на рис. 31). Колонка: Ø2 x 62 мм, Нуклеосил 5-С18. Элюент: градиент ацетонитрила в 0,01 М Трис-ТФУ, рН 7,2. Скорость потока 50 мкл/мин. Детектор 210 и 280 нм.

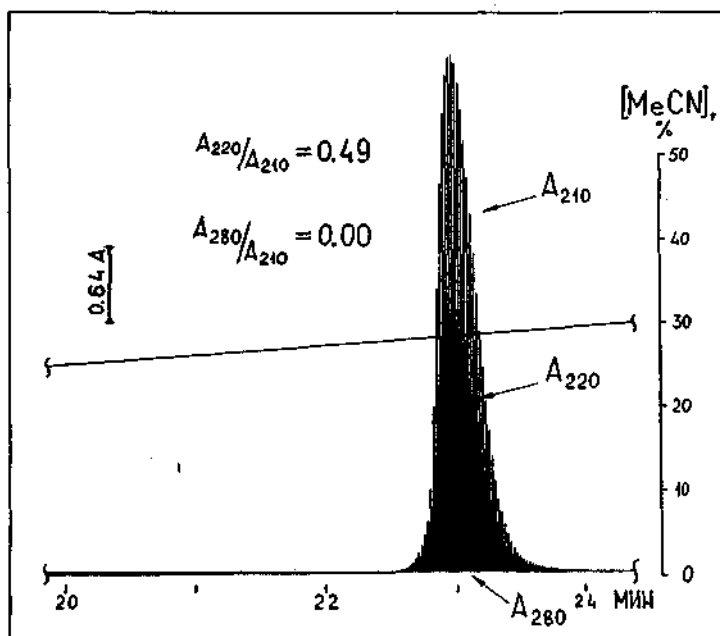


Рис. 33. Рехроматография пика 4 (рис. 32). Колонка та же. Элюент: градиент ацетонитрила в 0,1% ТФУ. Скорость потока 50 мкл/мин. Детектор 210, 220 и 280 нм.

пептидов в количестве от 30 до 5 наномолей. Количество пептидов оценивали по УФ-поглощению (I24).

Секвенирование триптических пептидов белка E. Четыре пептида были секвенированы совместно с В.В.Шемякиным и И.В.Назимовым на секвенаторе 890 C (Beckman, США). Идентификацию ФТГ-аминокислот проводили методами ОФ ВЭЖХ (хроматограф "Милихром") и параллельно путем их кислотного гидролиза до аминокислот с идентификацией на аминокислотном анализаторе с флуориметрическим детектором (реакция с о-фталевым альдегидом; анализатор LC7000, Biotronik, ФРГ). Один из вариантов разработанного нами анализа ФТГ-аминокислот на микроколоночном хроматографе "Милихром" показан на рис. 34. Двухволновая детекция позволяет надежно идентифицировать ФТГ-производные таких аминокислот, как His, Pro, Trp, Lys, Phe. Предел обнаружения ФТГ-аминокислот в нашем методе не хуже 2-3 пикомолей (рис. 35), что соответствует современному уровню ВЭЖХ (I58). Альтернативным по отношению к анализу аминокислот с флуориметрическим детектированием является их анализ в виде ФТК-производных с УФ-фотометрической детекцией (I38, I59). Несомненное преимущество этого варианта анализа - возможность определения пролина, который о-фталевым альдегидом не обнаруживается. Микроколоночный вариант анализа аминокислот в виде ФТК-производных показан на рис. 36. Предел обнаружения аминокислот составляет около двух пикомолей.

Результаты по секвенированию пептидов белка E суммированы в таблице 6. Пептид 8-3-2 является N-концевым пептидом белка E, судя по тому, что его N-концевая последовательность совпадает с N-концевой последовательностью белка E, определенной в работе (I60), и по тому, что соответствующая ему последовательность нуклеотидов находится на 5'-конце гена белка E. Пептиду 8-3-2 пред-

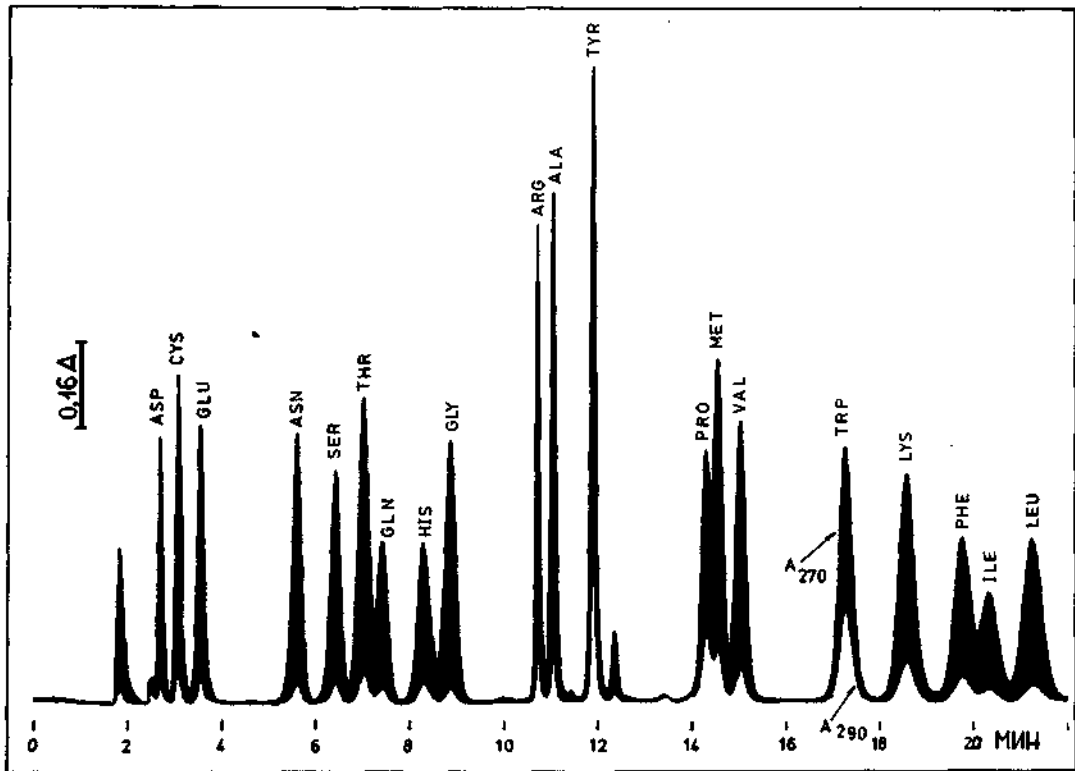


Рис. 34. Разделение ФТГ-аминокислот. Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил 5-С18. Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор 270 и 290 нм. Двухступенчатая элюция: I-ая ступень - 900 мкл 22% ацетонитрила в 0,1 М перхлорате лития-0,01 М ацетате натрия (рН 5,4); 2-ая ступень - 1300 мкл 40% этанола в 0,1 М перхлорате лития-0,01 М ацетате натрия (рН 5,4). Проба 10 мкл (по 0,8-1,2 наномолей каждой ФТГ-аминокислоты).

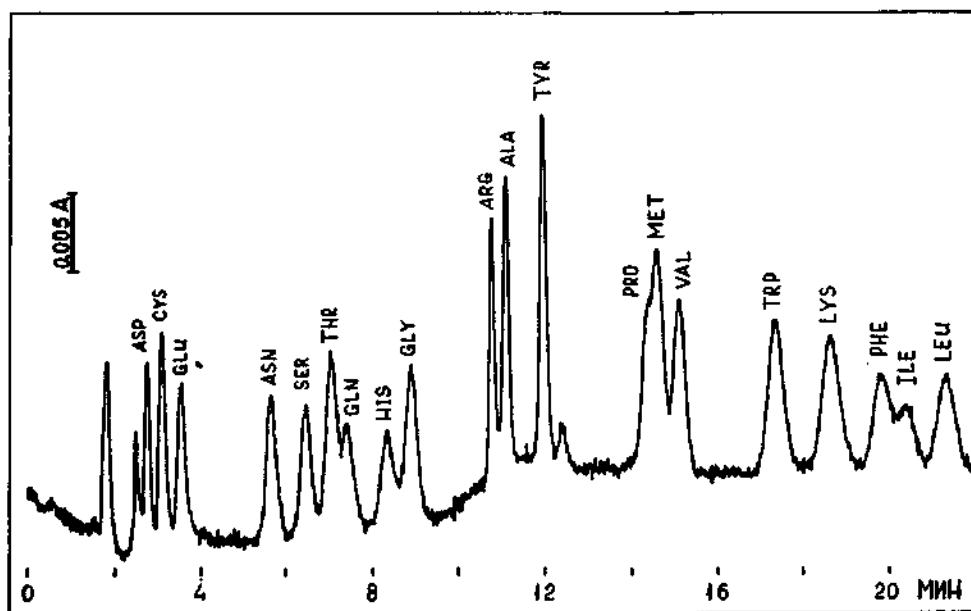


Рис. 35. Разделение ФТГ-аминокислот. Проба 10 мкл (по 20–30 пико-молей каждой аминокислоты). Детектор 270 нм. Условия разделения как на рис. 34.

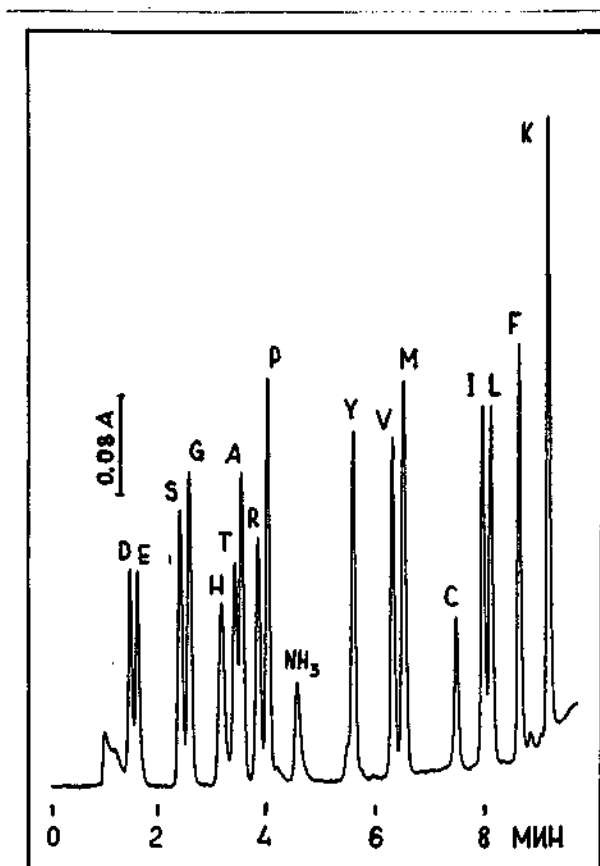


Рис. 36. Разделение ФТГ-аминокислот. Колонка: Ø1,7 x 75 мм, Нуклеосил 5-С18. Температура 60°C. Проба 5 мкл (по 300 пико-молей каждой аминокислоты). Скорость потока 200 мкл/мин. Детектор 250 нм. Элюент: градиент от 100% А до 100% В (А - 0,1 М перхлорат лития-0,05 М ацетат аммония, рН 6,8; В - 50% ацетонитрила в 0,1 М перхлорате лития-0,1 М ацетате аммония, рН 6,8. Продолжительность градиента 11 мин.

шествует последовательность RR, известный сайт протеиназы процессинга (I6I).

Спектральные отношения A_{220}/A_{210} и A_{280}/A_{210} для пептидов 4-3 и 10-1 свидетельствовали о наличии в них остатков триптофана. На основании аналогичных данных для двух других пептидов можно было утверждать, что триптофан и тирозин они не содержат.

Таблица 6.

Последовательность аминокислот некоторых триптических пептидов белка оболочки БКЭ.

Шифр пептида	Последовательность аминокислот	$\frac{A_{220}}{A_{210}}$	$\frac{A_{280}}{A_{210}}$
4-3	XEGAQNWNNXE*	0,95	0,16
	TEGAQNWNNNAER**		
8-3-2	XVLIXSXAQGDLE*	0,49	0
	SVLIPSHAQGDLEGR**		
10-1	XLEGDLE*	1,00	0,16
	WLEGDLEGR**		
8-4	LVXFXXXAVK*	0,49	0
	LVEFGAPHAVK**		

*) По данным секвенирования пептидов.

***) По данным определения последовательности нуклеотидов (I56).

Однобуквенный код аминокислот приведен в табл. 2.

X - неидентифицированная аминокислота.

5. ВЫВОДЫ

1. Разработан метод микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Эффективность колонок при их объеме 0,2 мл составляет 5000-6000 теоретических тарелок. Метод реализован в выпускаемом промышленностью хроматографе "Милихром" на примерах прямофазной и обращенно-фазовой хроматографии веществ разных классов.

2. Исследована обращенно-фазовая микроколоночная хроматография пептидов. Получены количественные данные, позволяющие в зависимости от скорости потока, нагрузки на колонку, крутизны градиента и состава подвижной фазы прогнозировать эффективность разделения пептидов.

3. С помощью обращенно-фазовой микроколоночной хроматографии решены следующие задачи:

- а) разработаны методики разделения ДНС-, ФТГ- и ФТК-производных аминокислот, необходимые для структурных исследований пептидов на уровне 10^{-11} моля;
- б) локализовано место аффинной модификации в молекуле рибонуклеазы при ее реакции с алкилирующим производным динуклеотида;
- в) получены в чистом виде триптические пептиды белка оболочки вируса клещевого энцефалита; секвенирование четырех таких пептидов позволило локализовать ген белка оболочки в геноме вируса.

6. УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

МК ВЭЖХ - микроколоночная ВЭЖХ

ОФ - обращенная фаза (или обращенно-фазовая)

k' - коэффициент емкости вещества (при хроматографии)

т.т. - теоретическая тарелка

N - эффективность хроматографической колонки в т.т.

ВЭТТ - высота эквивалентная теоретической тарелке

РС - пиковая емкость колонки

σ - дисперсия хроматографического пика

t_g - продолжительность градиента

T_R - время удерживания вещества в колонке

УФ - ультрафиолетовый (например, УФ-поглощение)

a_M - поглощение растворенного вещества при концентрации I М в кювете с длиной оптического пути l см - молярное поглощение

РНКаза - панкреатическая рибонуклеаза А

КМ-РНКаза - карбоксиметилированная РНКаза (по цистеинам)

КМ-целлюлоза - карбоксиметилированная целлюлоза

Трис - трис-(оксиметил-)-аминометан

ТФУ - трифторуксусная кислота

$C_6H_5CH_2NHd(pNpN)$ - 4-(N -2-хлорэтил- N -метиламино)-бензиламидное производное дидезокси-нуклеотида

ДНС-хлорид - 1-диметиламинонафталин-5-сульфонил хлорид (дансил-хлорид)

ДНС-аминокислоты - дансильные производные аминокислот

ВКЭ - вирус клещевого энцефалита

ФИЦ - фенилизотиоцианат

ФТГ-аминокислоты - фенилтиогидантоины аминокислот

ФТК-аминокислоты - фенилтиокарбомаилы аминокислот

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cunninghame J.G., Sizeland M.L., Willis H.H., Eakins J., Marcer E.R. The rapid separation of rare-earth fission product by cation exchange using lactic acid eluant. - J. Inorg. Nucl. Chem., 1955, v. 1, p. 163-167.
2. Stewart D.C. Rapid separation of tracer amounts of rare-earth elements of the yttrium group. - Analyt. Chem., 1955, v. 27, p. 1279-1283.
3. Crouch E.A.C., Swainbank I.G. The separation of fission products on ion-exchange micro-columns. - In: Proceedings of the international symposium on microchemistry, Pergamon Press, Oxford, 1960, p. 220-230.
4. Kirsten E., Kirsten R. A nanomole adaption of the automatic amino acid analysis according to Spackman, Stein and Moore (1958). - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1962, v. 7, N 1, p. 76-81.
5. Кузьмин С.В., Матвеев В.В., Прессман Е.К., Сандахчиев Л.С. Простая процедура количественного хроматографического анализа в ультрамикрощкале. - Биохимия, 1969, т. 34, вып. 4, с. 706-711.
6. Сандахчиев Л.С. Анализ нуклеиновых кислот и их производных в масштабе 10^{-8} - 10^{-9} г. - В кн: Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот. / Под. ред. Кнорре Д.Г. и Векстерн Т.В. - М., Наука, 1973, стр. 77-94.
7. Грачев М.А. Микроспектрофотометр МСФ-I и его применение для микроколоночной хроматографии и спектрального анализа олигонуклеотидов. - В кн: Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот. / Под. ред. Кнорре Д.Г. и Векстерн Т.В. - М., Наука, 1973, стр. 104-121.

8. Риман В., Уолтон Г. Ионообменная хроматография в аналитической химии. - М., Мир, 1973.
9. Современное состояние жидкостной хроматографии. /Под ред. Киркленда Дж. - М., Мир, 1974.
10. Belenkii B.G., Vilenchik L.Z. Modern Liquid Chromatography of Macromolecules. - Elsevier, Amsterdam, 1983.
- II. Детерман Г. Гель-хроматография. - М., Мир, 1970.
12. Regnier F.E., Gooding K.M. High-Performance Liquid Chromatography of Proteins. - *Analyt. Biochem.*, 1980, v. 103, p.1-25.
13. Hearn M.T.W. High-performance liquid chromatography and its application to protein chemistry. - In: *Advances in Chromatography.* /Giddings J.C., Ed. - Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1982, v. 20, p. 1-82.
14. Rubinstein M. Preparative high-performance liquid chromatography of proteins. - *Analyt. Biochem.*, 1979, v. 98, p. 1-7.
15. Hearn T.W., Regnier F.E., Wehr C.T. HPLC of peptides and proteins. - *American Laboratory*, 1982, October, p. 18-39.
16. Regnier F.E. HPLC of Proteins, Peptides, Polinucleotides. - *Analyt. Chem.*, 1983, v. 55, N 13, p. 1299-1306.
17. Regnier F.E. High-Performance Liquid Chromatography of Proteins. - In: *Methods in Enzymology*, 1983, v. 91, p. 137-190.
18. Regnier F.E. High-Performance Liquid Chromatography of Biopolymers. - *Science*, 1983, v. 222, N 4621, p. 245-252.
19. Krummen K., Frei R.W. The separation of nonapeptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography. - *J. Chromatogr.*, 1977, v. 132, p. 27-36.
20. Krummen K., Frei R.W. Quantitative analysis of nonapeptides in pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid

- chromatography. - J. Chromatogr., 1977, v. 132, p. 429-436.
21. Margolis S.A., Longenbach P.J. Separation of Structurally Similar, Biologically Active Peptides from Their Impurities. - J. of High Resol. Chromatogr., 1979, v. 2, p. 255-256.
 22. Terabe S., Konaka R., Inouye K. Separation of some polypeptide hormones by high-performance liquid chromatography. - J. Chromatogr., 1979, v. 172, p. 163-177.
 23. Lindeberg G. Separation of vasopressin analogues by reversed-phase high-performance liquid chromatography. - J. Chromatogr., 1980, v. 193, p. 427-431.
 24. Mabuchi H., Nakahashi H. Systematic separation of medium-sized biologically active peptides by HPLC. - J. Chromatogr., 1981, v. 213, p. 275-286.
 25. Knight M., Ito Y., Chase T.N. Preparative purification of the peptide des-enkefalin γ -endorphin. Comparison of HPLC and counter-current chromatography. - J. Chromatogr., 1981, v. 212, p. 356-360.
 26. Pask-Hughes R.A., Corran P.H., Calam D.H. Assay of the combined formulation of ergometrine and oxytocin by high-performance liquid chromatography. - J. Chromatogr., 1981, v. 214, p. 307-315.
 27. Szepesi G., Gazdag M. Improved high-performance liquid chromatographic method for the analysis of insulins and related compounds. - J. Chromatogr., 1981, v. 218, p. 597-602.
 28. Gazdag M., Szepesi G. Separation of large peptides by HPLC. - J. Chromatogr., 1981, v. 218, p. 603-612.
 29. Guy M.N., Roberson G.M., Barnes L.D. Analysis of Angiotensins I, II, III and Jodinated Derivatives by High-

- Performance Liquid Chromatography. - *Analyt. Biochem.*, 1981, v. 112, p. 272-277.
30. Bennett H.P.J., Browne C.A., Solomon S. Purification of the Two Major Forms of Rat Pituitary Corticotropin Using Only Reversed-Phase Liquid Chromatography. - *Biochemistry*, 1981, v. 20, p. 4530-4538.
31. Frank B.H., Beckage M.J., Willey K.A. High-performance liquid chromatography of single-site carrier-free pancreatic polypeptide hormone radiotracers. - *J. Chromatogr.*, 1983, v. 266, p. 239-248.
32. Grego B., Hearn M.W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. LXIII. Reversed-phase HPLC-characterization of several polypeptide and protein hormones. - *J. Chromatogr.*, 1984, v. 336, p. 25-40.
33. James S., Bennett H.P. Use of reversed-phase and ion-exchange batch extraction in the purification of bovine pituitary peptides. - *J. Chromatogr.*, 1985, v. 326, p. 329-338.
34. Aguilar M.-I., Hodder A.N., Hearn M.T.W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. LXV. Studies on the optimisation of the reversed-phase gradient elution of polypeptides: evaluation of retention relationships with β -endorphin-related polypeptides. - *J. Chromatogr.*, 1985, v. 327, p. 115-138.
35. Nice E.C., Capp M.W., Cooke N, O'Hare M.J. Comparison of short and ultrashort-chain alkylsilane-bonded silicas for the high-performance liquid chromatography of proteins by hydrophobic interaction methods. - *J. Chromatogr.*, 1981, v. 218, p. 569-580.
36. Mönch W., Dehnen W. High-performance liquid chromatography

- of polypeptides and proteins on a reversed-phase support.
- J. Chromatogr., 1978, v. 147, p. 415-418.
37. Henderson L.E., Sowder R., Oroszlan S. Protein and Peptide Purification by Reversed-Phase High Pressure Chromatography Using Volatile Solvents. - In: Developments in Biochemistry. / Liu, Schechter, Heinrikson, Condliffe, Eds. - Elsevier North Holland, Inc., 1981, v. 17, p. 251-260.
38. Meek J.L. Prediction of peptide retention times in HPLC on the basis of amino acid composition. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, N 3, p. 1632-1636.
39. Schaaper W.M.M., Voskamp D., Olieman C. Perfluoroalkanoic acids as lipophilic ion-pairing reagents in reversed-phase liquid chromatography of peptides including secretin. - J. Chromatogr., 1980, v. 195, p. 181-186.
40. Pingoud V. Homogeneous mono- ^{125}I -Tyr 10 - and mono- ^{125}I -Tyr 13 -glucagon. - J. Chromatogr., 1985, v. 331, p. 125-132.
41. van der Wal S.J. Optimization of Microbore HPLC Separation for Minimum Detectable Quantity and Separation Time. - J. Chromatogr. Sci., 1985, v. 23, N 8, p. 341-347.
42. Browne C.A., Bennett H.P.J., Solomon S. The Isolation of Peptides by High-Performance Liquid Chromatography Using Predicted Elution Positions. - In: Proceedings of the first international symposium "High-Performance Liquid Chromatography of Proteins and Peptides". / Hearn M.T.W., Regnier F. E., Wehr C.T., Eds. - Academic Press, New York, 1983, p. 65-72.
43. Wettenhall R.E.H., Quinn M.J. Separation of tryptic phosphopeptides of ribosomal origin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. - J. Chromatogr., 1984, v. 336,

- p. 51-61.
44. Kerlavage A.R., Weitzmann C.J., Hasan T., Cooperman B.S. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of *Escherichia coli* ribosomal proteins. Characteristics of the separation of complex protein mixture. - *J. Chromatogr.*, 1983, v. 266, p. 225-237.
 45. Kerlavage A.R., Hasan T., Cooperman B.S. Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography of *E. coli* Ribosomal Proteins: Standardization of 70 S, 50 S and 30 S Protein Chromatograms. - *J. Biol. Chem.*, 1983, v. 258, N 10, p. 6313-6318.
 46. Kamp R.M., Wittmann-Liebold B. Purification of *Escherichia coli* 50 S ribosomal proteins by high performance liquid chromatography. - *FEBS Letters*, 1984, v. 167, N 1, p. 59-63.
 47. Hobbs D.S., Pestka S. Purification and Characterization of Interferons from a Continuous Myeloblastic Cell Line. - *J. Biol. Chem.*, 1982, v. 257, N 8, p. 4071-4076.
 48. Strickler M.P., Kirtzlos J., Gemski M.J. The Purification of Prostatic Acid Phosphatase from Seminal Plasma by Reverse Phase HPLC. - *J. Liq. Chromatogr.*, 1982, v. 5, N 10, p. 1921-1931.
 49. Titani K., Sasagawa T., Resing K., Walsh K.A. A Simple and Rapid Purification on Commercial Trypsin and Chymotrypsin by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. - In: Proceedings of the first international symposium "High-Performance Liquid Chromatography of Proteins and Peptides". / Hearn M.T.W., Regnier F.E., Wehr C.T., Eds. - Academic Press, New York, 1983, p. 23-27.
 50. O'Hare M.J., Capp M.W., Nice E.C., Cooke N.H.C., Archer B.G.

Factors Influencing Chromatography of Proteins on Short Alkylsilane-Bonded Large Pore-Size Silicas. - In: Proceedings of the first international symposium "High-Performance Liquid Chromatography of Proteins and Peptides". / Hearn M.T.W., Regnier F.E., Wehr C.T., Eds. - Academic Press, New York, 1983, p. 161-172.

51. DiBussolo J.M., Gant J.R. Visualization of protein retention and migration in reversed-phase liquid chromatography. - J. Chromatogr., 1985, v. 327, p. 67-76.
52. Banes A.J., Link G.W., Snyder L.R. Comparison of reversed-phase columns for the separation of tryptic peptides by gradient elution. Correlation of experimental results and model prediction. - J. Chromatogr., 1985, v. 326, p.419-431.
53. Wilson K.J., Wieringen E.V., Klauser S., Berchtold M.W. Comparison of the high-performance liquid chromatography of peptides and proteins on 100- and 300 Å reversed-phase supports. - J. Chromatogr., 1982, v.237, N.3, p. 407-416.
54. Regnier F.E., Geng X. Retention model for proteins in reversed-phase liquid chromatography. - J. Chromatogr., 1984, v. 296, p. 15-30.
55. Stadalius M.A., Gold H.S., Snyder L.R. Optimization model for the gradient elution separation of peptide mixtures by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Verification of band width relationships for acetonitrile-water mobile phases. - J. Chromatogr., 1985, v. 327, p. 27-45.
56. Cohen S.A., Benedek K., Tapushi Y., Ford J.C., Karger B.L. Conformational Effects in the Reversed-Phase Liquid Chromatography of Ribonuclease A. - Analyt. Biochem., 1985, v. 144, p. 275-284.

- v. 144, p. 275-284.
57. Hearn M.T.W., Hodder A.N., Aguilar M.-I. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. LXVI. Investigations on the effects of chromatographic dwell in the reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of proteins. - *J. Chromatogr.*, 1985, v. 327, p. 47-66.
 58. Heukeshoven J., Dernick D. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of virus proteins and other large hydrophobic proteins in formic acid containing solvents. - *J. Chromatogr.*, 1982, v. 252, p. 241-254.
 59. Heukeshoven J., Dernick D. Characterization of a solvent system for separation of water-insoluble poliovirus proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. - *J. Chromatogr.*, 1985, v. 326, p. 91-101.
 60. Winkler C., Heinz F.K., Guirakhoo F., Kunz C. Separation of flavivirus membrane and capsid proteins by multistep high-performance liquid chromatography optimized by immunological monitoring. - *J. Chromatogr.*, 1985, v. 326, p. 113-119.
 61. Alpert C.A., Dörschug M., Saffen D., Frank R., Deutscher J., Hengstenberg W. The bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Isolation of active site peptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography and determination of their primary structure. - *J. Chromatogr.*, 1985, v. 326, p. 363-371.
 62. Lozier J., Takahashi N., Putnam F.W. Purification of cyanogen bromide fragments from α -2-glycoprotein I by high-performance liquid chromatography. - *J. Chromatogr.*, 1983,

- v. 266, p. 545-554.
63. Strickler M.P., Travis R.W., Olenick G. Peptide Mapping of Variant Glycoproteins from Trypanosoma Rhodeslense by Reversed-Phase Liquid Chromatography. - J. Liq. Chromatogr., 1982, v. 5, N 10, p. 1933-1940.
 64. Wright P.J., Warr H.M. Peptide Mapping of Envelope-related Glycoproteins Specified by the Flaviviruses Kunjin and West Nile. - J. gen. Virol., 1985, v. 66, N 3, p. 597-601.
 65. Gurley L.R., Prentice D.A., Valdez J.G., Spall W.D. High-Performance Liquid Chromatography of Chromatin Histones. - J. Chromatogr., 1983, v. 266, p. 609-627.
 66. Terabe S., Nishi H., Ando T. Separation of cytochromes c by reversed-phase high-performance liquid chromatography. - J. Chromatogr., 1981, v. 212, p. 295-304.
 67. Ingraham R.H., Lau S.Y.M., Taneja A.K., Hodges R.S. Denaturation and The Effects of Temperature on Hydrophobic Interactinn and Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Proteins. - J. Chromatogr., 1985, v. 327, p. 77-92.
 68. Grego B., Lambrou F., Hearn M.T.W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. XLVIII. Retention behavior of tryptic peptides of human growth hormone isolated by reversed-phase high-performance liquid chromatography. A comparative study using different chromatographic conditions and predicted elution behaviour based on retention coefficients. - J. Chromatogr., 1983, v. 266, p. 89-103.
 69. McWherter C.A., Thannhauser T.W., Fredrickson R.A., Zagotta M.T., Scheraga H.A. Peptide Mapping of Bovine Pancreatic

- Ribonuclease A by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. I. Application to the Reduced and S-Carboxymethylated Protein. - *Analyt. Biochem.*, 1984, v. 141, p. 523-537.
70. Thannhauser T.W., McWherter C.A., Scheraga H.A. Peptide Mapping of Bovine Pancreatic Ribonuclease A by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. II. A Two-Dimensional Technique for Determination of Disulfide Pairings Using a Continuous-Flow Disulfide-Detection System. - *Analyt. Biochem.*, 1985, v. 149, p. 322-330.
71. Takahashi N., Ishioka N., Takahashi Y., Putnam F.W. Automated tandem high-performance liquid chromatographic system for separation of extremely complex peptide mixtures. - *J. Chromatogr.*, 1985, v. 326, p. 407-418.
72. Mnanan A.S., Newton D.L., Klee C.B. Purification and peptide mapping of calmodulin and its chemically modified derivatives by reversed-phase high-performance liquid chromatography. - *J. Chromatogr.*, 1985, v. 326, p. 387-397.
73. Deibler G.E., Boyd L.F., Martenson R.E., Kies M.W. Isolation of tryptic peptides of myelin basic protein by reversed-phase high-performance liquid chromatography. - *J. Chromatogr.*, 1985, v. 326, p. 433-442.
74. Mant C.I., Hodges R.S. General Method for the Separation of Cyanogen Bromide Digests of Proteins by High-Performance Liquid Chromatography. Rabbit Skeletal Troponin I. - *J. Chromatogr.*, 1985, v. 326, p. 349-356.
75. Hughes G.J., Winterhalter K.H., Wilson K.J. Microsequence analysis: I. Peptide isolation using HPLC. - *FEBS Letters*, 1979, v. 108, N 1, p. 81-86.

76. Yuan P.-M., Pande H., Clark B.R., Shively J.E. Micro-sequence Analysis of Peptides and Proteins. I. Preparation of Samples by Reversed-Phase Liquid Chromatography. - *Analyt. Biochem.*, 1982, v. 120, p. 289-301.
77. Grego B., Van Driel I.R., Stearne P.A., Goding J.W., Nice E.C., Simpson R.J. A micribore high-performance liquid chromatography strategy for the purification of polypeptides for gas-phase sequence analysis. Structural studies on the murine transferrin receptor. - *Eur. J. Biochem.*, 1985, v. 148, N 3, p. 485-491.
78. Takahashi N., Takahashi Y., Putnam F.W. Two-dimensional high-performance liquid chromatography and chemical modification in the strategy of sequence analysis. Complete amino acid sequence of the lambda light chain of human immunoglobulin D. - *J. Chromatogr.*, 1983, v. 266, p. 511-522.
79. Schlabach T.D., Wehr C.T. Fluoreccent Techniques for the Selective Detection of Chromatographically Separated Peptides. - In: *Proceedings of the first international symposium "High-Performance Liquid Chromatography of Proteins and Peptides"*. / Hearn M.T.W., Regnier F.E., Wehr C.T., Eds. Academic Press, New York, 1983, p. 221-232.
80. Meek J.L. Derivatizing reagents for high-performance liquid chromatography detection of peptides at the picomole level. - *J. Chromatogr.*, 1983, v. 266, p. 401-408.
81. Chang J.Y. Isolation and chracterization of polypeptide at the picomole level. - *Biochem. J.*, v. 199, 1981, p.537-545.
82. Buko A.M., Phillips L.R., Fraser B.A. Peptide Studies Using

- a Fast Atom Bombardment High Field Mass Spectrometer and Data System. 2-Characteristics of Positive Ionization Spectra of Peptides, m/z 858 to m/z 5729. - Biomed. Mass Spectr., 1983, v. 10, N 7, p. 408-419.
83. Yamada S., Desiderio D.M. Measurement of Endogenous Leucine Enkephalin in Canine Caudate Nuclei and Hypothalami with High-Performance Liquid Chromatography and Field-Desorption Mass Spectrometry. - In: Proceedings of the first international symposium "High-Performance Liquid Chromatography of Proteins and Peptides". / Hearn M.T.W., Regnier F.E., Wehr C.T., Eds. - Academic Press, New York, 1983, p. 211-219.
84. Александров М.Л., Барам Г.И., Галль Л.Н., Грачев М.А., Кнорре В.Д., Краснов Н.В., Куснер Ю.С., Миргородская О.А., Николаев В.И., Шкуров В.А. Новый масс-спектрометрический метод для определения аминокислотной последовательности пептидов. - Биорган. химия, 1985, т. II, № 5, стр. 705-708.
85. Hermodson M., Mahoney W.C. Peptide Separation by High Pressure Liquid Chromatography as a Prelude to Sequencing of Peptides and Proteins. - In: Developments in Biochemistry / Liu, Schechter, Heinrikson, Condliffe, Eds., - Elsevier North Holland, Inc., 1981, v. 17, p. 119-130.
86. Shively J.E., Hawke D., J nes B.N. Microsequence Analysis of Peptides and Proteins. III. Artifacts and the Effects of Impurities on Analysis. - Analyt. Biochem., 1982, v. 120, p. 312-322.
87. Арзамазова Н.М., Аристархова Е.А., Шафиева Г.И., Назимов И.В., Алданова Н.А., Модянов Н.Н. Первичная структура -субъединицы $^{+}$, K^{+} -АТФ-азы. I. Анализ гидрофильных фраг-

ментов полипептидной цепи. - Биоорган. химия, 1985, т. II, № 12, стр. 1598-1606.

88. Hewick R.M., Hunkapiller M.W., Hood L.E., Dreyer W.J.
A Gas-Liquid Solid Phase Peptide and Protein Sequenator. -
J. Biol. Chem., 1981, v. 256, N 15, p. 7990-7997.
89. Hawke D.H., Harris D.C., Shively J.E. Microsequence Analy-
sis of Peptides and Proteins. V. Designe and Performance
of a Novel Gas-Liquid-Solid Phase Instrument. - Analyt.
Biochem., 1985, v. 147, p. 315-330.
90. Hunkapiller M., Kent S., Garuther M., Dreyer W., Firca J.,
Giffin C., Horvath S., Hunkapiller T., Tempst P., Hood L.
A microchemical facility for the analysis and synthesis of
genes and proteins. - Nature, 1984, v. 310, p. 105-111.
91. Лурье А.А. Хроматографические материалы. - М., Химия, 1978.
92. Энгельгард Х. Жидкостная хроматография при высоких давле-
ниях. - М., Мир, 1980.
93. Roumeliotis P., Unger K.K. Structure and properties of
n-alkyldimethylsilyl bonded silica reversed-phase packngs.
- J. Chromatogr., 1978, v. 149, p. 211-224.
94. Br-El Z., Zadenzaig Y., Shltiel S.^a Hydrocarbon coated
sepharoses. Use in the purification of glycogen phosphory-
lase. - Biochem. Biophys. Res. Comm., 1972, v. 49, p. 383-
-390.
95. Hjerten S., Rosengren J., Pahlman S. Hydrophobic interac-
tion chromatography. The synthesis and the use of some alkyl
and aryl derivatives of agarose. - J. Chromatogr., 1974,
v. 101, p. 281-288.
96. Fausnaugh J.L., Kennedy L.A., Regnier F.E. Comparison of

- hydrophobic-interaction and reversed-phase chromatography of proteins. - *J. Chromatogr.*, 1984, v. 317, p. 141-155.
97. Iskandarani Z., Pietrzyk D.J. Liquid chromatography separation of amino acids, peptides and derivatives on a porous polystyrene-divinyl benzene copolymer. - *Anal. Chem.*, 1981, v. 53, p. 489-495.
98. Lee D.P. Reversed-phase HPLC from pH 1-13. - *J. Chromatogr. Sci.*, 1982, v. 20, p. 203-208.
99. Lundanes E., Greibrokk T. Reversed-phase chromatography of peptides. - *J. Chromatogr.*, 1978, v. 149, p. 241-254.
100. Pearson J.D., Lin N.T., Regnier F.E. The Importance of Silica Type for Reverse-Phase Protein Separations. - *Analyt. Biochem.*, 1982, v. 124, p. 217-230.
101. Gonnet C., Bory C., Lachatre G. Comparative Study of Some Commercial Chemically Bonded Phase in Classical Reversed-Phase Chromatography and Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography. - *Chromatographia*, 1982, v. 16, p. 242-246.
102. Maciel G.E., Sindorf D.W., Bartuska V.J. Characterization of silica-attached system by ^{29}Si and ^{13}C cross-polarization and magic angle spinning nuclear magnetic resonance. - *J. Chromatogr.*, 1981, v. 205, p. 438-443.
103. Bayer E., Albert K., Reiners J., Nieder M., Müller D. Characterization of chemically modified silica gels by ^{29}Si and ^{13}C cross-polarization and magic angle spinning nuclear magnetic resonance. - *J. Chromatogr.*, 1983, v. 264, p. 197-213.
104. Verzele M., Dewaele C. Stationary phase characterization in HPLC. A test for trace metal activity in octadecyl bonded silica gel. - *J. Chromatogr.*, v. 217, p. 399-404 (1981).

105. Lewis R.V., Fallon A., Stein S., Gibson K.D., Udenfriend S. Supports for reversed-phase high-performance liquid chromatography of large peptides. - *Anal. Biochem.*, 1980, v. 104, p. 153-159.
106. Pearson J.D., Mahoney W.C., Hermodson M.A., Regnier F.E. Reverse-Phase Supports for The Resolution of Large Denature Protein Fragments. - *J. Chromatogr.*, 1981, v. 207, p. 325-332.
107. Pearson J.D., Regnier F.E. The influence of reversed-phase n-alkyl chain length on protein retention, resolution and recovery: implications for preparative HPLC. - *J. Liq. Chromatogr.*, 1983, v. 6, N 3, p. 497-510.
108. Fransson B., Grehn L., Ragnarsson U. Separation of basic, hydrophilic peptides by reversed-phase ion-pair chromatography. IV. Preparative applications related to purification of two substrates of cyclic AMP-dependent protein kinase. - *J. Chromatogr.*, 1985, v. 328, p. 396-401.
109. Hearn M.T.W., Grego B. HPLC of amino acids, peptides and proteins. XXXVI. Organic solvent modifier effects in the separation of unprotected peptides by reversed-phase liquid chromatography. - *J. Chromatogr.*, 1981, v. 218, p. 497-507.
110. van der Wal. S.J. Low Viscosity Organic Modifiers in Reversed-Phase HPLC. - *Chromatographia*, 1985, v. 20, N 5, p. 274-278.
111. Tandy N.E., Dilley R.A., Regnier F.E. High-Performance Liquid Chromatographic Purification of the Hydrophobic Subunit of the Chloroplast Energy Coupling Complex. - *J. Chromatogr.*, 1983, v. 266, p. 599-607.
112. Wehrli A., Hildenbrand J.C., Keller H.P., Stampfli R.S.,

- Frei R.W. Influence of organic bases on the stability and separation properties of reversed-phase chemically bonded silica gels. - *J. Chromatogr.*, 1978, v. 149, p. 199-210.
113. Molnar I., Horvath C. Separation of amino acids and peptides on non-polar stationary phases by high-performance liquid chromatography. - *J. Chromatogr.*, 1973, v. 142, p. 623-640.
114. Rivier J. Use of trialkyl ammonium phosphate (TAAP) buffers in reverse phase HPLC for high resolution and high recovery of peptides and proteins. - *J. Liq. Chromatogr.*, 1978, v. 1, p. 343-366.
115. Mahoney W.C., Hermodson M.A. Separation of large denatured peptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography. - *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 225, p. 11199-11203.
116. Fausnaugh J.L., Pfannkoch E., Gupta S., Regnier F.E. High-Performance Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins. - *Analyt. Biochem.*, 1984, v. 137, p. 464-472.
117. Барам Г.И., Грачев С.А. Использование перхлората лития при выделении и анализе олиго- и полинуклеотидов. - *Биорган. химия*, 1985, т. II, № 10, стр. 1420-1422.
118. Хиппель П., Шлейх Т. Влияние нейтральных солей на структуру и конформационную стабильность макромолекул в растворе. - В кн.: Структура и стабильность биологических макромолекул. - М., Мир, 1973, стр. 320-480.
119. Mönch W., Dehnen W. High-performance liquid chromatography of peptides. - *J. Chromatogr.*, 1977, v. 140, p. 260-262.
120. Hearn M.T.W., Grego B. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. XLVI. Selectivity effects of positional isomers and oligomers separa-

- ted by reversed-phase high-performance liquid chromatography - *J. Chromatogr.*, 1983, v. 266, p. 75-87.
121. Jandera P., Churaček J. Gradient elution in liquid chromatography. I. The influence of the composition of the mobile phase on the capacity ratio (retention volume, band width and resolution) in isocratic elution - theoretical considerations. - *J. Chromatogr.*, 1974, v. 91, p. 207-221.
122. Jandera P., Churaček J. Gradient elution in liquid chromatography. II. Retention characteristics (retention volume, band width, resolution, plate number) in solvent-programmed chromatography - theoretical considerations. - *J. Chromatogr.* 1974, v. 91, p. 223-235.
123. Бреслер С.Е. Молекулярная биология. - Л., Наука, 1973.
124. Демченко А.П. УФ-спектроскопия и структура белков. - Киев, Наукова думка, 1981.
125. Scott R.P.W. *Liquid Chromatography Detectors*. - Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1977.
126. *Microcolumn High-Performance Liquid Chromatography*. - / Kuchera P., Ed., - Elsevier, Amsterdam, 1984.
127. Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В., Николаев В.И., Павленко В.А., Шкуров В.А., Барам Г.И., Грачев М.А., Кнорре В.Д., Куснер Ю.С. Прямая стыковка микроколоночного жидкостного хроматографа с масс-спектрометром. - *Биоорган. химия*, 1984, т. 10, №5, стр. 710-712.
128. Александров М.Л., Барам Г.И., Галль Л.Н., Краснов Н.В., Куснер Ю.С., Миргородская О.А., Николаев В.И., Шкуров В.А. - *Биоорган. химия*, 1985, т. 11, № 5, стр. 700-704.
129. Hong Y.-M., Takao T., Aimoto S., Shimnishi Y. Simultaneous Analysis of C-Terminal Amino Acid Residues of Peptide

- Mixtures by Combination of Field Desorption Mass Spectrometry and Carboxypeptidase Digestion. - Biomed. Mass Spectrometry, 1983, v. 10, N 8, p. 450-457.
130. Stadalius M.A., Quarry M.A., Snyder L.R. Optimization model for the gradient elution separation of peptide mixtures by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Application to method development and the choice of column configuration. - J. Chromatogr., 1985, v. 327, p. 93-113.
131. Done J.N. Sample loading and efficiency in adsorption, partition and bonded-phase high-speed liquid chromatography. - J. Chromatogr., 1976, v. 125, p. 43-57.
132. Kopaciewicz W., Regnier F.E. A System for Coupled Multiple-Column Separation of Proteins. - Analyt. Biochem., 1983, v. 129, N 2, p. 472-482.
133. Taborsky G. Chromatography of Ribonuclease on Carboxymethyl^y Cellulose Columns. - J. Biol. Chem., 1959, v. 234, v. 10, p. 2652-2656.
134. Richards F.M., Wyckoff H.W. In: The Enzymes. / Boyer, Ed., - Academic Press, New York - London, 1971, v. 4, p. 647-806.
135. Гаррис И., Ингрэм В. Методы изучения последовательности аминокислотных остатков в белках. - В кн.: Аналитические методы белковой химии. - М., Изд. иностр. лит., 1963, стр. 550.
136. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. - М., Мир, 1976.
137. Levina N.B., Nasimov I.V. High-performance liquid chromatography of Dns-amino acids in the purity control of pep-

- tides. - J. Chromatogr., 1984, v. 286, p. 207-216.
138. Heinrikson R.L., Meredith S.C. Amino Acid Analysis by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate. - *Analyt. Biochem.*, 1984, v. 136, p. 65-74.
139. Ishii D., Asai K., Hibi K., Jonokuchi T., Nagaya M. A study of micro-high-performance liquid chromatography.
1. Development of technique for miniaturization of high-performance liquid chromatography. - *J. Chromatogr.*, 1977, v. 144, p. 157-168.
140. Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Мальцев В.Г. Микроколоночная жидкостная хроматография. - *Ж. Всесоюз. хим. Общ. им. Д.И. Менделеева*, 1983, XXVIII, № I, стр. 43-47.
141. Small Bore Liquid Chromatography Columns: Their Properties and Uses. / Scott R.P.W., Ed. - John Wiley & Sons, Inc., New York, 1984.
142. Sagliano N., Hsu Shin-Hsien Jr., Floyd T.R., Raglione T.V., Hartwick R.A. Aspects of Small-Bore Column Technology. - *J. Chromatogr. Sci.*, 1985, v. 23, N 6, p. 238-246.
143. Rabel F.M. Instrumentation for Small-Bore Liquid Chromatography. - *J. Chromatogr. Sci.*, 1985, v. 23, N 6, p. 247-252.
144. Martin M., Eon C., Guiochon G. Study of the pertinency of pressure in chromatography. I. Theoretical analysis. - *J. Chromatogr.*, 1974, v. 99, p. 357-376.
145. Halász I., Schmidt H., Vogtel P. Particle size, pressure and analysis time in routine high-performance liquid chromatography. - *J. Chromatogr.*, 1976, v. 126, p. 19-33.
146. Naish P.J., Goulder D.P., Perkins C.V. The New Generation

- of L.C.Columns; A Critical Evaluation of Their Systems Compatibility and Performance. - *Chromatographia*, 1985, v. 20, N 6, p.335-342.
147. Guiochon G., Colin H. Narrow-bore and micro-bore columns in liquid chromatography.- In: *Micro-column high-performance liquid chromatography.*/ Kucera P., Ed.,- Elsevier, 1984, p. 1-38.
148. Современное состояние жидкостной хроматографии / ред.Киркленд Дж., - М., Мир, 1974, с.35.
149. Martin M., Eon C., Guiochon G. Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography. II. Problems in equipment design. - *J.Chromatogr.*, 1975, v.108, p.229-241.
150. Martin M., Eon C., Guiochon G. Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography. III. A practical method for choosing the experimental conditions in liquid chromatography. - *J.Chromatogr.*, 1975, v.110, p.213-232.
151. Вейссерик Ю.А., Сымер Т.Э., Лихфельд Л.А. Капиллярная дозировка - надежный метод ввода пробы в колонку высокоскоростного жидкостного хроматографа. - Тезисы докладов I Всесоюзного симпозиума "Молекулярная жидкостная хроматография", Дзержинск, 1979 г., с.77.
152. Kever J.J., Belenki B.G., Gankina E.S., Vilenchik L.Z., Kurenbin O.I., Zhmakina T.P. Determination of molecular weight distribution of polymers by microcolumn exclusion chromatography. - *J.Chromatogr.*, 1981, v.207, 145-147.
153. Гринева Н.И., Ломакина Т.С., Тигеева Н.Г., Чимитова Т.А. Кинетика ионизации С-С1 связи в 4-(N -2-хлорэтил-N-метиламино)-бензил-5'-фосфамидах нуклеозидов и олигонуклеотидов.- *Биоорган.химия*, 1977, т.3, с.210-214.

154. Pares X., Llorens R., Arus C., Cuchillo C.M. The reaction of bovine pancreatic ribonuclease A with 6-chloropurine-ribonucleoside 5'-monophosphate.- *Eur.J.Biochem.*, 1980, v.105, p.571-579.
155. Smyth D.G., Stein W.H., Moore S. The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and confirmations.- *J.Biol.Chem.*, 1963,v.238, p.227-238.
156. Чумаков М.П., Кусов Ю.Ю., Рубин С.Г., Сальников Д.А., Семашко И.В., Георгиев Г.П., Чумаков П.М., Грачев М.А., Шаманин В.А., Плетнев А.Г. Клонирование и изучение первичной структуры ДНК-копий участков генома вируса клещевого энцефалита. - *Биоорганическая химия*, 1983, т.9, с.276-279.
157. Ленинджер А., Биохимия, М., Мир, 1974г., с.107.
158. Lottspeich F. Microscale isocratic separation of phenylthiohydantoin amino acid derivatives.- *J.Chromatogr.*, 1985, v. 326, p.321-327.
159. Bidlingmeyer B.A., Cohen S.A., Tarvin T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization.- *J.Chromatogr.*, 1984, v.336, p.93-104.
160. Boege U., Heinz F., Wengler G., Kunz C. Amino acid compositions and amino-terminal sequences of the structural proteins of a flavivirus, European tick-borne encephalitis virus. - *Virology*, 1983, c.126, p.651-657.
161. Bell J.R., Kinney R.M., Trent D.W., Lenches E.M., Dalgarno L., Strauss J.H. Amino terminal amino acid sequence of structural proteins of three flaviviruses.- *Virology*, 1985, v.143, p.224-229.