

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**OLBALTUMVIELU UN PEPTĪDU SORBCIJAS ĪPAŠĪBU
IZPĒTE AEŠH APSTĀKĻOS UZ DAŽĀDĀM C18
KOLONNĀM**

MAĢISTRA DARBS

Autors: Aļona Marduseviča

Studenta apliecības Nr.: am12029

Darba vadītāji:

asoc. profesors Dr. chem. Pēteris Mekšs

Oksana Rotkāja

RĪGA 2014

KOPSAVILKUMS

Olbaltumvielu un peptīdu sorbcijas īpašību izpēte AEŠH apstākļos uz dažādām C18 kolonnām. A. Marduseviča, darba vadītāji Dr. Chem. Asoc. Prof. P. Mekšs, O. Rotkāja. Maģistra darbs, 51 lappuses, 3 tabulas, 37 attēli, 42 literatūras avoti. Latviešu valodā.

Atslēgas vārdi: OLBALUMVIELAS, PEPTĪDI, AEŠH, C18 KOLONNAS, IZDALĪŠANAS FAKTORS, GRADIENTA SLĪPUMS.

Darbā apskatīti olbaltumvielu un peptīdu atdalīšanas mehānismi, gradients, organisko šķīdinātāju, kolonnas un temperatūras ietekme uz olbaltumvielu un peptīdu atdalīšanos. Izpētīta olbaltumvielu sorbcija četrās kolonnās no divām kustīgām fāzēm. Darbā tika izmantotas *Poroshell 300 SB-C18*, *Poroshell 300 Extend-C18*, *Zorbax 300 SB-C18* un *Zorbax 300 Extend-C18* kolonnas un organiskie šķīdinātāji - acetonitrils un metanols.

ABSTRACT

Protein and peptide sorption properties research in HPLC condition using different C18 columns. A. Mardusevich, scientific supervisors Dr. Chem. Assoc. prof. P. Mekšs, O. Rotkaja. Master thesis, 51 pages, 3 tables, 37 figures, 42 literature references. In Latvian.

Key words: PROTEIN, PEPTIDE, HPLC, C18 COLUMN, RETENTION FACTOR, SLOPE.

Protein and peptide separation mechanism, gradient, organic solvents, column and temperature effect on protein separation have been examined. In current investigation such sorption features as hydrophobicity and silanol activity on four column using two mobile phases have been evaluated. *Poroshell 300 SB-C18*, *Poroshell 300 Extend-C18*, *Zorbax 300 SB-C18* and *Zorbax 300 Extend-C18* columns and organic solvents – acetonitrile and methanol used for evaluation of the protein sorption regularities.

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS.....	5
IEVADS	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1. Olbaltumvielas un peptīdi	7
1.2. Olbaltumvielu un peptīdu atdalīšanās mehānismi	8
1.3. AEŠH gradienta metode	12
1.3. Hromatogrāfisku apstākļu izvēle	15
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	30
2.1. Izmantotā aparatūra.....	30
2.2. Izmantotas vielas un reaģenti.....	30
2.3. Kustīgo fāžu un analizējamo paraugu pagatavošana	31
2.4. Hromatogrāfiskās analīzes apstākļi	31
2.5. Aprēķinu formulas	32
3. REZULTĀTU IZVĒRTĒJUMS.....	34
3.1. Sorbentu testi	34
3.2. Gradienta slīpumi (S).....	35
3.3. Olbaltumvielu gradienta izdalīšanas faktori	37
SECINĀJUMI	46
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	47

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

AEŠH – augsti efektīva šķīduma hromatogrāfija

MeOH – metanols

ACN – acetonitrils

THF – tetrahidrofurāns

TFA – trifluoretiķskābe

HFBA – heptafluorsviestskābe

HPF₆ – heksafluorfosfonskābe

IEVADS

Bioloģiski aktīvās olbaltumvielas cilvēks iegūst, pārstrādājot ar ēdienu uzņemtās olbaltumvielas. Gan zinātniskais, gan industriālais sektors ir ieinteresēts šo olbaltumvielu izpētē, jo tās ir nepieciešamas dzīvības procesu uzturēšanai. Olbaltumvielām piemīt daudzveidīgas bioloģiskās aktivitātes īpašības, kā antihipertensivitāte, pretmikrobu u.c. [1].

Pēdējos gados novērots biofarmaceitisko olbaltumvielu skaita pieaugums, kas jau ir piejaujams vai tuvākā laikā parādīsies tirgū. To molekulām ir sarežģīta struktūra un ir nepieciešama pamatīga analītiskā bāze, lai kontrolētu to attīstības un „piegādes” procesu [2].

Peptīdu maisījuma analīze, izmantojot augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju (AEŠH) sasaistē ar masspektrometriju, ir viena no svarīgākajām olbaltumvielu identificēšanas metodēm. Individuālie peptīdi tiek atdalīti ar AEŠH un tad identificēti ar masspektrometriskajiem detektoriem [3].

Darba mērķis ir izpētīt olbaltumvielu un peptīdu sorbcijas īpašības augsti efektīvas šķidrums hromatogrāfijas apstākļos C18 tipa sorbentos.

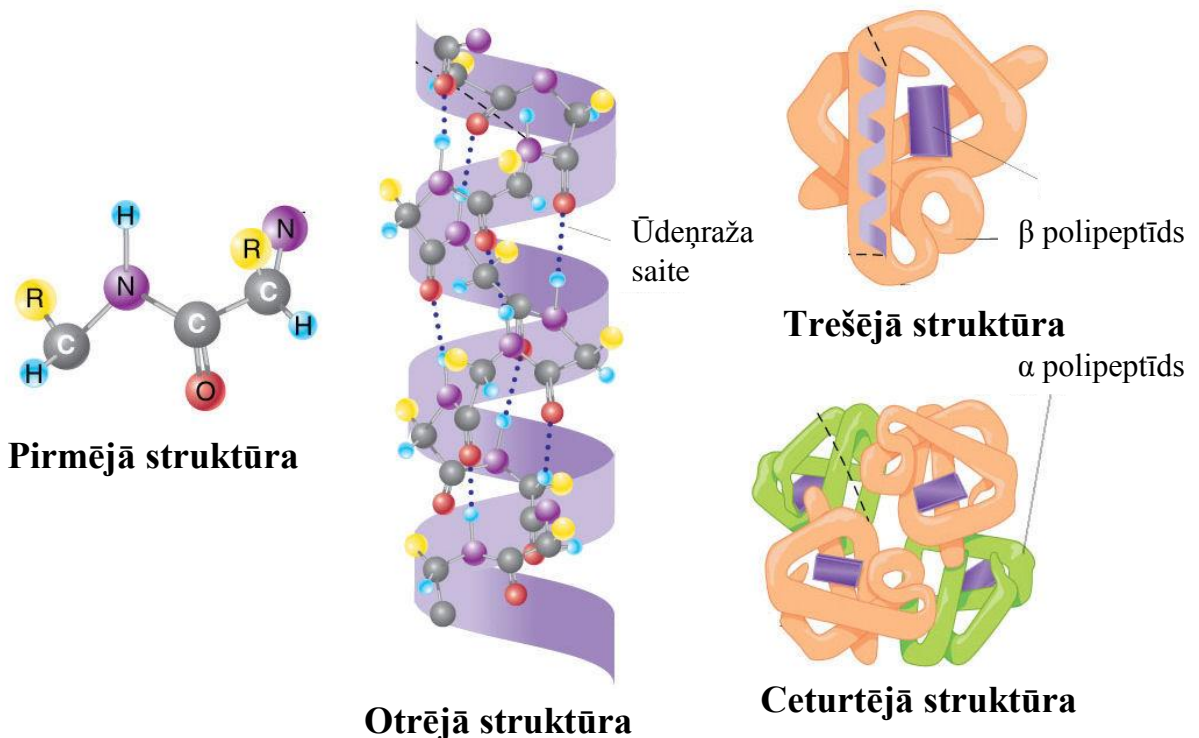
Darba uzdevumi ir:

- Iepazīties ar zinātnisko literatūru par olbaltumvielu un peptīdu atdalīšanas mehānismiem, gradientu un dažādu apstākļu ietekmi uz olbaltumvielu un peptīdu hromatogrāfiju.
- Noskaidrot C18 tipa sorbentu un kustīgas fāzes ietekmi uz olbaltumvielu izdalīšanos.
- Salīdzināt kolonnu ķīmiskās īpašības.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Olbaltumvielas un peptīdi

Olbaltumvielas ir lielmolekulāras molekulas, kas sastāv no aminoskābēm, kuras ir savienotas ar peptīdu saiti. Satur slāpekļa, oglekļa, ūdeņraža, skābekļa, sēra un dažreiz fosfora atomus [4]. Peptīds ir īsa aminoskābju virkne. Līdzīgi kā olbaltumvielās, peptīdos aminoskābes ir savienotas ar peptīdu saites palīdzību. [5]. Liels peptīds satur 10-15 aminoskābju grupas un tiek saukts par polipeptīdu. Lielie polipeptīdi tiek klasificēti kā olbaltumvielas [6]. 1.1. attēlā ir parādītas olbaltumvielu struktūras [7].



1.1. att. Olbaltumvielu struktūras [7]

Peptīdi ir svarīga komponentu grupa, kurai ir liela nozīme fizioloģiskos procesos, molekulārajā bioloģijā un klīniskos pētījumos [6, 1826. lpp.]. Olbaltumvielas ir biopolimēri, kuri ir atrodami jebkurā dzīvā organismā, kā daļa no muskuļiem, membrānām u.c. Hormoni, enzīmi, antivielas, daļa no medikamentiem, toksīni un citi bioloģiski aktīvi komponenti sastāv no olbaltumvielām [8]. Peptīdu un olbaltumvielu svarīgums farmācijā pēdējos gados pieaug. Piemēram, terapeitiskie peptīdi tiek pozicionēti kā zāles pret vēzi, kā arī piedāvāti alternatīvai ārstēšanai pret hepatītu C un osteoporozi [9].

Divas atdalīšanas metodes dominē olbaltumvielu un peptīdu analīzēs: elektroforēze un augsti efektīva šķīdumu hromatogrāfija [8, 8874. lpp].

1.2. Olbaltumvielu un peptīdu atdalīšanās mehānismi

Peptīdu un olbaltumvielu maisījuma atdalīšana hromatogrāfijā balstās uz dažādu katras izšķīdušas vielas sorbciju. Ja daļiņas molekulai piemīt augstā līdzība noteiktai specifiskai stacionārai fāzei, līdzsvara sadalījuma koeficients K ir augsts, tad sorbētā daļiņa tiek aizturēta ilgāk nekā citas molekulas ar mazāku līdzību stacionārai fāzei. Savienšanās tieksmes pakāpe un raksturs ir atkarīgs no izšķīdinātas daļiņas un imobilizētā liganda struktūras [10].

1.1. Tabulā parādītas dažas no olbaltumvielu atdalīšanās metodēm, izmantojot hromatogrāfiju.

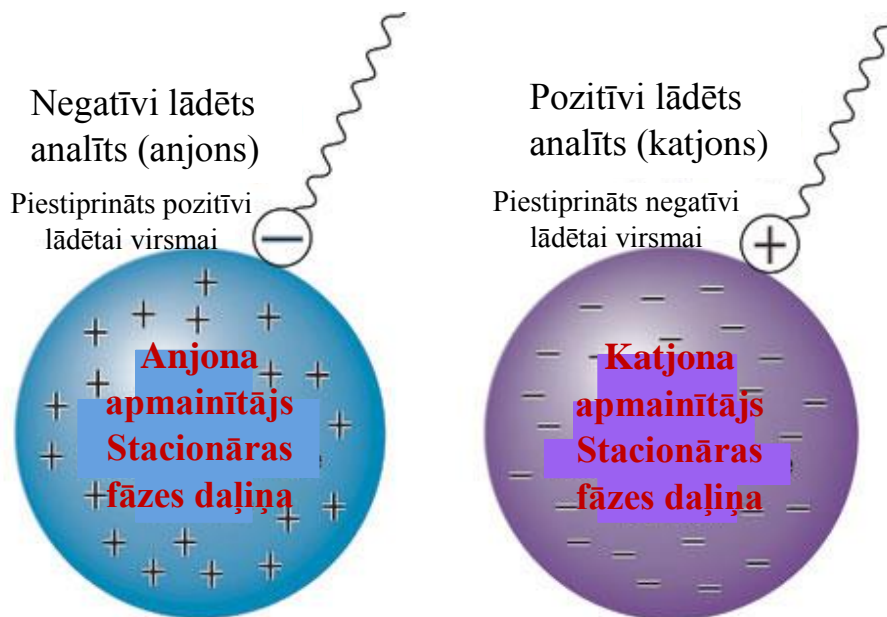
1.1. tabula

Olbaltumvielu atdalīšanai izmantotie hromatogrāfijas veidi [11]

Atdalīšanu noteicošais princips	Hromatogrāfijas veids
Izmērs un forma	Gēla filtrācijas vai eksklūzijas hromatogrāfijas
Saišu (net) lādiņš	Jonu apmaiņas hromatogrāfija
Izoelektriskais punkts	Hromatogrāfiskā fokusēšana
Hidrofobās mijiedarbības	Apgrieztās fāzes vai hidrofobo mijiedarbību hromatogrāfija
Bioloģiskās funkcijas	Afīna hromatogrāfija
Antigenitāte	Imunoadsorbcija
Ogļūdeņražu saturs	Lektīna afīna hromatogrāfija
Brīvo –SH saturs	Hemisorbcija („Kovalenta hromatogrāfija”)
Metāliskā saite	Imobilizētu metālu jonu afīnā hromatogrāfija

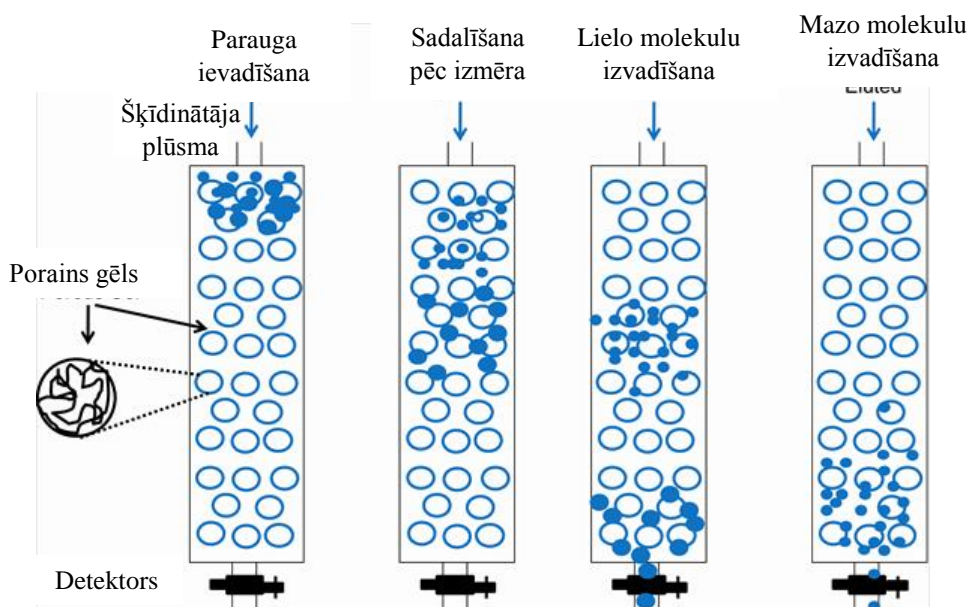
Jonu apmaiņas hromatogrāfijā sasaiste notiek elektrostatisko mijiedarbību dēļ [10, 4. lpp.]. Jonu apmainītājs sastāv no inertas pamatnes un ar kovalento saiti saistītu pozitīvu (anjona apmainītājs) vai negatīvu (katjona apmainītājs) funkcionālo grupu [12]. Anjona apmaiņas hromatogrāfijā (skat. 1.2. attēlu [13]) negatīvi lādētiem parauga komponentiem būs stiprākas mijiedarbības ar stacionāro fāzi un tie aizvietos līdzīgi lādētos jonus, kuri jau ir saistījušies ar matricas joniem. Negatīvi lādētas daļiņas izdalīsies vēlāk nekā neitrālas vai pozitīvi lādētas daļiņas.

Katjona apmaiņas gadījuma situācija ir tieši pretēja [3, 349. lpp.].



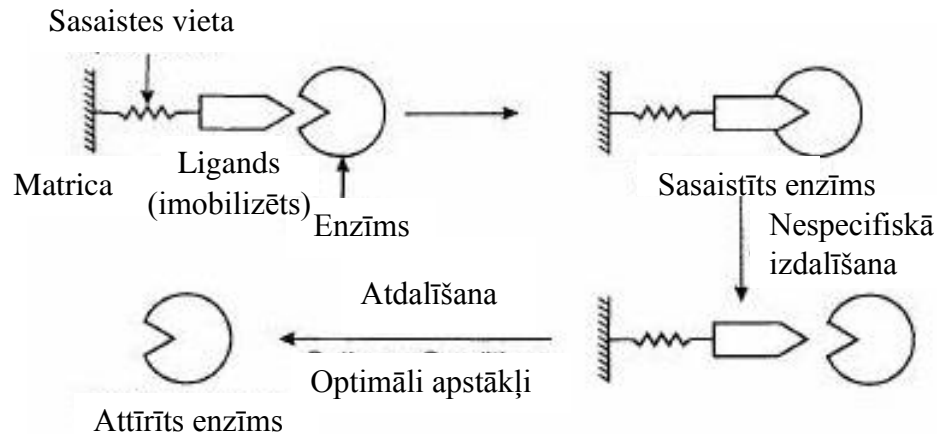
1.2. att. Jonu apmaiņas hromatogrāfijas principi [13]

Eksklūzijas hromatogrāfijā atšķirīga kustība caur kolonnu ir rezultāts cik ātri izšķīdušās daļiņas var iziet cauri stacionārās fāzes porainai struktūrai [5, 4. lpp.]. Stacionārā fāze ir izveidota no kserogēla (xerogel), kuru var definēt kā polimēra materiālu ar labām šķīdinātāja uztūkšanas spējām, veidojot gēlu. Par šķīdinātāju bieži izmanto ūdeni. Tāds pats šķidrums tiek izmantots par kustīgo fāzi vai eluentu [14]. Eksklūzijas hromatogrāfijas principi ir attēloti 1.3. attēlā [15]. Mazo, vidēji lielo un lielo molekulu maisījuma gadījumā, gēla hromatogrāfijā lielas molekulas netiks aizturētas vispār un izies uzreiz ārā. Mazās molekulas pavadīs kolonnā ilgāku laiku. Vidēji lielas molekulas aiztures laiks ir mazāks nekā mazām molekulām. Eksklūzijas efekts nepastāv, ja poru izmērs ir 2-10 reizes lielāks par molekulas izmēru [14, 164.-165. lpp.].



1.3. att. Eksklūzijas hromatogrāfijas principi [15]

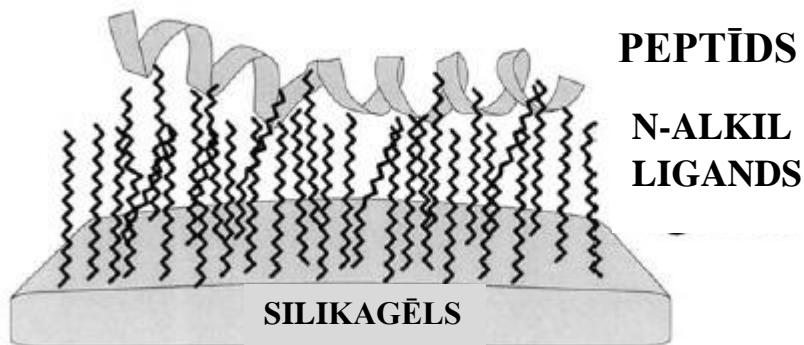
Afīnā hromatogrāfija ir atdalīšanas metode, kurā sākumā tika attīstīta kā enzīmu attīrīšanas metode, bet tika paplašināta līdz nukleotīdiem, nukleīnskābēm, imūnglobulīniem, membrānu receptoriem, šūnu un šūnu fragmentu atdalīšanas metodēm. Afīnajā hromatogrāfijā, lai attīrītu maisījumā esošu specifisku sastāvdaļu, maisījums tiek ievadīts hromatogrāfijas kolonnā ar iešūtiem imobilizētiem ligandiem. Mijiedarbību laikā tikai specifiskā sastāvdaļa piestiprināsies pie liganda. Pārējās sastāvdaļas tiks izvadītas ārā un nepieciešamais komponents tiks atdalīts no liganda. 1.4. attēlā ir parādīta enzīma attīrīšana ar afīno hromatogrāfiju [15].



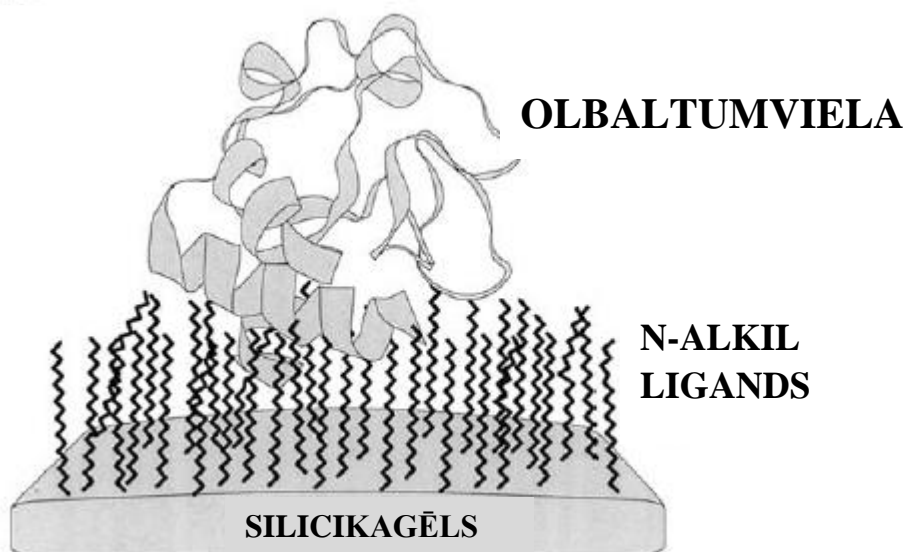
1.4. att. Enzīma atdalīšana ar afīno hromatogrāfiju [15]

Apgrīztās fāzes un hidroforo mijiedarbību hromatogrāfijas gadījumā, mijiedarbības īstenojas starp izšķīdušo vielu un imobilizēto *n*-alkil- ligandu [10, 4. lpp]. Hidrofobas mijiedarbības var īstenot, izmantojot reaģentus, ar kuriem sorbciju ietekmē jonu spēks vai temperatūra [11, 26. lpp.].

1.5. un 1.6. Attēlos attiecīgi parādītas peptīda un olbaltumvielas piesaiste uz silikagēla bāzes veidotam sorbentam apgrīztās fāzes augsti efektīvajā šķidrumu hromatogrāfijā (AEŠH) [10, 10. lpp].



1.5. att. Shematiska peptīda piesaiste uz silikagēla bāzes veidotam sorbentam apgrīztas fāzes AEŠH



1.6. att. Shematiska olbaltumvielas piesaiste uz silikagēla bāzes veidotam sorbentam apgrieztās fāzes AEŠH

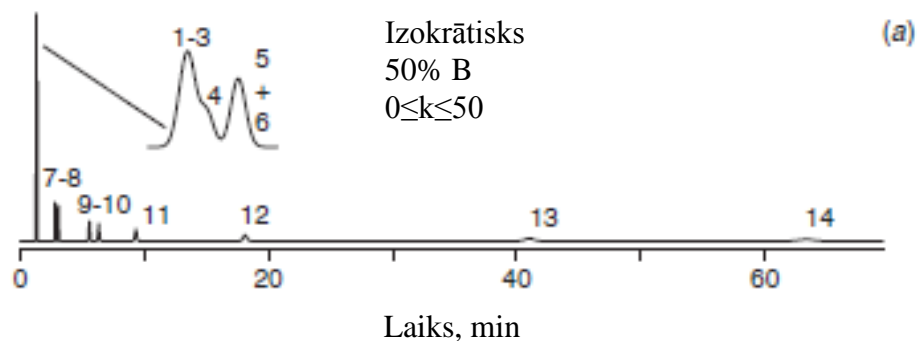
Izšķīdušo vielu maisījums sākumā saskaras ar sorbentu uz ūdens bāzes veidota buferšķīduma klātbūtnē analizējamā viela izdalās no sistēmas, pievienojot organisko komponentu kustīgai fāzei. Izdalīšana no sistēmas var tikt īstenota, izmantojot izokrātiskos vai gradienta apstākļus [10, 9. lpp].

1.3. AEŠH gradienta metode

AEŠH gradienta metode paraugu atdalīšanai balstās uz pakāpenisku kustīgās fāzes sastāva maiņu eluācijas laikā. To var sasniegt arī mainot temperatūru vai plūsmas ātrumu [17].

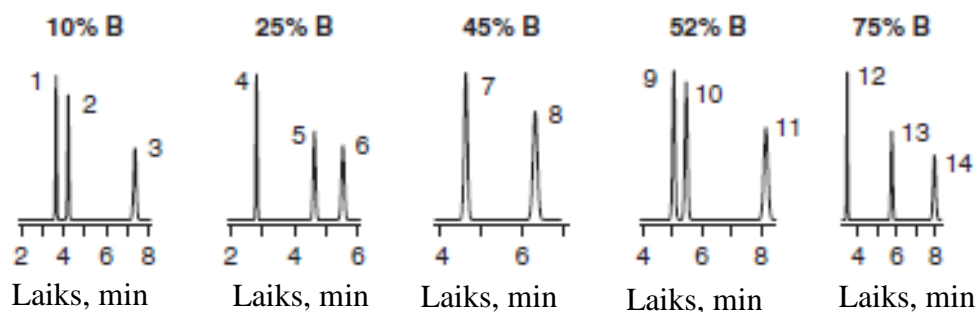
AEŠH gradienta metode tiek izmantota gadījumos, kad ar izokrātiskas eluēšanas metodēm nevar atdalīt vielas. Viens no iemesliem, kāpēc izmanto gradienta metodi, ir aiztures diapazona pārsniegums, kurš ir vēlams, izmantojot izokratisku atdalīšanu ($1 \leq k \leq 10$). AEŠH gradienta metodē šo diapazonu ir iespējams palielināt līdz $0,5 \leq k \leq 20$. [18]

1.7. attēlā parādīts 14 toksisku standartu maisījums, kurš tika atdalīts uz C_{18} kolonnas par kustīgo fāzi tiek izmantojot 50% acetonitrila buferšķīdumu. 1.7. Attēlā parādīta parauga atdalīšana, izmantojot izokrātisko metodi. Pārāk liels aiztures diapazons (k -vērtības diapazonā no 0 līdz 50) šim paraugam izraisa izšķirtspējas pasliktināšanos no 1 līdz 6 joslām, bet 13 un 14 joslām ir pārāk lieli izdalīšanās laiki. Pēdējās joslas ir pārāk platas, kas var apdraudēt mērījumu precizitāti. [18, 404. lpp.]



1.7. att. 14 toksisku standartu maisījuma atdalīšana, izmantojot izokrātīsku kustgās fāzes metodi

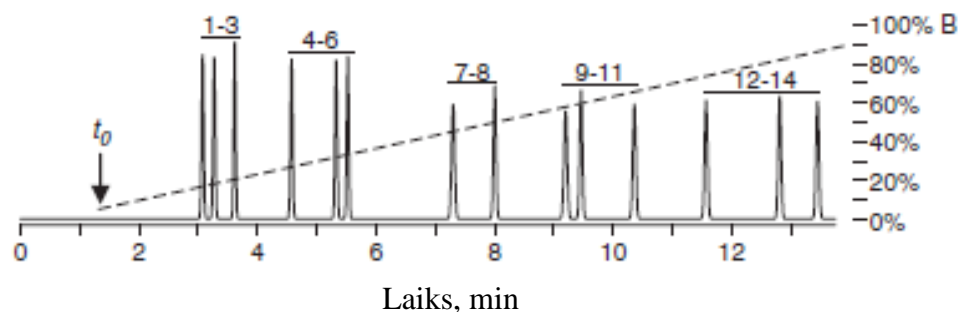
Izokrātīskos apstākļos, izmainot acetoniitrila (%B) daudzumu kustīgajā fāzē, nevar uzlabot šī maisījuma atdalīšanu. Izmantojot stiprāku kustīgo fāzi samazinās k vērtības un vēl vairāk samazinās joslu izšķirtspēja (tām vielām, kuras praktiski nedalās šajos izvēlētajos apstākļos). Izmantojot vājāku kustīgo fāzi tiks novērots pretējs process – k vērtības palielināsies, apgrūtinot pēdējo joslu identificēšanu [18, 404. lpp.]. Izšķiršanas uzlabošanai var izmantot dažādas koncentrācijas kustīgo fāzi (skat. 1.8. attēlu).



1.8. att. Dažāda sastāva kustīgo fāžu izmantošana parauga atdalīšanai

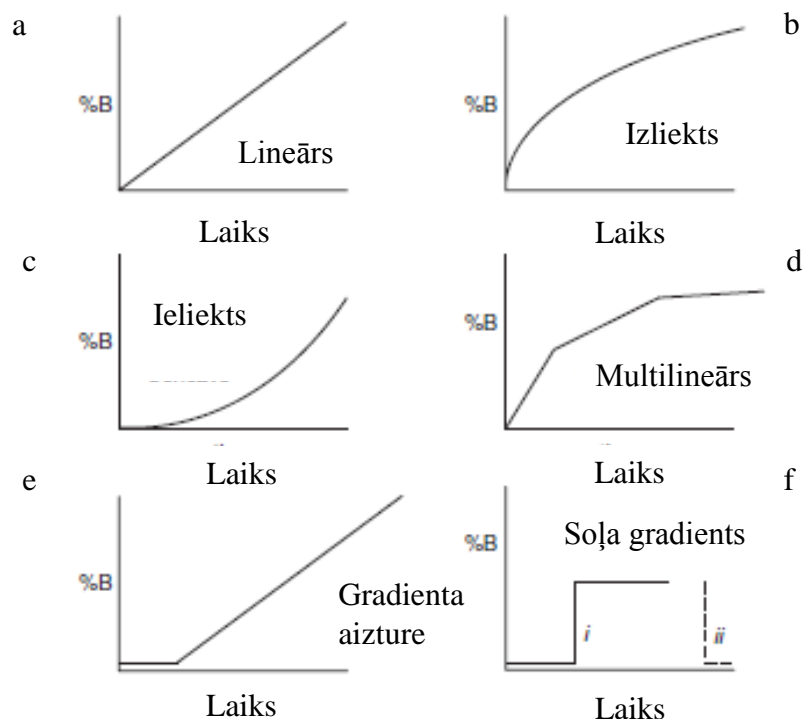
1.9. Attēlā ir parādīta parauga atdalīšana, izmantojot gradienta apstākļus. Pārtrauktā līnija attēlo kustīgās fāzes koncentrācijas pieaugumu (skat. 1.9. attēlu). Izvēloties plaša diapazona lineāru gradienta profilu, var iegūt apmierinošu maisījuma komponentu atdalīšanu. Gradienta apstākļos vielām, kuru molekulu lielums ir līdz 500 kDa ir vienādas k vērtības [18, 404.-405. lpp.].

5-90% B 13 min



1.9. att. Gradients metodes izmantošana 14 toksisko komponentu maisījuma atdalīšanai

Gradients slīpums ir kustīgas fāzes sastāva (%B) izmaiņa gradienta laikā. Plašāk lieto lineāro gradientu (skat. 1.10. a. attēlu). Metodes izstrādes sākuma stadijās tiek ieteikts izmantot tieši lineāro gradientu. Izliktie gradienta slīpumi (skat. 1.10. b, 1.10. c. attēlu) agrāk tika izmantoti noteikta veida paraugiem, bet dažādu iemeslu dēļ tiek aizstāti ar multilineāriem gradientiem (skat. 1.10. d. attēlu). Multilineārie gradienti sniedz izliktu gradientu priekšrocības, tos vieglāk izveidot dažādiem paraugiem un šo gradienta veidu var realizēt ar lielāk gradienta iekārtu daļu. Gradients aizkavēšanas jeb izokrātiskā aizture parādīta e attēlā, tā arī var tikt īstenota gradienta beigās. Soļa gradientā (skat. 1.10. f attēlu) %B izmaiņa notiek momentāni sadalīšanas laikā. Tas ir speciāls segmentēta gradienta gadījums. Šis gradienta veids tiek izmantots reti, izņemot gadījumus, kad ir nepieciešams iztīrīt kolonnu no lēni eluējošajiem komponentiem gradienta beigās. Pēkšņa kustīgas fāzes stipruma palielināšana perfekti der šim mērķim [18, 407.-408. lpp.].

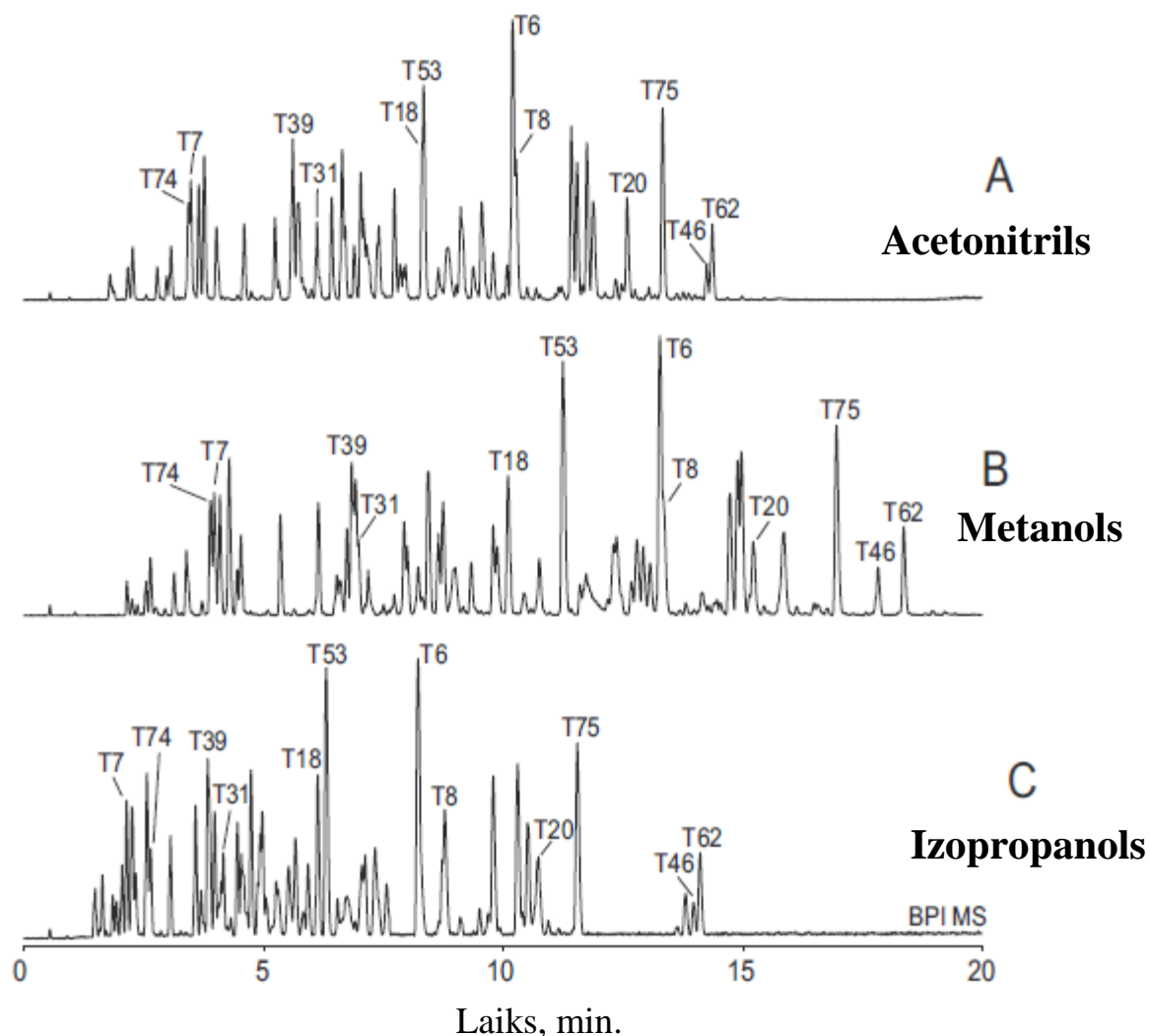


1.10. att. Gradianta slīpumi

1.3. Hromatogrāfisku apstākļu izvēle

Organiskā šķīdinātāja izvēle. AEŠH par organisko šķīdinātāju visbiežāk izvēlās acetonitrilu vai metanolu, retāk citus spirtus vai tetrahidrofurānu (THF).

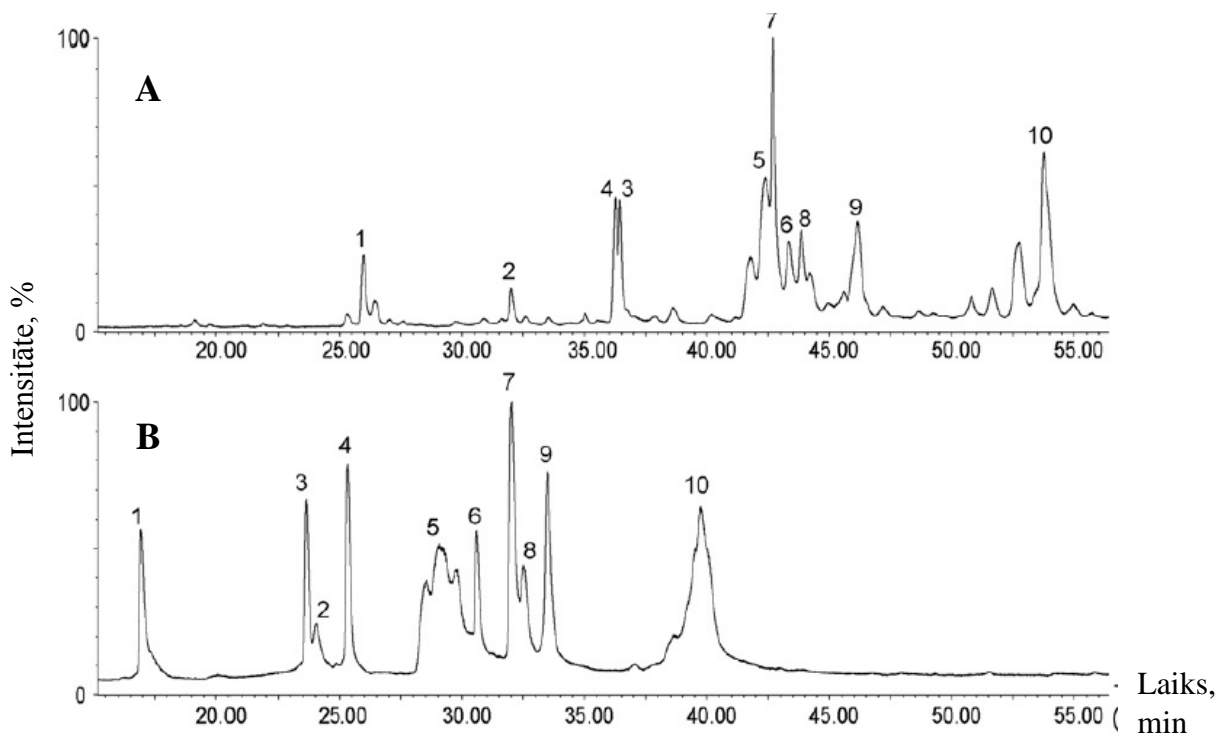
Selektivitātes atšķirība starp dažādiem organiskiem šķīdinātājiem ir parādīta 1.11. attēlā. Par kustīgām fāzēm izmantoti acetonitrils (A), metanols (B) un izopropanols (C), bet paraugs ir sagremotais liellopu sēruma albumīns. Mērījumi veikti pie vienādiem hromatogrāfijas apstākļiem – gradients no 0% līdz 100% organiskā šķīdinātājā visām kustīgām fāzēm. Peptīdu T18 un T53 joslas, izmantojot kā organisko šķīdinātāju acetonitrilu, pārklājas, bet metanola vidē to joslas pilnība sadalījās un izopropanola vidē tie nedaudz sadalījās. Cits peptīdu pāris T6 un T8 labi sadalījās tikai, ja par organisko šķīdinātāju izmanto izopropanolu. [19].



1.11. att. Albumīna hromatogrāfiskā sadalīšana, izmantojot par kustīgo fāzi acetonitrilu (A), metanolu (B) un izopropanolu (C)

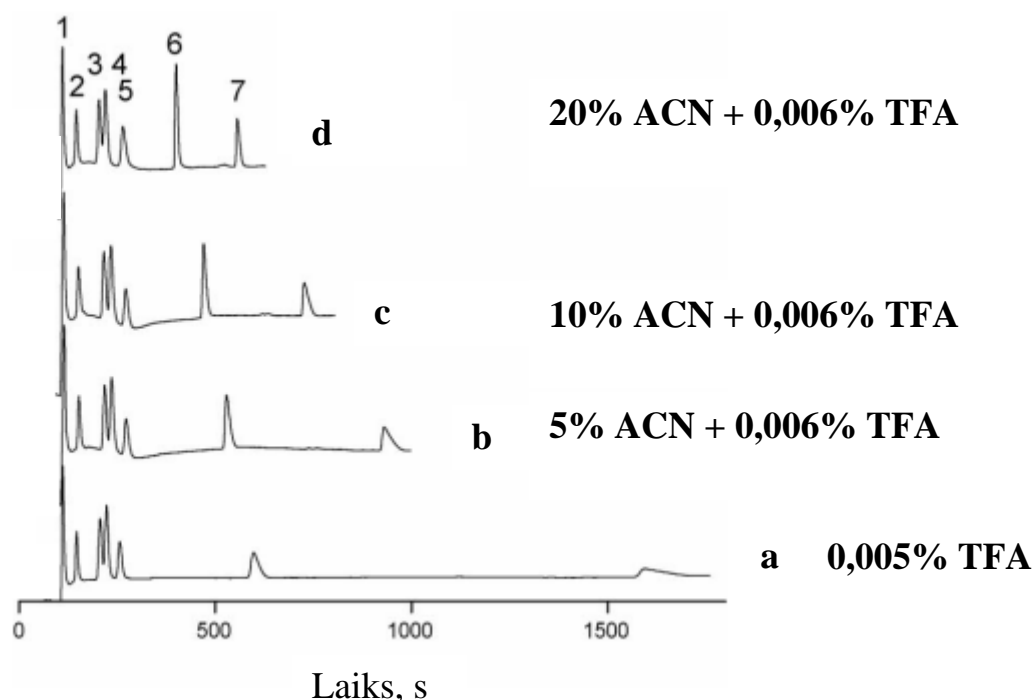
1.12. attēlā parādīta olbaltumvielu aizture, atkarībā no kustīgas fāzes sastāva, izmantojot vienu un to pašu kolonnu, kolonnas temperatūru, plūsmas ātrumu un gradienta profilu. 1.12. A attēlā izmantotā kustīgā fāze ir 1% skudrskābe acetonitrilā un 1.12. B attēlā ir 1% skudrskābe izopropanolā. Apskatot 1.12. attēlu, redzams, ka ovalbumīna (Nr. 10) izdalīšanas laiks samazinās par 14 minūtēm, izmantojot izopropanolu.

Izmantojot šo šķīdinātāju, var samazināt gradienta laiku un patērēt mazāk šķīdinātāja, jo atdalīšanai nepieciešama mazāk stipra kustīgā fāze. Izmantojot izopropanolu, pieaug olbaltumvielu 5-8 izšķirtspēja, bet olbaltumvielu 2 (citohroms C) un 3 (insulīns) labāk atdalīt, izmantojot acetonitrilu par kustīgās fāzes organisko šķīdinātāju [20].



1.12. att. Olbaltumvielu aizture, atkarībā no kustīgas fāzes izvēles

Kustīgās fāzes koncentrācijas ietekme uz aminoskābju sorbciju parādīta 1.13. attēlā, kur 1.13.a attēlā redzama izokrātiska aminoskābju atdalīšana (kustīgā fāze 0,005% TFA dejonizētā ūdenī). Gradients atdalīšanā B kustīgā fāzē 5% acetonitrils un 0,006% TFA (1.13. b att.), 10% acetonitrils un 0,006% TFA (1.13. c att.) un 20% acetonitrils un 0,006% TFA (1.13. d att.). Gradients – lineārs, 0%-100% kustīga fāze B 12 minūtēs. Gradients metodē tiek novērots mazāks aminoskābju izdalīšanas laiks nekā izokrātiskos apstākļos. Gradients apstākļos pie acetonitrila koncentrācijas 20% izdalīšanas ilgums ir mazāks par 10 minūtēm. Izokrātiskos apstākļos aminoskābju izdalīšanas notiek 30 minūšu laikā. Pirmām sešām aminoskābēm novietojums hromatogrammā ir vienāds, mainās tikai triptofāna (7) novietojums hromatogrammā. Palielinoties gradienta sākuma koncentrācijai, aminoskābē izdalās ātrāk. Pie lielākas organiskā šķīdinātāja sākuma koncentrācijas fenilalanīna (6) un triptofāna (7) joslas ir smailākas un simetriskākas [21].



1.13. att. Acetonitrila koncentrācijas ietekme uz aminoskābju izdalīšanos

(1 - valīns, 2 - metionīns, 3 - izoleicīns, 4 - leicīns, 5 - tirozīns, 6 - fenilalanīns, 7 - triptofāns)

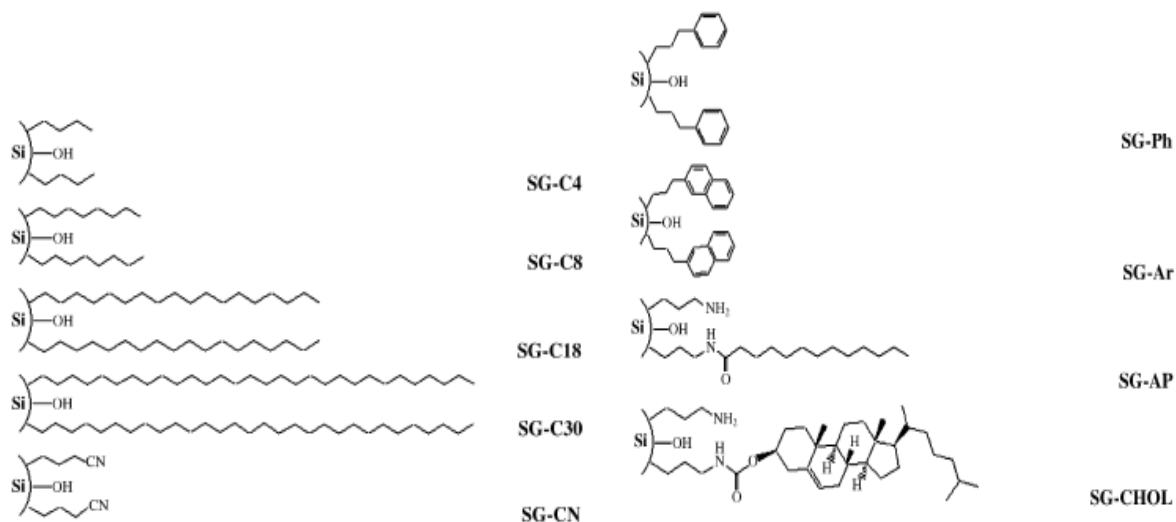
Bieži izmantotie jonu pāru reaģenti olbaltumvielu atdalīšanā ir trifluoretiķskābe (TFA), heptafluorsviestskābe (HFBA) un heksafluorfosfonskābe (HPF₆). HFBA ir plaši izmantots jonu pāru reaģents, kā arī tas ir stiprāks reaģents nekā TFA. HPF₆ arī tiek uzskatīts par stipru jonu pāru reaģentu. 1.2. tabulā ir parādīti šo trīs jonu pāru reaģentu ietekme uz izdalīšanas laiku un joslas platumu trīs olbaltumvielām – insulīnam, lizocīnam un mioglobīnam. Analīzei izmantotā kolonna ir HC-C₁₈ un hromatogrāfiskie apstākļi ir kolonnas temperatūra – 35 °C, plūsmas ātrums – 1 mL/min, parauga injekcijas tilpums – 1 μL, detektēšanas viļņa garums – 220 nm. Kustīgā fāze A – 13 mM skābe ūdenī, kustīgā fāze B – 8,7 mM skābe acetonitrilā [22].

Katrs anjons (jonu pāra reaģents) sorbējas uz stacionāras fāzes dažādā pakāpē. Kad pozitīvi lādēta olbaltumvielas molekula saskaras ar palielināto anjonu koncentrāciju tuvu stacionāras fāzes virsmai, izveidojas jonu pāris, kurš nodrošina aizturi. Šis modelis arī strādā attiecībā joslu platumiem. Jona pāra izveide starp olbaltumvielu un sorbētu piedevas anjonu, samazina olbaltumvielas aizturi jonu apmaiņas ceļā ar jonizēto silanola grupu. Rezultātā aiztures laiks kļūst lielāks un joslas šaurākas, ja izmanto stiprāku jonu pāra reaģentu [22, 216. lpp.].

Jonu pāru reaģentu ietekme uz aiztures laiku un joslas platumu

	Aiztures laiks (t_R), min			Joslas platumu ($w_{1/2}$), min		
	TFA	HFBA	HPF ₆	TFA	HFBA	HPF ₆
Insulīns	3,98	5,47	5,45	0,065	0,060	0,057
Lizocīns	4,82	6,67	6,52	0,104	0,075	0,063
Mioglobīns	6,10	8,11	7,94	0,108	0,086	0,073

Sorbenta izvēle. 1.14. attēlā ir parādītas dažādi sorbenti.



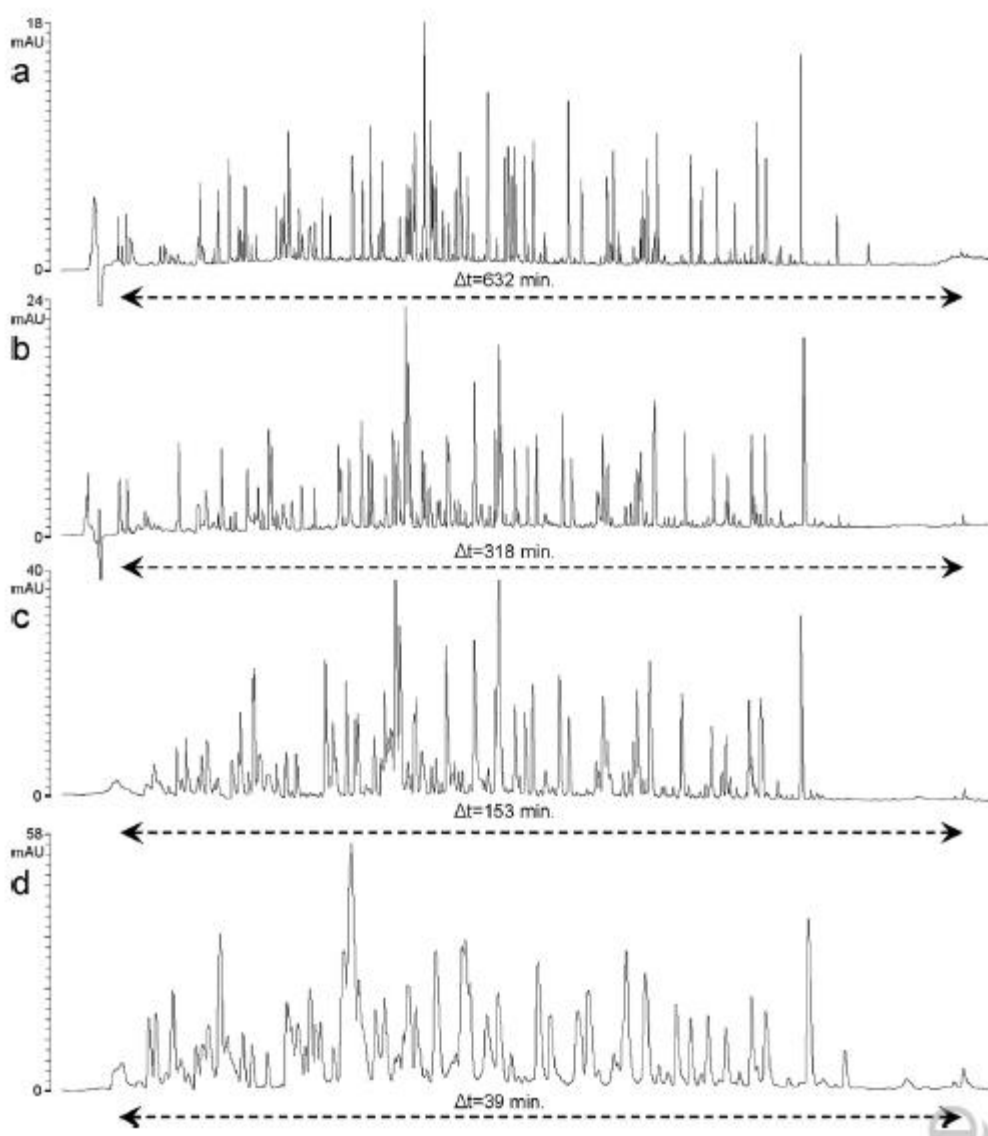
1.14. att. Silikagēlā "iešūtas" funkcionālās grupas

Izdalīšanas faktors tiek izmantots, lai salīdzinātu dažādus sorbentus (skat. 1.3. tabulu). Vislīdzīgākie izdalīšanas faktori ir SG-C18 un SG-C30 sorbentiem, kuros peptīdu piesaiste notiek pie garām alkilķēdēm, ar kurām ir modificēta silikagēla virsma. Šīs ķēdes dod stipro hidrofobo raksturu stacionārai fāzei. Nākamā, līdzīga sorbentu grupa ir SG-C4 un SG-C8 kolonas. Īsas alkilķēdes ir ķīmiski sasaistītas ar stacionāro fāzi, kas samazina hidrofobo raksturu un silanola grupas var vieglāk mijiedarbojas ar analizējamām substancēm. SG-CHOL un SG-AP sorbentos organiskas grupas, kurām piemīt hidrofobais-hidrofilais raksturs, ir iešūtas modificētas stacionāras fāzes virsmā. Abām kolonnām piemīt pseidomembrānas īpašības. SG-CN sorbents ir hidrofils [23].

Peptīdu izdalīšanas faktoru atkarība no sorbentu veida

Proteīns	<i>SG-C4</i>	<i>SG-C8</i>	<i>SG-C18</i>	<i>SG-C30</i>	<i>SG-AP</i>	<i>SG-CHOL</i>	<i>SG-CN</i>
3d	0,23	0,57	2,07	2,22	1,47	8,72	0,42
8d	0,03	0,21	1,39	1,39	0,81	5,86	0,04
2p	0,04	0,54	1,14	1,22	0,63	6,25	3,98
3p	2,47	2,92	2,59	3,00	1,83	11,84	1,92
4p	0,14	0,53	1,15	1,30	0,61	5,91	$t_R < t_0$
8p	2,29	2,46	2,19	2,56	1,57	1,95	1,79
68p	1,00	1,36	1,67	1,87	1,14	1,44	0,78

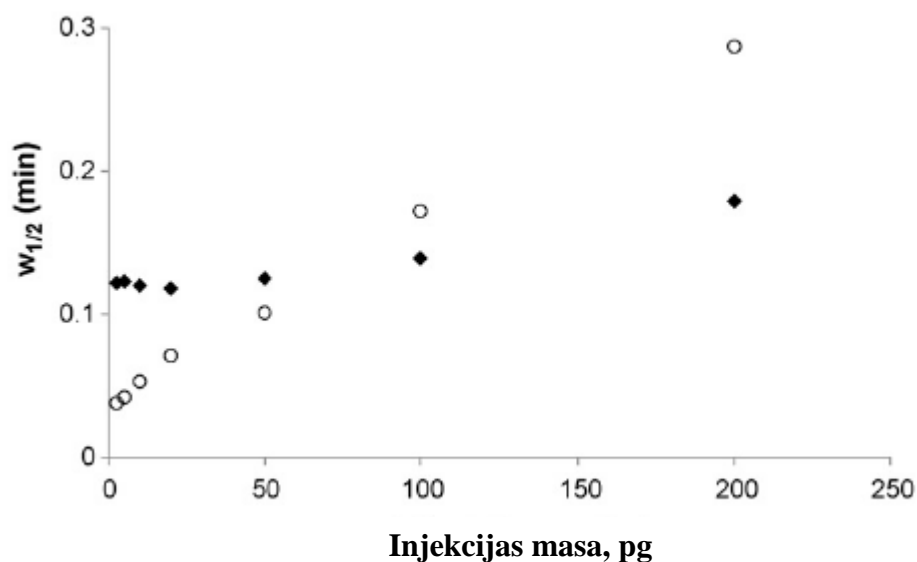
Liellopu seruma albumīna atdalīšanai tika izmantotas 4 dažāda garuma kolonnas (skat. 1.15. attēlu). Lai iegūtu līdzīgus izdalīšanas faktorus dažādiem komponentiem, gradienta laiks tika proporcionāli pieskaņots kolonnas garumam. Kolonnas garumi un gradienta laiks ir attiecīgi ir 4 m $t_g=840$ min (a); 2m un $t_g=420$ min (b); 1 m un $t_g=210$ min (c); 0,25 m un $t_g=52,5$ min (d). Samazinoties kolonnas garumam, samazinās arī laiks, kurš ir nepieciešams visu komponentu atdalīšanai [24].



1.15. att. Kolonas garuma ietekme uz aiztures laiku

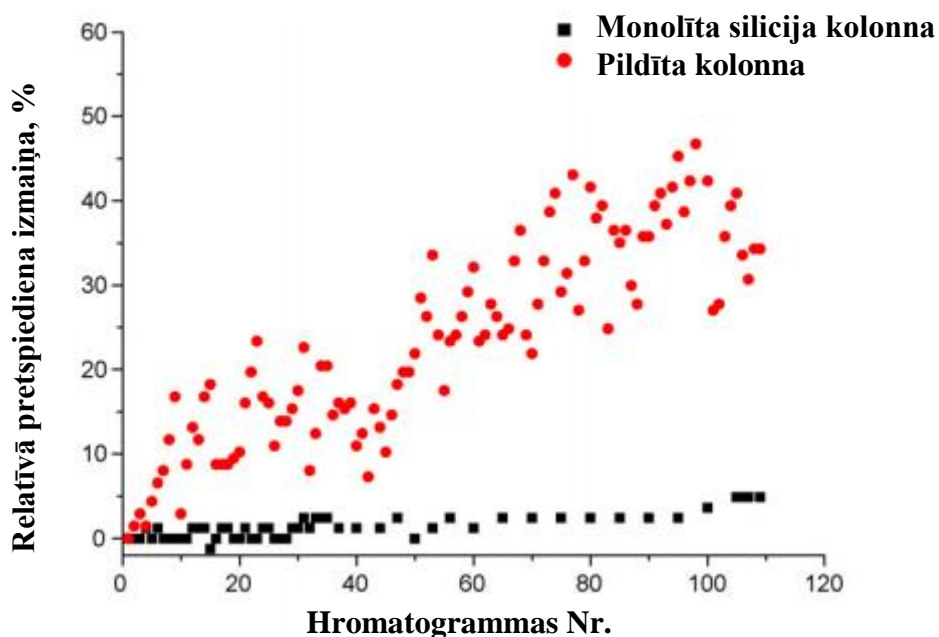
Masas nestspēja tika pārbaudīta, palielinot karboanhidrozes masu, uzturot nemainīgu injekcijas tilpumu – 1 μl . 1.16. attēlā parādīts masas slodzes efekts 50 mm monolīta sorbenta kolonnai un kolonnai, kura pildīta ar porainām silikagēla granulām. Joslas platums tika mērīts augstuma pusē. Palielinoties masai, tiek novērots lineārs joslas platuma pieaugums, izmantojot monolīta kolonnu. Pie 100 pg injekcijas masas joslas profils norāda uz pārslodzi un aiztures laiks mainās uz mazākām vērtībām. Pildītai kolonnai pusaugstumā joslas platums ir konstants līdz 50 pg injicētai masai, pirms joslas platums palielinās [25]. Silikagēla monolītam piemīt labas mazo molekulu atdalīšanas spējas [26].

Monolīta polimēra gadījuma dēļ mezoporu neesamības visas mijiedarbības saites ir aizņemtas pie mazām parauga koncentrācijām. Ierobežotas masas slodzes efekts ir neapšaubāms uz joslas platumu, joslas formu un aiztures laiku [25, 3088. lpp.].



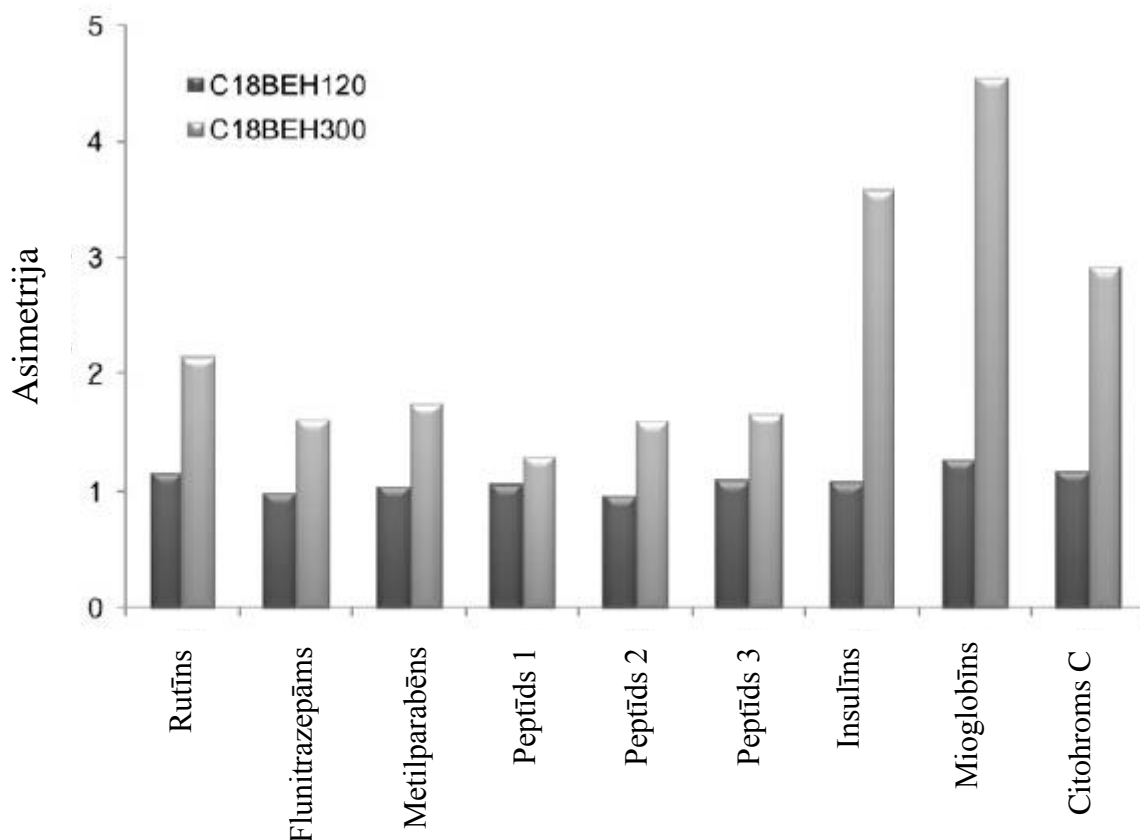
1.16. att. Masas nestspējas efekta salīdzinājums monolīta kolonnai (o) un kolonnai pildītai ar silīcija granulām (◆)

Ievadot bioloģiskus paraugus, svarīgs ir kolonnas pretspiediens. 1.17. attēlā ir parādīta pildītas kolonnas un monolīta silīcija kolonnas pretspiedienu atkarība no mērījumu daudzuma. Izmantotas kolonnas: *RAM-SCX* (25 nm x 4mm I.D.) pildīta kolonna ar 25 μm granulām un *Chromolith CapRod* monolīta silīcija kolonna (150 mm x 0,1mm I.D.). Pildītai kolonnai tiek ātrāk piesārņota nekā monolīta kolonna. 120 plazmas injekcijas (50 μL katrā) noveda pie blīvuma paaugstinājuma līdz 6 bar *RAM-SCX* kolonnai. Monolīta kolonnai pretspiediens ir apmērām 1 bar [27].



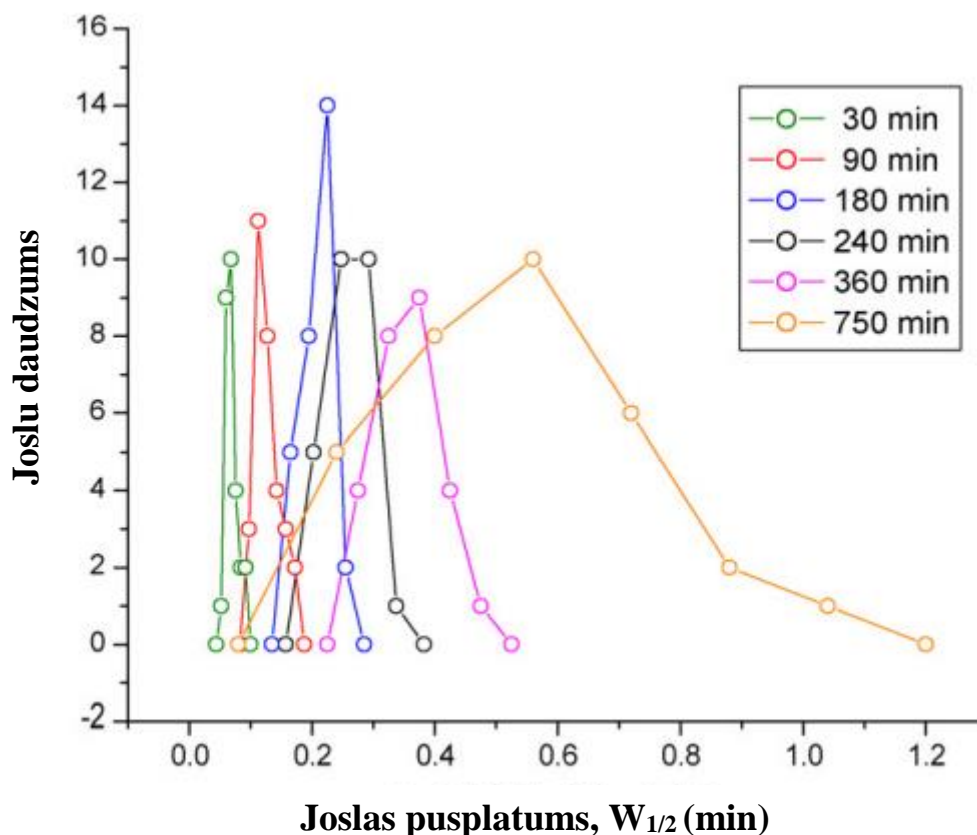
1.17. att. Pretspiediena izmaiņas atkarība no mērījuma skaita pildītai un monolīta kolonnām

Tā kā olbaltumvielām piemīt ievērojami hidrodinamiskie rādiusi, tad poru izmēram jābūt palielinātam. 1.18. attēlā ir parādīta insulīna, mioglobīna un citohroma C joslu asimetriju, analizējot tos ar divām dažādām C18 Acquity kolonnām ar dažādiem poru izmēriem 120 un 300 Å. Apstākļi: kustīga fāze A – 0,1% TFA (tilp/tilp) ūdenī, mobilā fāze B – 0,1% TFA (tilp/tilp) acetonnitrilā, gradienta profils – 5-60% acetonnitrila 10 minūtes, plūsmas ātrums 500 µL/min, $\lambda=214$ nm, injekcijas tilpums – 2 µL, $t=50^{\circ}\text{C}$. Iegūtie rezultāti ir pretējie, tika novērots, joslu simetrijas degradācija, izmantojot kolonnas ar poru izmēru 300 Å. Līdzīga uzvedība tika novērota arī mazām molekulām un pozitīvi lādētiem peptīdiem – asimetrija ir lielāka kolonnām ar poru izmēru 300 Å. Lielas astes veidošanas ir novērota kolonnā ar 300 Å poru izmēru dēļ to piepildīšanas problēmas, nekā dēļ silanola grupu atšķirīgas aktivitātes. To pierada tas fakts, ka neitrāliem maziem komponentiem arī piemīt augstāka asimetrijā [9, 8909.-8910. lpp.].



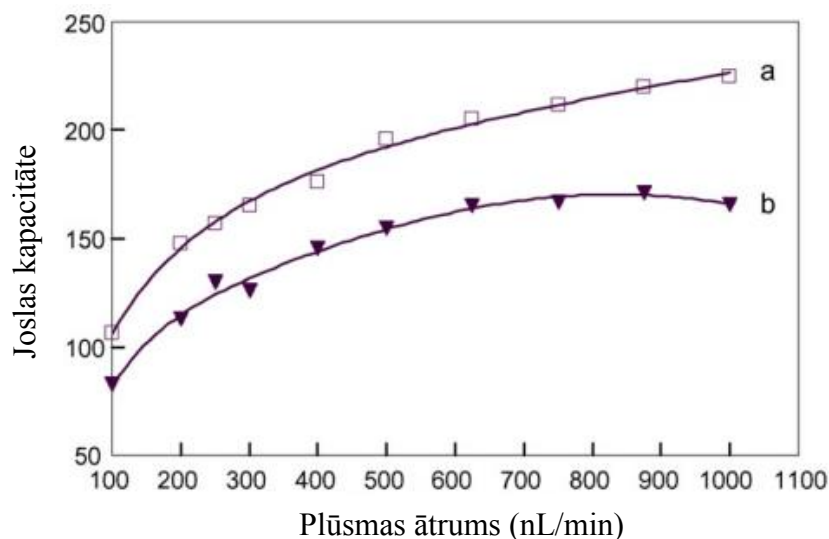
1.18. att. Poru efekts uz joslu asimetriju

Gradianta laika izvēle. Joslu pusplatuma atkarība no gradianta laika ir atspoguļota 1.19. attēla. Katrs atvērtais aplis histogrammā nozīmē cik daudz joslas ir pie noteikta joslas pusplatuma. Hromatogrāfijas apstākļi: temperatūra 60 °C, plūsmas ātrums 0,5 mL/min, gradianta laiks 30, 60, 90, 180, 240, 360 un 750 minūtes. Kā redzams no 1. 19. attēlā joslas pusplatums var atšķirties, atdalot olbaltumvielas, pie dažādiem gradientu laikiem. Lielā starpība ir pie ilgākiem gradientiem. Piemēram, pie gradianta laika 750 minūtes mioglobīnam ir 10 joslas ar pusplatumu starp 0,5 un 0,6 minūtes, 8 joslas – starp 0,4 un 0,5 minūtes, 6 joslas – starp 0,6 un 0,7 minūtes. Ir novērojams joslu pusplatumu palielinājums, palielinoties gradianta laikam [28].



1.19. att. Joslu pusplatuma atkarība no gradienta laika

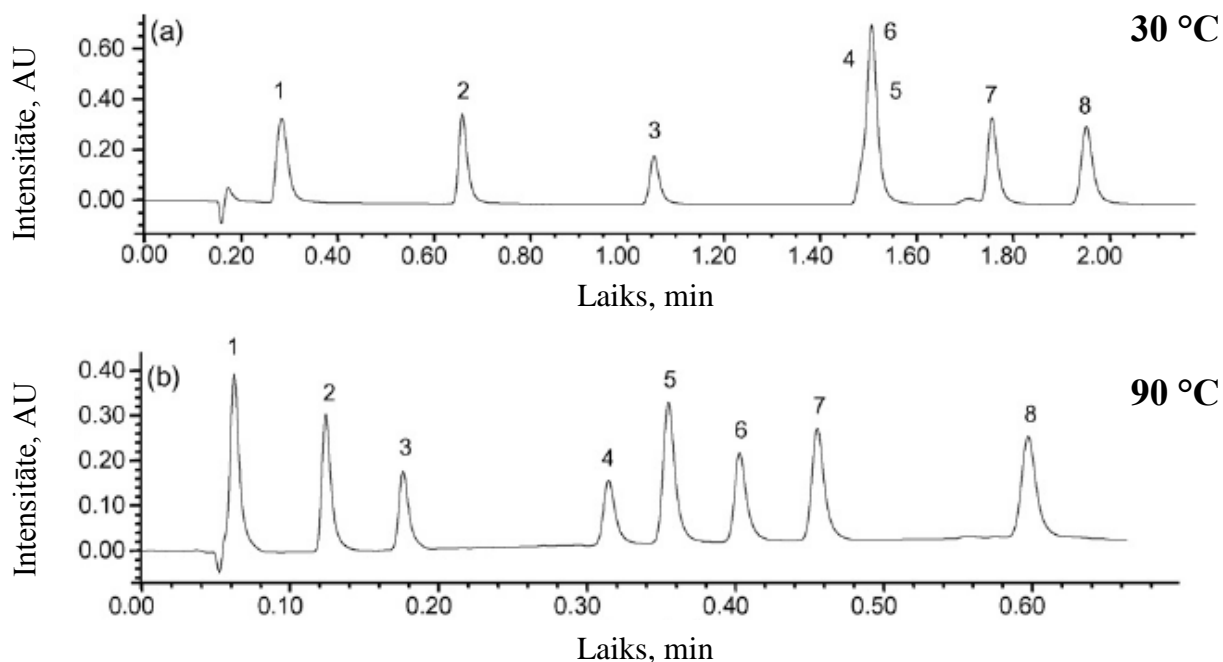
Plūsmas ātruma izvēle. Plūsmas ātruma ietekme uz joslu kapacitāti ir parādīta 1.20. attēlā. Tika izmantotas divas 10 cm kolonnas, kuras ir pildītas ar 1,7 μm (1.20. a att.) un 3 μm (1.20. b att.) granulām, gradienta ilgums 24 minūtes. Abas līknes ir līdzīgas pēc izskata. Pie plūsmas ātruma 100-300 nL/min ir redzama vislielākais joslu kapacitātes pieaugums. Grafika līknes kļūst lēzenāki pie plūsmas ātruma 300-700 nL/min. Līknes iet dažādos virzienos pie plūsmas ātruma no 700 līdz 1000 nL/min. Līknes a gadījumā tiek novērots kapacitātes pieaugums, bet līknei b tiek novērots kapacitātes samazinājums. Vienāda joslu kapacitāte abām kolonnām ir novērota pie plūsmas ātrumiem 250 nL/min un 750 nL/min attiecīgi 1,7 μm un 3,0 μm kolonnām. Lielākā joslas kapacitāte 3 μm kolonnai ir pie plūsmas ātruma ~750 nL/min, tādējādi šis plūsmas ātrums ir piemērotāks šai kolonnai. 1,7 μm kolonnai efektīvākais plūsmas ātrums ir 1000 nL/min [29].



1.20. att. Joslu kapacitātes atkarība no plūsmas ātruma

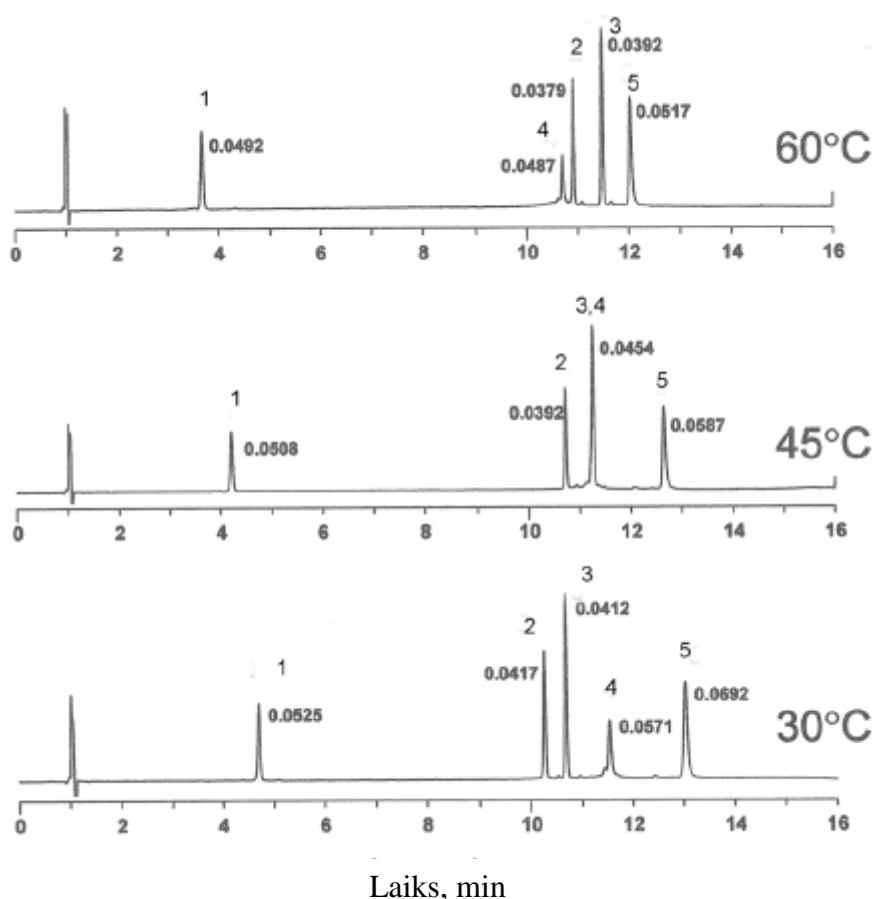
Temperatūra izvēle. Temperatūra ietekme peptīdu izdalīšanos un izdales koeficientus [19, 141. lpp.]. Temperatūras palielinājums būtiski uzlabo hromatogrāfiskās atdalīšanas efektivitāti. Palielinās analīzes ātrums – tas ir 5-15 reizes lielāks, ja temperatūra tiek palielināta no istabas līdz 200 °C. Izmainot temperatūru, var tikt palielināta kolonnas efektivitāti, samazinot to līdz optimālām šķīvju augstumam.. Joslas ir simetriskākas dēļ sekundāro mijiedarbību ierobežošanas [30].

1.21. attēlā ir parādīta temperatūras ietekmi uz farmaceitiskā kokteiļa atdalīšanos. Tika izmantota *Acquity BEH C18* (2,1mm I.D. x 30 mm, 1,7 μm), kustīga fāze 0,1% skudrskābe ūdenī un 0,1% skudrskābe acetonitrilā (gradients). Maisījums sastāv no paracetamola (1), fenazona (2), fenobarbitāla (3), metilfenobarbitāla (4), propifenazona (5), nitrazepāma (6), flunitrazepāma (7), diazepāma (8). 1.21.a att. atdalīšana notika pie temperatūras 30 °C un plūsmas ātruma 600 μL/min, 1.21.b att. pie 90 °C un 2000 μL/min. Apskatot hromatogrammu ir redzams, ka noteikšanas laiks samazinājās no 2 minūtēm līdz 0,6 minūtēm, pie tam katru joslu ir viegli identificēt [31].



1.21. att. Temperatūras ietekme uz farmaceitiskā maisījuma atdalīšanu

1.22. attēlā parādīta temperatūras ietekme uz mazo olbaltumvielu atdalīšanu. Apstākļi: kustīga fāze A – 10% acetnitrils-0,1% TFA, kustīga fāze B – 70% acetnitrils-30% ūdens-0,1% TFA; gradients no 15% B līdz 50% 15 minūtēs; plūsmas ātrums 1 $\mu\text{L}/\text{min}$; detektēšana pie 220 nm. Joslu platums samazinās pie lielākām temperatūrām, notiek efektīvākā atdalīšana. Tas var novest pie tā, ka izšķirtspēja uzlabosies un joslu kapacitāte palielināsies. Darbošanās pie augstākām temperatūrām (60 °C) var būt efektīva un to var izskatīt, ka peptīdu un mazo olbaltumvielu atdalīšanas metodi. Temperatūras izmaiņas var arī izraisīt saišu intervāla (selektivitātes) izmaiņu, kas var būt noderīgi vai kaitīgi atkarībā no kāds specifiskais paraugs tiek atdalīts [32].

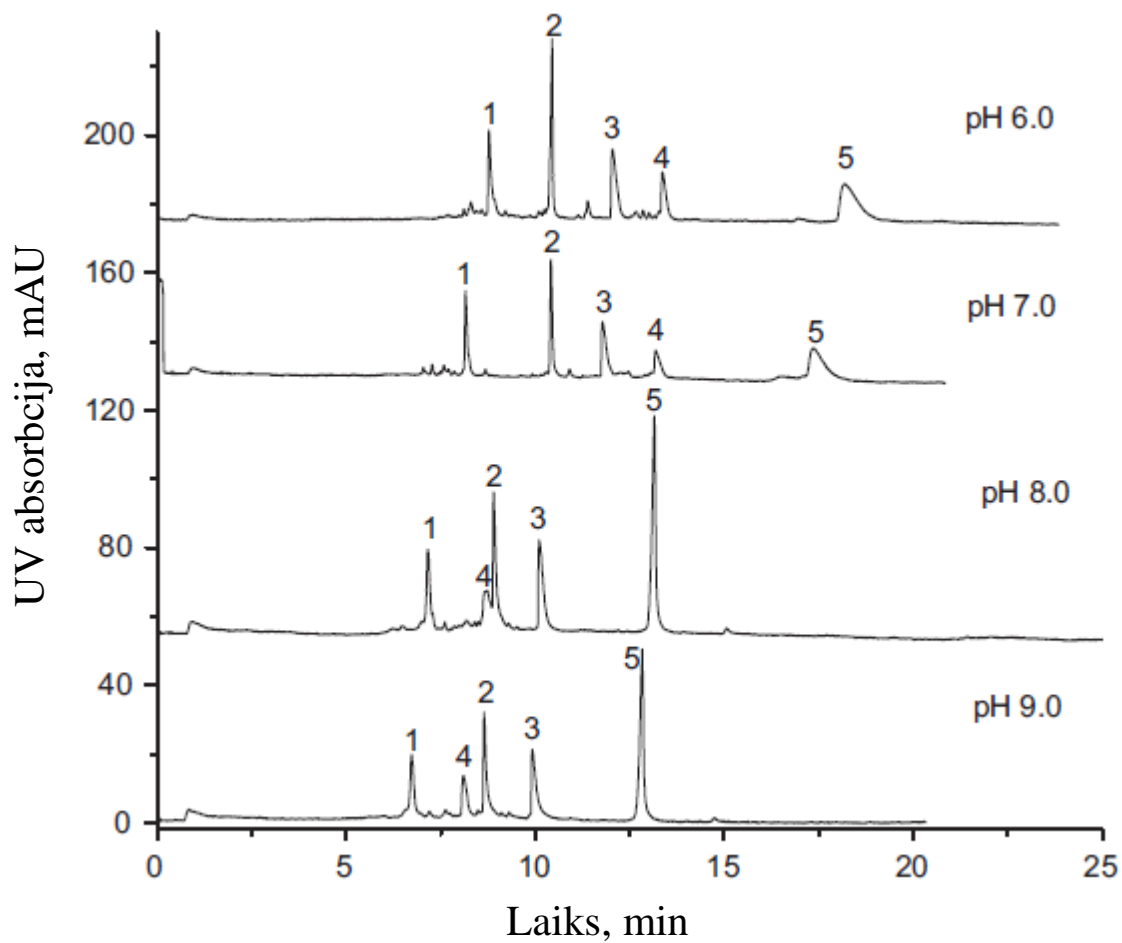


1.22. att. Temperatūras ietekme uz mazo olbaltumvielu atdalīšanu

pH izvēle. Kustīgas fāzes pH vērtība atstāj būtisku efektu uz peptīdu un olbaltumvielu atdalīšanu jonu apmaiņas hromatogrāfijā. pH ietekme jonu apmaiņas funkcionālo grupu un analīta jonizācijas apjomu [33]. Sakarā ar to kā fosforskābe ir diezgan stipra skābe, tad pH vērtībai virs 3,0 piemīt niecīgs efekts uz skābes jonoizāciju. Sintētiskiem peptīdiem CES P0050 nav skābju grupu, bet tiem ir neliels lādiņš no skābēm līdz neitrālām vidēm. Teorētiski pH nevajadzētu būt nozīmīgam efektam uz peptīdu atdalīšanos [34].

1.23. attēlā ir parādīta pH gradienta ietekme uz tripsinogēna (1), citohroma C (3), α -himotripsinogēna A (2), ribonukleāzes A (4) un lizocīma (5) aiztures laiku, joslu kapacitāti un izšķirtspēju, izmantojot monolīta kolonnu. Hromatogrāfijas apstākļi: kolonna 10,5 cm x 75 μ m i.d.; A kustīga fāze 5 mmol/L nātrija fosfāta šķīdums ar pH 6,0, 7,0, 8,0 un 9,0, B kustīga fāze 1 M NaCl 5 mmol/L nātrija fosfāta šķīdumā; 2 minūšu 100% A kustīgas fāzes izokratiskā eluēšana, kurai seko lineārais gradients no 100% A līdz 100% B kustīgas fāzes 10 minūtēs; plūsmas ātrums 40 μ L/min; UV detektēšana pie 214 nm. Palielinoties pH, olbaltumvielas izdalīšanas laiks samazinās. Ribonukleāze A tiek eluēta pirms citohroma C pie pH 8,0 un augstāka, bet pie pH vērtības 6,0 un 7,0 vēlāk. Šis efekts var tikt izmantots, lai optimizētu dažādas atdalīšanas un

izmainīt selektivitāti. Izšķirtspēja starp citohromu C un α -himotripsinogēnu A samazinās no 3,8 līdz 2,0 pie pH vērtībām 6,0 un 9,0 [34, 4328. lpp.].



1.23. att. Kustīgas fāzes pH ietekme uz olbaltumvielu atdalīšanu

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Izmantotā aparatūra

Izmantotā aparatūra

- *Agilent* hromatogrāfiskā iekārta:
 - detektors –*Infinity* 1290DAD
 - sūknis –*Infinity* 1290 ar automātisko paraugu ievadīšanu,
 - datu apstrādes programma *Chemstation*, *Chromsword*,
- Analītiskie svāri *Precisa* 32324 ($d = \pm 0,0001$ g).
- Ultraskaņas vanna *Selector Ultrasons* 38035.
- Magnētiskais maisītājs

2.2. Izmantotas vielas un reāģenti

Izmantotās standartvielas un reāģenti

Albumīns (M=66,5kDa)	≥96%, Sigma-Aldrich Nr. A2153
β-Laktoblobulīns (M=18,0 kDa)	≥90%, Sigma-Aldrich Nr. L3908
Karboanhidrāze (M=29,0 kDa)	≥95%, Sigma-Aldrich Nr. C2624
Aprotinīns (M=6,5 kDa)	3-8 TIU/mg ciets, Sigma-Aldrich Nr. A1153
L-Glutamātes dehidrogenāze (M=290,0 kDa)	≥40 vien/mg olbaltumvielas, Sigma-Aldrich Nr. G2501
Peroksidāze (M=44,0 kDa)	150 U/mg, Sigma-Aldrich Nr. 77332
Mioglobīns (M=17,8 kDa)	≥90%, Sigma-Aldrich Nr. M1882
Enolāze (M=67,0 kDa)	≥50%, Sigma-Aldrich Nr. E6126
Citohroms C (M=12,0 Da)	≥95%, Sigma-Aldrich Nr. C7752
Lizocīms (M=14,3 kDa)	≥90%, Sigma-Aldrich Nr. L6876
α-Laktalbumīns (M=14,1 kDa)	≥85%, Sigma-Aldrich Nr. L5385
Ribonukleāze A (M=14,0 kDa)	≥70 Kunitz vien./mg olbaltumvielas, Sigma-Aldrich Nr. R6516
Elastāze (M=25,9 kDa)	≥98%, Sigma-Aldrich Nr. SCP0249
Insulīns, cilvēka (5,8 kDa)	Sigma-Aldrich Nr. I2643

Metanols	≥99,9%, Sigma-Aldrich Nr. 34885
Acetonitrils	≥99,9%, Sigma-Aldrich Nr. 34851
Trifluoretiķskābe	Penta Nr. t-4390

2.3. Kustīgo fāžu un analizējamo paraugu pagatavošana

Kustīgo fāžu pagatavošana.

Kustīgās fāzes I pagatavošana. 500 ml ūdens pievieno 0,50 ml trifluoretiķskābes un labi samaisa.

Kustīgās fāzes II pagatavošana. 500 ml metanola pievieno 0,50 ml trifluoretiķskābes un labi samaisa.

Kustīgās fāzes III pagatavošana. 500 ml acetonitrila pievieno 0,50 ml trifluoretiķskābes un labi samaisa.

2.4. Hromatogrāfiskās analīzes apstākļi

Hromatogrāfiskie apstākļi

- Kolonna: Firmas *Agilent* kolonna *Zorbax 300 SB-C18* uz silikagēla bāzes ar C18 grupām, darba pH intervāls 1,0-8,0 un maksimāla temperatūra 90 °C [35]. Sorbenta daļiņu izmērs – 1,8 μm, poru izmērs – 300 Å [36], īpatnējs virsmas laukums – 45 m²/g [35]. Kolonnas izmērs 2,1x50 mm [36].
- Kolonna: Firmas *Agilent* kolonna *Zorbax 300 Extend-C18* uz silikagēla bāzes ar C18 grupām, darba pH intervāls 2,0-11,5 un maksimāla temperatūra 60 °C. Sorbenta daļiņu izmērs – 3,5 μm, poru izmērs – 300 Å, īpatnējs virsmas laukums – 42 m²/g. Kolonnas izmērs 2,1x50 mm [37].
- Kolonna: Firmas *Agilent* kolonna *Poroshell 300 SB-C18* uz silikagēla bāzes ar C18 grupām, darba pH intervāls 1,0-8,0, maksimāla temperatūra pie pH vērtības mazākas par 5 70 °C un pie pH 4-8 70 °C. Sorbenta daļiņu izmērs – 5 μm, poru izmērs – 300 Å, īpatnējs virsmas laukums – 4,5 m²/g [38]. Kolonnas izmērs 2,1x75 mm [39].
- Kolonna: Firmas *Agilent* kolonna *Poroshell 300 Extend-C18* uz silikagēla bāzes ar C18 grupām, darba pH intervāls 2,0-11,0 un maksimāla temperatūra pie pH vērtības lielākas par

8 40 °C un pie pH vērtības zemākas par 8 60 °C. Sorbenta daļiņu izmērs – 5 μm, poru izmērs – 300 Å. Kolonnas izmērs 2,1x75 mm [39]

- *Gradients I*: kustīgas fāzes stipruma palielinājums no 15% līdz 50% acetonitrila 5 minūšu laikā.
- *Gradients II*: kustīgas fāzes stipruma palielinājums no 15% līdz 50% acetonitrila 10 minūšu laikā.
- *Gradients III*: kustīgas fāzes stipruma palielinājums no 35% līdz 85% metanola 5 minūšu laikā.
- *Gradients IV*: kustīgas fāzes stipruma palielinājums no 35% līdz 85% metanola 10 minūšu laikā.
- Kolonnas temperatūra: 60 °C.
- Plūsmas ātrums: 1,00 mL/min (*Poroshell kolonnām*) un 0,5ml/min (*Zorbax kolonnām*).
- Detektors: UV absorbcija, $\lambda = 210 \text{ nm}$.
- Injekcijas tilpums: 20 μL.

2.5. Aprēķinu formulas

Gradianta slīpums tika noteikts ar vienādojuma 2.1 palīdzību.

$$b = \frac{V_m \cdot \Delta\varphi \cdot S}{t_G \cdot F} \quad (2.1)$$

, kur b – gradianta solis;

t_G – gradianta laiks, min;

F – kustīgas fāzes ātrums, mL/min;

V_m – kolonnas tukšais tilpums, mL;

$\Delta\varphi\%$ – kustīgo fāžu stipruma starpība pēc organiskā šķīdinātāja (gradient range; $\Delta\varphi\% = \varphi_s - \varphi_b$);

S – gradianta slīpums [18, 410. lpp.], ja molekulārā masa ir $>500 \text{ Da}$, tad $10 \leq S \leq 100$ [40].

Gradianta soļa aprēķināšanai tiek izmantota formula 2.2:

$$b = \frac{t_o \cdot \log\beta}{t_{R1} - (t_{R2}/\beta) - (t_o + t_D) \cdot (\beta - 1)/\beta} \quad (2.2)$$

, kur t_o – kolonnas tukšais laiks, min;

β – koeficients, divu gradientu dalījums;

t_{R1} , t_{R2} – viena komponenta pirmā un otrā gradienta aiztures laiki, min;

t_D – iekārtas tukšais laiks, min [18, 432. lpp.].

β tiek noteikts, izmantojot vienādojumu 2.3:

$$\beta = \frac{t_{G2}}{t_{G1}} \quad (2.3)$$

, kur $t_{G2} > t_{G1}$.

Izdalīšanas faktors tiek rēķināts, izmantojot vienādojumu 2.4 [18, 412. lpp.]:

$$k^* = \frac{0,87 \cdot t_G \cdot F}{V_m \cdot \Delta\varphi \cdot S} \quad (2.4)$$

Hidrofobitātes aprēķina formula ir 2.5:

$$\text{Hidrofobitāte} = \frac{(k_{\text{toluols}} - k_{\text{benzols}})}{2} \quad (2.5)$$

, kur k_{toluols} – toluola izdalīšanas faktors;

k_{benzols} – benzola izdalīšanas faktors.

Silanolaktivitāte tiek aprēķināta, izmantojot vienādojumu 2.6:

$$\text{Silanolaktivitāte} = 1 + 3 \cdot \left(\frac{k_{\text{anilīns}}}{k_{\text{fenols}}} - 1 \right) \quad (2.6)$$

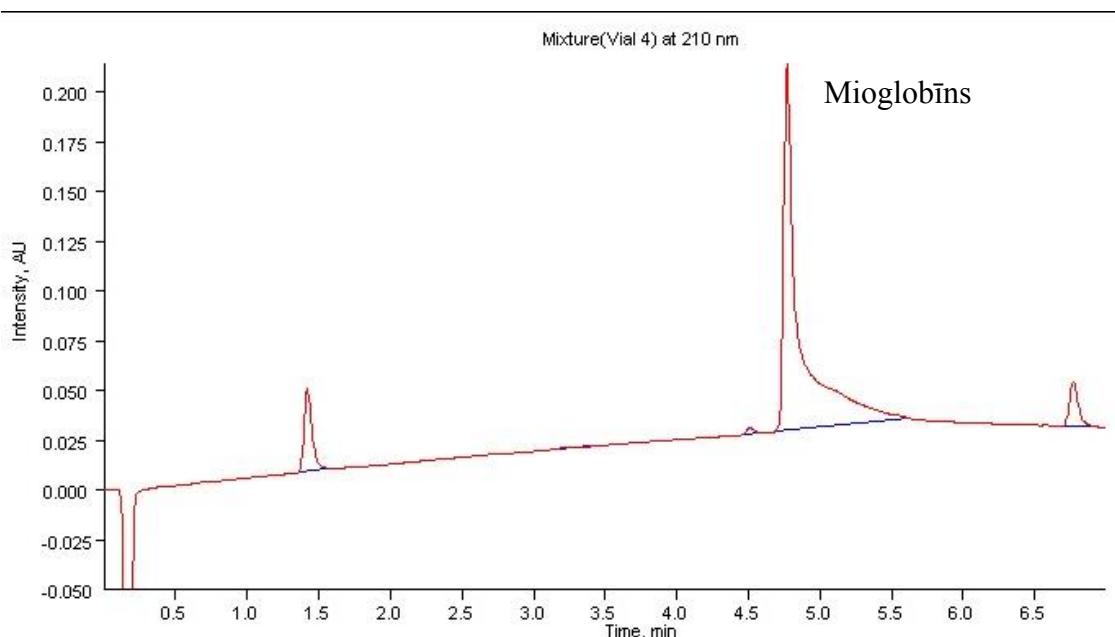
, kur $k_{\text{anilīns}}$ – anilīna izdalīšanas faktors;

k_{fenols} – fenola izdalīšanas faktors [41].

3. REZULTĀTU IZVĒRTĒJUMS

Darba tika izmantotas 14 olbaltumvielas. Katrai olbaltumvielai tika piešķirts numurs: 1 – insulīns, 2 – aprotinīns, 3 – citohroms C, 4 – ribonukleāze, 5 – α -laktalbumīns, 6 – lizocīms, 7 – mioglobīns, 8 – β -laktoglobulīns, 9 – elastāze, 10 – karboanhidrāze, 11 – peroksidāze, 12 – albumīns, 13 – enolāze, 14 – L-glutamātes dehidrogenāze. Katras olbaltumvielas molekulārā masa ir norādīta 2.2 nodaļā. Vislielākā molekulārā masa ir L-glutamāzes dehidrogenāzei un mazāka ir insulīnam, attiecīgi 290,0 kDa un 5,8 kDa. Eksperimentālie dati tika iegūti, izmantojot četras kolonnas – *Zorbax 300 SB-C18*, *Zorbax 300 Extend-C18*, *Poroshell 300 SB-C18* un *Poroshell 300 Extend-C18* un divus organiskos šķīdinātājus – 0,1% TFA ūdeņš maisījumi ar acetonitrilu vai metanolu.

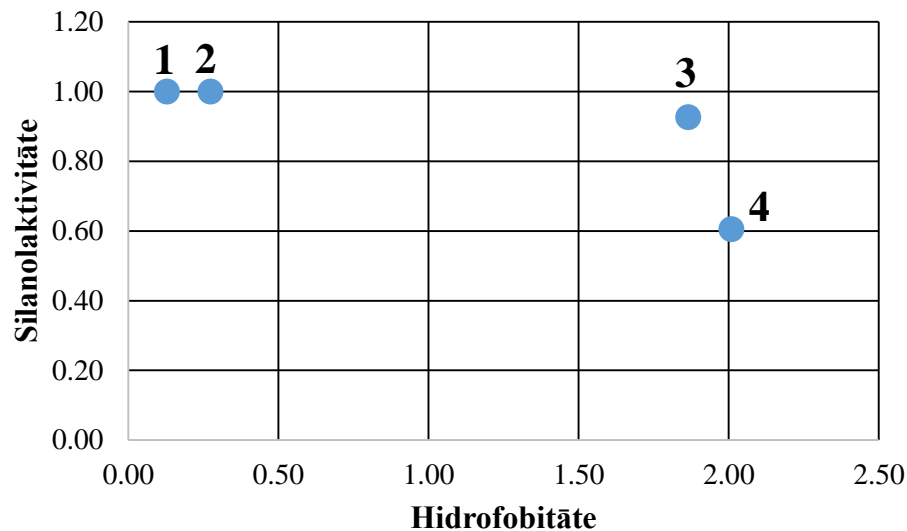
3.1. attēlā ir parādīta mioglobīna hromatogramma. Hromatogrāfiskie apstākļi: kustīga fāze – metanols, kustīgās fāzes gradients no 35 līdz 85% metanola 10 minūtēs.



3.1. att. Mioglobīna hromatogramma

3.1. Sorbentu testi

Tika noteikta sorbentu hidrofitāte – sorbenta spēja saistīt hidrofilos savienojumus un silanolaktivitāte – spēja stāties mijiedarbībā ar skābajām silanolu grupām. [42]. 3.2. attēlā ir parādīta izmantoto sorbentu hidrofitātes un silanolaktivitātes sakarība.



3.2. att. Sorbenta hidrofobitātes un silanolaktivitātes sakarība

(1-Poroshell 300 SB-C18, 2-Poroshell 300 Extend-C18, 3-Zorbax 300 SB-C18, 4-Zorbax 300 Extend-C18)

Analizējot 3.2. attēlu, tika ievērots, ka sorbentus pēc hidrofobitātes var izteikti iedalīt divās grupās: a) kuriem hidrofobitāte ir maza – *Poroshell 300 SB-C18* un *Poroshell 300 Extend-C18* un b) kuriem piemīt liela hidrofobitāte – *Zorbax 300 SB-C18* un *Zorbax 300 Extend-C18*. Hidrofobitāte *Zorbax* sorbentiem ir vairāk nekā 10 reizes lielāka nekā *Poroshell* sorbentiem. Vislielākā hidrofobitāte novērota *Zorbax 300 Extend-C18* sorbentam, kas nozīmē, ka tas visilgāk aizturēs hidrofobos savienojumus. Starp *Poroshell* sorbentiem vismazākā hidrofobitāte ir *Poroshell 300 SB-C18* sorbentam un tā ir 0,13.

Pēc silanolaktivitātes sorbentus iedalīt ir grūtāk. Vismazākā silanolaktivitāte ir *Zorbax 300 Extend-C18* sorbentam – 0,61. Savukārt pārējiem sorbentiem piemīt līdzīga silanolaktivitāte.

3.2. Gradientsa slīpumi (S)

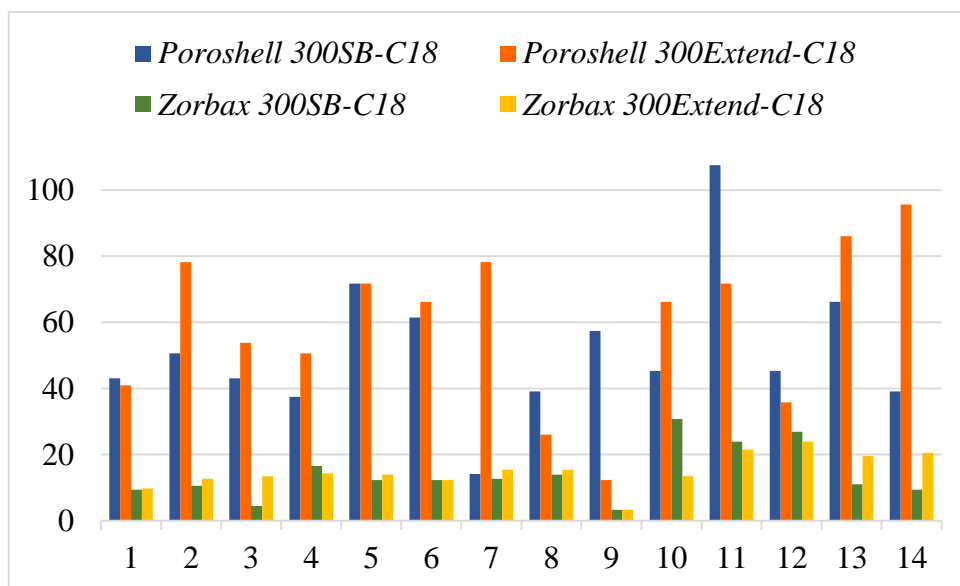
Analizējot eksperimentāli iegūtos datus, tika izrēķināti gradientu slīpumi. 3.3. Attēlā parādīti gradientu slīpumi, kuri ir iegūti ar *Poroshell 300 SB-C18*, *Poroshell 300 Extend-C18*, *Zorbax 300 SB-C18* un *Zorbax 300 Extend-C18* sorbentiem, par organisko šķīdinātāju izmantojot acetonitrilu. Rezultātu iegūšanai tika izmantots gradientu pāris, kurā acetonitrila koncentrāciju no 15 līdz 50% mainīja 5 un 10 minūtēs.

Tikai peroksidāzei (11) un sorbentam *Poroshell 300 SB-C18* gradienta slīpuma vērtība pārsniedz literatūrā atrasto vērtību, kurā savienojumiem ar molekulāro masu >500 Da ir $10 \leq k' \leq 100$. Tā ir 107. Pārējām olbaltumvielām gradienta slīpums iekļaujas šajās robežās.

Apskatot grafiku, tika ievērota sakarība, ka dažām olbaltumvielām gradienta slīpuma vērtības dažādiem sorbentiem ir līdzīgas. Šī sakarība ir novērota olbaltumvielai 8 un 12. Olbaltumvielu 1, 5 un 6 gadījumā slīpuma vērtības ir līdzīgas vienas markas sorbentiem, tas ir slīpuma vērtības ir līdzīgas sava starpā sorbentu pārim *Zorbax 300 SB-C18* un *Zorbax 300 Extend-C18* un sorbentu pārim *Poroshell 300 SB-C18* un *Poroshell 300 Extend-C18*.

Olbaltumvielām 2, 4, 7 un 11 ir novērots kā gradientu slīpuma vērtība ir līdzīga tikai vienam sorbentu pārim – *Zorbax 300 SB-C18* un *Zorbax 300 Extend-C18*. Tas nozīmē, ka šīm olbaltumvielām *Poroshell 300 SB-C18* un *Poroshell 300 Extend-C18* sorbenta īpašības ietekmē olbaltumvielu uzvedību kolonnā, bet *Zorbax 300 SB-C18* un *Zorbax 300 Extend-C18* – neietekmē.

Olbaltumvielām 3, 10, 13 un 14 gradienta slīpuma vērtības katram sorbentam ir dažādas, tādējādi, visi sorbenti ietekmē olbaltumvielu uzvedību kolonnā.



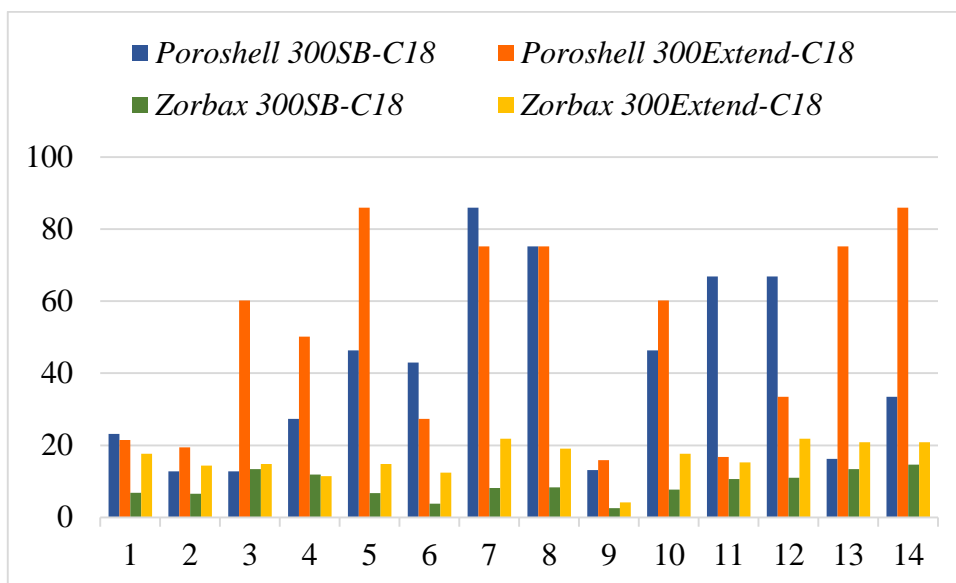
3.3. att. Acetonitrila gradienta slīpumi

3.3. Attēlā parādīti gradienta slīpumi, kuri ir iegūti izmantojot *Poroshell 300 SB-C18*, *Poroshell 300 Extend-C18*, *Zorbax 300 SB-C18* un *Zorbax 300 Extend-C18* sorbentus, par organisko šķīdinātāju izmantojot metanolu. Rezultātu iegūšanai tika izmantots gradientu pāris, kurā metanola koncentrāciju no 15 līdz 50% mainīja 5 un 10 minūtēs

Metanola gadījumā gradienta slīpuma vērtība nepārsniedz literatūrā atrasto lielumu. Atšķirībā no acetonitrila, lielākai daļai olbaltumvielu novērota gradienta slīpumu vērtību izkliede dažādām olbaltumvielām. Olbaltumvielām 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 un 14 gradienta slīpums ir atšķirīgs katram sorbentam. Tas nozīmē, ka šo olbaltumvielu uzvedību ietekmē sorbentos esošās polārās funkcionālās grupas.

Olbaltumvielu 1, 3, 4 un 8 gadījumā vienam no sorbenta pāriem ir līdzīgs gradienta slīpums. Olbaltumvielai 1 gradienta slīpums ir līdzīgs *Poroshell 300 SB-C18* un *Poroshell 300 Extend-C18* sorbentiem, bet olbaltumvielai 8 šiem pašiem C18 sorbentiem gradienta slīpuma vērtības ir vienādas. Olbaltumvielām 3 un 4 gradienta slīpums ir līdzīgs *Zorbax 300 SB-C18* un *Zorbax 300 Extend-C18* sorbentiem. Olbaltumvielām 1 un 8 sorbenta īpašības ietekmē to uzvedību tikai *Zorbax 300 SB-C18* un *Zorbax 300 Extend-C18* sorbentos, bet olbaltumvielām 3 un 4 – *Poroshell 300 SB-C18* un *Poroshell 300 Extend-C18* sorbentos.

Līdzīgi kā acetonitrilam, var izdarīt secinājumus, ka šīm olbaltumvielām sorbents būtiski ietekmē gradienta slīpumu, tādējādi ietekmējot olbaltumvielu sorbciju.



3.4. att. Metanola gradienta slīpumi

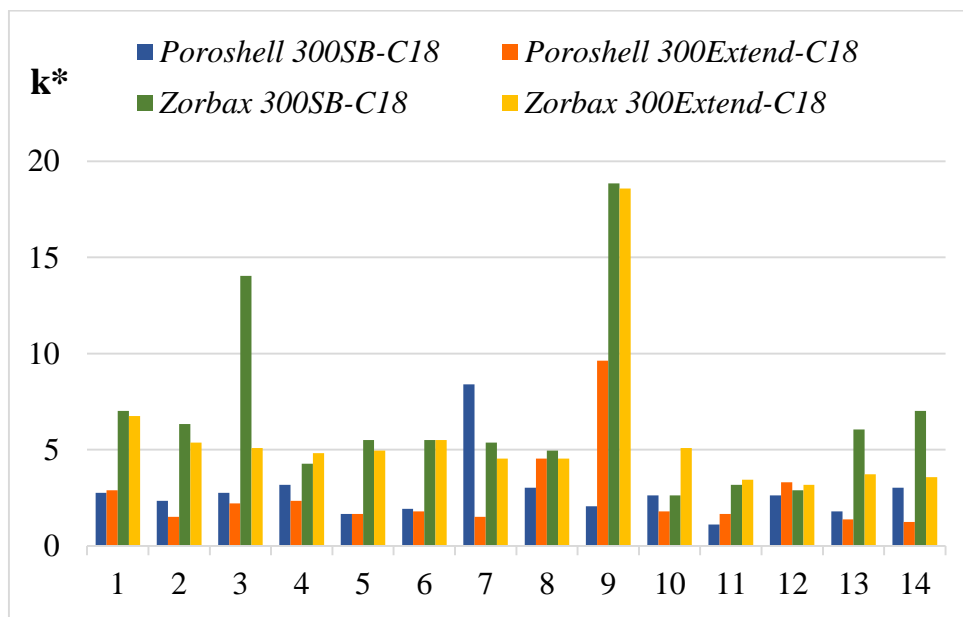
3.3. Olbaltumvielu gradienta izdalīšanas faktori

Izmantojot gradienta slīpumu, tika izrēķināti gradienta izdalīšanas faktori. 3.5. Attēlā ir parādīti olbaltumvielu gradienta izdalīšanas faktori atkarībā no sorbenta veida, par organisko šķīdinātāju izmantojot acetonitrilu. *Poroshell 300 SB-C18* un *Poroshell 300 Extend-C18*

sorbentiem gandrīz visām olbaltumvielām gradienta izdalīšanas faktori ir līdzīgi. Būtiska atšķirība starp gradienta izdalīšanas faktoriem ir olbaltumvielām mioglobīnam (6) un elastāzei (9). Mioglobīnam gradienta izdalīšanas faktors sorbentam *Poroshell 300 SB-C18* ir gandrīz 7 reizes lielāks nekā sorbentam *Poroshell 300 Extend-C18* iegūtam gradienta izdalīšanas faktoram. Elastāzei ir novērots pretējs efekts - izdalīšanas laiks no sorbenta *Poroshell 300 SB-C18* ir gandrīz 4 reizes mazāks nekā no *Poroshell 300 Extend-C18*.

Zorbax 300 SB-C18 un *Zorbax 300 Extend-C18* olbaltumvielu gradienta izdalīšanas faktoru vērtības arī ir līdzīgas. Olbaltumvielu citohromam C (3) sorbentam *Zorbax 300 SB-C18* gradienta izdalīšanas faktors ir divas reizes lielāks par sorbentam *Zorbax 300 Extend-C18*.

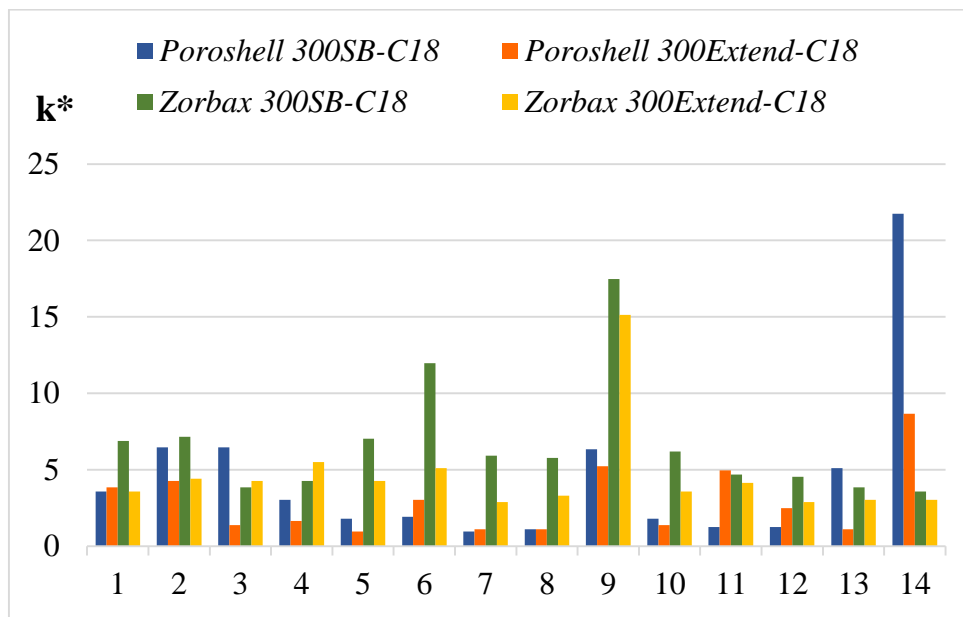
Salīdzinot *Zorbax* sorbentus un *Poroshell* sorbentu olbaltumvielu gradientu izdalīšanas faktoru vērtības, tika konstatēts, ka *Zorbax* sorbentiem tie ir augstāki nekā *Poroshell* sorbentiem. Būtiskā izdalīšanas faktora atšķirība starp *Poroshell* un *Zorbax* sorbentiem ir novērota olbaltumvielai – elastāzei (9). Elastāzes gradienta izdalīšanas faktors *Zorbax 300 SB-C18* un *Zorbax 300 Extend-C18* ir divreiz lielāks par elastāzes gradienta izdalīšanas faktoru *Poroshell 300 Extend-C18* sorbentam un piecas reizes lielāks nekā *Poroshell 300 SB-C18* sorbentam. *Zorbax* kolonnām tiek izmantots porains silikagela mikrosfēras, *Poroshell* kolonnām tiek izmantotas porainas silikagela granulas.



3.5. att. Olbaltumvielu izdalīšanas faktori, noteikti par kustīgo fāzi izmantojot acetnitrilu

Olbaltumvielu izdalīšanas faktori, izmantojot kā organisko šķīdinātāju metanolu ir parādīti 3.6. attēlā. Līdzīgi kā acetnitrilam, olbaltumvielu gradienta izdalīšanas faktori, kas iegūti ar

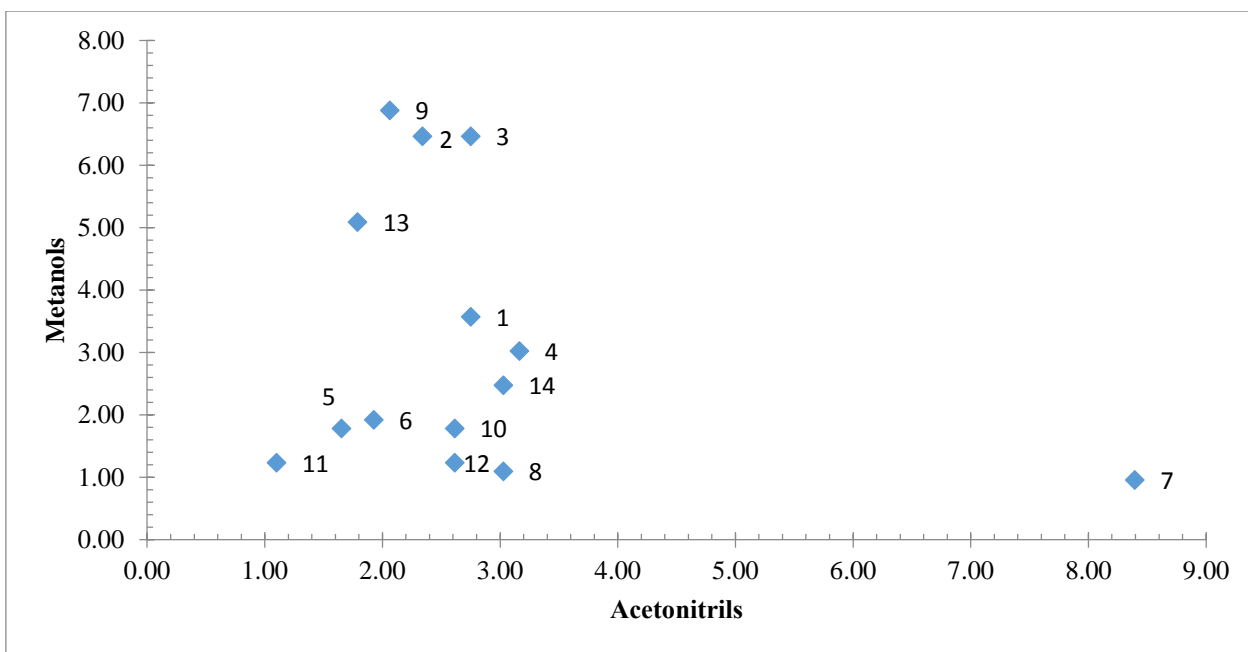
metanolu ir tuvi. Vislielākā atšķirība starp olbaltumvielu gradienta izdalīšanas faktoriem *Poroshell 300 SB-C18* un *Poroshell 300 Extend-C18* sorbentiem ir L-glutamāzes dehidrogenāzei. Faktori atšķiras 2 reizes un sorbentam *Poroshell 300 SB-C18* tas ir lielāks. Peroksidāzei ar *Poroshell 300 Extend-C18* sorbentu iegūtais faktors ir 3 reizes lielāks par ar sorbentu *Poroshell 300 SB-C18* izdalīšanas faktoru. Grafiks pierāda augstāk minēto sakarību, ka sorbentos „iešūtās” sorbenta grupas var būtiski ietekmēt gradienta izdalīšanas faktoru.



3.6. att. Olbaltumvielu izdalīšanas faktori, noteikti par kustīgo fāzi izmantojot metanolu

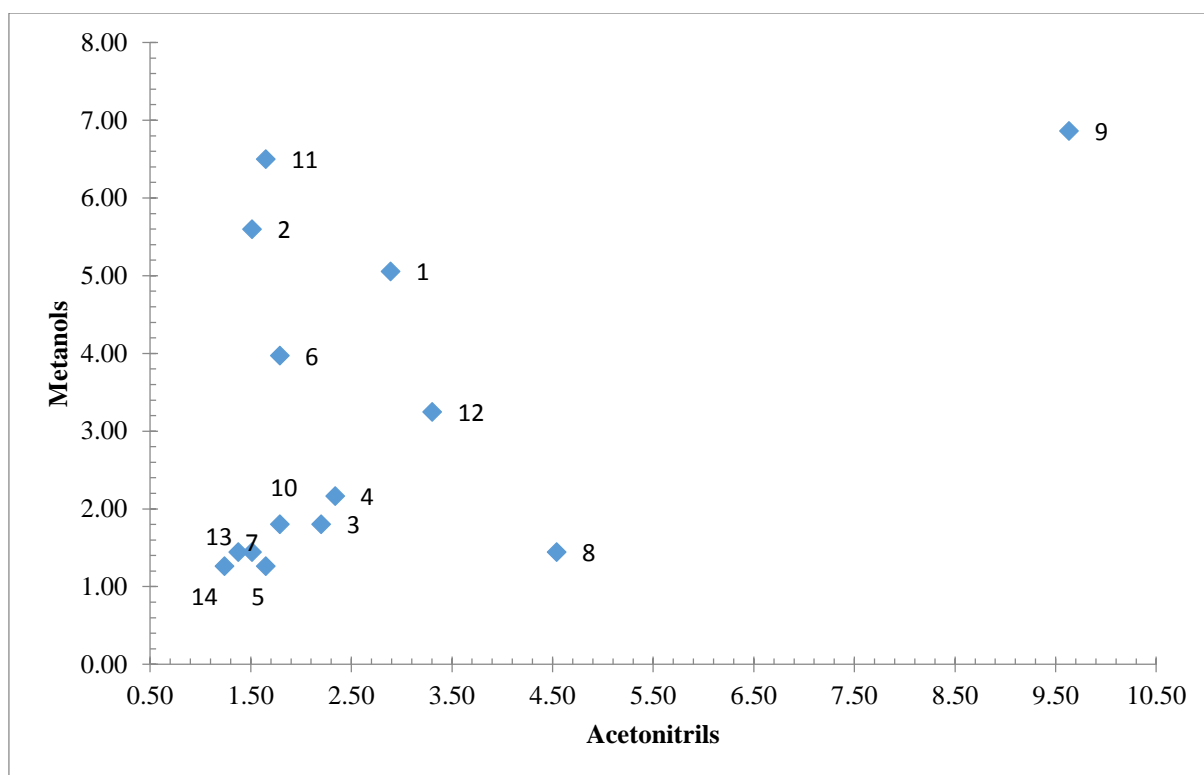
Organiskā šķīdinātāja ietekmes novērtēšanai tika iegūta izdalīšanas faktoru atkarība no organiskā šķīdinātāja (metanola vai acetonitrila), kas parādīta 3.7. attēlā *Poroshell 300 SB-C18* sorbentam. Organiskam šķīdinātājam metanolam piemīt tieksme atdot protonu – skābums un, iespējams tādēļ olbaltumvielu aizture notiek hidrofilo mijiedarbību dēļ, savukārt, acetonitrilam ir liels dipolmoments, tāpēc sorbcija notiek pateicoties dipola-dipola mijiedarbībām.

Apskatot 3.7. attēlu, tika konstatēts, ka *Poroshell 300 SB-C18* gadījumā olbaltumvielai 7 ir izteiktas dipola-dipola mijiedarbības sorbcijas procesā. Olbaltumvielām 2, 3 un 9 lielākā izdalīšanas faktora vērtība ir ar metanolu, kas, iespējams, norāda uz šīs olbaltumvielas dominējošo hidrofobo iedarbību izpausmi *Poroshell 300 SB-C18* sorbenta gadījumā. Lielākai daļai olbaltumvielu vienlīdz stipri gradienta izdalīšanas faktoru ietekme gan metanols, gan acetonitrils.



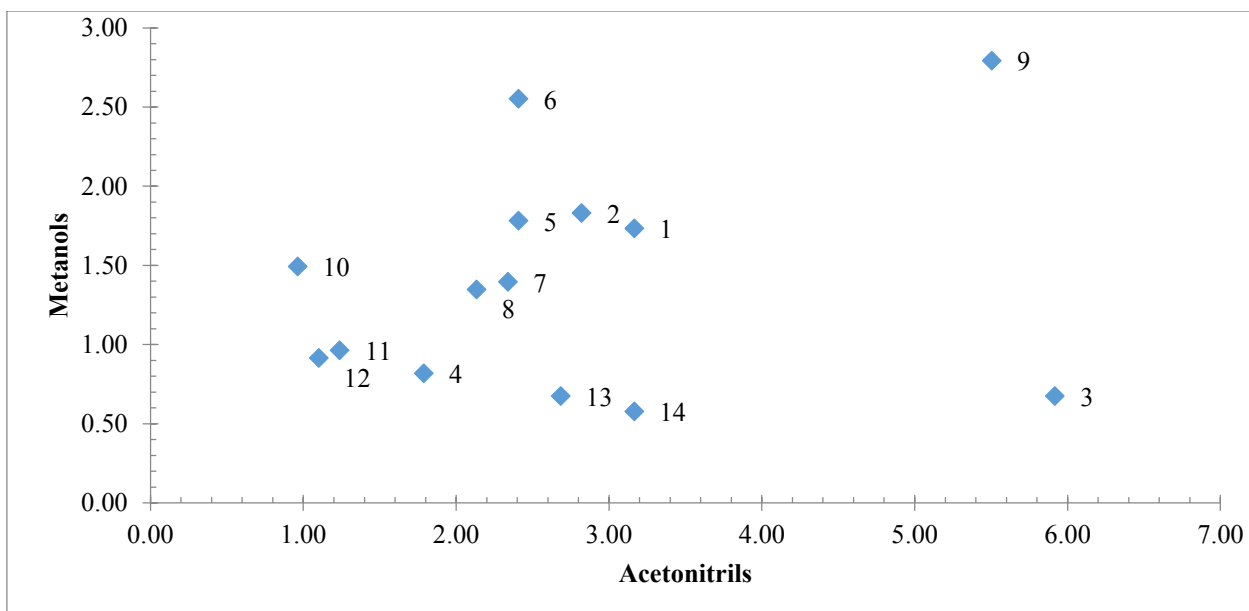
3.7. att. Izdalīšanas faktoru saistība metanolam un acetonitrilam *Poroshell 300 SB-C18* sorbentā

3.8. attēlā ir parādīta gradienta izdalīšanas faktoru korelācija starp metanolu un acetonitrilu *Poroshell 300 Extend-C18* sorbentam. Olbaltumvielai 9 ir novēroti līdzīgi gradientu izdalīšanas faktori gan metanolam, gan acetonitrilam ar *Poroshell 300 Extend-C18*. Izteikti hidrofobs raksturs novērots olbaltumvielām 2 un 11. Līdzīgi kā *Poroshell 300 SB-C18* sorbentam, *Poroshell 300 Extend-C18* sorbenta gadījumā izdalīšanas faktora vērtību vienādi ietekmē gan metanols, gan acetonitrils.



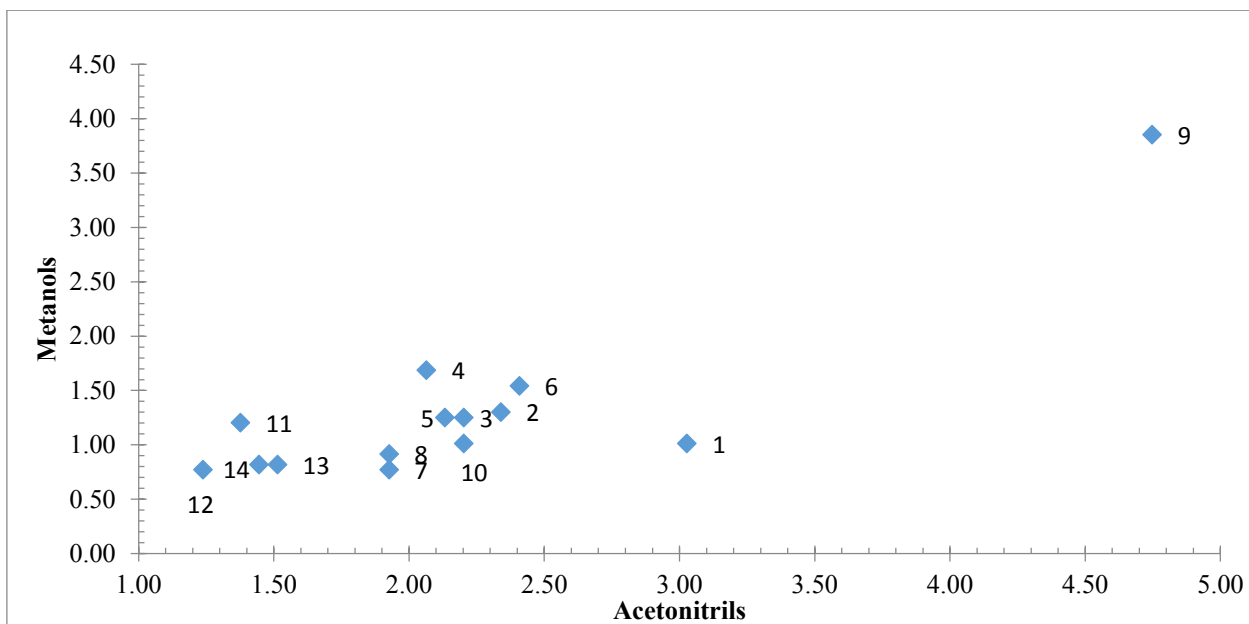
3.8. att. Izdalīšanas faktoru saistība metanolam un acetonitrilam no sorbenta *Poroshell 300 Extend-C18*

Zorbax 300 SB-C18 gadījumā (skat. 3.9. attēlu) olbaltumvielām 3 un 9 novēro izteiktas dipola-dipola mijiedarbības, bet olbaltumvielai 3 - hidrofobās mijiedarbības ir vājas. Savukārt, olbaltumvielai 9 hidrofobā mijiedarbības ir vidēji izteiktas. Lielākai daļai olbaltumvielu piemīt vienlīdz stipras dipola-dipola un hidrofobās mijiedarbības.



3.9. att. Izdalīšanas faktoru saistība metanolam un acetonitrilam no sorbenta *Zorbax 300 SB-C18*

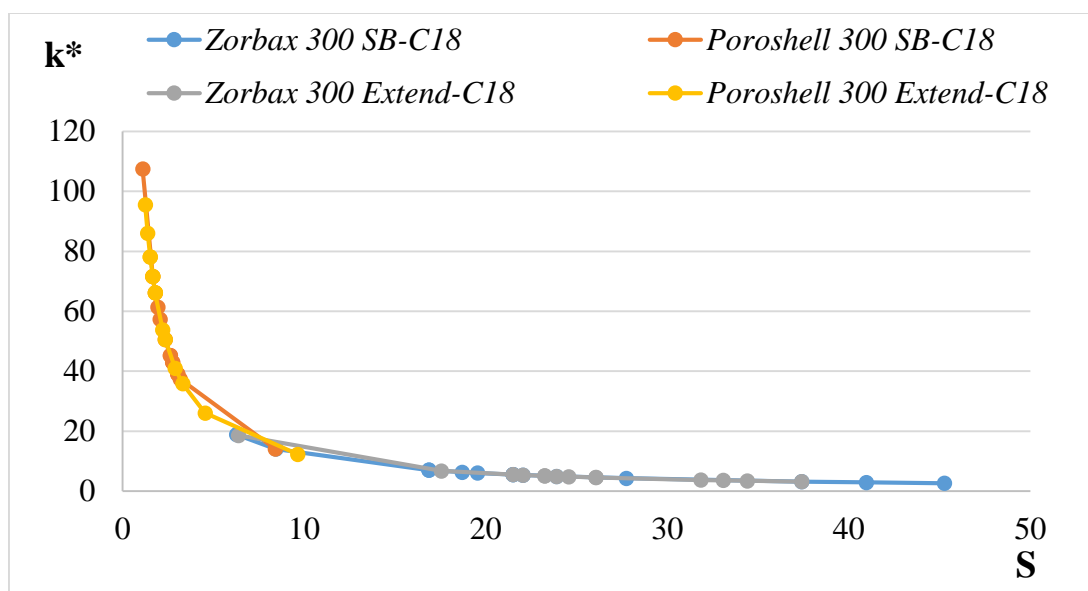
3.10. attēlā ir parādīta izdalīšanas faktoru saistība starp metanolu un acetonitrilu *Zorbax 300 Extend-C18* sorbentam. Izņemot olbaltumvielu 9, pārējām olbaltumvielām dipola-dipola un hidrofobās mijiedarbības ir līdzīgas, bet to vērtības nav lielas. Olbaltumvielai 9 ir izteiktākās gan dipola-dipola, gan hidrofobās mijiedarbības. Abu tipu mijiedarbības līdzīgi ietekmē izdalīšanas faktoru.



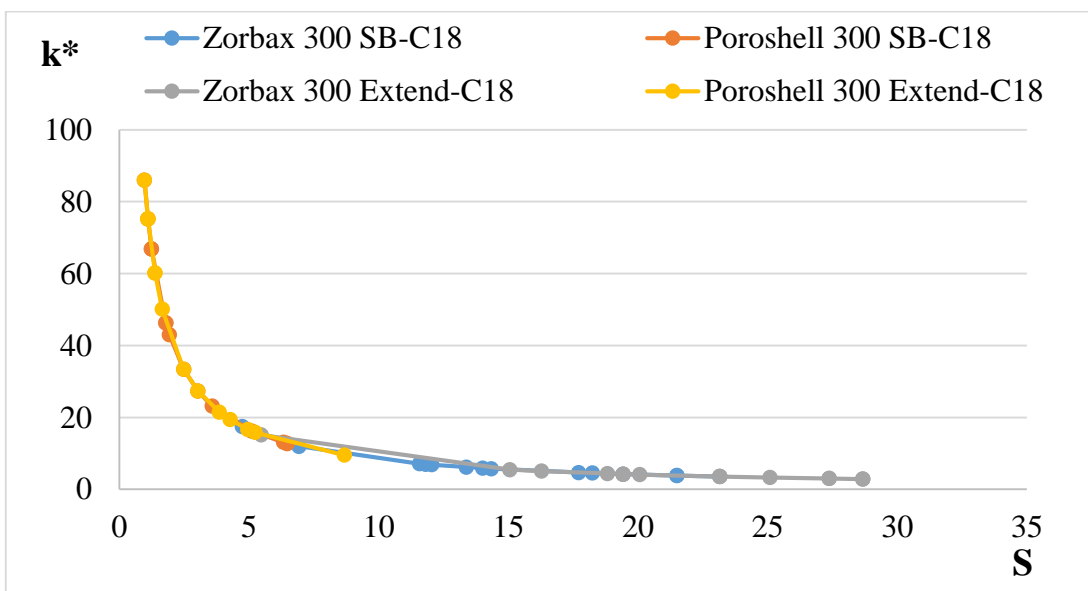
3.10. att. Izdalīšanas faktoru sakarība metanolam un acetonitrilam *Zorbax 300 Extend-C18* sorbentam

Salīdzinot 3.7., 3.8., 3.9. un 3.10. attēlus, var ievērot sakarību, ka izdalīšanas faktoru ietekmē gan izvēlētais organiskais šķīdinātājs, gan sorbenta veids.

Attēlojot grafiski slīpuma un izdalīšanas faktora vērtības *Poroshell* sorbentiem (skat. 3.11. attēlu) un *Zorbax* sorbentiem (skat. 3.12. attēlu) tika konstatēta sakarība, ka palielinoties slīpuma vērtībai, samazinās izdalīšanas faktors. Sakarība ir spēka abiem izmantotiem organiskiem šķīdinātājiem un visiem sorbentiem.



3.11. att. Slīpuma un izdalīšanas faktora sakarība acetoniitrilam



3.12. att. Slīpuma un izdalīšanas faktora sakarība metanolam

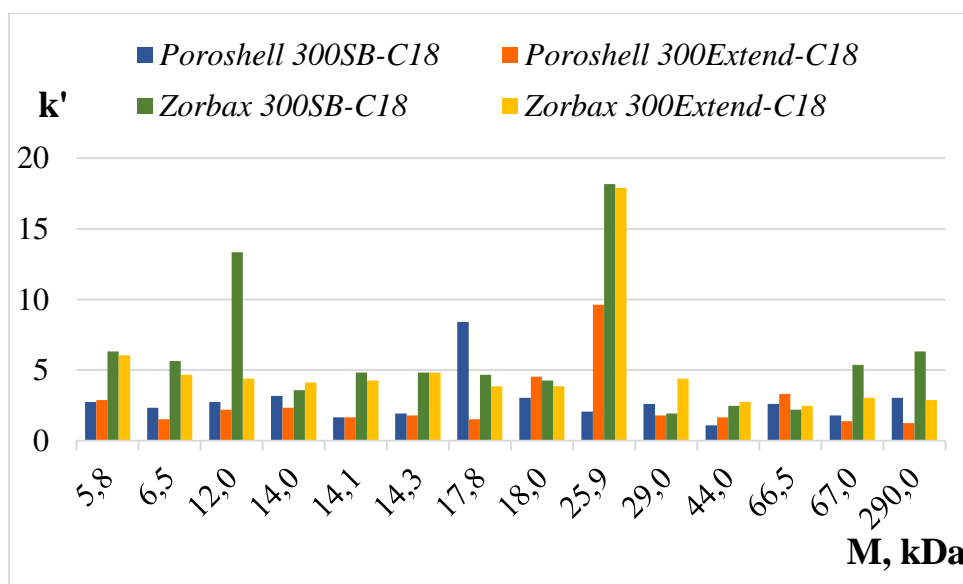
Olbaltumvielu izdalīšanas faktoru atkarība no molekulāras masas *Poroshell 300 SB-C18*, *Poroshell 300 Extend-C18*, *Zorbax 300 SB-C18* un *Zorbax 300 Extend-C18* sorbentiem un organiskam šķīdinātājam acetoniitrilam ir parādītas 3.13. attēlā. Izdalīšanas faktori ir līdzīgi visiem pētītajiem sorbentiem. Izņēmums ir olbaltumvielām ar molekulāro masu 12,0 kDa, 17,8 kDa, 25,9 kDa, 67,0 kDa un 290,0 kDa. Šīm olbaltumvielām izdalīšanas faktori ir līdzīgi tikai viena no sorbenta tipa gadījumā.

Poroshell 300 SB-C18 sorbenta vismazākais izdalīšanas faktors ir olbaltumvielai ar molekulāro masu 44,0 kDa un tas ir 1,10. Vislielākais izdalīšanas faktors ir olbaltumvielai ar molekulāro masu 17,8 kDa un tā vērtība ir 8,40.

Sorbentam *Poroshell 300 Extend-C18* vismazākais izdalīšanas faktors ir olbaltumvielai ar vislielāko molekulāro masu (290,0 kDa) – 1,24. Vislielākā vērtība ir 9,63 un tā ir olbaltumvielai ar molekulāro masu 25,9 kDa.

Zorbax 300 SB-C18 sorbentam lielākai daļai olbaltumvielu izdalīšanas faktoru vērtība ir līdzīga. Vislielākais izdalīšanas faktors ir novērots olbaltumvielai ar molekulāro masu 25,9 kDa un tā vērtība ir 18,85, vismazākā izdalīšanas faktora olbaltumvielai ar molekulāro masi 29,0 kDa – 2,62.

Zorbax 300 Extend-C18 sorbentam un organiskam šķīdinātājam acetonitrilam vislielākais izdalīšanas faktors ir novērots olbaltumvielai ar molekulāro masu 25,9 kDa. Tā vērtība ir 18,56. Vismazākā izdalīšanas faktora vērtība ir acetonitrilam kā organiskam šķīdinātājam – olbaltumvielai ar molekulāro masu 66,5 kDa.



3.13. att. Olbaltumvielu izdalīšanas faktoru atkarība no molekulārās masas. Kustīgā fāze – acetonitrils

Olbaltumvielu izdalīšanas faktoru atkarība no molekulārās masas *Poroshell 300 SB-C18*, *Poroshell 300 Extend-C18*, *Zorbax 300 SB-C18* un *Zorbax 300 Extend-C18* sorbentiem un organiskam šķīdinātājam metanolam ir parādītas 3.14. attēlā. Izdalīšanas faktoru vērtības vienas

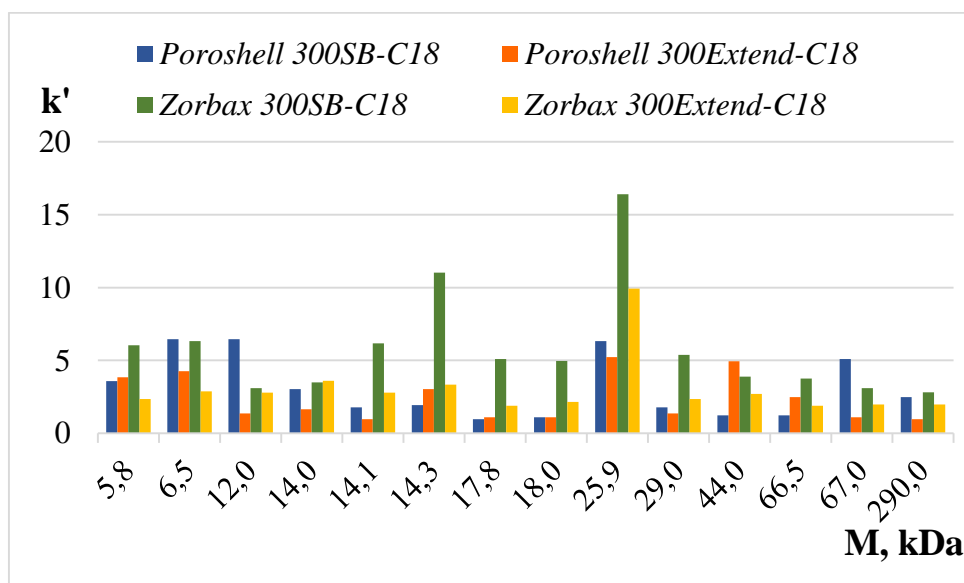
molekulārās masas un dažādu sorbentu gadījumā diezgan krasi atšķiras gandrīz visām olbaltumvielām.

Poroshell 300 SB-C18 sorbentam vismazākais un vislielākais izdalīšanas faktors ir molekulārajām masām 17,8 kDa un 290,0 kDa un tie attiecīgi ir 0,96 un 21,74. Sorbentam

Poroshell 300 Extend-C18 pie kustīgas fāzes metanols vismazākā vērtība ir 0,96 – olbaltumvielai ar molekulāro masu 18,0 kDa un vislielākā 8,67 – olbaltumvielai ar molekulāro masu 290,0 kDa.

Zorbax 300 SB-C18 sorbentam vislielākais izdalīšanas faktors ir novērots olbaltumvielai ar molekulāro masu 25,9 kDa un tā vērtība ir 17,48. Vismazākā izdalīšanas faktora vērtība metanolam 3,58 molekulārai masai 290,0 kDa.

Zorbax 300 Extend-C18 sorbentam vislielākais izdalīšanas faktors ir novērots olbaltumvielai ar molekulāro masu 25,9 kDa, ir 15,14. Vismazākā izdalīšanas faktora vērtība ir metanolam – 2,89 olbaltumvielām ar molekulāro masu 17,8 kDa un 66,5 kDa.



3.14. att. Olbaltumvielu izdalīšanas faktoru atkarība no molekulārās masas: kustīgā fāze – metanols

Apkopojot rezultātus, ievērots, ka kopumā olbaltumvielu izdalīšanas faktors nepalielinās, palielinoties olbaltumvielu molekulārajai masai. Tas nozīmē, ka izdalīšanas faktors nav tikai atkarīgs no molekulārās masas, bet arī no hidrofilajām mijiedarbībām starp olbaltumvielu molekulas ķēdēm un sorbenta silanolgrupām.

SECINĀJUMI

1. *Zorbax* sorbentiem piemīt lielāka hidrofobitāte nekā *Poroshell* sorbentiem.
2. Silanolaktivitāte *Poroshell 300 SB-C18*, *Poroshell 300 Extend-C18* un *Zorbax 300 SB-C18* sorbentiem ir līdzīga, bet *Zorbax 300 Extend-C18* sorbenta tā vērtība ir mazāka.
3. Gradients slīpums un izdalīšanas faktors (k^*) ir atkarīgs gan no sorbenta, gan no izvēlēta organiskā šķīdinātāja.
4. Palielinoties gradienta slīpuma vērtībai, samazinās arī izdalīšanas faktora (k^*) vērtība.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Goba, R.; Kobayashi, N. Evaluation of peptide adsorption-controlled liquid chromatography–tandem mass spectrometric (PAC-LC–MS/MS) method for simple and simultaneous quantitation of amyloid β 1–38, 1–40, 1–42 and 1–43 peptides in dog cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr. B.* **2012**, 137-145.
2. Staub, A.; Guillarme, D.; Schappler, J.; Veuthey, J.-L.; Rudaz, S. Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 55, 810-822.
3. McCalley, D.V. Comparison of an organic polymeric column and a silica-based reversed-phase for the analysis of basic peptides by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 1073, 137-145.
4. Biology Online Home Page. <http://www.biology-online.org/dictionary/Protein> (skatīts 13.02.2014)
5. Scitable Home Page. <http://www.nature.com/scitable/definition/peptide-317> (skatīts 16.02.2014)
6. Issaq, H.J.; Chan, K.C.; Blonder, J.; Ye, X.; Veenstra, T.D. Separation, detection and quantitation of peptides by liquid chromatography and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A.* **2009**, 1216, 1825-1837.
7. Memorial University Home Page. https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_06-04.html (skatīts 15.02.2014)
8. Jandera, P.; Kučerova, Z.; Urban, J. Retention times and bandwidths in reversed-phase gradient liquid chromatography of peptides and proteins. *J. Chromatogr. A.* **2011**, 1218, 8874-8889.
9. Staub, A.; Zurlino, D.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L.; Guillarme, D. Analysis of peptides and proteins using sub-2 μm fully porous and sub 3- μm shell particles. *J. Chromatogr. A.* **2011**, 1218, 8903-8914.
10. *Methods in Molecular biology, vol. 251. HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols*; Agullar, M.-I., Ed.; Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2003, pp. 9-11.
11. Janson, J.-C. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications (3rd Edition)*; Wiley, Hoboken, NJ, USA, 2011, pp. 26-33.
12. Upadhyay, A.; Upadhyay, K.; Nath, N. *Biophysical Chemistry: Principles and Techniques*; Global Media, Mumbai, IND, 2009, pp. 349.

13. Waters Home Page. http://www.waters.com/waters/en_US/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=en_US (skatīts 20.02.2014)
14. Budhiraja, R.P. *Separation Chemistry*; New Age International Location, Daryaganj, Delhi, IND, 2004, pp. 164-165.
15. Gupta, A. *Instrumentation and Bio-Analytical Techniques*; Global Media, Meerut, IND, 2009, pp. 199
16. MedicinesComplete Home Page.
<http://www.medicinescomplete.com/mc/rem/2012/images/c19-fig-19-6.png> (skatīts 12.02.2014)
17. Chatwal, G.R. *Analytical Chromatography*; Global Media, Mumbai, IND, 2006, pp. 6.
18. Snyder, L.R.; Kirkland J.J.; Dolan J.W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography (3rd edition)*; A John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2010, pp. 404-432.
19. Gilar, M.; Jaworski, A.; McDonald, T.S. Solvent selectivity and strength in reversed-phase liquid chromatography separation of peptides. *J. Chromatogr. A*. **2014**, *1337*, 140-146.
20. Everley, R.A.; Croley, T.R. Ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry of intact proteins. *J. Chromatogr. A*. **2008**, *1192*, 239-247.
21. Kuban, P.; Hauser, P.C. Application of gradient programs for the determination of underivatized amino acids and small peptides in reversed-phase high-performance liquid chromatography with contactless conductivity detection. *J. Chromatogr. A*. **2006**, *1128*, 97-104.
22. Yang, X.; Ma, L.; Carr, P.W. High temperature fast chromatography of proteins using a silica-based stationary phase with greatly enhanced low pH stability. *J. Chromatogr. A*. **2005**, *1079*, 213-220.
23. Buszewski, B.; Kowalska, S.; Kowalkowski, T.; Rozpedowska, K.; Michel, M.; Jonsson, T. HPLC columns partition by chemometric methods based on peptides retention. *J. Chromatogr. A*. **2007**, *845*, 253-260.
24. Eghbali, H.; Sandra, K.; Detobel, F.; Lynen, F.; Nakanishi, K.; Sandra, P.; Desmet, G. Performance evaluation of long monolithic silica capillary columns in gradient liquid chromatography using peptide mixtures. *J. Chromatogr. A*. **2011**, *1218*, 3360-3366.
25. Detobel, F.; Broeckhoven, K.; Wellwans, J.; Wouters, B.; Swart, R.; Ursem, M.; Desmet, G.; Eeltink, S. Parameters affecting the separation of intact proteins in gradient-elution

- reversed-phase chromatography using poly(styrene-co-divinylbenzene) monolithic capillary columns. *J. Chromatogr. A.* **2010**, *1217*, 3085-3090.
26. Dolman, S.; Eeltink, S.; Vaast, A.; Pelzing, M. Investigation of carryover of peptides in nano-liquid chromatography/mass spectrometry using packed and monolithic capillary columns. *J. Chromatogr. B.* **2013**, *912*, 56-63.
 27. Machtejevas, E.; Andrecht, S.; Lubda, D.; Unger, K.K. Monolithic silica columns of various format in automated sample clean-up/multidimensional liquid chromatography/mass spectrometry of peptidomics. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1144*, 97-101.
 28. Marchetti, N.; Guiochon, G. High pike capacity separations of peptides in reversed-phase gradient elution liquid chromatography on columns packed with porous shell particles. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1176*, 206-216.
 29. Liu, H.; Finch, J.W.; Lavalley, M.J.; Collamati, R.A.; Benevides, C.C.; Gebler, J.C. Effects of column length, particle size, gradient length and flow rate on peak capacity of nano-scale liquid chromatography for peptide separations. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1147*, 30-36.
 30. Guillarme, D.; Heinisch, S.; Rocca, J.L. Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1052*, 39-51.
 31. Nguyen, D. T.-T.; Guillarme, D.; Heinisch, S.; Barrioulet, M.-P.; Rocca, J.-L.; Rudaz, S.; Veutney, J.-L. High throughput liquid chromatography with sub-2 μ m particles at high pressure and high temperature. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1167*, 76-84.
 32. Schuster, S.A.; Wagner, B.M.; Boyes, B.E., Kirkland, J.J. Wider Pore Superficially Porous Particles for Peptide Separations by HPLC. *J. Chromatogr. Sci.*, **2010**, *48*, 566-571.
 33. Chen, X.; Tolley, H.D.; Lee, M.L. Polymeric cation-exchange monolithic columns containing phosphoric acid functional groups for capillary liquid chromatography of peptides and proteins. *J. Chromatogr. A.* **2010**, *1217*, 3844-3854.
 34. Chen, X.; Tolley, H.D.; Lee, M.L. Monolithic capillary columns synthesized from a single phosphate-containing dimethacrylate monomer for cation-exchange chromatography of peptides and proteins. *J. Chromatogr. A.* **2011**, *1218*, 4322-4331.
 35. Agilent Technologies Home Page. <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/LC-LC-MS-Columns/BioHPLC/ZORBAX-300StableBond/Pages/default.aspx> (skafīts 19.12.2013).
 36. Agilent Zorbax 300SB-C18.

- <http://www.chem.agilent.com/Library/datasheets/Public/820646-002f.pdf> (skatīts 19.12.2013).
37. Agilent Technologies Home Page. <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/LC-LC-MS-Columns/BioHPLC/ZORBAX-300Extend-C18/Pages/default.aspx> (skatīts 19.12.2013).
38. Agilent Poroshell 300SB-C18
<https://www.chem.agilent.com/Library/datasheets/Public/820624-002%20Poroshell%20300SB-C18.pdf> (skatīts 23.02.2014)
39. Agilent Technologies Home Page. <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/LC-LC-MS-Columns/BioHPLC/Poroshell-300/Pages/default.aspx> (skatīts 23.02.2014)
40. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Glaich, J.L. *Practical HPLC Method Development, second edition*; John Wiley & Sons, INC., 1997, pp. 366.
41. Claessens, H.A. *Characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography: column testing, classification and chemical stability*; Technische Universiteit Eindhoven, 1999, 107-140.
42. EDQM Home Page.
http://www.edqm.eu/medias/fichiers/qualification_of_analytical_columns_paphomcl_12_128_5r.pdf (skatīts 28.02.2014)

Kursa darbs „Olbaltumvielu un peptīdu sorbcijas īpašību izpēte AEŠH apstākļos uz dažādām C18 kolonnas” izstrādāts LU Ķīmijas fakultātē.

(darba nosaukums)

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: _____
(personiskais paraksts) *(paraksta atšifrējums)*

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai
Vadītājs, asoc. profesors Dr. chem. Pēteris Mekšs: _____
(personiskais paraksts) *(datums)*

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai
Vadītāja, Oksana Rotkāja: _____
(personiskais paraksts) *(datums)*

Recenzents asoc. profesors, Dr.chem. Vadims Bartkevičs: _____
(personiskais paraksts) *(datums)*

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: _____ *(datums)*
Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: _____ Vija Gutāne
(personiskais paraksts)

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē:
_____ protokols Nr. _____ *(ieraksta sekretārs)*
(datums) *(protokola Nr.)*

Komisijas sekretāre, lektore: _____
(personiskais paraksts) *(paraksta atšifrējums)*