

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

OKSANA ROTKĀJA

**PROTEĪNU HROMATOGRĀFISKĀS IZTURĒŠANĀS
IZPĒTE APGRIEZTĀS FĀZES AUGSTI EFEKTĪVĀS
ŠĶIDRUMU HROMATOGRĀFIJAS APSTĀKĻOS**

PROMOCIJAS DARBS

Darba vadītājs: Dr. Ķīm.,
asoc. prof. Pēteris Mekšs

RĪGA, 2018

KOPSAVILKUMS

Proteīnu hromatogrāfiskās izturēšanās izpēte apgrieztās fāzes augsti efektīvās šķidrumu hromatogrāfijas apstākļos. Rotkāja O., zinātniskais vadītājs asoc. prof., Dr. chem., Mekšs P. Promocijas darbs, 102 lappuses, 51 attēli, 15 tabulas, 110 literatūras avoti. Latviešu valodā.

Eksperimentālajā daļā sistemātiski izpētīta proteīnu (insulīna, aprotinīna, citohroma C, ribonukleāzes, α -laktalbumīna, lizocīma, mioglobīna, β -laktoglobulīna, elastāzes, ogļskābes anhidrāzes, peroksidāzes, albumīna, enolāzes, L-glutamīnskābes dehidrogenāzes) sorbcija atšķirīgas hidrofobitātes un silanolaktivitātes apgrieztās fāzes kolonnās, kuras tikai nesē ir kļukušas komerciāli pieejamas (-C18, -C8, -C4, -C3, -(CH₂)CN, -Diphenyl, PLRP-S un Protein-RP) ar trīs organiskajiem šķīdinātājiem (acetonitrils, metanols un 2-propanols). Izpētīts, kā proteīnu izdalīšanās laiku ietekmē temperatūra, gradienta stāvums, sorbenta un šķīdinātāja daba. Piena proteīnu noteikšanai izstrādāta metode apgrieztās fāzes augsti efektīvās šķidrumu hromatogrāfijas apstākļos.

AUGSTI EFEKTĪVĀ ŠĶIDRUMU HROMATOGRĀFIJA, APGRIEZTĀ FĀZE, PROTEĪNU, SORBCIJA, PIENA PROTEĪNI.

ABSTRACT

Study of Chromatographic Behaviour of Proteins in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Conditions. Rotkāja O., scientific supervisor asoc. prof., Dr. chem., Mekšs P. Doctoral Thesis, 102 pages, 51 pictures, 15 tables, 110 sources of literature. In Latvian.

The experimental part contains a systematic study of protein (insulin, aprotinin, cytochrom C, ribonuclease, α -lactalbumin, lysozyme, mioglobulin, β -lactglobulin, elastase, carbonic anhydrase, peroxidase, albumin, enolase, L-glutamic dehydrogenase) sorption in reversed-phase columns of different hydrophobicity and silanol activity, which have only recently become commercially available (-C18, -C8, -C4, -C3, -(CH₂)CN, -Diphenyl, PLRP-S and Protein-RP) with three organic solvents (acetonitrile, methanol and 2-propanol). It has been examined how protein retention time is affected by temperature, gradient steepness and the nature of the sorbent and the solvent. A method in reversed-phase high-performance liquid chromatography conditions has been developed to determine milk proteins.

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, REVERSED-PHASE, PROTEIN, SORPTION, MILK PROTEIN.

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	5
IEVADS	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	10
1.1. Hromatogrāfijas metodes proteīnu analīzēm	10
1.2. Proteīnu noteikšana apgrieztās fāzes AEŠH apstākļos	14
1.3. Apgrieztās fāzes AEŠH kolonnu raksturošana un salīdzināšana	24
1.4. Piena proteīnu noteikšana ar AEŠH metodi	32
1.5. Secinājumi	34
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	35
2.1. Izmantotā aparatūra, reaģenti un analizējamās vielas	35
2.2. Kustīgo fāžu un analizējamo paraugu pagatavošana	36
2.3. Hromatogrāfiskās analīzes apstākļi	40
2.4. Aprēķinu formulas	43
3.1. Hromatogrāfisko apstākļu un analītu izvēle	45
3.2. Proteīnu stabilitāte, linearitāte un atkārtojamība	55
3.3. Kolonnas sorbenta ietekme uz proteīnu izdalīšanās laiku un joslu platumu pusaugstumā	59
3.4. Kustīgās fāzes ietekme uz proteīnu sorbciju	66
3.5. Proteīnu maisījumu atdalīšana apgrieztās fāzes AEŠH apstākļos	69
3.6. Piena proteīnu noteikšana apgrieztās fāzes AEŠH apstākļos	71
3.7. Proteīnu izdalīšanās laiku paredzēšana	75
1. Pielikums	99
2. Pielikums	100
3. Pielikums	101
Dokumentārā lapa	102

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

AEŠH – augsti efektīvā šķīdumu hromatogrāfija

β -Lg A, β -Lg B un β -Lg C - β -Laktoglobulīna ģenētiskie varianti

F – plūsmas ātrums, ml/min

k – sorbcijas koeficients

KF – kustīgā fāze

LSER modelis – lineārās solvatācijas enerģijas mijiedarbības modelis (Linear Solvation Energy Relationship)

LSST – Lineārā šķīdinātāja stipruma teorija (Linear solvent strength theory)

MeCN – acetonitrils

MeOH – metanols

QSRR modelis - Kvantitatīvas struktūras-sorbcijas mijiedarbība (Quantitative structure-retention relationship model)

S - slīpums

TFA – trifluoretiķskābe

t_R – izdalīšanās laiks, min

t_0 – nesorbējošās vielas izdalīšanās laiks, min

UAEŠH - ultra-augsti efektīvā šķīdumu hromatogrāfija

$w_{0,5}$ – joslas platums pusaugstumā, min.

IEVADS

Proteīni ir biopolimēri, kuri ir sastopami jebkurā dzīvā organismā, piemēram, muskuļos, membrānas utt. Hormoni, fermenti, antivielas, toksīni un daudzi citi bioloģiski aktīvi savienojumi sastāv no proteīniem. Mūsdienās arvien biežāk tiek izstrādāti medikamenti uz proteīnu bāzes. Pēdējo desmitgadu laikā pastāvīgi attīstās proteīnu, peptīdu un citu biopolimēru analīzes metodes. Proteīnu un peptīdu analīzēm ir divas dominējošās atdalīšanas metodes: elektroforēze un šķīdumu hromatogrāfija [1].

Proteīnu analīzēm var lietot dažādus šķīdumu hromatogrāfijas režīmus apgrieztās fāzes augsti efektīvo šķīdumu hromatogrāfiju (AF AEŠH), jonu apmaiņas hromatogrāfiju, afīno hromatogrāfiju, gēlfiltrācijas un hidrofobo mijiedarbību hromatogrāfiju. Hromatogrāfiskā režīma izvēle ir atkarīga no parauga matricas sarežģītības [2]. Ir jāņem vērā proteīnu stabilitāte, iespējamā denaturācija, kas ir atkarīga no pH, sāls tipa un tā koncentrācijas, kā arī organiskā šķīdinātāja daudzuma kustīgajā fāzē [1].

Metožu izstrāde un optimizācija proteīniem ir visai laikietilpīga un dārga, tāpēc ir svarīgi izpētīt proteīnu hromatogrāfisko izturēšanos uz dažādām mūsdienās plaši izmantotām apgrieztās fāzes kolonnām, lietojot dažādas kustīgās fāzes organiskās piedevas. Izmantojot lineāro sorbcijas modeli, kurš balstās uz diviem eksperimentāliem mērījumiem, var prognozēt izdalīšanās laikus proteīniem.

Literatūras avotos ir atrodama informācija par nesen ražotā pieejamām apgrieztās fāzes AEŠH kolonnām, ir atrodami ieteikumi par kustīgās fāzes izvēli. Ir pieejamas hromatogrammas dažiem proteīniem (piemēram, citohromam C, albumīnam, β -laktoglobulīnam un α -laktalbumīnam) uz vienas kolonnas ar vienu kustīgās fāzes sastāvu.

No dažiem eksperimentiem ir grūti novērtēt proteīnu izturēšanos uz dažāda tipa apgrieztās fāzes AEŠH sorbentiem. Literatūras avotos ir ieteikts lietot acetonitrilu kā kustīgās fāzes šķīdinātāju, bet apgrieztās fāzes AEŠH apstākļos var izmantot dažādus organiskos šķīdinātājus, piemēram, metanolu, 2-propanolu, tetrahidrofurānu u.c. Lai izstrādātu programmu, kas spēj optimizēt hromatogrāfiskos apstākļus proteīnu maisījumu atdalīšanai, bija nepieciešams iegūt eksperimentālos datus uz dažādām kolonnām (-C18, -C8, -C4, -C3, -(CH₂)CN, -Diphenyl, PLRP-S un Protein-RP), izmantojot arī dažādus organiskos šķīdinātājus, lai varētu novērtēt proteīnu sorbciju apgrieztās fāzes apstākļos.

Darba aktualitāte:

Apgrieztās fāzes AEŠH apstākļos proteīnu atdalīšana ir problemātiskāka nekā mazmolekulāru savienojumu gadījumā, jo proteīnu joslas mēdz būt ne tikai platas un asimetriskas. Problēmas mēdz rasties arī zemas molekulu difūzijas, kā arī vairāku izomēru klātbūtnes dēļ, kas gala rezultātā samazina izšķiršanu. Viens no veidiem, kā uzlabot proteīnu atbilstošo joslu formu un palielināt izšķiršanu, ir izmantot kolonnas ar mazāku daļiņu diametru ($< 2 \mu\text{m}$). Pēdējā laikā proteīnu analīzēm ražotāji piedāvā kolonnas ar dažādiem daļiņu izmēriem ($1,7\text{-}10 \mu\text{m}$) tādēļ ir nepieciešamība noskaidrot atdalīšanas iespējas ar sorbentiem, kas ir izstrādāti pēdējā piecgadē un kļuvuši komerciāli pieejami analīžu veikšanai apgrieztās fāzes AEŠH apstākļos.

Proteīnu sorbcijas parametru prognozēšanas metožu izstrāde mūsdienās ir aktuāls bioanalītiskās ķīmijas uzdevums arī tādēļ, ka tā ļauj paredzēt izdalīšanās laikus uz dažādām nekustīgajām fāzēm, lai ar minimālu eksperimentālu darbu varētu izstrādāt jaunas šo vielu analīzes metodes.

Darba mērķis:

Noskaidrot, kā dažādu proteīnu ar iespējami plašu īpašību diapazonu (dažādu molmasu, ogļhidrātu saturs un citas īpašības, kas raksturo aprotinīnu, insulīnu, citohromu C, ribonukleāzi, α -laktalbumīnu, lizocīmu, mioglobīnu, β -laktoglobulīnu, elastāzi, ogļskābes anhidrāzi, peroksidāzi, albumīnu, enolāzi, L-glutamīnskābes dehidrogenāzi) sorbciju ietekmē kustīgās fāzes organiskais šķīdinātājs un sorbenta daba, kā arī novērtēt, lineārā sorbcijas modeļa lietošanas iespējas proteīnu izdalīšanās parametru prognozēšanai un analīzes metodes optimizācijai.

Darba uzdevumi:

- Izmantojot *Galusko* testu, salīdzināt izmantotās kolonnas pēc to hidrofobitātes un silanolaktivitātes;
- Atrast optimālus proteīnu izšķiršanas gradienta apstākļus, izmantojot dažādus organiskus šķīdinātājus - acetonitrilu, metanolu un 2-propanolu;
- Novērtēt sorbenta daļiņu izmēra ietekmi uz proteīnu veidoto joslu platumu.
- Novērtēt sorbenta poru izmēra ietekmi uz proteīnu sorbciju.
- Noteikt proteīnu (α -laktalbumīna un β -laktoglobulīna) daudzumu dažādos piena paraugos.

Darba novitāte:

Sistemātiski izpētīta 15 dažādu proteīnu sorbcija atšķirīgas hidrofobitātes un silanolaktivitātes apgrieztās fāzes kolonnās, piemērotas proteīnu analīzēm, kuras tikai nesen ir kļuvušas komerciāli pieejamas (*Poroshell, PLRP-S, YMC un Zorbax (piemēram, 300-Diphenyl, 300-C3)*). Stacionāro fāžu raksturošanai izmantotie hidrofobitātes un silanolaktivitātes kritēriji ir būtiski proteīnu izšķiršanai kustīgās fāzes gradienta apstākļos. Darba ietvaros pārbaudīta organiskā šķīdinātāja dabas ietekme uz proteīnu sorbciju. Parādīts, ka lineāro sorbcijas modeli var veiksmīgi izmantot proteīnu izdalīšanās laiku prognozēšanai, lietojot vien divus sorbcijas parametru mērījumus.

Praktiskā nozīme:

Pētījuma dati tika izmantoti ChromSword programmnodrošinājuma algoritma uzlabošanai. Jaunā programmnodrošinājumā versija tiek plaši izmantota daudzos uzņēmumos, tai skaitā “CSL” Austrālijā, “Buyer” ASV, “Novartis” Šveicē, “Taiho Pharmaceuticals” Japānā utt.

Darba rezultāti apkopoti 6 publikācijās:

1. Rotkaja O., Goluško J., Mekšs P. The behaviours of proteins on reversed-phase high-performance liquid chromatography and prediction of protein retention time on YMC columns. *Latvian Journal of Chemistry*. **2014**, 1, 71-76.
2. Rotkaja O., Goluško J., Mekšs P. Behaviour of proteins on reversed-phase supports during high-performance liquid chromatography on C18 stationary phase. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*. **2015**, 64(1), 36-42.
3. Rotkaja O., Goluško J., Mekšs P. Behaviour of proteins on reversed-phase supports during high-performance liquid chromatography and prediction of protein retention times on different Zorbax stationary phases. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*. **2015**, 64(2), 179-183.
4. Rotkaja O., Goluško J., Mekšs P. RP-HPLC of peptides and proteins. LAP Lambert Academic Publishing. **2015**, 1-55.
5. Rotkaja O., Goluško J., Mekšs P. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Analysis of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin in Different Types of Milk. RTU zinātniskie raksti: *Materiālzinātne un lietišķā ķīmija*. **2016**, 33, 36-39.
6. Goluško S., Šiskina I., Urtāns E., Rotkāja O. Software-Assisted Method Development in High Performance Liquid Chromatography. World Scientific. 2018. Tiks publicēta. Ir pieņemta.

Konferences:

1. Rotkaja O., Goluško J., Goluško S. Zalcburga, Austrija, International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides, 2016, 6-9 novembris, stenda referāts.
2. Rotkaja O., Goluško J., Mekšs P. Rīga, Latvija, Riga Technical University 57th International Scientific Conference "Materials Science and Applied Chemistry", 2016, 21 oktobris, stenda referāts.
3. Rotkaja O., Goluško J., Mekšs P. Amsterdamā, Nīderlande. 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2013, 16-20 jūnijs, stenda referāts.
4. Rotkaja O., Goluško J., Mekšs P. Daugavpils, Latvija, Modern aspects and applications of chromatography in education, research and industry, 2013, 16-18 oktobris, stenda referāts.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Hromatogrāfijas metodes proteīnu analīzēm

Literatūras avotos ir atrodama informācija par dažādām metodēm proteīnu noteikšanai: jonu apmaiņas hromatogrāfija, gēlfiltrācijas hromatogrāfija, elektroforēze, afīnā hromatogrāfija, hidrofobo mijiedarbību hromatogrāfija un apgrieztās fāzes augsti efektīvā šķidrumu hromatogrāfija.

Jonu apmaiņas hromatogrāfija. Jonu apmaiņas hromatogrāfijā biomolekulu (proteīni, polipeptīdi, nukleīnskābes, polisaharīdi u.c.) atdalīšana notiek, pateicoties dažādajiem to lādiņiem [3].

Sorbenta izvēle. Jonu apmaiņas kolonnas ir pieejamas ar dažādiem poru un daļiņu izmēriem. Mazākām biomolekulām būs piemērotas kolonnas ar poru izmēru ~125 Å, bet lielākām biomolekulām nepieciešams lielāks poru izmērs. Lai iegūtu augstāku joslu izšķiršanu, piemērotākas var būt arī kolonnas ar mazāku daļiņu izmēru (<10 μm) [4-8].

Kustīgās fāzes izvēle. Lai notiktu jonu apmaiņas process hromatogrāfijas apstākļos, molekulai jābūt jona formā, tāpēc ir svarīgi piemeklēt atbilstošu buferšķīduma pH vērtību. Lai to izdarītu, jāveic eksperimentu sērija ar dažādām buferšķīduma pH vērtībām. Ja nav zināms proteīnu izoelektriskais punkts, ieteicams būtu vispirms izvēlēties buferšķīdumu 8,0-8,5 pH diapazonā, jo lielākai daļai proteīnu izoelektriskais punkts ir zemāks par 7,0-7,5 (skat. 1.1. tab.).

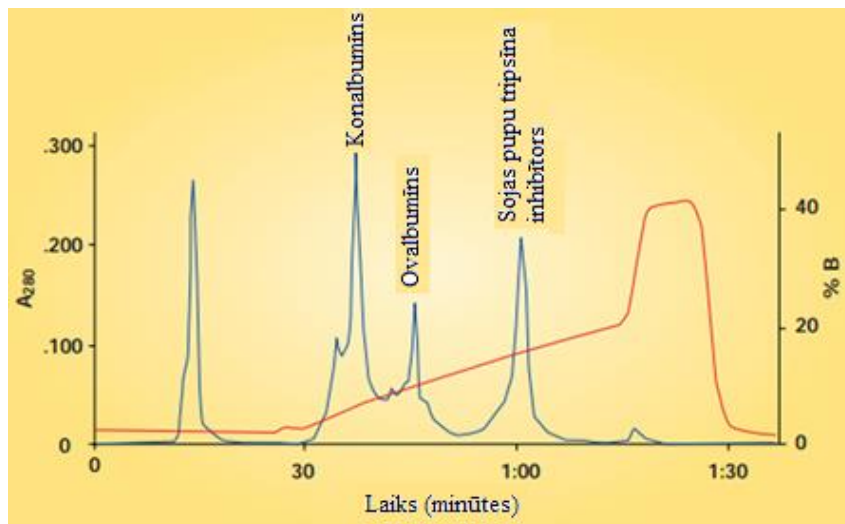
Proteīnu izoelektrisko punktu aprēķināšanai var izmantot izoelektriskā punkta kalkulatoru lietojot aminoskābju sekvenci.

1.1. tabula

Izoelektriskie punkti un molekulārās masas dažiem proteīniem [4]

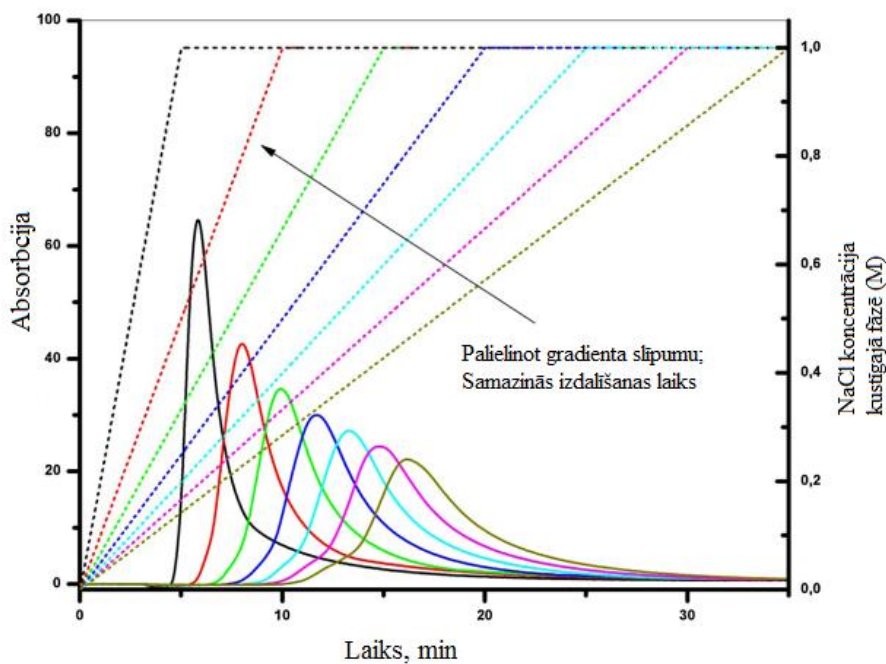
Proteīnu nosaukums	Izoelektriskais punkts pI	Molekulārā masa
Pepsīns	~1,0	35500
Ovalbumīns	4,6	43000
Tireoglobulīns	4,6	660000
Albumīns	4,9	68000
Ureāze	5,0	480000
β-Laktoglobulīns	5,2	20000
Insulīns	5,3	5700
Hemoglobīns	6,8	64000
Mioglobīns	7,0	17500
Ogļskābes anhidrāze	7,3	29000
Himotripsinogēns	9,5	25700
Citohroms C	10,7	12000
Lizocīms	11,0	14300

Jonu apmaiņas hromatogrāfijā lieto lineāru gradientu (skat. 1.1. att.), kurā vielu atdalīšanu panāk pateicoties jonu mijiedarbībām [5]. Jonu apmaiņas hromatogrāfijā gradienta mainīgie faktori ir pH vai buferšķīduma koncentrācijas izmaiņas kustīgajā fāzē.



1.1. att. Konaalbumīna, ovalbumīna un sojas pupiņu tripsīna inhibītora atdalīšana. Ar sarkano līniju apzīmēta nātrija hlorīda izmaiņa kustīgajā fāzē, 280nm [5]

Attēlā 1.2. parādīts kā gradienta slīpums ietekmē citohroma C izdalīšanās laiku. Stāvāks gradienta profils nodrošina īsāku analīzes laiku un šaurākas proteīnu joslas.

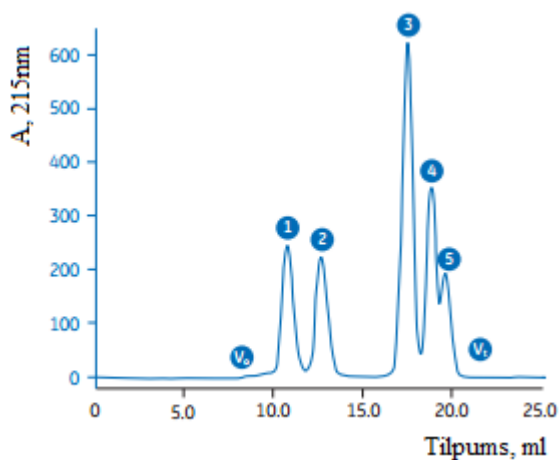


1.2. att. Daži eluēšanas profili citohromam C, 25 °C, 1 ml/min, gradienta režīms 0-100%, 5, 10, 15, 20, 25, 30 un 35 min, kustīgā fāzē 1M NaCl (pH=5), 410nm [9]

Gēlfiltrācijas hromatogrāfija. Gēlfiltrācijas hromatogrāfija (dažreiz saukta par eksklūzijas hromatogrāfiju) biomolekulas atdala, pamatojoties uz atšķirībām to molekulu izmēros vai oligomēro stāvokli šķīdumā. Kolonnās ir iepildīts gēla tipa sorbents, kurš veido sfēriskas, porainas daļiņas. Lielās molekulas izdalās ātrāk, jo nevar iekļūt porās, bet mazās - izdalās vēlāk, jo tās pārvietojas pa sorbenta porām [10].

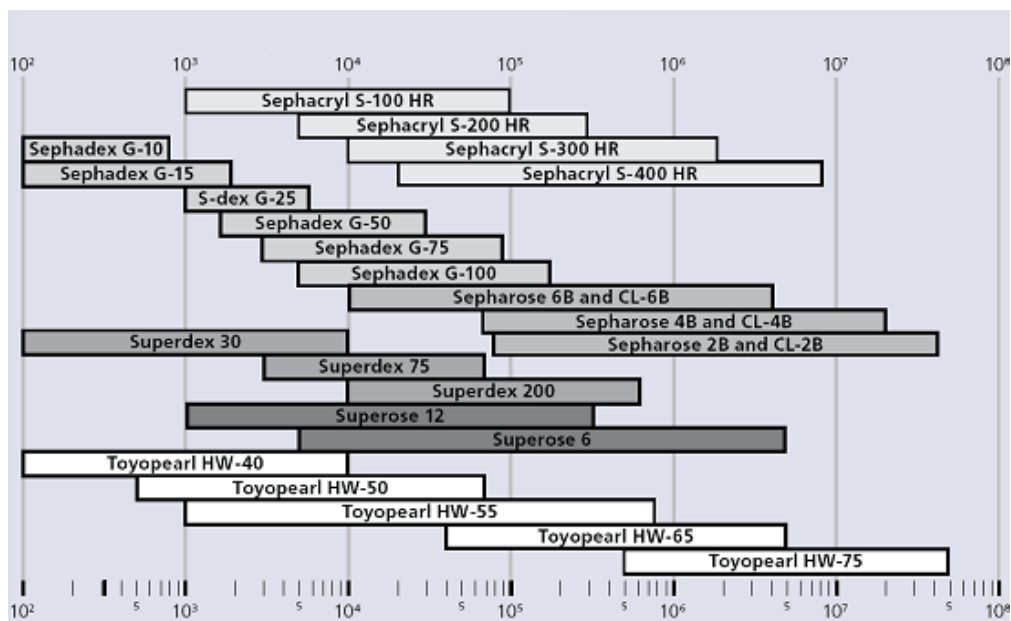
Gēlfiltrācijas hromatogrāfiju iedala frakcionēšanas un grupu atdalīšanas metodēs. Frakcionējot var atdalīt molekulas, kurām ir nelielas molekulārā izmēra atšķirības. Grupā atdalīšanā var atšķirt lielās molekulas no mazajām [10, 11].

Attēlā 1.3. parādīta peptīdu, proteīnu un vitamīna B₁₂ atdalīšana gēlfiltrācijas hromatogrāfijas apstākļos [12].



1.3. att. Citohroma C (1), aprotināna (2), vitamīna B₁₂ (3), (Gly)₅ (4) un Gly (5) atdalīšana uz Superdex Peptide 10/300 GL, kustīgā fāze: 50 mM nātrija dihidrogenfosfāta un 150 mM nātrija hlorīda maisījums, pH 7,0, 215nm

Kolonnas izvēle. Gēlfiltrācijas hromatogrāfijā par sorbentiem lieto gēlus uz desktrānu, agarozes un poliakrilamīda bāzes. [13-15]. Attēlā 1.4. ir parādītas ražotāju piedāvātās kolonnas un ir redzams molekulārās masas diapazons, kurā var izmantot katru kolonnu.



1.4. att. Gēlfiltrācijas hromatogrāfijas kolonnas

Kustīgās fāzes izvēle. Parasti kā kustīgo fāzi izmanto destilētu ūdeni. Ja nepieciešams, var lietot arī buferšķīdumus [13].

Hidrofobo mijiedarbību hromatogrāfija. Hidrofobo mijiedarbību hromatogrāfijā proteīnu atdalīšana notiek pēc molekulu hidrofobitātēm.

Hidrofobo mijiedarbību hromatogrāfijas metode tiek uzskatīta par piemērotu proteīnu attīrīšanai. Metodes priekšrocība ir tāda, ka hromatogrāfiskie apstākļi ir visai tuvi fizioloģiskajiem cilvēka ķermeņa apstākļiem – neitrāls pH, sāls - ūdens šķīdums, istabas temperatūra. Visi šie aspekti veicina proteīnu bioaktivitāti. Tomēr metode nav guvusi plašu popularitāti, jo piemērotu sorbentu atrašana ir pārāk darbietilpīga [16].

Hidrofobo mijiedarbību hromatogrāfijas metode reizēm tiek saukta arī par izsālīšanas hromatogrāfiju, šķīdības hromatogrāfiju un sāls ierosināto proteīnu hromatogrāfiju, jo šajā metodē proteīnu adsorbciju izraisa augsta sāls (piemēram, amonija sulfāta) koncentrācija [16, 17].

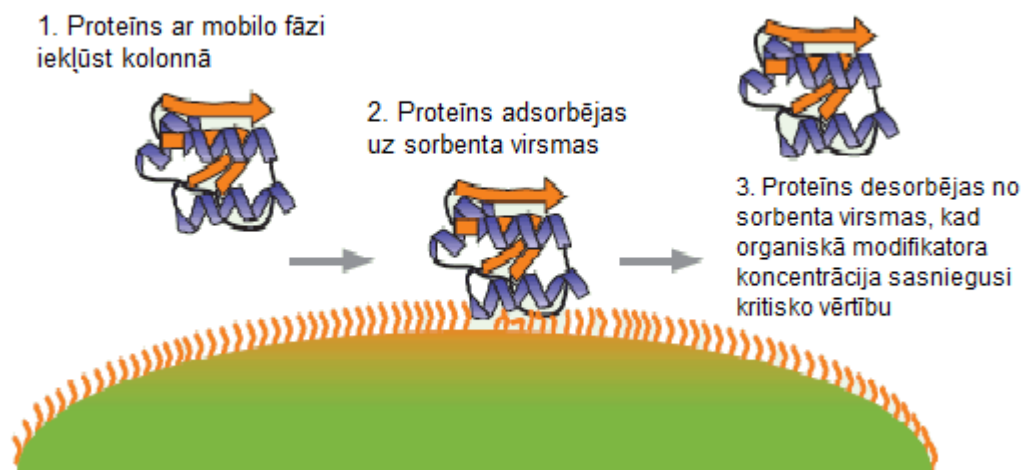
Afīnā hromatogrāfija. Metode balstās uz mijiedarbību starp mērķa proteīniem un stacionāro fāzi, kura ir ļoti selektīva vai specifiska. Selektīvā mijiedarbība var notikt starp proteīnu un mazmolekulāru vielu vai arī starp diviem vai vairākiem biopolimēriem. Metode ir ļoti spēcīgs instruments proteīnu attīrīšanai, jo tai ir augsta selektivitāte. To izmanto, ja mērķa proteīni veido tikai nelielu daļu no komplicēta maisījuma. Atkarībā no stacionārajā fāzē imobilizētā liganda, metodi iedala vairākās apakš metodēs – inhibitoru, nukleīnskābju, hormonu, vitamīnu, cukuru, imobilizētā metāla, kā arī imunoafīnajā hromatogrāfijā [18].

Kapilārā elektroforēze. Proteīnu atdalīšana galvenokārt notiek pēc to pārvietošanās elektriskā lauka iedarbībā. Šo metodi pielieto proteīnu tīrības noteikšanai, kā arī izoelektriskā punkta noteikšanai [19]. Loti svarīgi ir izvēlēties piemērotu buferšķīduma proteīnu analīzei. Proteīni un peptīdi ir amfotēri, to lādiņš ir atkarīgs no izvēlēta buferšķīduma pH. Jo vairāk ir zināma informācija par proteīna molekulu, jo vieglāk būs atrast piemērotus analīzes apstākļus. Svarīgi ir zināt izoelektrisko punktu, jo tas atvieglo atrast piemērotu buferšķīduma pH un tā koncentrāciju. Svarīgs lielums ir proteīnu lādiņš, kuru var kontrolēt ar buferšķīduma pH, lai notiktu proteīnu kustība caur kapilāru.

Apriektās fāzes augsti efektīvās šķīdumu hromatogrāfija. AEŠH ir vēl viena interesanta alternatīva proteīnu raksturošanai [2]. Apriektās fāzes augsti efektīvās šķīdumu hromatogrāfijas metodes pamatā ir molekulu atdalīšana pēc to hidrofobitātēm. Apriektās fāzes AEŠH par sorbentiem visbiežāk izmanto silikagela vai oglekļa sorbenta daļiņas ar to virsmai pievienotām fāzēm, piemēram, fenilgredzeniem vai nepolārām alifātiskām virknēm. Par kustīgo fāzi izmanto, piemēram, ūdens/acetoniātrila/0,1% TFA vai ūdens/metanola/0,1% TFA maisījumus. Var atdalīt komplicētus proteīnu maisījumus, var atdalīt proteīnu izomērus [20].

1.2. Proteīnu noteikšana apriektās fāzes AEŠH apstākļos

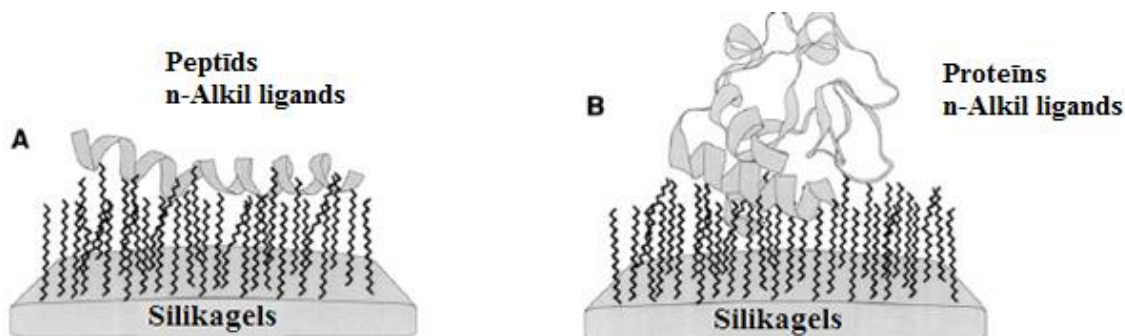
Proteīnu un peptīdu sorbcija kolonnā notiek saskaņā ar adsorbcijas/desorbcijas mehānismu. Peptīdu un proteīnu molekulas ir pārāk lielas, lai sorbcija notiktu pēc mazu molekulu mehānisma. Nonākot kolonnā, tās adsorbējas uz sorbenta hidrofobās virsmas, un paliek adsorbētā stāvoklī tik ilgi, kamēr organiskais šķīdinātājs ir sasniedzis kritisko koncentrāciju, kura izraisa molekulas desorbciju. Pēc desorbcijas, tā veic ceļu cauri kolonnai, visai nedaudz iedarbojoties ar sorbenta virsmu [21]. Šī procesa būtība shematiski attēlota 1.5. attēlā.



1.5. att. Proteīnu sorbcijas/desorbcijas mehānisma shematisks attēlojums [22]

Proteīnu konformācija ir atkarīga no hromatogrāfiskās analīzes apstākļiem. Tie ir temperatūra, organiskā šķīdinātāja daba, spiediens u.c. Šie parametri ietekmē proteīnu sorbciju un joslu formu, tāpēc tie ir galvenie faktori proteīnu analīzes optimizācijā [22].

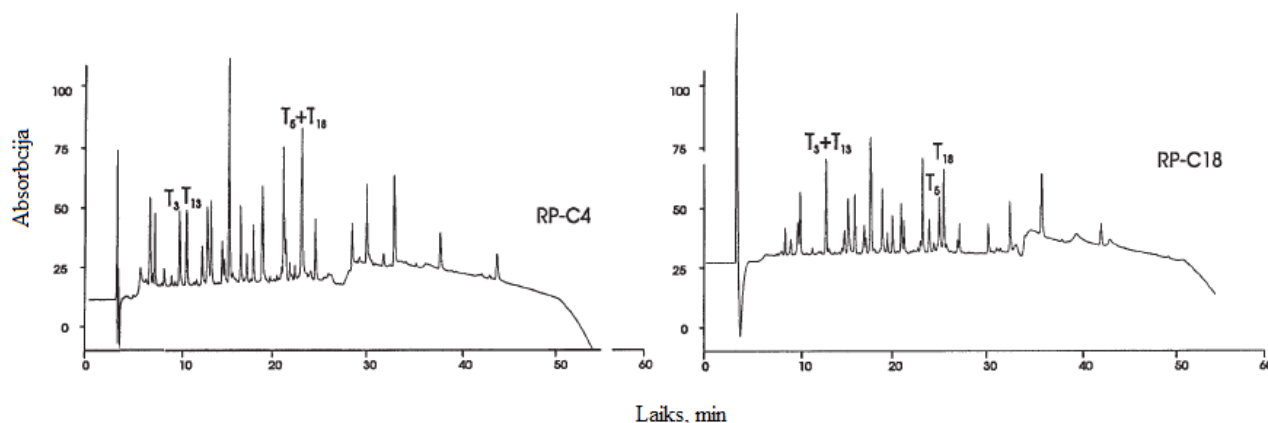
Attēlā 1.6. parādīta peptīdu un proteīnu iespējamais novietojums uz sorbenta. Peptīdi un proteīnu piesaistās sorbenta ligandiem, pateicoties hidroforbām mijiedarbībām.



1.6. att. Peptīdu (molmasa līdz 10 000 Da) un proteīnu (molmasa > 10 000 Da) orientācija attiecībā pret sorbenta slāni [22]

Sorbenta izvēle. Proteīnu atdalīšanai pārsvarā izmanto kolonnas, kurās sorbenta virsma modificēta ar relatīvi īsām alkilķēdēm ($-C_3H_7$; $-C_4H_9$; $-C_5H_{11}$), jo uz garākām virknēm to augstās hidroforbitātes dēļ var notikt neatgriezeniska proteīnu adsorbēcija. Lieto arī kolonnas uz polimēru bāzes, kuru priekšrocības ir vienmērīga hidroforbitāte un uzlabota mehāniskā izturība [23]. Attēlā 1.7. parādīta n-alkilgrupu ietekme uz peptīdu atdalīšanu. Uz $-C_4$ tipa sorbenta izdodas atdalīt pāri T_3 un T_{13} (cūku augšanas hormona peptīdi), tad uz $-C_{18}$ kolonnas šie peptīdi netiek atdalīti. Bet uz $-C_4$ tipa sorbenta nav izdevies atdalīt pāri T_5 un T_{18} (cūku augšanas

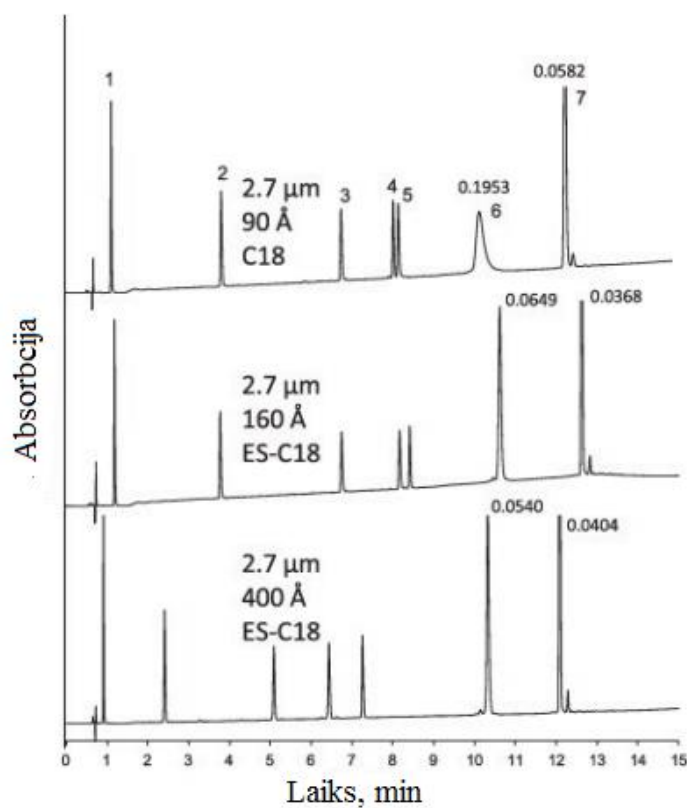
hormona peptīdu), savukārt uz *-C18* kolonnas ir novērota to atdalīšana, visu joslu pilnīga atdalīšana netika panākta. Pilnīgai visu 19 peptīdu maisījumu atdalīšanai ir nepieciešama metodes optimizācija.



1.7. att. N-alkilgrupas ietekme uz cūku augšanas hormona peptīdu atdalīšanu, (Absorbācija pie 214 nm) [22]

Sorbenta poru izmēru ietekme. Lielākā daļa AEŠH izmantoto sorbentu ir poraini, jo tādā veidā sorbentam ir lielāka saskares virsma, uz kuras var notikt sorbcija. Mazu molekulu analīzēm izmanto sorbentus ar 60-150 Å poru izmēriem, bet proteīnu gadījumā sorbenta porām ir jābūt pietiekoši lielām, lai molekulas tajās varētu iekļūt, kas iespējams ar sorbentiem, kuru poru izmēri pārsniedz 300 Å [2, 24].

Attēlā 1.8. ir parādīts, kā poru izmērs ietekmē vielu atdalīšanu un joslu formu. Piemēram ribonukleāzes joslas forma uzlabojas, ja izvēlas kolonnu ar lielāku poru izmēru (skat. 1.8. att.). Tika arī novērota angiotenzīna (4) un leicīna (5) pilnīga atdalīšana palielinoties sorbenta poru izmēram. Proteīnu atdalīšanai plašāk tiek izmantoti sorbenti, kuru poru izmērs ir no 250 – 300 Å [25].



1.8. att. Poru izmēru ietekme. Analizējamais paraugs Gly-Tyr (1), Val-Tyr-Val (2), enkefalīns (3), angiotenzīns (4), leicīns (5), ribonukleāze A (6) un insulīns (7), kustīgā fāze: acetonitrils/ūdens/0,1%TFA, gradienta režīms 0-50% 15min, 214nm [26]

Tabulā 1.2. uzskaitītas komerciāli pieejamās kolonnas, kuras šobrīd lieto dažādu proteīnu atdalīšanai. Kolonnas atšķiras ne tikai ar stacionārās fāzes modifikatora dabu, bet ir pieejamas kolonnas ar dažādu sorbenta daļiņu un poru izmēru.

1.2. tabula

Komerčiāli pieejamās kolonnas proteīnu atdalīšanai [21]

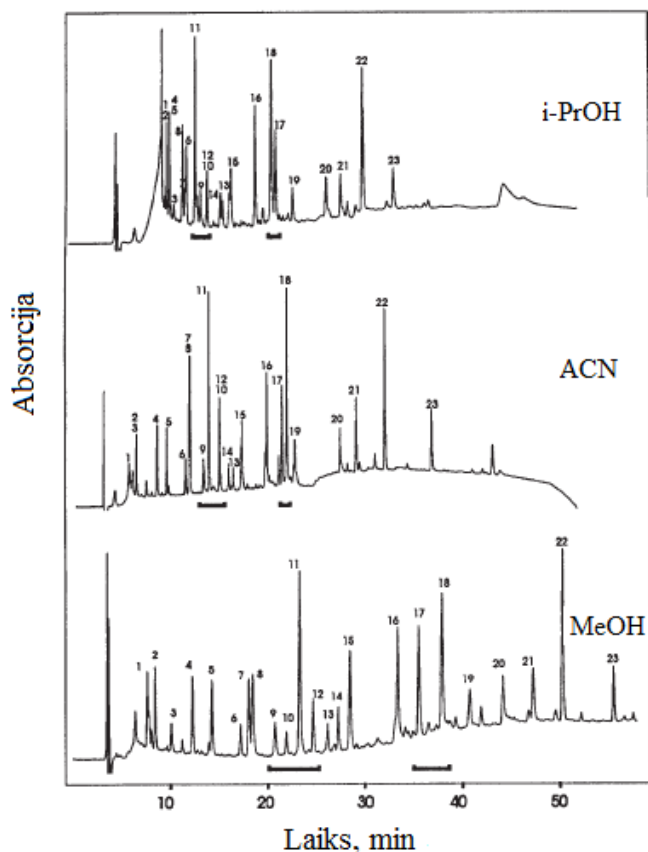
Kolonnas nosaukums	Ligands funkcionālā grupa	Daļiņu izmērs/makroporu izmērs	Poru izmērs	Maksimālā darba temperatūra, °C	pH izmantošanas diapazons	Maksimālais spiediens, bar
Monolīti						
<i>Thermo Scientific Proswift RP-1S</i>	<i>Fenil</i>	1 μm	Informācija nav pieejama	70 °C	1-14	200
<i>Thermo Scientific Proswift RP-2H</i>	<i>Fenil</i>	2,2 μm	Informācija nav pieejama	70 °C	1-14	200
<i>Thermo Scientific RP-3U</i>	<i>Fenil</i>	5,1 μm	Informācija nav pieejama	70 °C	1-14	200
<i>Thermo Scientific RP-10R</i>	<i>Fenil</i>	Informācija nav pieejama	Informācija nav pieejama	80 °C	1-10	300
<i>Merck Chromolith 2nd generation</i>	<i>-C18</i>	1,2 μm	150 Å	60 °C	1-8	200
Poru izmērs < 2μm						
<i>Waters Acquity BEH</i>	<i>-C18, -C4</i>	1,7 μm	300 Å	80 °C	1-12	1000
<i>Agilent ZORBAX 300SB RRHD</i>	<i>-C18, -C8</i>	1,8 μm	300 Å	80 °C	1-8	1200
<i>Thermo Hypersil GOLD</i>	<i>-C18, -C8, -(CH₂)CN, PFP, - Fenil</i>	1,9 μm	175 Å	60 °C	2-9	1000
Kodola apvalks (core-shell type)						
<i>Halo Peptide ES</i>	<i>-C18</i>	2,7 μm (kodols 0,5 μm)	160 Å	100 °C	1-9	600

1.2. tabulas turpinājums

<i>Supelco Ascentis Peptide ES</i>	-C18	2,7 μm (kodols 0,5 μm)	160 Å	100 °C	1-9	600
<i>Perkin-Elmer Brownlee SPP Peptide ES</i>	-C18	2,7 μm (kodols 0,5 μm)	160 Å	90 °C	1-8	600
<i>Phenomenex Aeris Widepore</i>	-C18, -C8, -C4	3,6 μm (kodols 0,5 μm)	Informācija nav pieejama	90 °C (C18, C8) 60 °C (C4)	1,5-9	600
<i>Phenomenex Aeris Peptide</i>	-C18	3,6 μm (kodols 0,2 μm) 1,7 μm (kodols 0,2 μm)	Informācija nav pieejama	90 °C	1,5-9	1000
<i>Agilent Zorbax poroshell SB300</i>	-C18, -C8, -C3	5 μm (kodols 0,25 μm)	300 Å	90 °C	1-8	600
<i>Agilent Zorbax poroshell 300Extend</i>	-C18	5 μm (kodols 0,25 μm)	300 Å	60 °C	2-11	600

Organiskā šķīdinātāja izvēle. Proteīnu desorbēcija un eluēšana no apgrieztās fāzes sorbenta notiek ūdens šķīdumā, kurš satur organisko šķīdinātāju un jonu pāru reaģentu vai buferšķīdumu. Proteīni desorbē no hidrofobas sorbenta virsmas, buferšķīdums nodrošina vajadzīgo pH un mijiedarbojas ar proteīnu jonizētām grupām. Visbiežāk lietotais organiskais šķīdinātājs ir acetonitrils [27]. Lieliem vai hidrofobiem proteīniem var lietot arī izopropanolu, jo tam ir lielāks eluējošais spēks. Tomēr tam piemīt liela viskozitāte, kas rada augstu spiedienu. Lai samazinātu viskozitāti, lieto acetonitrila un izopropanola maisījumus. Kā organiskos šķīdinātājus var izmantot arī etanolu vai metanolu. Pētījumos ir noskaidrots, ka acetonitrila pievienošana lielā koncentrācijā izraisa daudzu globulāro proteīnu denaturāciju, it īpaši augstākās analīzes temperatūrās [28].

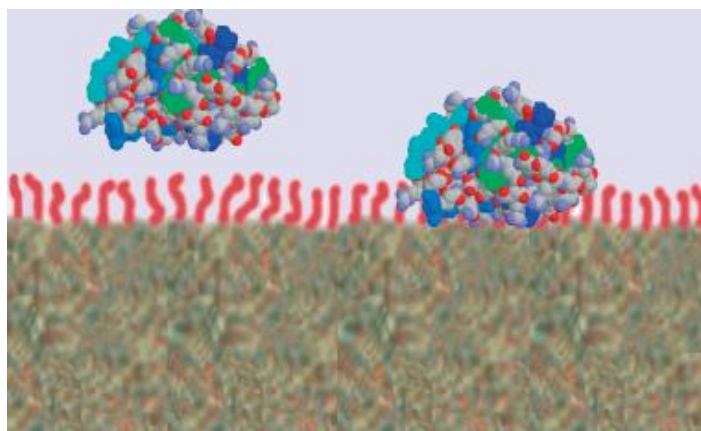
Attēlā 1.9. parādīta organiskā šķīdinātāja ietekme uz peptīdu atdalīšanu. Izmantojot 2-propanolu iespējams samazināt analīzes laiku. Salīdzinot ar metanolu un 2-propanolu iegūtos rezultātus ir redzams, ka, izmantojot 2-propanolu analīzes laiks ir apmēram divas reizes īsāks nekā ar metanolu. Acetonitrila un 2-propanola gadījumā visi peptīdi netiek atdalīti. Šo peptīdu maisījumu atdalīšanai piemērotākais ir metanols, jo tika novērota peptīdu maisījuma atdalīšana.



1.9. att. Organiskā šķīdinātāja ietekme uz peptīdu atdalīšanu, 214nm [22]

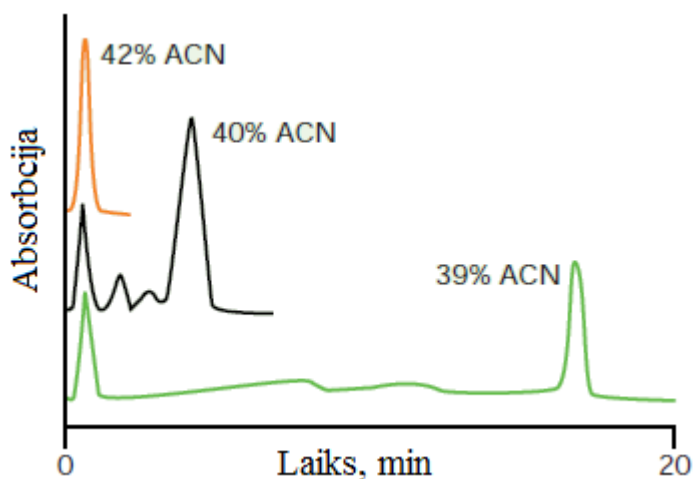
Eluēšanās režīma izvēle. Tā kā proteīnu molekulas ir lielas, tad tikai daļa no tās veido hidrofobās mijiedarbības ar sorbenta virsmu, pārējā proteīna molekula ir saskarsmē ar kustīgo fāzi. Proteīna molekula adsorbējas uz sorbenta virsmas kolonnas sākumā tik ilgi līdz kamēr tiek

sasniegta organiskā šķīdinātāja koncentrācija, lai notiktu proteīna desorbcijas process. Adsorbcijas/desorbcijas process proteīniem un peptīdiem notiek tikai vienu reizi, kamēr tās atrodas kolonnā (skat. 1.10. att.). Pēc desorbcijas starp sorbenta virsmu un proteīnu ir vājas mijiedarbības, kurām ir maza ietekme uz atdalīšanu.



1.10. att. Proteīna sorbcija uz stacionārās fāzes [21]

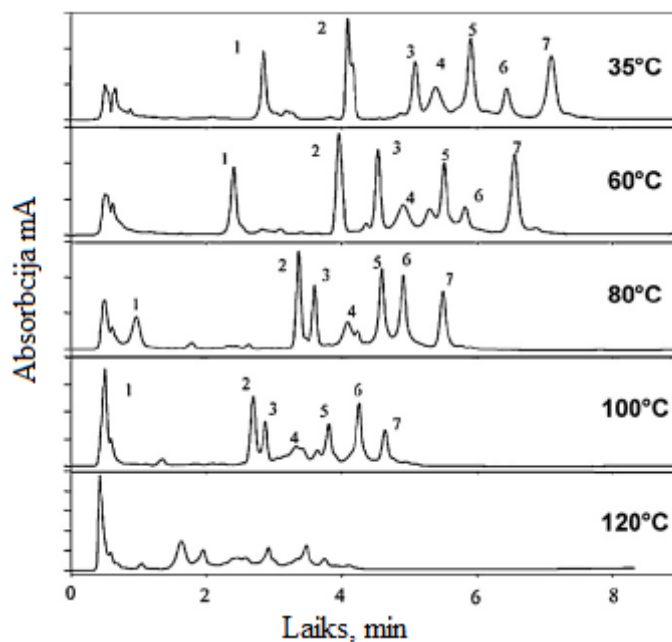
Tas nozīmē to, ka proteīnu molekulas ir ļoti jutīgas pret organiskā šķīdinātāja koncentrācijas izmaiņu. Organiskā šķīdinātāja koncentrācijas ietekme uz proteīnu sorbciju lizocīma gadījumā, izmainot acetonitrila koncentrāciju no 42% uz 39% analīzes laiks palielinās ~ 10 reizes. Attēlā 1.11. ilustrētas gradienta apstākļu priekšrocības proteīnu analīzēs [22].



1.11. att. Lizocīma izdalīšanās laiki ar dažādām acetonitrila koncentrācijām. Kolonna: VYDAC® 214TP54 C4, 300 Å. Kustīgā fāze: Acetonitrils + 0,1% TFA šķīdumā, 215nm [22]

Temperatūras ietekme. Paaugstināta temperatūra var ietekmēt proteīnu struktūru un izmainīt sorbenta virsmas īpašības. Paaugstinoties temperatūrai, analīta sorbcijas ātrums pieaug un tas ir svarīgi lēni difundējošiem proteīniem. Kolonnas efektivitāte pieaug līdz ar temperatūru tāpēc, ka paātrinās difūzija porās un ārā no tām, samazinot joslu platumu. Paaugstināta temperatūra samazina organisko šķīdinātāju viskozitāti, kā rezultātā samazinās kolonnas

pretpiedienu. Līdz ar to analīzei var izmantot lielākus plūsmas ātrumus. Tā kā proteīniem ir mainīga konformācija atkarībā no temperatūras, tā var ietekmēt to aizturi kolonnā. Temperatūra ir faktors, kuru var izmantot, lai mainītu atdalīšanas selektivitāti [2, 26, 29-31]. Attēlā 1.12. ir attēlota proteīnu maisījuma atdalīšana temperatūras diapazonā 35-120°C. Šī proteīnu maisījuma atdalīšanai ieteicamais temperatūras diapazons 35°C līdz 60°C, virs 60°C var novērot, ka ribonukleāze (1) praktiski nesorbējas izvēlētajos hromatogrāfijas apstākļos, kā arī var novērot, proteīnu joslu paplašināšanos, to varētu skaidrot ar to, ka proteīni pie augstām temperatūrām var denaturēties [32]. Lai samazinātu proteīnu nestabilitāti ieteicamais temperatūru diapazons (60-100 °C) un jāsamazina analīzes laiks, to viegli var panākt izmantojot UAEŠH (ultra-augsti efektīvo šķidrumu hromatogrāfiju) [2]. Literatūras avotā [32] tika veikts stabilitātes tests mioglobīnam un lizocīmam un tika noskaidrots, ka šo divu proteīnu denaturācija 80°C temperatūrā šķīdumā (0,1%TFA/50%acetonitrils/50%ūdens) notiek, ja lizocīms un mioglobulīns atrodas vismaz 10 minutes.



1.12. att. Temperatūras ietekme uz proteīnu atdalīšanu [2]. Ribonukleāze (1), insulīns (2), lizocīms (3), apotransferīns (4), laktalbūmīns (5), hemotripsīns (6) un konkavalīns A (7) 220nm

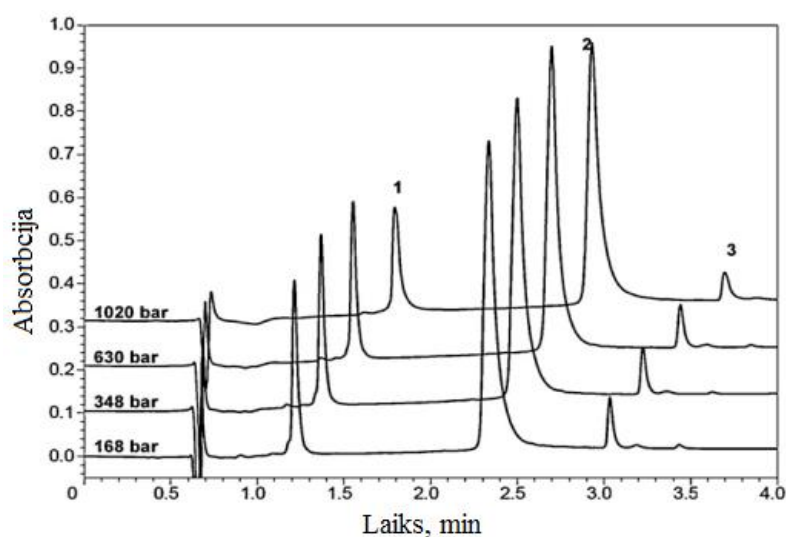
Jonu pāru reaģenta ietekme. Iespēja izmantot sāļus un buferšķīdumus saturošas kustīgās fāzes ir galvenais iemesls, kāpēc šķidrumu hromatogrāfijas metodes tiek plaši lietotas bioloģisku molekulu analīzēm [33]. Proteīni satur daudzas skābas un bāziskas dabas jonizējamas grupas aminoskābju sānu virknēs, kā arī to amino- un karboksil- galos. Kustīgās fāzes pH ir svarīgs faktors, kuru mainot, var koriģēt joslu formu un platumu, sorbciju un selektivitāti [33]. Trifluoretiķskābe (TFA) koncentrācijās no 0,05 līdz 0,1 % ir visplašāk lietotā

kustīgās fāzes piedeva, kuru izmanto proteīnu analīzē. Tā nodrošina jonu pāru veidošanos un molekulu solvatāciju, kā rezultātā joslu forma kļūst simetriskāka. TFA koncentrāciju līdz 0,5% lieto lielu vai ļoti hidrofobu proteīnu šķīdināšanai. Samērā plaši izmanto fosfātu buferšķīdumus, kuri mijiedarbojas ar bāzisko proteīnu sānu virknēm [33, 34].

Spiediena un plūsmas ātruma ietekme. 2012. gadā *S. Feketa* ar kolēģiem veica pētījumus par kustīgās fāzes plūsmas ātruma un sistēmas pretspiediena ietekmi uz selektivitāti un sorbcijas koeficientu dažādām vielām ar ļoti atšķirīgām molekulu masām (MW). Tika pētītas izdalīšanās laiku izmaiņas dažāda molekulu izmēra vielām, palielinot spiedienu no 100 līdz pat 1100 bar. Rezultātā tika noskaidrots, ka, spiediena palielināšanai, lietojot plūsmas ierobežotāju, nelielām molekulām (MW < 300 g/mol) *lnk* pie 1100 bar spiediena palielinājās par 25 līdz 100%, peptīdiem (1,3 kDa) par 150%, insulīnam (~ 6 kDa) par 800% un mioglobīnam (~ 17 kDa) par vairāk nekā 3000%, salīdzinot ar izdalīšanās laikiem pie 100 bar spiediena. Tika novērots, ka augsts spiediens vairāk ietekmē lielāku molekulu izdalīšanos no kolonnas. Spiedienu palielinot līdz ar plūsmas ātruma izmaiņu, tika novērotas mazākas, tomēr visai lielas sorbcijas koeficienta izmaiņas. Turklāt, saistība starp sorbcijas koeficienta izmaiņām un molekulu izmēriem novērota netika.

Proteīnu sorbcijas koeficientus, visticamāk, ietekmē konformācijas izmaiņas lielā molekulu izmēra dēļ. Mainoties spiedienam, molekulas ieņem dažādas konformācijas. Molekulu difūzija palielinātā pretspiedienā notiek lēnāk, kas arī pāldzina izdalīšanos no kolonnas [35].

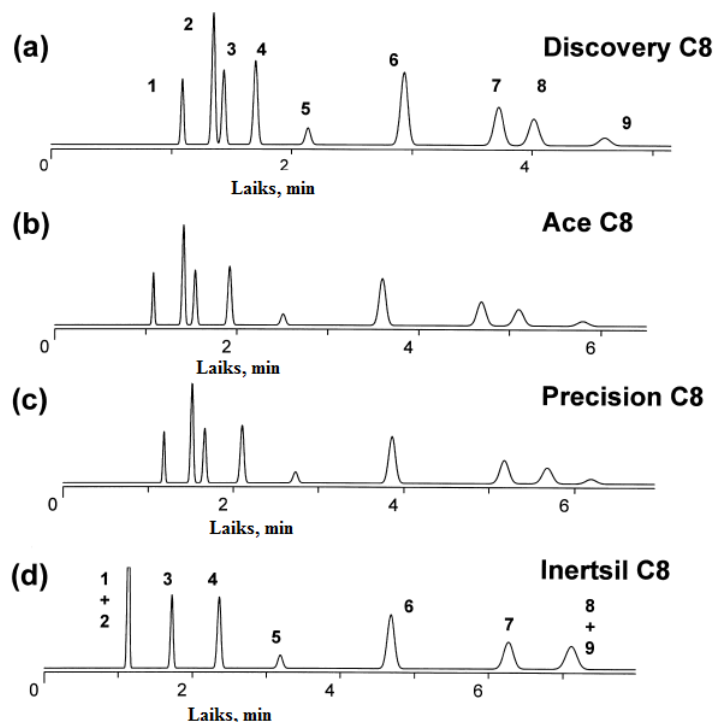
Tika konstatēts, ka spiediens ietekmē proteīnu sorbciju, palielinoties spiedienam palielinās izdalīšanās laiks (skat. 1.13. att.).



1.13.att. Kolonnas pretspiediena ietekme uz proteīnu izdalīšanās laikiem. Citohroms C (1), liellopa albumīns (2) un mioglobīns (3), 280nm [35]

1.3. Apgrieztās fāzes AEŠH kolonnu raksturošana un salīdzināšana

Mūsdienās ir pieejams pietiekami plašs apgrieztās fāzes augsti efektīvās šķīdumu hromatogrāfijas kolonnu klāsts, lai hromatogrāfisti varētu izvēlēties piemērotāko nekustīgo fāzi un spētu atrisināt visdažādākās atdalīšanas problēmas. AEŠH nekustīgās fāzes kvalitāti nosaka tās ķīmiskās un fizikālās īpašības [36, 37]. Mūsdienās daudzi ražotāji kolonnas pases datus norāda tikai fizikālās īpašības - daļiņu lieluma sadalījumu (μm), īpatnējo virsmas laukumu (m^2/g), poru izmēru (\AA), poru tilpumu (ml/g), kā arī norāda, vai nekustīgai fāzei ir aizsargātas silanolgrupas [38-40]. Izmantojot tikai šādus datus, ir ļoti grūti salīdzināt un novērtēt kolonnu selektivitāti [38]. Attēlā 1.14. ir parādīta 9 komponentu atdalīšana uz četrām dažādu ražotāju - C8 kolonnām vienādos hromatogrāfiskos apstākļos. Novērtējot iegūtos datus, redzams, ka kolonnām *Discovery C8*, *Ace C8* un *Precision C8* ir līdzīga selektivitāte, bet kolonna *Inertsil C8* uzrāda atšķirīgu selektivitāti no pārējām C8 kolonnām. Metodes izstrādes procesā var būt nepieciešamas kolonnas ar ļoti atšķirīgu selektivitāti, lai panāktu pieņemamu komponentu atdalīšanu. Piemēram, pārnēsot metodi no kolonnas *Inertsil C8* uz *Precision C8*, var sasniegt visu komponentu atdalīšanu izvēlētajos hromatogrāfiskajos apstākļos.



1.14. att. Kolonnu selektivitātes salīdzinājums. Paraugs: N,N-dietilacetamīds (1), nortriptilīns (2), 5,5-difenilhidantoīns (3), Benzonitrils (4), metoksibenzols (5), toluols (6), cis-halkons (7), trans-halkons (8) un mefenamskābe (9) [39]. Hromatogrāfiskie apstākļi: kustīgā fāze – 60 mM kālija fosfāta buferšķīdums (pH=2,8)/acetonitrils 50:50 (v/v), plūsmas ātrums – 2 ml/min, temperatūra – 35 °C, 254nm

Noskaidrots, ka starp nomināli līdzīgiem apgrieztās fāzes (AF) sorbentiem pastāv atšķirības arī tad, ja eluēšanas apstākļi ir vienādi. Šis apgrieztās fāzes aspekts tiek plaši pētīts [41-44]. Veiksmīgai atdalīšanas procesa pārnesi no vienas tā paša sorbenta partijas uz citu, parasti ir nepieciešamas izmaiņas izstrādātajā analīzes metodē.

Katra hromatogrāfista darba uzdevums ir izvēlēties piemērotu kolonnu konkrēta maisījuma komponentu atdalīšanai. Lai būtu vieglāk izvēlēties piemērotu kolonnu, tās ir nepieciešams klasificēt. Tās var klasificēt pēc sorbentu īpašībām, kuras var noteikt hromatogrāfiski: efektivitāte, hidrofobitāte, selektivitāte, silanolgrupu aktivitāte, jonu apmaiņas spēja, polārās mijiedarbības [45-48]. Hidrofobitātes, selektivitātes, silanolgrupu aktivitātes, jonu apmaiņas spējas novērtēšanas metodes ir iedalītas divās grupās [35, 36, 49, 50]:

1. *Empīriskās novērtēšanas metodes.* Ar šo metožu palīdzību iegūst hromatogrāfiskos parametrus, kurus izsaka specifiskas kolonnas īpašības, piemēram, hidrofobitāti. Parasti šie hromatogrāfiskie parametri ir atkarīgi no samērā patvaļīgi izvēlētajiem testēšanā izmantotajiem savienojumiem. Šādas metodes ir *Tanakas* [49-55], *Engelharta* [42, 46, 49, 50, 51-57], *Eimana* [55, 56], *Valtera* [55-57] u.c. darbos.
2. *Modeļos balstītās novērtēšanas metodes.* Metodes ir balstītas uz īpašiem modeļiem kā, piemēram, QSRR modelis, kas izmantots šādos darbos [58-69].

Testēšanas metodes. Kolonnas efektivitātes novērtēšanai, parasti izmanto aromātiskos ogļūdeņražus. Piemēram, *Viski* un līdzautori [46] izmantoja trīs testēšanas metodes, lai noteiktu kolonnas efektivitāti. Metožu apraksts, ko iesaka *Viski* acetonitrils/ūdens/0,2M kālija dihidrogenfosfāta buferšķīdums (pH=2,3) 312:340:348 (tilp.) un testa savienojums: 5-p-metilfenil-5-fenilhidantoīns. Var izmantot arī metodi metanols/ūdens 50:50 (tilp.) ar testa savienojumu toluols vai eluentu metanols/ūdens 30:70 (tilp.) kombinācijā ar pentilbenzolu. *Tanaka* piedāvā šādu testu:

Šķīdinātājs 1: metanols/ūdens 80:20 (tilp.), temperatūra 25 °C.

Šķīdinātājs 2: metanols/ūdens 30:70 (tilp.), temperatūra 30 °C.

Šķīdinātājs 3: metanols/fosfāta buferšķīduma 0,02M ūdens šķīdums, pH 7,6; 30:70 (tilp.)

Šķīdinātājs 4: metanols/fosfāta buferšķīduma 0,02M ūdens šķīdums, pH 2,7; 30:70 (tilp.)

Testa savienojumi: uracils (t_0), butilbenzols, o-terfenils, pentilbenzols, trifenilēns, fenols, kofeīns, benzilamīns.

Rezultātu aprēķināšana:

$$\text{Hidrofobitāte} = k_{\text{pentilbenzols}} / k_{\text{butilbenzols}}, (\text{Šķīdinātājs 1}) \quad (1.1.)$$

$$\text{Alkilgrupu daudzums} = k_{\text{pentilbenzols}}, (\text{Šķīdinātājs 1}) \quad (1.2.)$$

$$\text{Selektivitāte} = k_{\text{trifenilēns}}/k_{\text{o-terfenils}}, (\text{Šķīdinātājs 1}) \quad (1.3.)$$

$$\text{Ūdeņraža saišu veidošanas kapacitāte} = k_{\text{kofeīns}}/k_{\text{fenols}}, (\text{Šķīdinātājs 2}) \quad (1.4.)$$

$$\text{Jonu apmaiņas kapacitāte pie } \text{pH} > 7 = k_{\text{pentilbenzols}} / k_{\text{fenols}}, (\text{Šķīdinātājs 3}) \quad (1.5.)$$

$$\text{Jonu apmaiņas kapacitāte pie } \text{pH} < 3 = k_{\text{pentilbenzols}} / k_{\text{fenols}}, (\text{Šķīdinātājs 4}) \quad (1.6.)$$

Engelharta tests [42, 46, 49, 50, 55-57]

Šķīdinātājs: metanols/ūdens 55:45(tilp.), temperatūra 40°C.

Testa savienojumi: uracils (t_0), anilīns, N,N-dimetilanilīns, fenols, toluols, etilbenzols.

Rezultātu aprēķināšana:

Silanolaktivitāte = katra maisījuma komponenta asimetrija 5% joslas augstumā.

Valtera tests [55-57]

Šķīdinātājs 1: acetonitrils/ūdens 65:35 (tilp.), temperatūra 40 °C.

Testa savienojumi: uracils (t_0), benzols un antracēns.

Šķīdinātājs 2: acetonitrils, temperatūra 40 °C.

Testa savienojumi: N,N-dietil-3-metil-benzamīds un antracēns.

Rezultātu aprēķināšana:

$$\text{Hidrofobitāte} = k_{\text{antracēns}} / k_{\text{benzols}}, (\text{Šķīdinātājs 1}) \quad (1.7.)$$

$$\text{Silanolaktivitāte} = k_{\text{N,N-dietil-3-metil-benzamīds}} / k_{\text{antracēns}}, (\text{Šķīdinātājs 2}) \quad (1.8.)$$

Izveidots arī NIST References materiālu standarts 870 (*NIST Standard Reference Material*® 870) [41, 51, 69].

Šķīdinātājs: metanols/0,02M fosfāta buferšķīduma ūdens šķīdums, pH 7, 80:20 (tilp.), temperatūra 23 °C.

Testa savienojumi: uracils (t_0), toluols, etilbenzols, hinazarīns un amitriptilīns.

Rezultātu aprēķināšana:

$$\text{Hidrofobitāte} = k_{\text{etilbenzols}} / k_{\text{toluols}} \quad (1.9.)$$

Joslas simetrija:

hinazarīnam (aktivitāte pret helātu veidotājiem).

amitriptilīns (aktivitāte pret bāzēm).

Galuško tests [44]

Šķīdinātājs: metanols/ūdens 60:40 (tilp.), temperatūra 30 °C.

Testa savienojumi: toluols, benzols, anilīns un fenols.

Rezultāts:

$$\text{Hidrofobitāte} = (k_{\text{toluols}} + k_{\text{benzols}}) / 2 \quad (1.10.)$$

$$\text{Silanolaktivitāte} = 1 + 3[(k_{\text{anilīns}} / k_{\text{fenols}}) - 1] \quad (1.11.)$$

Abrahams un līdzautori [70] izveidoja atšķirīgu pieeju kolonnas selektivitātes raksturošanai, aprakstot sorbcijas koeficientu, kā funkciju, kuru izsaka ar vienādojumu:

$$\lg k = C_1 + rR_2 + s\pi_2^H + a \sum a_2^H + b \sum \beta_2 + vW_x \quad (1.12.)$$

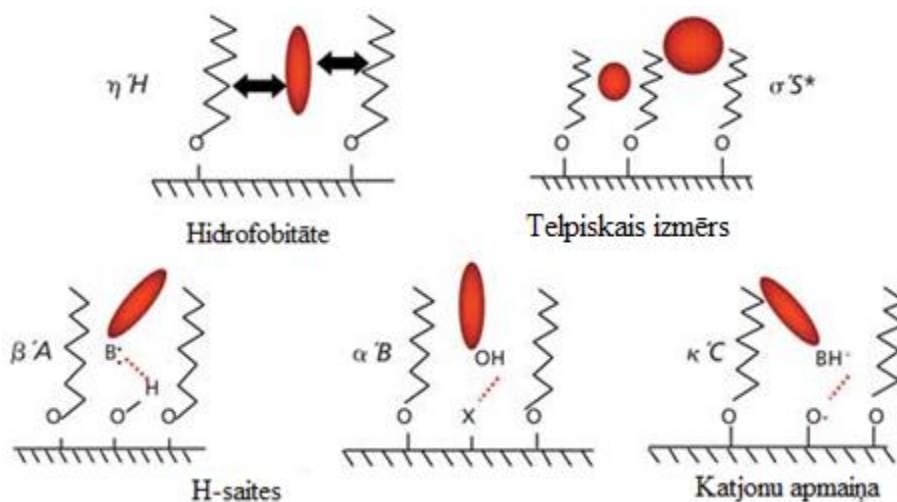
C_1 ir konstante, kas ietver kustīgās un nekustīgās fāžu attiecības, kas mainās, atkarībā no temperatūras, bet rR_2 , $s\pi_2^H$, $a\sum a_2^H$, $b\sum \beta_2$ un vW_x ir izšķīdušās vielas mijiedarbību parametri ar kustīgo un nekustīgo fāzēm.

Uzskatāmības dēļ, pārveidojot izteiksmi (1.10), iegūst šādu vienādojumu:

$$\lg k = \log k_{\text{ref}} + \eta' H + \sigma' S + \beta' A + \alpha' B + k' C \quad (1.13.)$$

η' , σ' , β' , α' un k' – ietver izšķīdušās vielas koeficientus (hidrofobitāti, telpiskais izmērs, H-saites, katjonu apmaiņa, šīs vērtības dažiem mazmolekulāriem savienojumiem ir noteiktas un ir pieejamas literatūrā, skat. 1.13. att.), bet H, S, B un C – ietver sistēmas koeficientus (kolonna, kustīgā fāze un temperatūra), bet k_{ref} – etilbenzola sorbcijas koeficients. Hidrofobās mijiedarbības - $\eta'H$, $\sigma'S$ – telpiskā izmēra selektivitāti, $\beta'A$ – ūdeņraža saites starp akceptoru izšķīdušo vielu un nejonizētām silanolgrupām nekustīgajā fāzē (skābums), $\alpha'B$ – ūdeņraža saites starp izšķīdušo vielu un neidentificētām nekustīgās fāzes grupām (bāziskums). $k'C$ – mijiedarbības starp protonētām bāzēm un jonizējamām silanolgrupām. Sistēmas konstantes var aprēķināt, izmantojot daudzfaktoru lineārās regresijas analīzi.

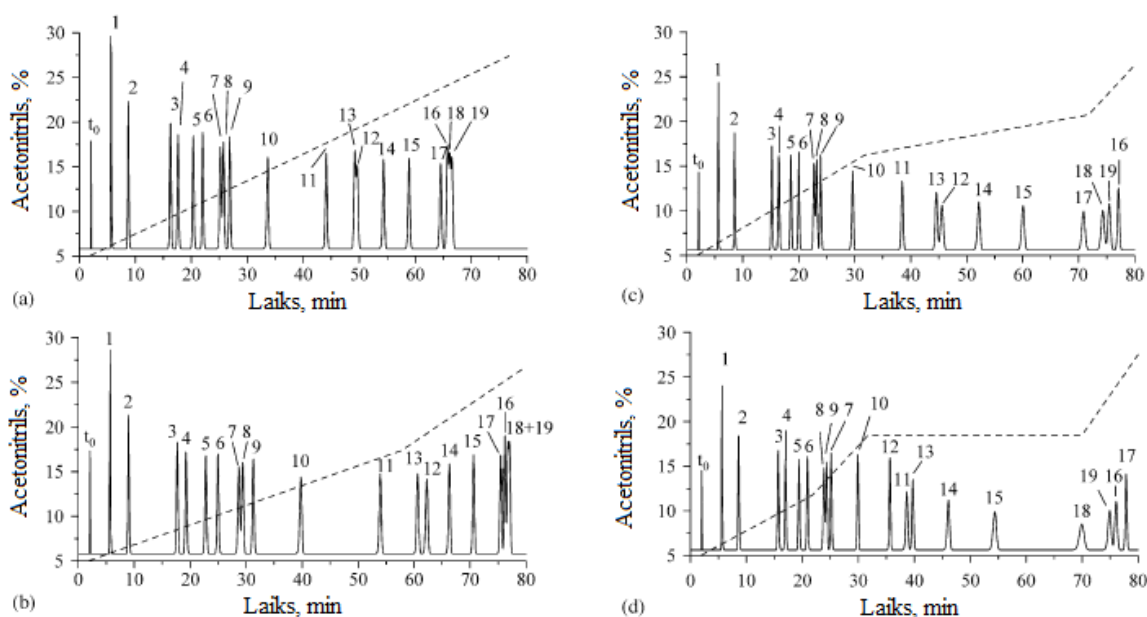
Izmantojot šādu pieeju kolonnas selektivitātes raksturošanai, var noteikt dažādas mijiedarbības starp izšķīdušo vielu un sorbentu, piemēram, hidrofobās, telpiskā izmēra un jonu mijiedarbības (skat. 1.15. att.). Šo kolonnu testēšanas metodi plaši izmantojis un pētījis *Snaiders* ar līdzautoriem [71-76].



1.15. att. Izšķīdušās vielas un sorbenta mijiedarbību shematisks attēlojums [71, 72]

Modeļos balstītās novērtēšanas metodes. AEŠH izmanto divu veidu eluēšanas apstākļus: izokrātiskos vai gradienta. Izokrātiskos apstākļos analīzes laikā organiskā šķīdinātāja koncentrācija kustīgajā fāzē ir nemainīga, savukārt, gradienta apstākļos - analīzes laikā kustīgās fāzes sastāvs mainās [77]. Izokrātiskie apstākļi ir piemēroti savienojumiem ar līdzīgu polaritāti, savukārt, gradienta apstākļus izmanto maisījumiem, kuri satur dažādas polaritātes savienojumus [78]. Gradients profils [79] var būt lineārs vai sastāvēt no vairākām atsevišķām stadijām - multilineārs [80].

Multilineāra gradienta profilu izmanto sarežģītiem kompleksiem paraugiem, piemēram, dabas paraugiem [81]. Attēlā 1.16. parādīta 19 aminoskābju atvasinājumu atdalīšana, izmantojot dažādus gradienta profilus. No 1.16. attēla ir redzams, ka lineārais gradients nenodrošina pilnīgu komponentu 7, 8, 9 un 16, 17, 18, 19 atdalīšanu. Savukārt, izmantojot trilineāros gradientus ir izdevies panākt komponentu 16, 17, 18 un 19 atdalīšanu šajos hromatogrāfiskajos apstākļos (1.16. att. c, d). Komponentus 7, 8 nav izdevies atdalīt ne ar vienu gradienta profilu. Lai panāktu pilnīgu visu maisījuma komponentu atdalīšanu, nepieciešama gradienta profila optimizācija.



1.16. att. 19 aminoskābju atvasinājumu atdalīšana, izmantojot lineāro (a), bilineāro (b) un trilineāro (c un d) gradientu, 214nm [81]

Metodes optimizācija ir svarīga AEŠH metodes izstrādes stadija. Viena no pieejām optimizēt hromatogrāfiskos apstākļus ir veikt dažādus eksperimentālus mēģinājumus, bet tas ir laikietilpīgs un bieži vien neefektīvs process. Cita pieeja optimizēt hromatogrāfiskos apstākļus izmantojot datorsimulācijas, kas ļauj paredzēt savienojumu izdalīšanās laikus [82]. Dažas datorprogrammas, kuras tiek lietotas hromatogrāfisko apstākļu optimizācijai: *DryLab*, *Preopt-W*, *Osiris* un *ChromSword* [83].

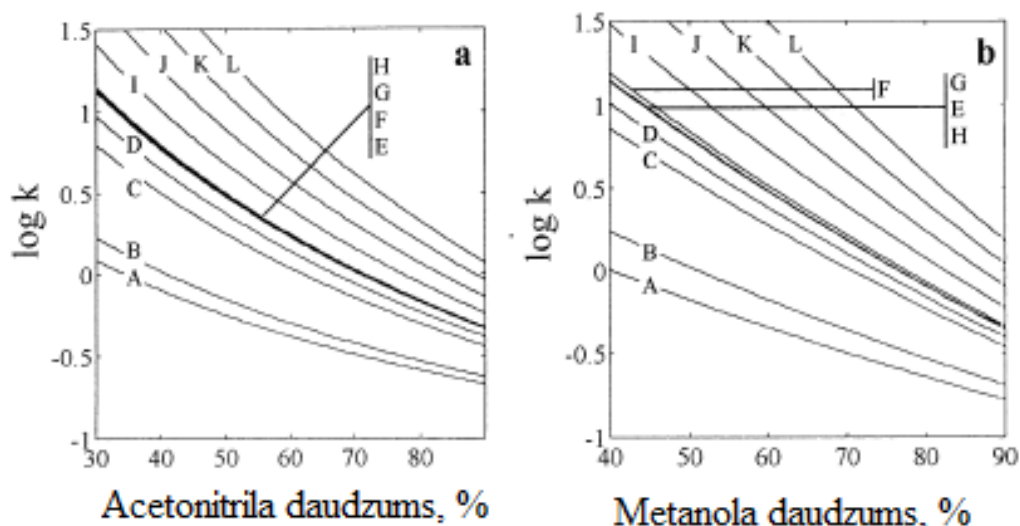
Polinomu modeļi. Izokrātiskos apstākļos analizējamo paraugu sorbciju var paredzēt, izmantojot polinomu modeli starp logaritmu no sorbcijas koeficienta (k) un organiskā modifikatora daudzuma kustīgajā fāzē (φ) sistēmā ūdens-organiskais modifikators. Vienādojumā ir attēlots kvadrātiskais polinoms [41, 50, 57]:

$$\log k = c_0 + c_1\varphi + c_2\varphi^2 \quad (1.14.)$$

Šaurā organiskā šķīdinātāja diapazonā (ja, $\Delta\varphi=0,3$) lineārā sakarība var dot diezgan precīzus rezultātus sorbcijas paredzēšanai (parasti izmanto, ja $1 < k < 10$). Vienādojumā ir attēlots lineārais polinoms [84, 85]:

$$\log k = c_0 + c_1\varphi \quad (1.15)$$

kur c_1 – regresijas koeficients, kurš raksturo katru analizējamo paraugu un kolonna/kustīgā fāze sistēmu. Izokrātiskos apstākļos biežāk tiek izmantots kvadrātiskais polinoms [86], jo šo modeli [87] var lietot plašā organiskā šķīdinātāja koncentrāciju diapazonā (skat. 1.17. att.).



1.17. Att. 4-Hidroksiacetofenona (A), 3-hidroksiacetofenona (B), acetofenona (C), 2-hidroksiacetofenona (D), 4-metilacetofenona (E), propiofenona (F), 3-metilacetofenona (G), 2-metilacetofenona (H), butirofenona (I), valerofenona (J), 1-fenil-heksanons-1 (K) un 1-fenil-heptanons-1 (L) log k atkarība no a) acetonitrila, b) metanola koncentrācijas kustīgajā fāzē, 254nm [88]

LSEER modelis. Izšķīdušas vielas – šķīdinātāja mijiedarbības var aprakstīt ar solvatācijas parametru modeli. *Abrahams LSEER* modeli attiecināja uz hromatogrāfiskajām sistēmām, kur sorbcijas koeficienta logaritms ir saistīts ar specifisko iedarbību summu izteiksmē:

$$\lg k = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1.16)$$

kur E, S, A, B, V – izšķīdušās vielas koeficienti (E - molekulārā refrakcija, S - šķīduma dipolaritāte/polarizējamība, A un B summārais ūdeņraža saišu skābums un bāziskums, V – McGowan tilpums (cm³/mol)/100)) un c, e, s, a, b, v – šķīdinātāja koeficienti (e – koeficients atspoguļo dispersijas un indukcijas ietekmi, s – raksturo polaritātes un polarizācijas atšķirības, a un b parāda ūdeņraža donoro saišu (“*hydrogen-bond donor*”) un ūdeņraža saišu (“*H-bonds*”) atšķirības, v – raksturo dobumu veidošanos atšķirības, c – raksturo apzīmē atlkušos procesus, kuri nav ietverti pirmajos piecos koeficientos) [89, 90].

Ar šī modeļa palīdzību var ļoti vienkārši paredzēt sorbciju izokrātiskos apstākļos, ja vielām ir zināmi koeficienti (E, S, A, B, V). Sistēmas konstantes var aprēķināt, izmantojot daudzfaktoru lineārās regresijas analīzi [85]. Gradianta apstākļos *LSEER* modeļa izmantošana ir ierobežota lieto tikai lineāra gradianta apstākļos [85]. *LSEER* modeli sorbcijas paredzēšanai pārsvarā izmanto neitrāliem savienojumiem, kuriem ir zināmas vielu īpašības, piemēram benzolam [85-94], naftalīnam [92-94], anilīnam [90, 85, 94], acetofēnam [85, 90], fenolam [91-95] u.c. Jaunām vielām šīs īpašības nav zināmas un tās ir jānosaka eksperimentāli. Ir nepieciešams liels eksperimentu skaits, lai aprakstītu dažādu kolonnu raksturlielumus plašā

organisko šķīdinātāju koncentrāciju apgabalā. Tas apgrūtina modeļa izmantošanu dažādos eksperimentālos apstākļos.

Lai paredzētu jonizējamu savienojumu sorbciju noteiktos hromatogrāfiskos apstākļos, tiek izmantots modificētais *LSE*R modelis:

$$\lg k = c + eE + sS + aA + bB + vV + dD \quad (1.17)$$

D aprēķina pēc formulas:

$$D = \frac{10^{pH-pK_a}}{(1+10^{pH-pK_a})} \quad [94]. \quad (1.18)$$

Lai modeli varētu izmantot jonizētu savienojumu sorbcijas paredzēšanai, jāzina šo savienojumu pK_a vērtības, kas jauniem savienojumiem nav zināmas un ir jānosaka eksperimentāli. Literatūras avotos [96, 97] izmanto *LSE*R modeli dažādu jonizētu savienojumu sorbcijas paredzēšanai, piemēram, 2-nitrobenzoscābei, benzoscābei, 2,6-dietilanilīns, 4-nitrobenzoscābei u.c.

Solvātu sorbcijas modelis. Sorbcijas un selektivitātes aptuvenai noteikšanai var lietot hromatogrāfiskās sistēmas divu slāņu nepārtraukto modeli. Modificētā sorbenta virsma ir apgrieztās fāzes AEŠH virsmas slānis (VS), kurš sastāv no oktadecilgrupām un kustīgās fāzes sastāvdaļām; analizējamā parauga molekulas iespiežas virsmas slānī [98]. Sorbcijas koeficientu aprēķina, izmantojot formulu:

$$\ln k = a(V)^{2/3} + b(\Delta G_w) + c \quad (1.19)$$

kur V ir analizējamā parauga parciālais mola tilpums (cm^3/mol); ΔG_w ir analizējamā parauga mijiedarbības enerģija ar ūdeni (kJ/mol); a , b un c ir parametri, kurus nosaka apgrieztās fāzes sorbents ar izmantoto kustīgo fāzi. Izmantojot savienojuma struktūru ar datorprogrammas palīdzību var izrēķināt V un ΔG_w . Parametrus a , b un c var noteikt kalibrējot kolonnu ar references standartiem [99, 100]. Var izmantot šādu metodi sorbcijas parametra noteikšanai.

$$\ln k = \frac{-\Delta G}{RT} + \phi \quad (1.20)$$

kur ϕ ir fāžu attiecība [98, 100].

LSST modelis. Vienādojums, kas apraksta LSST modeli:

$$\ln k' = \ln k'_w - S\phi,$$

kur S izšķīdušās vielas jutīgums pret kustīgas fāzes izmaiņām, $\ln k'_w$ - ekstrapolētais sorbcijas faktors ūdenī.

S aprēķināšanai izmanto šādu formulu [101]:

$$S = \frac{b \cdot t_G}{t_0 \cdot \Delta\varphi}; \quad (1.21.)$$

kur b – gradienta stāvums, t_0 – nesorbējošās vielas izdalīšanās laiks, t_D – sajaukšanās laiks (*dwel time*). Lai aprēķinātu gradienta sorbcijas koeficientu (k^*), nepieciešams iegūt eksperimentālos datus, lietojot divus dažādus gradienta profilus. Tie atšķiras ar gradienta laiku (t_{G1} un t_{G2} ($t_{G1} < t_{G2}$), $\beta = t_{G2}/t_{G1}$). No pirmā eksperimenta iegūst t_{R1} , no otrā - t_{R2} un b vērtību aprēķina ar šādas formulas palīdzību [46]:

$$b = \frac{t_0 \cdot \log \beta}{t_{R1} - (t_{R2} / \beta) - (t_0 + t_D)(\beta - 1) / \beta} \quad (1.22.)$$

kur b – gradienta stāvums, t_0 – nesorbējošās vielas izdalīšanās laiks, t_D – sajaukšanās laiks (*dwel time*).

Gradienta sorbcijas koeficientu (k^*) aprēķina pēc šādas formulas:

$$k^* = \frac{0.87 t_G F}{V_m \Delta\varphi S}; \quad (1.23.)$$

kur V_m ir kolonnas brīvais tilpums (ml), gradienta laiks t_G , plūsmas ātrums F un organiskā šķīdinātāja koncentrācijas izmaiņa kustīgajā fāzē $\Delta\varphi$ [102, 103] Proteīnu un peptīdu analīzēm izmantotajām kolonnām nav izstrādātas specifiskas raksturošanas metodes.

1.4. Piena proteīnu noteikšana ar AEŠH metodi

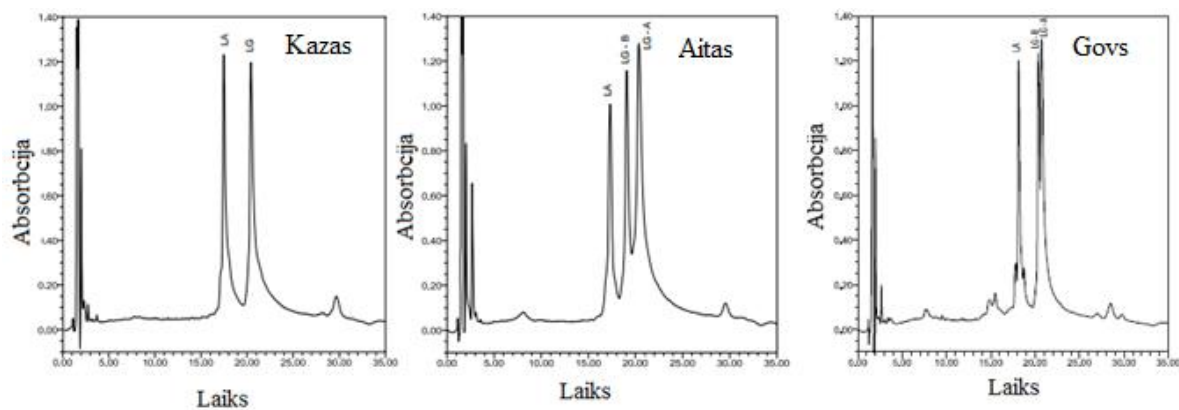
Proteīnu noteikšana piena paraugos. Proteīnu kvantitatīvā daudzuma noteikšana pienā ir svarīga, jo ar tās palīdzību var pierādīt piena “viltojumu” [104]. β -Laktoglobulīnu var izmantot kā indikatoru, lai noskaidrotu kāds pasterizācijas veids ir izmantots pienam (β -laktoglobulīnu denaturācija notiek >60 °C vai pie pH $>8,6$) [104]. Starptautiskā piensaimniecību federācija ir noteikusi minimālo β -laktoglobulīna saturu pasterizētā pienā 2600 mg/L, pasterizētā augstā temperatūrā (HTST) – 2000 mg/L un pasterizētā īpaši augstā temperatūrā (UHT) – 50 mg/L [105].

Piena pārstrādes veidi:

- 1) Pasterizēšana augstā temperatūrā – 127 °C 1-5 sekundes,
- 2) pasterizēšana (šo metodi lieto pārsvarā) 72-75 °C 15-30 sekundes,
- 3) UHT piens 135° C 2 sekundes [106].

Proteīnu noteikšanai pienā var izmantot gēla elektroforēzi, kapilāro elektroforēzi vai šķidrums hromatogrāfiju. Starptautiskā piensaimniecību federācija piena proteīnu noteikšanai ir ieteikusi lietot AEŠH metodi ar UV detektoru [104, 107, 108]. Attēlā 1.18. parādīta piena proteīnu atdalīšana, lietojot AEŠH metodi. β -Laktoglobulīnam ir trīs ģenētiskie varianti: β -Lg A, β -Lg B un β -Lg C. β -Lg A un β -Lg B atšķiras ar vienu aminoskābi 20. pozīcijā (Histidīnu un Tirozīnu), bet β -Lg C atšķiras no β -Lg A ar 148 pozīciju (arginīnu un glutamīnu). Izpētot literatūras avotus par β -laktoglobulīna noteikšanu piena paraugos, izrādījās, ka β -Lg A un β -Lg B joslas netiek pilnīgi atdalītas līdz bāzes līnijai un to daudzumu nosaka, summējot laukumus β -Lg A un β -Lg B.

Literatūras avotā [104] ir analizēti kazas, aitas un govju piena paraugi (skat. 1.18. att.). Nosakot β -laktoglobulīna B un β -laktoglobulīna A attiecību piena paraugā var noteikt piena tipu (kazas, govju vai aitas). Govju piens satur vismazāk β -laktoglobulīna attiecīgi (3,07 g/L). Visvairāk β -laktoglobulīnu satur aitas piens (5,97 g/L). α -Laktalbumīnu aitas piens satur vairāk nekā kazas vai govju piens (attiecīgi 1,80 g/L, 1,27 g/L un 1,16 g/L). Kazas piens praktiski nesatur β -laktoglobulīnu B, (govju pienā tas ir 1,19 g/L, aitas pienā ir 1,80 g/L).



1.18. att. α -Laktalbumīna un β -laktoglobulīna hromatogrammas dažādos piena paraugos. Kolonna *XBridge™ C18*, 150x3,0 mm, 3,5 μ m, kustīgā fāze: acetonitrils/ūdens/0,1% TFA gradienta režīms, 40 °C, F=0,4 ml/min

1.5. Secinājumi

1. Lai varētu izvēlēties piemērotas kolonnas konkrēta maisījuma atdalīšanai, nepieciešams tās klasificēt pēc īpašībām, kuras var noteikt hromatogrāfiski: kolonnas efektivitātes, hidrofobitātes, selektivitātes, silanolgrupu aktivitātes, jonu apmaiņas spējas un polārām mijiedarbībām.
2. Kolonnu īpašības var novērtēt, izmantojot empīriskās vai modeļos balstītās metodes.
3. Proteīnu atdalīšanai biežāk izmanto mazāk hidrofobas kolonnas, kurās sorbenta virsma modificēta ar īsākām alkilķēdēm ($-C_3H_7$; $-C_4H_9$; $-C_5H_{11}$). Izmanto arī kolonnas uz polimēru bāzes. Proteīnu analīzei izmanto sorbentus, kuru poru izmēri pārsniedz 300 Å.
4. Visbiežāk lietotais organiskais šķīdinātājs proteīnu analīzēs ir acetnitrils, bet izmanto arī izopropanolu, etanolu un metanolu. Trifluoretiķskābe ir visplašāk lietotā kustīgās fāzes piedeva.
5. Balstoties uz iegūto informāciju par faktoriem, kuri ietekmē proteīnu sorbciju, tiks izvēlēti piemēroti sorbenti, organiskie šķīdinātāji, kustīgās fāzes piedeva, temperatūras režīms, lai izpētītu proteīnu sorbciju apgrieztās fāzes augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas apstākļos.

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Izmantotā aparatūra, reaģenti un analizējamās vielas

Izmantotā aparatūra.

- *Agilent* hromatogrāfs (ražotājvalsts – ASV):
 - detektors –*Infinity* 1290DAD
 - sūknis –*Infinity* 1290 ar automātisko paraugu ievadišanu,
 - Datu apstrādes sistēma *Agilent ChemStation*;
 - Hromatogrāfijas metožu izstrādes vide *ChromSword Auto 5.0 Professional*;
- Analītiskie svāri *Precisa 32324* ($d = \pm 0,0001$ g).

Izmantotie reaģenti un analizējamās vielas.

Acetonitrils	99,9%, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. 34851 (ASV)
Albumīns	≥96%, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. A2153 (ASV) Liellopa seruma albumīns
Aprolinīns	SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. A1153 (ASV), Aprolinīns no liellopu plaušām
Citohroms C	95 %, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. C2506 (ASV), Citohroms C no zirgu sirds
Enolāze	95 %, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. E6126 (ASV), Enolase no maizes rauga
Elastāze	95 %, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. SCP0249 (ASV), Aizkuņģa dziedzera elastāzes substrāts
Fosforskābe	85%, ACS, Acros Organics, kat. Nr. 424045000 (Beļģija)
L-Glutamīnskābes dehidrogenāze	95 %, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. G2501 (ASV), L-Glutamīnskābes dehidrogenāze no liellopu aknām
Insulīns	SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. I2643 (ASV), Cilvēka insulīns
Ogļskābes anhidrāze	≥85%, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. C2624 (ASV), Ogļskābes anhidrāze no liellopu eritrocītiem
α-Laktalbumīns	≥85 %, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. L5385 (ASV), α-Laktalbumīns no liellopu piena
β-Laktoglobulīns	≥90 %, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. L3908 (ASV), β-Laktoglobulīns no liellopu piena
Lizocīms	≥90 %, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. L6876 (ASV), Lizocīms no vistu olu baltuma
Kālija hidroģenfosfāts bezūdens	Anal. tīrs, PENTA CHEMICALS, kat. Nr. K-2130 (Čehija)
Metanols	99,9 %, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. 34885 (ASV)
Mioglobīns	≥90 %, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. M1882 (ASV)
Peroksidāze	SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. 77332 (ASV), Peroksidāze no mārrutkiem

Piens Nr. 1	Pasterizēts govus piens, 2%, (Latvija)
Piens Nr. 2	Pasterizēts UHT kazas piens, pilnpiens, 3,3% (Beļģija)
Piens Nr. 3	Pasterizēts UHT govus piens, 2% (Polija)
D-Pienskābes dehidrogenāze	SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. L3888 (ASV)
Ribonukleāze	≥70 %, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. R6513 (ASV), Ribonukleāze A no liellopu aizkuņģa dziedzera
2-Propanols	99,9 %, SIGMA-ALDRICH, kat. Nr. 34863 (ASV)
Sālsskābe	2mol/L, TCI Europe, kat. Nr. H1203 (Japāna)
Trifluoretiķskābe	99%, PENTA CHEMICALS, kat. Nr. T-4390 (Čehija)

2.2. Kustīgo fāžu un analizējamo paraugu pagatavošana

Kustīgo fāžu šķīdumu pagatavošana.

Šķīdums A kanālam: 500 mL mērkolbā ielej aptuveni 100 mL dejonizēta ūdens, kuram pievieno 500 µL TFA un atšķaida līdz atzīmei, tādējādi iegūstot kustīgo fāzi ar 0,1% TFA un ūdens tilpumu attiecību.

Šķīdums B kanālam:

- 500 mL mērkolbā ielej aptuveni 100 mL acetonitrila, kuram pievieno 500 µL TFA un atšķaida līdz atzīmei, tādējādi iegūstot kustīgo fāzi ar 0,1% TFA un acetonitrila tilpumu attiecību.
- 500 mL mērkolbā ielej aptuveni 100 mL metanola, kuram pievieno 500 µL TFA un atšķaida līdz atzīmei, tādējādi iegūstot kustīgo fāzi ar 0,1% TFA un metanola tilpumu attiecību.
 - 500 mL mērkolbā ielej aptuveni 100 mL 2-propanola, kuram pievieno 500 µL TFA un atšķaida līdz atzīmei, tādējādi iegūstot kustīgo fāzi ar 0,1% TFA un 2-propanola tilpumu attiecību.

Proteīnu standartu pagatavošana. Katrs no 15 (skat. 2.1. tabulu) proteīnu paraugiem (2-3 mg) tika šķīdināts 5ml dejonizēta ūdens un izmantots hromatogrāfiskai analīzei. Ar katru proteīnu tika veikti 3-4 eksperimenti ar dažādiem gradienta profiliem (2.4. tabula). Izmantotajiem proteīnu šķīdumiem tika noteikta stabilitāte šķīdumā 50% acetonitrils/50%ūdens/0.1%TFA pētītie proteīni neizgulsnējās.

Fosfāta buferšķīduma pagatavošana. Nosver 8,71 g K_2HPO_4 un pārnes 500 ml mērkolbā, pievieno dejonizētu ūdeni, izšķīdina un atšķaida līdz atzīmei. Iegūtajam buferšķīdumam ar fosforskābi ieregulē pH 6,7.

Piena paraugu pagatavošana.

10 ml piena pārnes 20 ml penicilīna pudelītē, pievieno 2 M salskābes līdz pH 4,6. Iegūto šķīdumu pārnes 15 ml centrifugējamās mēģenēs. Centrifugē 20 min ar 4000 apgriezieniem. Piena paraugu pagatavošanas metodes apraksts izmantots no literatūras avotu [104].

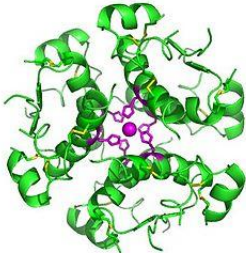
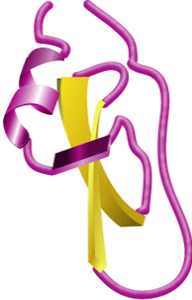
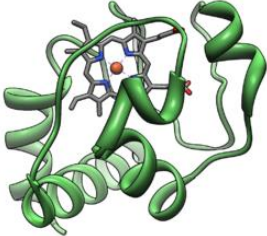
Piens Nr. 1 100 µl piena sūkalu šķīduma pārnes autoinjektora pudelītēs (2 ml) un pievieno 1000 µl fosfāta buferšķīduma (100 mM pH=6,7).

Piens Nr. 2 un Piens Nr. 3 100 µl piena sūkalu šķīduma pārnes autoinjektora pudelītēs (2 ml) un pievieno 500 µl fosfāta buferšķīdumu (100 mM pH=6,7).


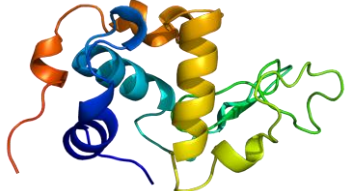
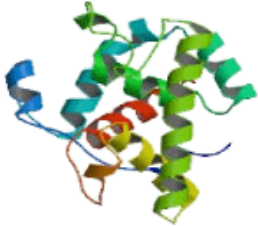
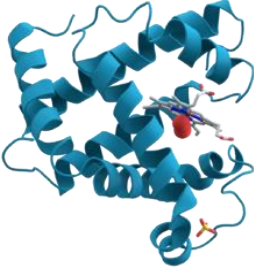
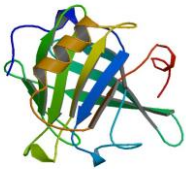
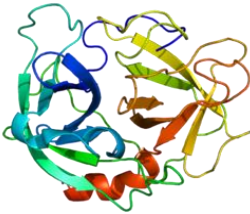
Visus piena sūkalu paraugus nofiltrē, izmantojot 0,45 µm celulozes filtrus.

2.1. tabula




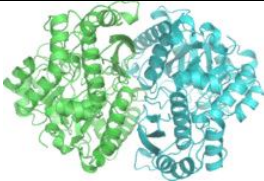
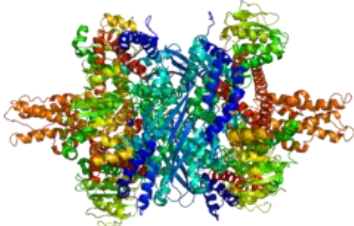
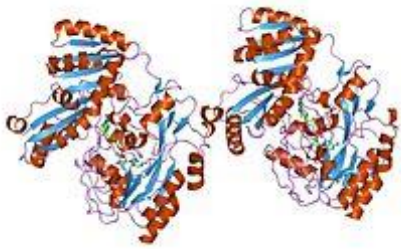
Proteīnu numerācija, nosaukums un molekulārā masa

Nr.p.k.	Proteīnu nosaukums	Molekulārā masa, Da	Proteīnu shematisks 3D attēlojums
1	Insulīns	5800	
2	Aprotinīns	6500	
3	Citohroms C	12400	

2.1. tabulas turpinājums

4	Ribonukleāze A	13700	
5	α -Laktalbumīns	14200	
6	Lizocīms	14400	
7	Mioglobīns	17700	
8	β -Laktoglobulīns	18400	
9	Elastāze	25900	

2.1. tabulas turpinājums

10	Ogļskābes anhidrāze	29100	
11	Peroksidāze	44000	
12	Albumīns	66500	
13	Enolāze	93000	
14	L-Glutamīnskābes dehidrogenāze	290000	
15	D-Pienskābes dehidrogenāze	140000	

2.3. Hromatogrāfiskās analīzes apstākļi

2.2. tabula

Pētījumā izmantotās apgrieztās fāzes kolonnas*

Nr.p.k.	Kolonnas nosaukums	Ražošanas gads
1	<i>Poroshell 300Extend-C18, 5μm</i> (Kanāda)	2011
2	<i>Poroshell 300SB-C18, 5μm</i> (Kanāda)	2011
3	<i>Poroshell 300SB-C8, 5μm</i> (Kanāda)	2011
4	<i>Poroshell 300SB-C3, 5μm</i> (Kanāda)	2011
5	<i>Zorbax 300Extend-C18, 3,5μm</i> (Kanāda)	2012
6	<i>Zorbax 300SB-C18, 1,8μm</i> (Kanāda)	2011
7	<i>Zorbax 300SB-C8, 1,8μm</i> (Kanāda)	2011
8	<i>Zorbax 300SB-C3, 1,8μm</i> (Kanāda)	2011
9	<i>Zorbax 300Diphenyl, 1,8μm</i> (Kanāda)	2011
10	<i>Zorbax 300SB-CN, 3,5μm</i> (Kanāda)	2009
11	<i>PLRP-S 300 A, 3μm</i> (Kanāda)	2012
12	<i>PLRP-S 1000 A, 5μm</i> (Kanāda)	2012
13	<i>PLRP-S 4000 A, 5μm</i> (Kanāda)	2012
14	<i>YMC-Pack C4, 5μm</i> (Kanāda)	2011
15	<i>YMC-Pack Protein-RP, 5μm</i> (Kanāda)	2011

* visas izmantotās kolonnas bija jaunas.

Ražotāji proteīnu analīzēm pārsvarā piedāvā dažādas -C18 kolonnas (skat. 1.2. tab.).

Literatūrā iesaka izvēlēties -C3, -C4,-C8 kolonnas.

2.3. tabula

Izmantoto kolonnu fizikālās īpašības

Kolonnas numurs*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Daļiņu lielums, μm	5	5	5	5	3,5	1,8	1,8	1,8	1,8	3,5	3	5	5	5	5
Poru izmērs, Å	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	1000	4000	300	300
Īpatnējais virsmas laukums, m^2/g	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	-	-	-	-	-
Papildu silanolgrupu derivatizācija	Jā	Nē	Nē	Nē	Jā	Nē	Nē	Nē	Nē	Nē	-	-	-	Nē	Nē
Sorbents	Si-18	Si-C18	Si-C8	Si-C3	Si-18	Si-C18	Si-C8	Si-C3	Si-Diphenyl	- (CH_2) CN	Polistirola un divinilbenzola sfēriskas daļiņas			Si-C4	Si-C4
Kolonnas garums, mm	75	75	75	75	50	50	50	50	50	50	50	50	50	150	150
Kolonnas diametrs, mm	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	4,6	2,1	2,1	2,1	4,6	4,6
Kolonnas brīvais tilpums, ml	0,26	0,26	0,26	0,26	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,83	0,17	0,17	0,17	2,49	2,49

* - Kolonnas numuram atbilstošo kolonnas nosaukumu skat. 2.2. tabulā.

- Kustīgā fāze: Šķīdums A/šķīdums B (attiecības skat. 2.4. tab.).
- Kolonnas temperatūra: 45 °C (priekš *YMC Pack-C4* un *YMC-Pack Protein-RP* kolonnām) vai 60 °C (*Poroshell*, *Zorbax* un *PLRP-S* kolonnām).
- Plūsmas ātrums: 0,150 ml/min; 0,200 ml/min; 0,350 ml/min; 0,500 ml/min un 1 mL/min.
- Detektors: UV absorbcija, $\lambda = 210$ nm.
- Inžekcijas tilpums: 20 μ L.

Hromatogrāfiskie apstākļi piena paraugiem:

- Kustīgā fāze: Ūdens/acetonitrils/0,1%TFA
- Izmantotā kolonna: *YMC Pack-C4*
- Kolonnas temperatūra: 40°C
- Plūsmas ātrums: 1 ml/min;
- Detektors: UV absorbcija, $\lambda = 210$ nm.
- Injekcijas tilpums: 20 μ L.
- Gradients režīms: 0-10,9 min/0-36% B, 10,9-29,9 min/36%-43% B; 29,9-35 min/43% B

2.4. tabula

Izmantotie gradienta profili

Organiskais šķīdinātājs	Kolonnas nosaukums	Gradients profils, (organiskā šķīdinātāja izmaiņas kustīgajā fāzē, %)	Gradients laiks, min
Acetonitrils	<i>Zorbax 300SB-C18,</i> <i>Poroshell 300SB-C18,</i> <i>Zorbax Extend-C18,</i> <i>Poroshell Extend-C18</i>	30-80	5
		30-80	10
		25-80	5
		25-80	10
Metanols		40-90	5
		40-90	10
		35-90	5
		35-90	10
2-Propanols		10-60	5
		10-60	10
		15-60	5
		15-60	10

Acetonitrils	<i>Zorbax 300SB-C8, Poroshell 300SB-C8, Zorbax 300-C3, Poroshell 300-C3, Zorbax 300SB-CN, Zorbax 300-Diphenyl, PLRP-S 300, PLRP-S 1000, PLRP-S 4000</i>	20-80	5
		20-80	10
		25-80	5
		25-80	10
Metanols		30-90	5
		30-90	10
		25-90	5
		25-90	10
2-Propanols		5-60	5
		5-60	10
		10-60	5
		10-60	10
Acetonitrils	<i>YMC-Pack C4, Protein-RP</i>	20-80	25
		20-80	30
		25-80	25
		25-80	30
Metanols		30-90	25
		30-90	30
		35-90	25
		35-90	30
2-Propanols		5-60	25
		5-60	30
		10-60	25
		10-60	30

2.4. Aprēķinu formulas

Joslas platuma aprēķināšana ($w_{0,5}$) [109].

$w_{0,5}$ – joslu platums pusaugstumā, min.

Joslu izšķiršana.

$$R_s = 1,18((t_{R2} - t_{R1}) / (w_{0,5(1)} + w_{0,5(2)})) \quad (2.1.)$$

kur:

t_{R1} un t_{R2} – izdalīšanās laiks,

$w_{0,5(1)}$ un $w_{0,5(2)}$ – joslu platums pusaugstumā, min.

Sorbcijas koeficients [109].

$$k = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.2.)$$

Proteīnu izdalīšanās laiku teorētisko vērtību aprēķināšana. Lai noteiktu teorētisko. Lai noteiktu teorētisko proteīnu izdalīšanās laiku, ir nepieciešami divi eksperimentāli mērījumi, kurus ievadot programmā *ChromSword* var izrēķināt teorētisko proteīnu izdalīšanās laiku.

$$\ln k' = \ln k_0' + aC, \text{ kur:} \quad (2.3.)$$

k' - sorbcijas koeficients,

C – organiskā šķīdinātāja koncentrācija,

a – koeficients.

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

3.1. Hromatogrāfisko apstākļu un analītu izvēle

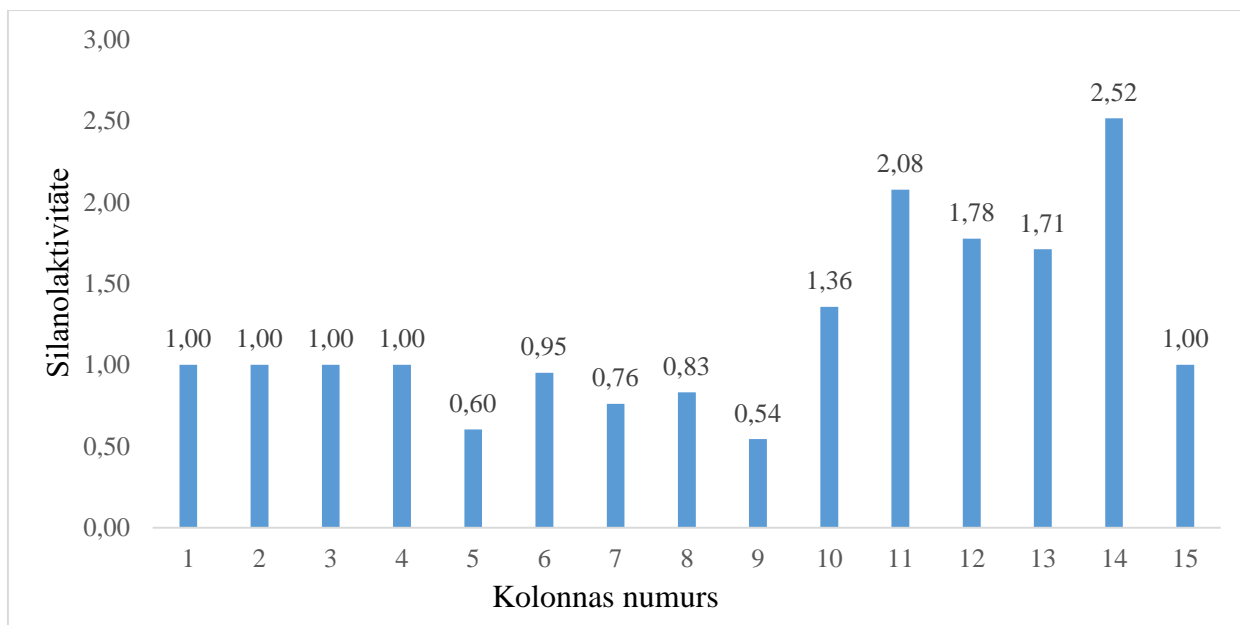
Promocijas darba ietvaros par paraugiem tika izvēlēti dažādi proteīni. Izmantotie proteīni satur dažādas aminoskābes. Piemēram, triptofāns, izoleicīns, fenilalanīns, leicīns, cisteīns, metionīns, valīns, tirozīns, prolīns un alanīns ir hidrofobas aminoskābes. Vienkāršie proteīni (insulīns, aprotinīns, β -laktoglobulīns, elastāze, albumīns) un saliktie proteīni: hemoproteīni (citohroms c, mioglobulīns, peroksidāze), nukleoproteīni (ribonukleāze A, L-glutamīnskābes dehidrogenāze, D-Pienskābes dehidrogenāze) metālus saturošie proteīni (α -laktalbumīns, ogļskābes anhidrāze, enolāze) un glikoproteīns (lisoziīns).

Kolonnas izvēle. Apgrieztās fāzes hromatogrāfijā silikagēlu visbiežāk ķīmiski modificē ar *-C18* grupām, retāk ar *-C4* vai *-C8* grupām, kuras izvēlās īpaši hidrofobu savienojumu gadījumā. Fenil- un $-(CH_2)CN$ grupas var nodrošināt alternatīvu selektivitāti proteīnu atdalīšanai. Sorbcijas procesā svarīgi ir vairāki faktori: relatīvā liganda hidrofobitāte, virsmas pārklājums, ligandu blīvums, oglekļa saturs, brīvās sorbenta virsmas silanolgrupas, bet pilnībā nav saprotams, kādā mērā šie faktori ietekmē proteīnu sorbciju [55].

Izpētot literatūras avotus par proteīnu analīzes iespējām, izmantot augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju tika izvēlēti šādi sorbenti (*-C18*, *-C8*, *-C4*, *-C3*, *-Diphenyl*, $-(CH_2)CN$, polimēru bāzes un *Protein-RP*). Tos raksturo dažāds alkilķēžu garums un atšķirīga ligandu daba. Šādi sorbenti tika izvēlēti, lai būtu iespējams, novērtēt, kā proteīnu sorbciju ietekmē silanolaktivitāte, hidrofobitāte, alkilķēžu garums un liganda daba. Darba mērķa un uzdevumu sasniegšanai tika izvēlēti relatīvi jauni sorbenti, kuri tikai nesen ir komerciāli pieejami un varētu būt perspektīvi proteīnu analīzēm.

Kolonnas salīdzinājums, izmantojot Galuško testu [34]. Šobrīd nav vienota kolonnas testa, ar kura palīdzību tās varētu savstarpēji salīdzināt, padarot vienkāršāku piemērotas kolonnas izvēli. Katrs ražotājs izmanto atšķirīgu testu, ko pievieno kolonnas sertifikātam. Kolonnas salīdzināšanai tiks izmantots *Galuško tests* (hromatogrāfiskos apstākļus skat. 1.3. apakšnodaļā 28.lpp).

Silanolaktivitāte ($-NH_2$ mijiedarbības) ir sorbenta virsmas spēja iedarboties noteiktos hromatogrāfiskos apstākļos ar analītu, kurš satur protonu akceptoru slāpekļa atomu. Attēlā 3.1. parādīta izmantoto kolonnas silanolaktivitāte. Silanolaktivitāte > 1 piemīt kolonnām uz polimēru bāzes kā arī $-(CH_2)CN$ un *-C4* kolonnām.



3.1. att. Silanolaktivitāte *Poroshell* Nr. 1 – 4, *Zorbax* Nr. 5 – 10, *PLRP-S* Nr. 11 – 13, *YMC-Pack* Nr. 14 un Nr. 15 (kolonnu numerāciju skat. 2.2. tab.) (Izdalīšanās laikus un sorbcijas koeficientus skat. 3.1. tab.)

Piemēram, polimēru bāzes kolonnām silanolaktivāte ir augstāka nekā *Zorbax* vai *Poroshell* kolonnām (skat. 3.2. att.).

3.1. tabula

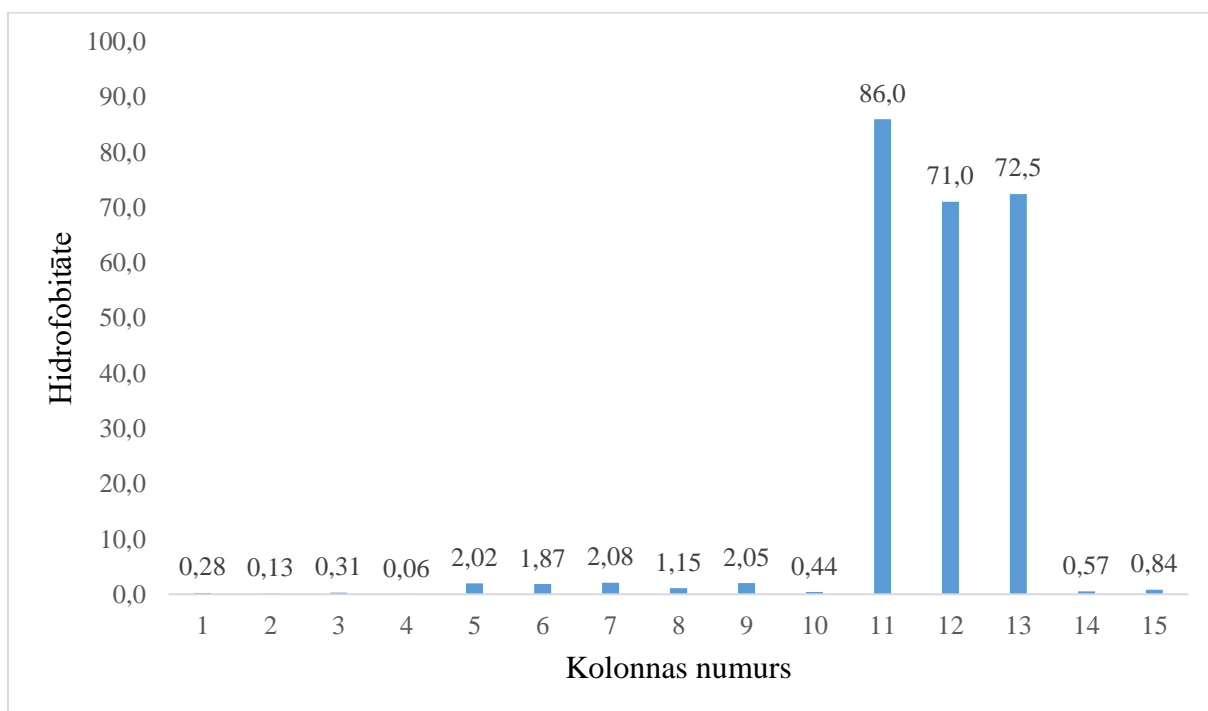
Anilīna, fenola, toluola un benzola izdalīšanās laiks, sorbcijas koeficienti, kustīgā fāze: metanols/ūdens, T=30 °C, 210 nm

Kolonnas nosaukums	anilīns		fenols		toluols		benzols	
	tr, min	k	tr, min	k	tr, min	k	tr, min	k
<i>Poroshell 300Extend-C18, 5μm</i>	0,42	1,63	0,42	1,63	0,21	0,31	0,2	0,25
<i>Poroshell 300SB-C18, 5μm</i>	0,36	1,25	0,36	1,25	0,17	0,06	0,19	0,19
<i>Poroshell 300SB-C8, 5μm</i>	0,41	1,56	0,41	1,56	0,22	0,38	0,2	0,25
<i>Poroshell 300SB-C3, 5μm</i>	0,17	0,06	0,17	0,06	0,16	0,00	0,18	0,13
<i>Zorbax 300Extend-C18, 3,5μm</i>	0,90	1,90	0,99	2,19	0,93	2,00	0,94	2,03
<i>Zorbax 300SB-C18, 1,8μm</i>	0,92	1,97	0,93	2,00	0,79	1,55	0,99	2,19
<i>Zorbax 300SB-C8, 1,8μm</i>	2,04	5,58	2,19	6,06	1,10	2,55	1,10	1,62
<i>Zorbax 300SB-C3, 1,8μm</i>	1,15	2,71	1,20	2,87	0,78	1,52	0,75	0,79

3.1. tabulas turpinājums

<i>Zorbax 300Diphenyl, 1,8μm</i>	1,37	3,42	1,56	4,03	1,17	2,77	0,98	1,33
<i>Zorbax 300SB-CN, 3,5μm</i>	0,78	1,52	0,73	1,35	0,38	0,23	0,51	0,65
<i>PLRP-S 300 A, 3μm</i>	32,6	76,62	24,1	56,38	14,1	32,57	59,0	139,5
<i>PLRP-S 1000 A, 5μm</i>	29,0	92,55	23,1	73,52	6,67	20,52	38,0	121,6
<i>PLRP-S 4000 A, 5μm</i>	29,0	92,55	23,5	74,81	6,55	20,13	39,0	124,8
<i>YMC-Pack C4, 5μm</i>	3,22	0,71	2,77	0,47	2,80	0,49	3,10	0,65
<i>YMC-Pack Protein-RP, 5μm</i>	3,00	0,60	3,00	0,60	3,40	0,81	3,50	0,86

Kolonnas raksturošanai tika noteikta arī hidrofobitāte (skat. 3.2. att.).



3.2. att. Hidrofobitāte *Poroshell* Nr. 1 – 4, *Zorbax* Nr. 5 – 10, *PLRP-S* Nr. 11 – 13, *YMC-Pack* Nr. 14 un Nr. 15 (kolonnas numerāciju skat. 2.2. tab.) (Izdalīšanās laikus skat. Pielikumu 1.)

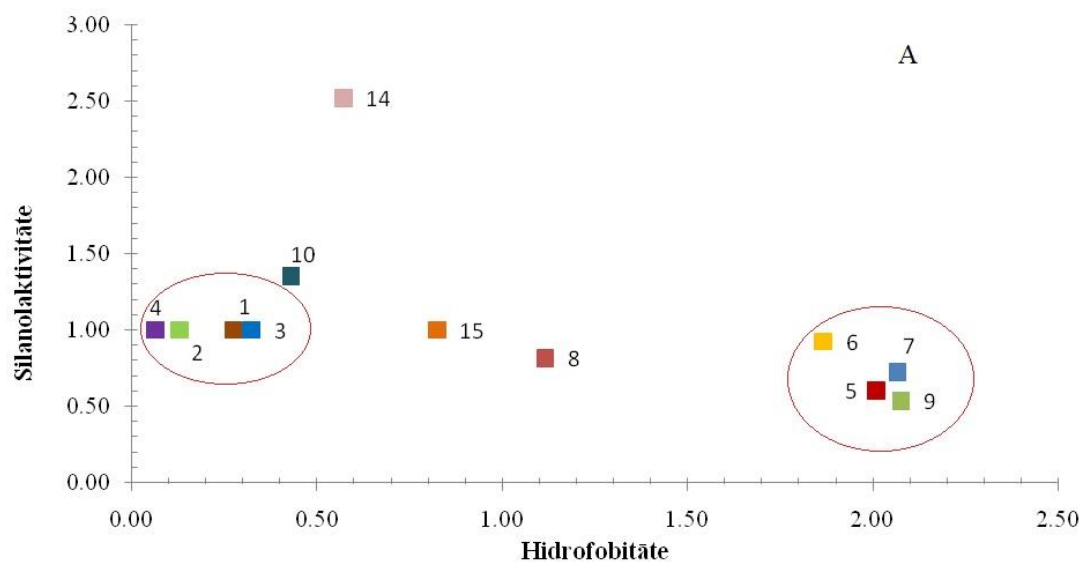
PLRP-S kolonnas sorbenti ir uz polimēru bāzes, sorbenta daļiņas ir hidrofobas un brīvas no silanolu grupām un smago metālu joniem. Šajās kolonnās vielu atdalīšana notiek atbilstoši

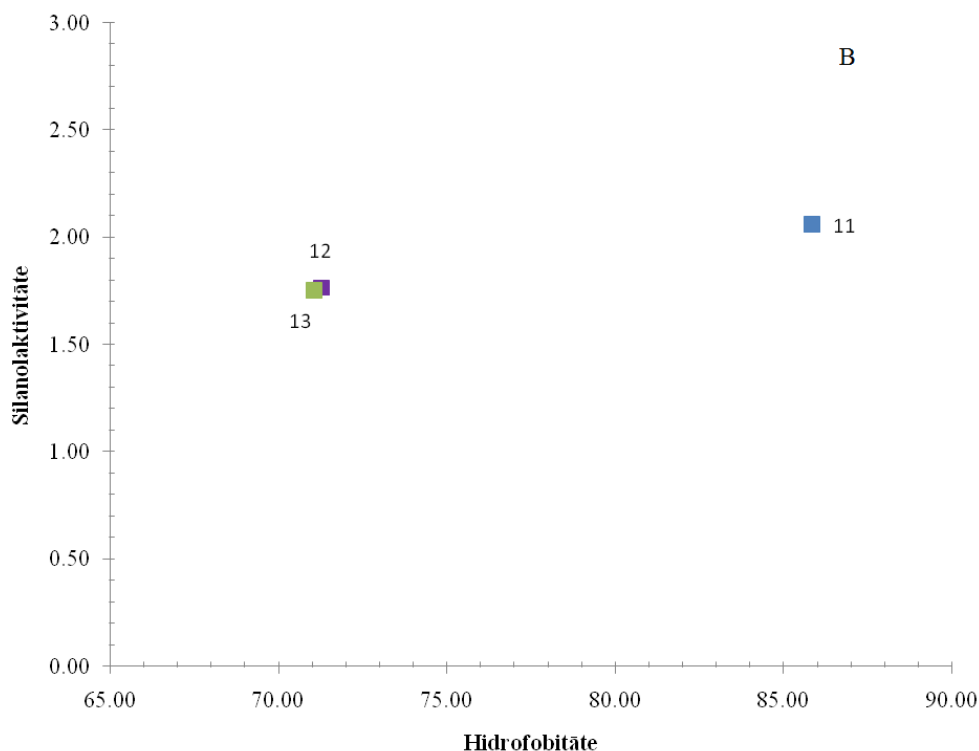
adsorbcijas mehānismam. *PLRP-S* kolonnām piemīt augsta hidrofbītāte ~ 70 , salīdzinot ar uz silikagēla bāzes lietotajām nekustīgajām fāzēm ~ 2 (skat. 3.2. un 3.3. att.).

Savukārt, kolonnām *Poroshell* (Nr. 1 - 4, skat. 2.2. tab.) praktiski nepiemīt hidrofbās īpašības, bet no eksperimentālajiem datiem izriet, ka proteīniem ir novērota sorbcija arī uz šīm kolonnām. Tas norāda, ka proteīnu sorbcija uz sorbenta virsmas notiek ne tikai pateicoties hidrofbām īpašībām, bet arī mijiedarbībām ar sorbenta polārajām grupām (Si-OH), kā rezultātā proteīnus ir iespējams aizturēt un atdalīt.

Sorbenta izvēlei, izstrādājot metodi, vai arī to pārnesot no viena sorbenta uz citu, izmanto silanolaktivitātes/hidrofbītātes kartes (skat. 3.3. att.). Izmantojot šādas kartes, ir vieglāk izvēlēties kolonnas ar krasi atšķirīgām, vai līdzīgām īpašībām, kas ir svarīgi atdalīšanas selektivitātes novērtēšanai. Piemēram, kolonnas *Zorbax 300Extend-C18* (5), *Zorbax 300SB-C18* (6), *Zorbax 300SB-C8* (7) un *Zorbax 300Diphenyl* (9) šajā ziņā ir līdzīgas. Kā arī *Poroshell* kolonnas ir līdzīgas (skat. 3.3. att.).

Savukārt *PLRP* polimēru bāzes grupas kolonnas ir krasi atšķirīgas no pārējām hidrofbītātes ziņā. *PLRP-S 1000* un *PLRP-S 4000* ir hidrofbītātes un silanolaktivitātes ziņā ir līdzīgas savā starpā, *PLRP-S 300* no pārējām polimēra bāzes kolonnām nedaudz atšķiras tai ir augstāka silanolaktivitāte un hidrofbītāte. No 3.3. attēla ir redzams, ka kolonnai *YMC Pack C4* piemīt visaugstākā silanolaktivitāte salīdzinoši ar pārējām kolonnām.

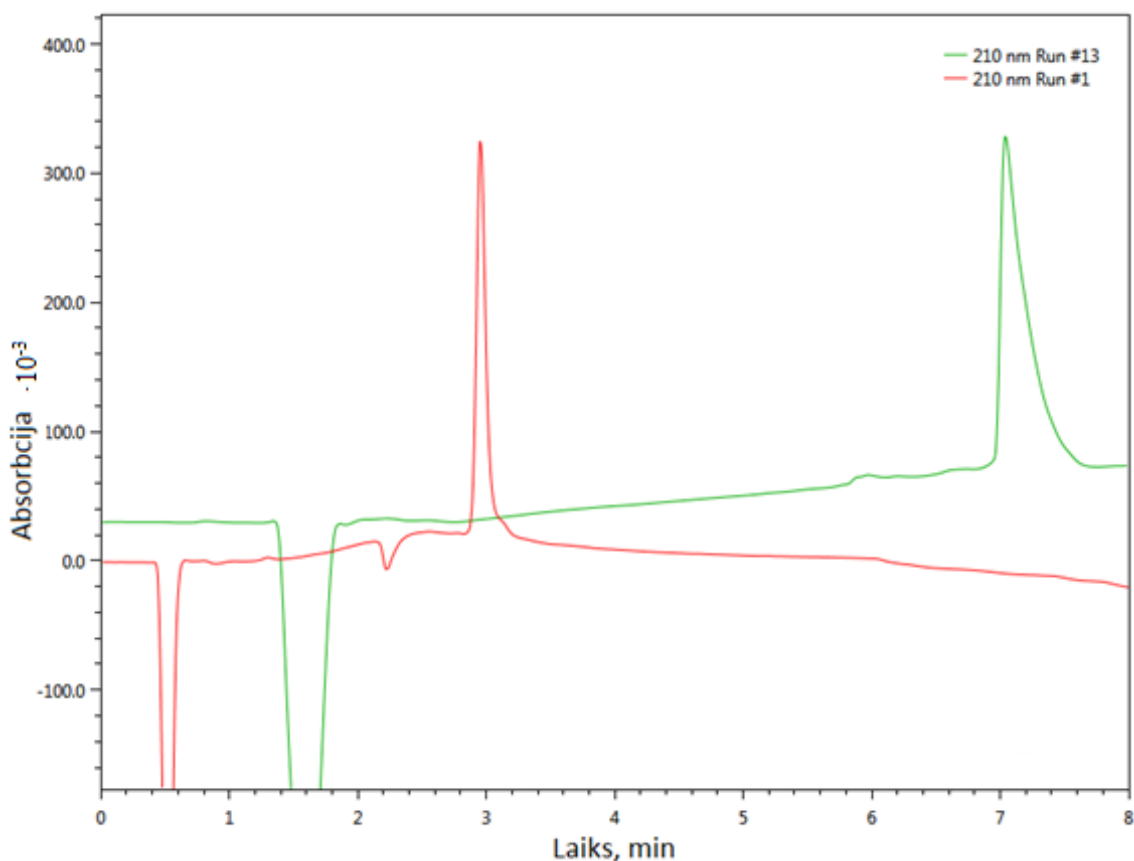




3.3. att. Sorbentu hidrofobitātes un silanolaktivitātes kartes *Poroshell* Nr. 1 – 4 (A), *Zorbax* Nr. 5 – 10 (A), *PLRP-S* Nr. 11 – 13 (B), *YMC-Pack* Nr. 14 un Nr. 15 (A) (kolonnu nosaukumus skat. 2.2. tab.)

Kustīgās fāzes izvēle. Kā kustīgo fāzi proteīnu analīzei iesaka izmantot ūdens/organiskā šķīdinātāja (acetoniitrilu, metanolu vai 2-propanolu)/TFA(trifluoretiķskābes) piedevas maisījumu. Proteīni ir lielmolekulāri savienojumi, kuri ir jutīgi pret organiskā šķīdinātāja krasām izmaiņām kustīgajā fāzē, tāpēc visos eksperimentos tiek izmantots kustīgās fāzes gradienta režīms.

Organiskā šķīdinātāja (acetoniitrila un 2-propanola) ietekme uz mioglobīna joslas platumu kolonnā *Zorbax 300SB-C3* parādīta 3.4. attēlā.



3.4. att. Mioglobīna hromatogramma ar acetonitrilu - sarkanā un 2-propanolu – zaļā. Kolonna *Zorbax 300SB-C3*, kustīgā fāze: acetonitrils/ūdens/0,1%TFA (30-80% 10 min), 2-propanols/ūdens/0,1%TFA (10-60%, 10 min)

No iegūtajām hromatogrammām (skat. 3.4. att.) redzams, ka mioglobīna joslas ir šaurākas, ja izmanto acetonitrilu. Joslu platums pusaugstumā ar acetonitrilu ir 0,076, bet 2-propanola gadījumā tas ir 0,202.

Veicot eksperimentus uz dažādām kolonnām tika novērots, ka proteīnu joslas ir platas ($w_{0,5} > 0,12$), ja tiek izmantots 2-propanols kā kustīgās fāzes organiskais šķīdinātājs. Iespējams, izmantojot 2-propanolu proteīnu molekulas ir atlocītā veidā, zaudējušas savu sākotnējo struktūru.

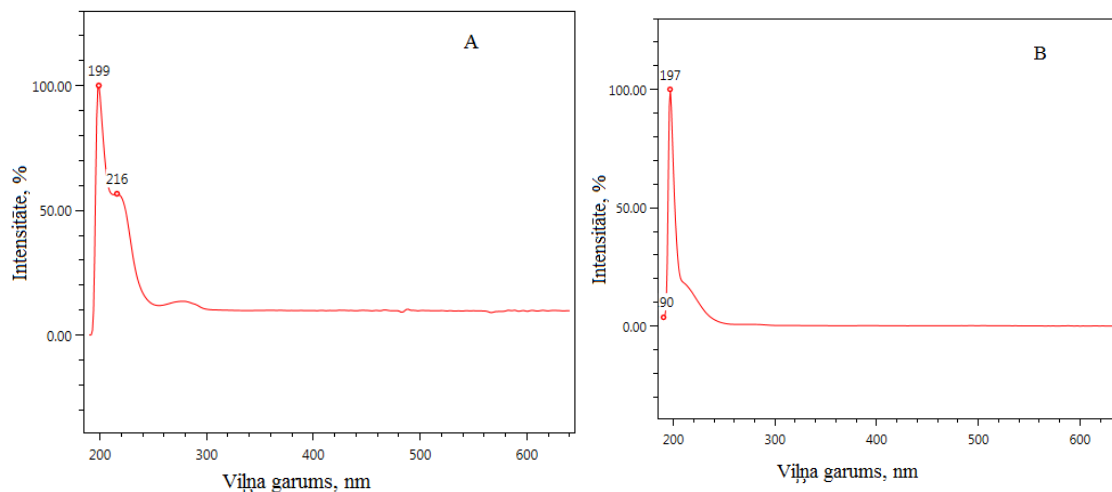
Viens no molekulārās bioloģijas jautājumiem ir saistīts ar proteīnu dažādu konformāciju un telpisko struktūru izmaiņu (“folding”). Ir zināms, ka dažādi proteīni var veidot telpiski ļoti līdzīgas struktūras [110]. Tiek uzskatīts, ka hidrofobitāte ir viens no galvenajiem spēkiem, kas liek proteīnu molekulām ieņemt vienu vai citu telpisko struktūru [110].

Šī darba ietvaros proteīnu sorbcija vairāk pētīta, izmantojot acetonitrilu un metanolu, bet daži eksperimenti tika veikti, izmantojot 2-propanolu.

Jāņem vērā, ka izmantotajiem organiskajiem šķīdinātājiem ir dažāds eluēšanas spēks,

tāpēc ir jāpiemeklē atbilstošs organiskā šķīdinātāja daudzums kustīgajā fāzē. 2. Nodaļā 2.4. tabulā ir parādīti lietotie gradienta profili. Lietojot metanolu un 2-propanolu, jāņem vērā, ka to ūdens šķīdumiem piemīt augstāka viskozitāte nekā acetonitrilam, līdz ar to kolonnās ir daudz augstāks spiediens. No literatūras zināms, ka paaugstinoties spiedienam hromatogrāfiskajā sistēmā, palielinās proteīnu izdalīšanās laiks.

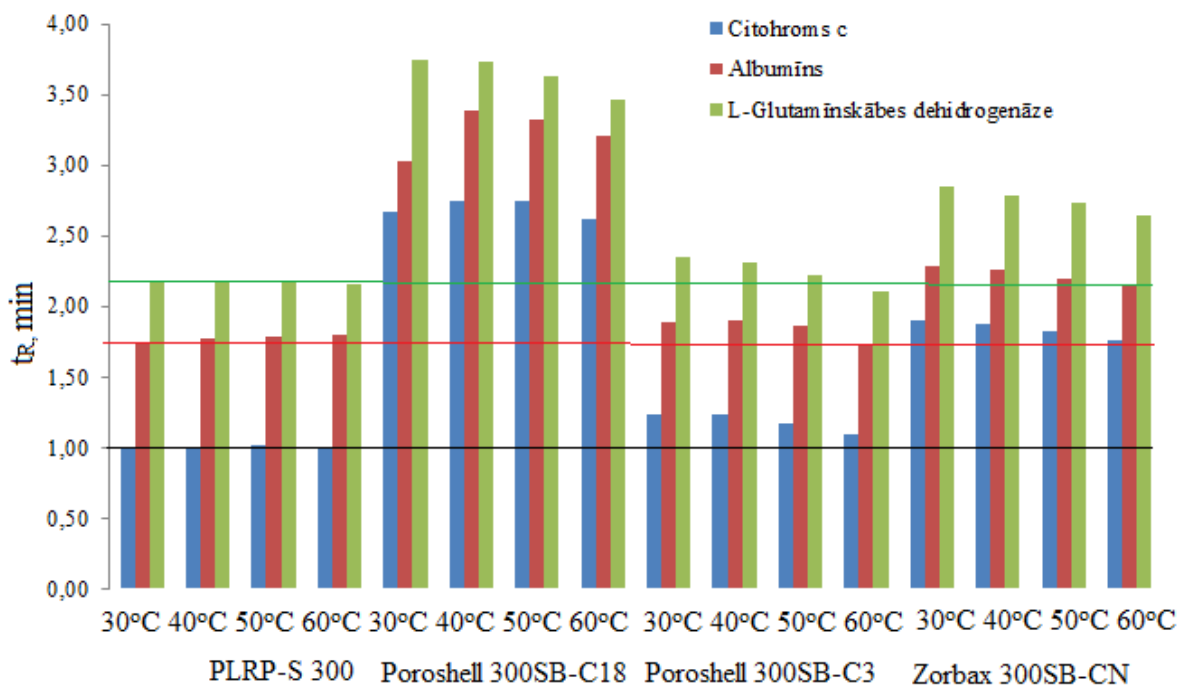
Detektēšanas viļņa garuma izvēle. Proteīniem tika noteikts optimāls analīzes viļņa garums, absorbcijas spektri tika iegūti visiem izmantotajiem proteīniem. Attēlā 3.5. redzams α -laktalbumīna (A) un β -laktoglobulīna (B) ultravioletās gaismas absorbcijas spektrs ar izteiktu absorbcijas maksimumu pie 200 nm. Literatūras avotos [2, 55, 107] proteīnu analīzēm AEŠH apstākļos izmantots 214, 215 nm viļņa garumus. Visiem proteīniem tika lietots izvēlētais viļņa garums 210 nm.



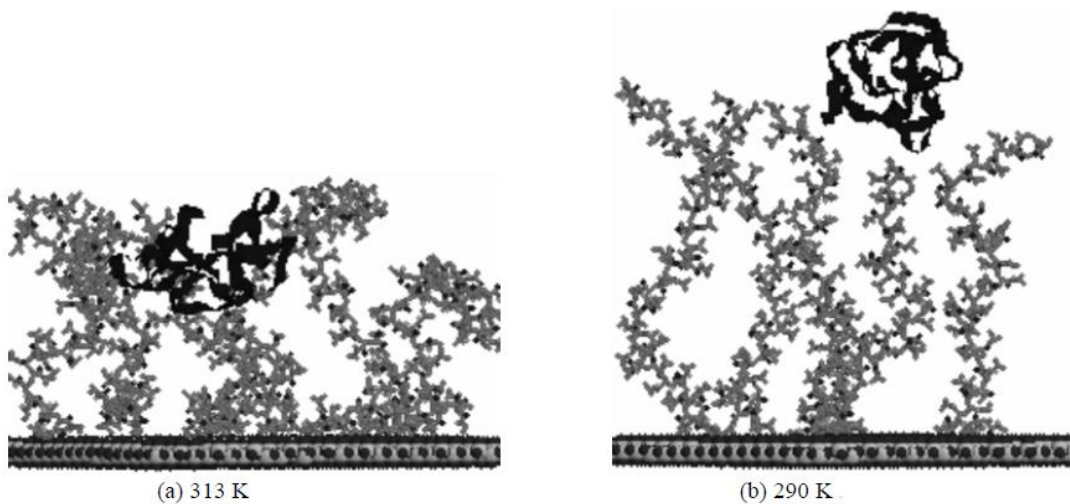
3.5. att. α -Laktalbumīna (A) un β -laktoglobulīna (B) ultravioletās gaismas absorbcijas spektrs

Temperatūras izvēle. Apgrieztās fāzes AEŠH apstākļos temperatūras izvēle ir mazsvarīgāks faktors nekā, piemēram, kustīgās fāzes pH un kustīgās fāzes sastāvs, bet ir novērots, ka arī temperatūras izmaiņas var uzlabot selektivitāti un dot būtiskus uzlabojumus izvēlētajai hromatogrāfijas metodei. Piemēram, paaugstinot temperatūru, tiek samazināta kustīgās fāzes viskozitāte (maisījumam no 50:50 MeOH:H₂O (v/v) piemīt viskozitāte 1,47 cP 30 °C, bet tikai 0,46 cP pie 100 °C) [22].

Temperatūras ietekmes noteikšanai tika izmantotas trīs dažādi proteīni. Attēlos 3.6. un 3.7. ir parādīta citohroma C (III), albumīna (II), L-glutamīnskābes dehidrogenāzes (IV) izdalīšanās laiks un joslu platums ($w_{0,5\%}$) uz četrām kolonnām dažādās temperatūrās (30 °C, 40 °C, 50 °C un 60 °C). No 3.6 attēla izriet, ka temperatūras maiņa minimāli ietekmē izvēlēto proteīnu izdalīšanās laiku. Piemēram, uz polimēru bāzes kolonnas proteīnu izdalīšanās laiks nav atkarīgs no temperatūras, bet uz -C18 un -C3 kolonnas albumīna gadījumā izdalīšanās laiks sākumā paaugstinās, paaugstinoties temperatūrai, bet pēc tam samazinās. L-glutamīnskābes dehidrogenāzes gadījumā novērots, ka, paaugstinoties temperatūrai, izdalīšanās laiks samazinās. Attēlā 3.7. parādīts, ka temperatūras paaugstināšana var uzlabot proteīnu spēju mijiedarboties ar sorbentu.



3.6. att. Citohroma C, albumīna, L-glutamīnskābes dehidrogenāzes izdalīšanās laiks uz kolonnām *PLRP-S 300*, *Poroshell 300SB-C18*, *Poroshell 300SB-C3* un *Zorbax 300SB-CN* pie 30 °C, 40 °C, 50 °C un 60 °C temperatūras, kustīgā fāze: acetonitrils/ūdens/0,1% TFA, gradienta profils 10-90% B 10 min

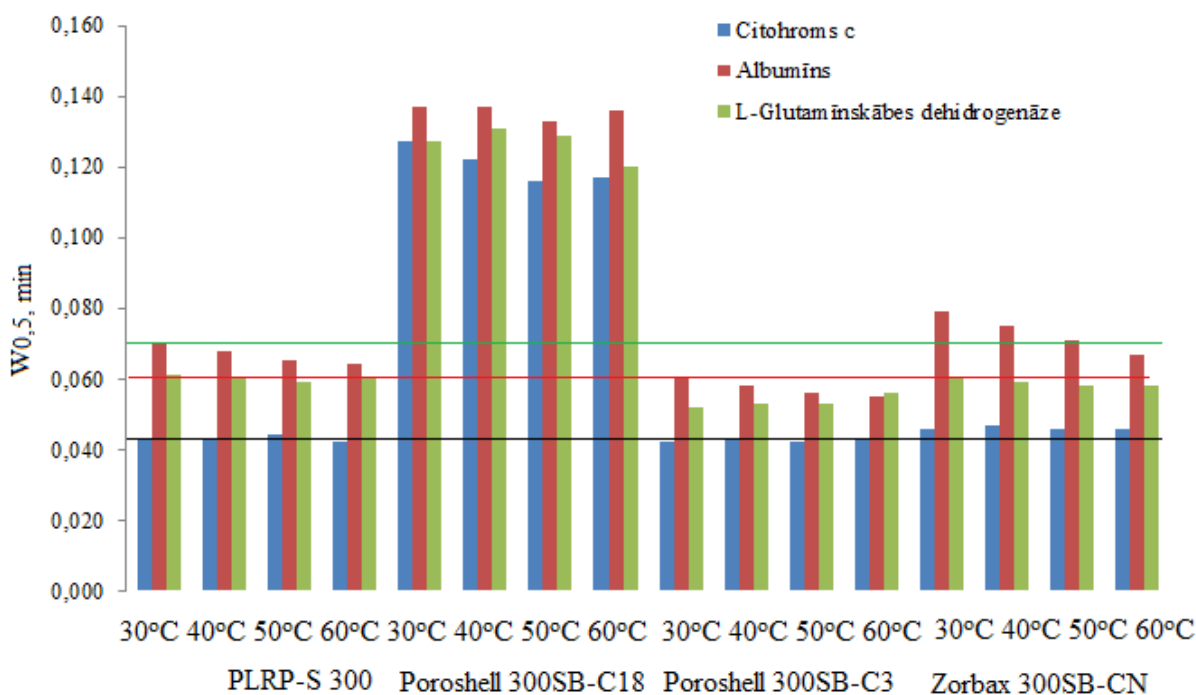


3.7. att. Shematisks attēls, kas rāda temperatūras ietekmi uz proteīnu mijiedarbībām ar sorbentu [110]

Ar *-C18* kolonnu novērots, ka joslas ir platākas $w_{0,5\%} > 0,08$ nekā izmantojot polimēru bāzes kolonnas, *-C3* vai *-(CH₂)CN* (skat. 3.8. att.) $w_{0,5\%}$ uz *-C18* kolonnas ir $>0,08$, savukārt uz polimēru bāzes kolonnas, *-C3* vai *-(CH₂)CN* platums augstuma pusē ir $<0,08$ (aprēķinu

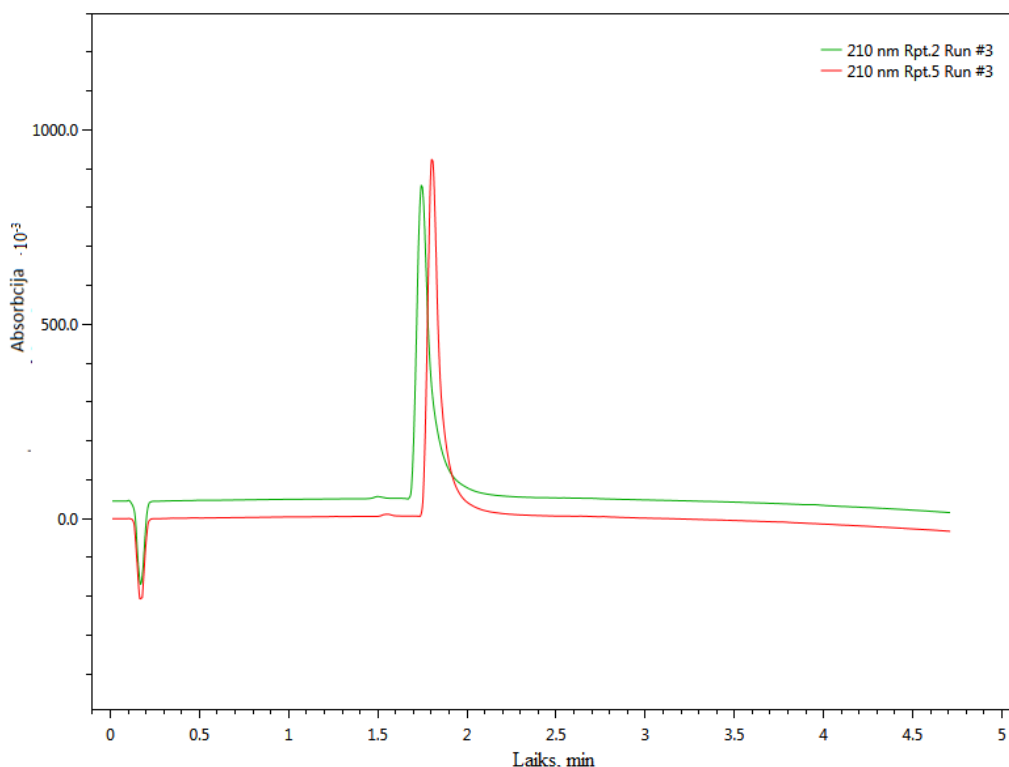
formulu skat. 2.4. nod.). Iespējams to varētu skaidrot ar, to ka proteīnu molekulas ir atlocījušās uz *-C18* sorbenta un joslas kļūst platākas nekā uz polimēru bāzes, *-C3* vai *-(CH₂)CN* sorbenta. Proteīnu molekulām pārvietojoties salocītā veidā pa sorbenta virsmu joslas ir šaurākas nekā, ja proteīnu molekulas pārvietojas pa sorbenta virsmu atlocītā veidā veidojot garāku hidrofobo “pēdu” (*hydrophobic foot*).

Albumīna gadījumā novērots, ka joslas platumš minimāli samazinās paaugstinoties temperatūrai. Citohroma C un L-glutamīnskābes dehidrogenāzei minimāli samazinās joslas platumš uz *-C18* kolonnas, un pārējām kolonnām tas praktiski nemainās. Proteīnu joslas platumu temperatūra praktiski neietekmē, bet ietekmē kolonnas daba.



3.8. att. Citohroma C, albumīna, L-glutamīnskābes dehidrogenāzes joslu platumš (*w*_{0,5}) uz kolonnām *PLRP-S 300*, *Poroshell 300SB-C18*, *Poroshell 300SB-C3* un *Zorbax 300SB-CN* pie 30 °C, 40 °C, 50 °C un 60 °C temperatūras, kustīgā fāze: acetonitrils/ūdens/0,1% TFA, gradienta profils 10-90% B 10min

Attēlā 3.9. ir parādītas albumīna hromatogrammas uz kolonnas *Poroshell 300SB-C18* par kustīgo fāzi lietojot ūdens/acetonitrila/trifluoretiķskābes maisījumu pie dažādām kustīgās fāzes temperatūrām (30 °C un 60 °C). No iegūtajām hromatogrammām var secināt, proteīnu gadījumā temperatūra minimāli ietekmē uz joslas platumu. Ieteicams izmantot augstāku temperatūru, lai samazinātu šķīdinātāja viskozitāti un proteīnu molekulām pie augstākas temperatūras ir vieglāk mijiedarboties ar sorbenta virsmu. Turpmākajiem eksperimentiem tika izmantota 60 °C temperatūra.

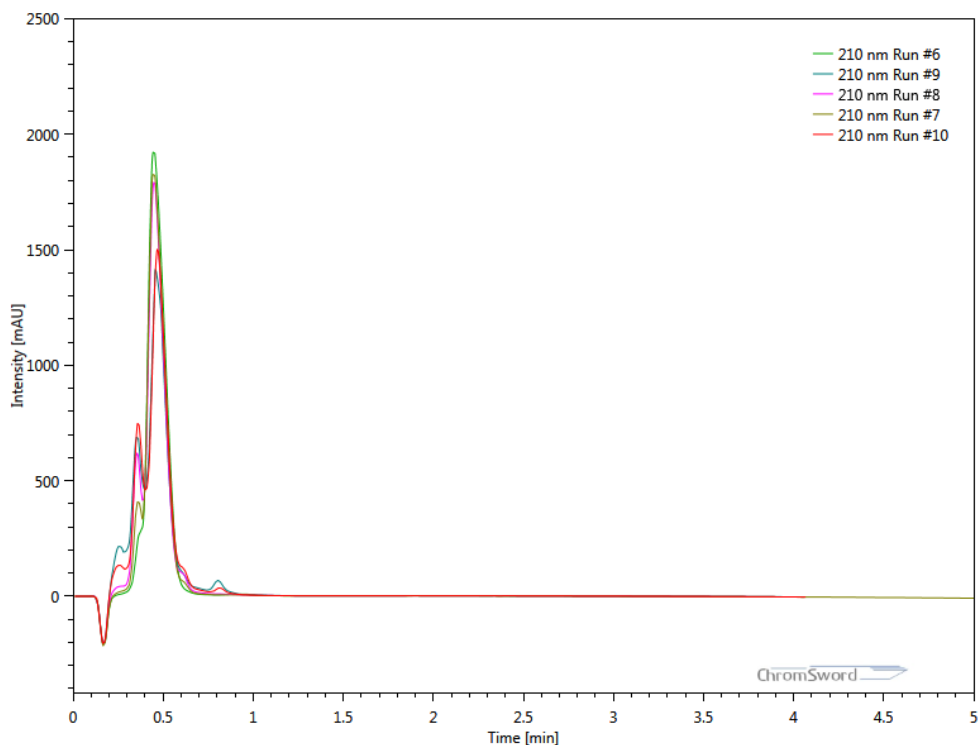


3.9. att. Albumīna hromatogramma ar acetoniātrilu kā organisko šķīdinātāju T=30 °C - zaļā un T=60 °C – sarkanā. Kolonna *Poroshell 300SB-C18*, kustīgā fāze: acetoniātrils/ūdens/0,1%TFA (25-75%, 5min)

3.2. Proteīnu stabilitāte, linearitāte un atkārtojamība

Izmantotie proteīni no hromatogrāfiskās sistēmas izdalās, ja kolonnā acetoniātrila koncentrācija kustīgajā fāzē sasniedz 17%-45%. Gradiēnta apstākļos, ja ACN maiņa ir no 30-80% 10 minūtēs, augstākā koncentrācija, ar kuru mijiedarbojas proteīni ir ~50%. Tāpēc darba ietvaros tika pārbaudīta proteīnu stabilitāte kustīgajā fāzē: 50% acetoniātrils/ūdens/0,1%TFA 80°C. Attēlā 3.10. parādīta mioglobīna joslas forma T=80°C atkarībā no laika (0min; 5min; 10min; 20min un 30min). Tika noskaidrots, ka mioglobīns sāk zaudēt savu sākotnējo struktūru (samazinās joslas laukums), ja to 80°C temperatūrā iztur vairāk kā 10 minūtes. Albumīna gadījumā tika novērots, ka piecas minūtes izturot 80°C temperatūrā, tā hromatogrāfiskā josla sāk paplašināties, bet laukuma izmaiņas praktiski nenotiek. Tas nozīmē, ka albumīns karsējot zaudē savu sākotnējo konformāciju un proteīna ķēdē sāk atlocīties, kā rezultātā var novērot hromatogrāfiskās joslas paplašināšanos. Lizocīma gadījumā tika novērots, ka izturot 10 minūtes 80°C temperatūrā, tas sāk zaudēt savu sākotnējo struktūru, kā rezultātā samazinās lizocīma joslas laukums. Proteīnu izdalīšanas laiks pēc izturēšanas 80°C temperatūrā praktiski nemainās (skat. 3.2. tab.). Karsējot proteīnus vismaz 10 minūtes 80°C temperatūrā novēro proteīna

hromatogrāfiskās joslas laukuma samazināšanos un hromatogrammā var novērot jaunu joslu parādīšanos, var secināt, ka proteīns zaudē savu sākotnējo struktūru.



3.10. att. Mioglobīna stabilitātes hromatogrammas (T=80°C, 0min; T=80°C, 5min; T=80°C, 10min; T=80°C, 20min; T=80°C, 30min ar acetonitrilu kā organisko šķīdinātāju T=60 °C. Kolonna *Poroshell 300SB-C3*, kustīgā fāze: acetonitrils/ūdens/0,1%TFA (30-80%, 10min)

Tika pārbaudīta proteīnu stabilitāte kustīgajā fāzē pēc 24 stundām. Proteīnu paraugi tika izšķīdināti ūdenī un kustīgajā fāzē (50%acetonitrils/ūdens/0,1%TFA) un pārbaudīta stabilitāte. Izturot proteīnu paraugus 20°C temperatūrā 24 stundas ūdens vidē un kustīgajā fāzē, netika novērota proteīnu hromatogrāfisko joslu paplašināšanās vai arī to laukuma izmaiņas (skat. 3.3. tab.). Proteīns hromatogrāfiskajā sistēmā no injekcijas brīža līdz izdalīšanai no kolonnas atrodas ~1-6 minūtes 60°C temperatūrā (tas atbilst acetonitrila saturam 17-45% kustīgajā fāzē, atkarībā no proteīna).

Noteikts, ka albumīna, mioglobīna, lizocīma signāli mainās lineāri līdz ar koncentrāciju (skat. 3.11. att.). Zemākā detektēšanas robeža attiecīgi albumīnam, mioglobīnam un lizocīmam ir 0,008mg/ml, 0,006mg/ml un 0,007mg/ml. Kvantitatīvās noteikšanas robeža ir 0,024mg/ml, 0,018mg/ml un 0,020mg/ml (skat. 3.4. tab.).

3.2. tabula

Proteīnu stabilitāte T=80°C*

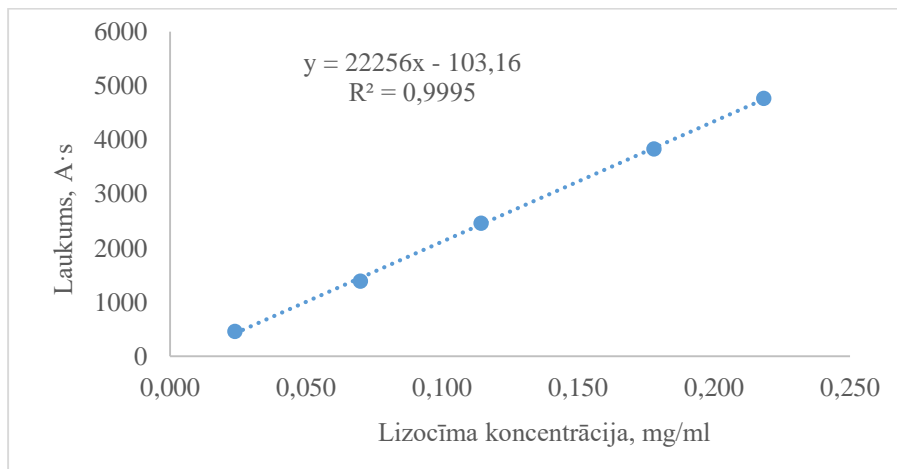
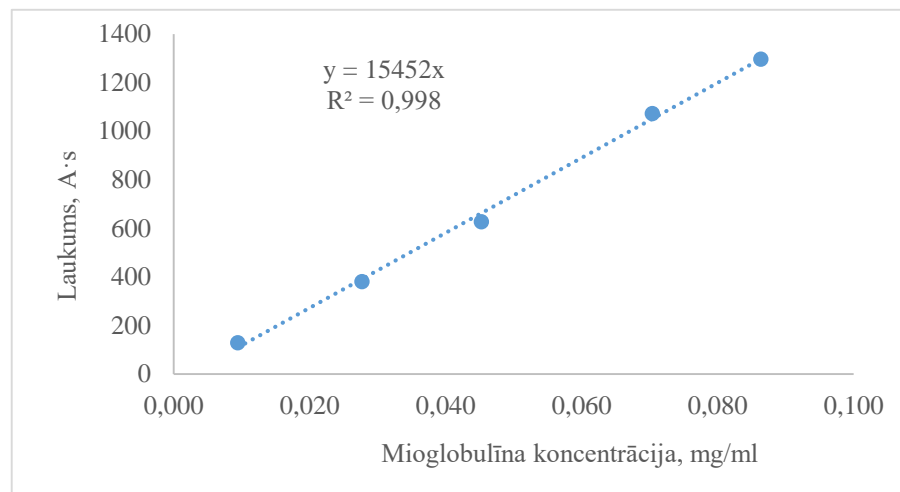
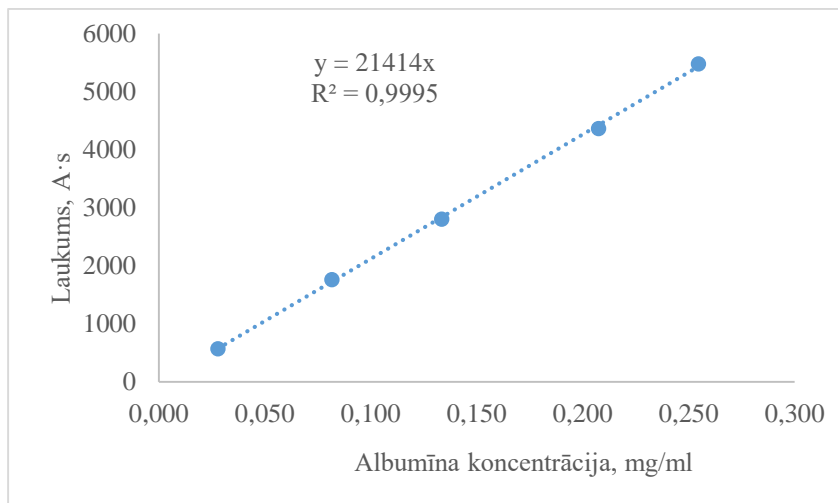
Laiks, min	Albumīns			Mioglobīns			Lizocīms		
	t _R	w _{0,5}	Laukums, mA·s	t _R	w _{0,5}	Laukums, mA·s	t _R	w _{0,5}	Laukums, mA·s
0	1,57	0,102	14000	1,78	0,082	3500	0,45	0,105	11500
5	1,56	0,115	14000	1,78	0,081	3500	0,45	0,100	11500
10	1,56	0,119	14000	1,78	0,083	3500	0,45	0,096	11500
20	1,55	0,135	14000	1,78	0,085	3000	0,47	0,093	9500
30	1,56	0,154	14000	1,79	0,085	2400	0,47	0,093	9300

* - proteīni izšķīdināti 0,1%TFA/50%acetoniitrils/50%ūdens

3.3. tabula

Proteīnu stabilitāte kustīgajā fāzē, T=20°C

Laiks, h	Šķīdums, kurā izšķīdināts proteīns	Albumīns			Mioglobīns			Lizocīms		
		t _R	w _{0,5}	Laukums, mA·s	t _R	w _{0,5}	Laukums, mA·s	t _R	w _{0,5}	Laukums, mA·s
0	Ūdens	1,58	0,101	14000	1,79	0,082	3500	0,45	0,100	11500
0	0,1%TFA/50%acetoniitrils /50%ūdens	1,58	0,100	14000	1,78	0,082	3500	0,45	0,102	11500
24	Ūdens	1,58	0,101	14000	1,79	0,082	3500	0,45	0,100	11500
24	0,1%TFA/50%acetoniitrils /50%ūdens	1,58	0,101	14000	1,79	0,083	3500	0,45	0,102	11500



3.11. att. Albumīna, mioglobīna un lizocīma linearitāte. Kolonna *Poroshell 300SB-C3*, kustīgā fāze: acetnitrils/ūdens/0,1%TFA (30-80%, 10min)

Proteīna nosaukums	Zemākā detektēšanas robeža, mg/ml	Kvantitatīvās noteikšanas robeža, mg/ml	Atkārtojamība	
			t _R RSD (%)	Laukums RSD (%)
Albumīns	0,008	0,024	0,23	2,30
Mioglobulīns	0,006	0,018	0,22	2,32
Lizocīms	0,007	0,020	0,81	0,61

3.3. Kolonnas sorbenta ietekme uz proteīnu izdalīšanās laiku un joslu platumu pusaugstumā

Kolonnas sorbenta ietekme uz izdalīšanās laiku. Lai izpētītu proteīnu hromatogrāfisko izturēšanos uz izvēlētajām kolonnām, pirmkārt, bija nepieciešams atrast piemērotus gradienta profilus šo vielu izdalīšanai. Tika izvēlēti četri proteīni ar dažādu molekulāro masu, lai noskaidrotu proteīnu sorbciju izvēlētajos hromatogrāfiskajos apstākļos.

Attēlā 3.12. (A, B, C un D) ir parādīta citohroma C, enolāzes, pienskābes dehidrogenāzes un L-glutamīnskābes dehidrogenāzes izdalīšanās laiki (tika veikti 3 mērījumi, katram gradientam) uz kolonnām (*Zorbax 300SB-Diphenyl*, *Zorbax 300SB-C8*, *Zorbax 300SB-CN* un *Zorbax 300SB-C3*) gan ar acetonitrilu, gan metanolu kā kustīgās fāzes organisko šķīdinātāju. Izvēlētās kolonnas atšķiras ne tikai ar ligandu dabu, bet arī ar daļiņu izmēru un kolonnas diametru.

Citohromam C ar acetonitrilu kā kustīgās fāzes organisko šķīdinātāju tika izmantots gradienta režīms 29-50% (acetonitrila satura izmaiņa 10 minūtēs), bet metanola gadījumā - gradienta režīms 50-80% (izmaiņa 10 minūtēs). Enolāzei, pienskābes dehidrogenāzei un L-glutamīnskābes dehidrogenāzei par kustīgās fāzes organisko šķīdinātāju tika izmantots gradienta režīms 30-80% (acetonitrila izmaiņa 10 minūtēs), bet metanola gadījumā - 70-80% (10 minūšu laikā).

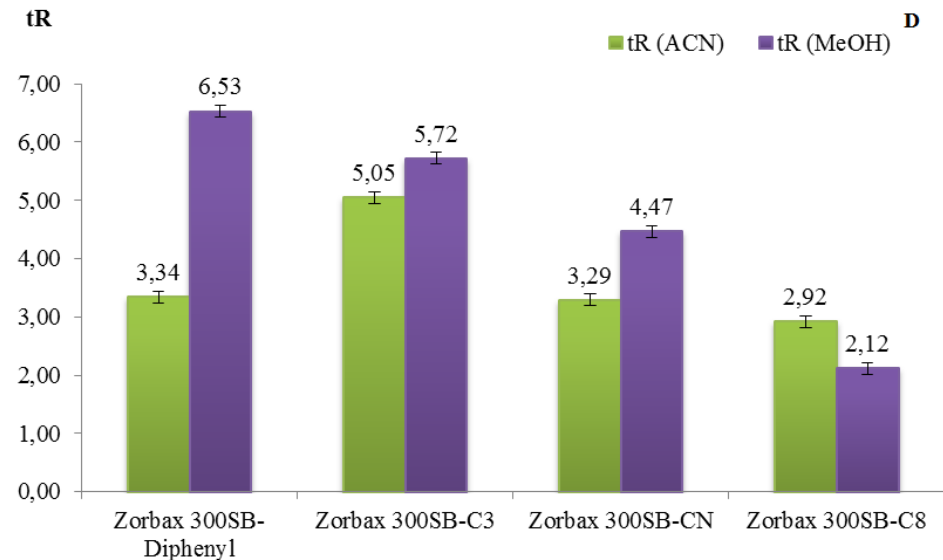
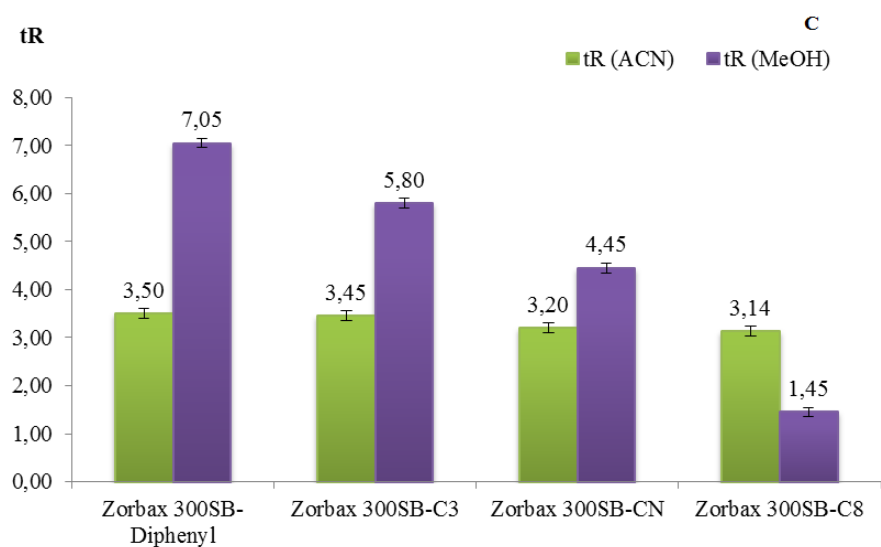
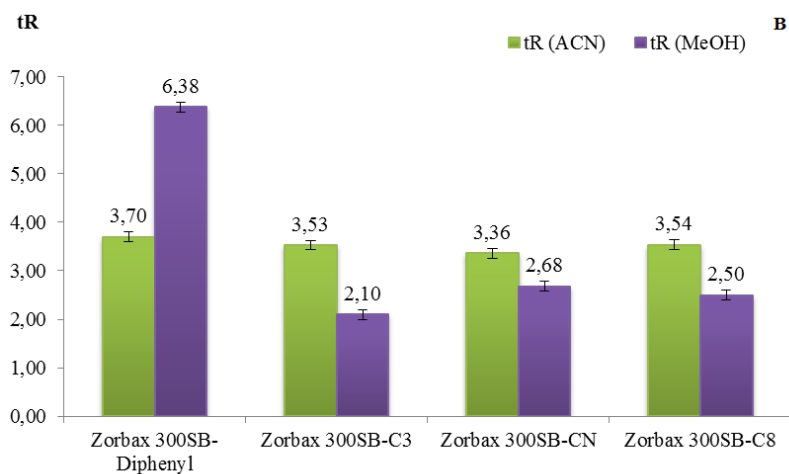
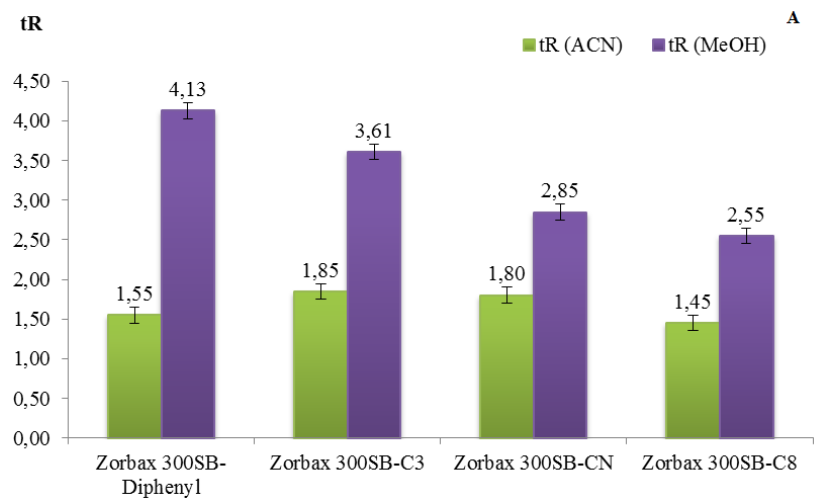
Piemēram, citohroma C gadījumā no 3.12., A attēla var redzēt, ka sorbcija kolonnu pāros ir līdzīga -C3 un -(CH₂)CN; -Diphenyl un -C8, izmantojot acetonitrilu. Citohroms C ilgāk sorbējas uz -C3 un -(CH₂)CN kolonnām nekā uz -Diphenyl un -C8. Savukārt, ja izmanto metanolu, redzams, ka citohroms C stiprāk sorbējas uz *Zorbax 300SB-Diphenyl* kolonnas. Tas nozīmē, ka citohroma C sorbciju ietekmē gan izvēlētais kolonnas daba, gan organiskais šķīdinātājs.

Enolāzes gadījumā, var novērot, ka kolonnas daba praktiski neietekmē sorbciju, ja izmanto acetonitrilu (skat. 3.12., B att.). Savukārt, metanola gadījumā novēro, ka uz kolonnas -Diphenyl ~ izdalīšanās laiks ir 2,5 reizes lielāks nekā uz kolonnām -(CH₂)CN, -C3 un -C8.

Pienskābes dehidrogenāzes gadījumā, līdzīgi kā enolāzes gadījumā, var novērot, ka kolonnas daba praktiski neietekmē sorbciju, ja izmanto acetonitrilu (skat. 3.12., B un C att.). Savukārt metanola gadījumā, pienskābes dehidrogenāzes sorbciju ietekmē kolonnas daba un sorbcija samazinās šādā secībā: *-Diphenyl* > *-C3* > *-(CH₂)CN* > *-C8*. L-glutamīnskābes dehidrogenāzes gadījumā var novērot, ka gan nekustīgās fāzes, gan organiskā šķīdinātāja daba ietekmē sorbciju (skat. 3.12., D att.). Ja izmanto acetonitrilu kā organisko šķīdinātāju, tad var novērot, ka L-glutamīnskābes dehidrogenāze visstiprāk sorbējas uz *-C3*, bet metanola gadījumā uz *-Diphenyl* kolonnas.

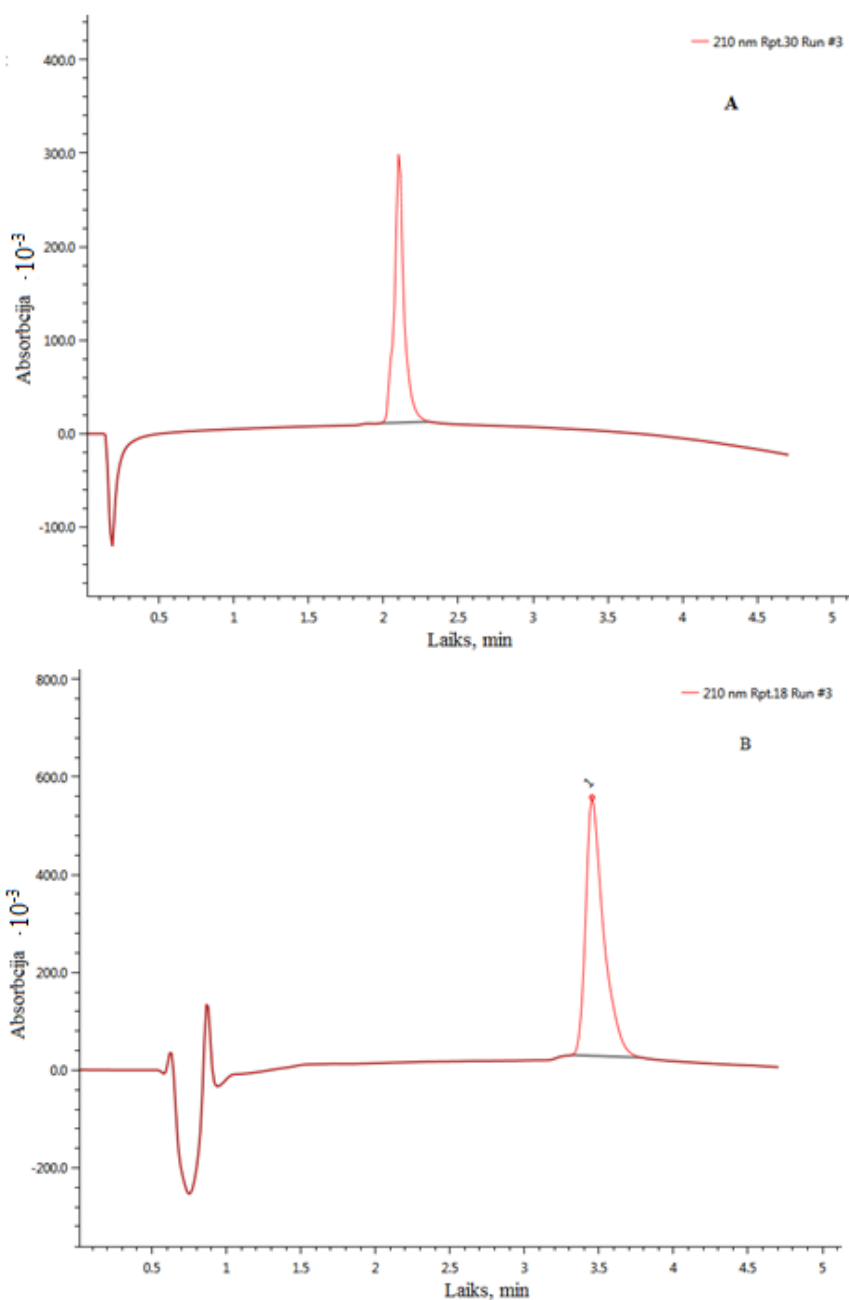
Piemēram, uz *-Diphenyl* kolonnas acetonitrila gadījumā enolāze (67 kDa) izdalās vēlāk nekā pienskābes dehidrogenāze (140 kDa) un L-glutamīnskābes dehidrogenāze (290 kDa), bet molekulas tai ir vismazākā. Var secināt, ka proteīnu izdalīšanās secība ir atkarīga no to spējas veidot mijiedarbību ar sorbenta virsmu. Proteīnu spēju veidot mijiedarbību ar sorbenta virsmu ietekmē arī šķīdinātāja daba. Uz *-Diphenyl* kolonnas izvēlētais proteīni stiprāk sorbējas, ja tiek lietots metanols. Var secināt, ka metanols uz šīs kolonnas veicina proteīnu saķeri ar sorbenta virsmu. Piemēram, uz *-C3* kolonnas metanola gadījumā pienskābes dehidrogenāzes un L-glutamīnskābes dehidrogenāzes sorbcijas īpašības ir līdzīgas. Ja nepieciešams atdalīt šos proteīnus ir nepieciešams izvēlēties acetonitrilu kā organisko šķīdinātāju, jo ar šo šķīdinātāju proteīnu sorbcija atšķiras uz *-C3* sorbenta virsmas, kas ļauj veikt proteīnu atdalīšanu.

No iegūtiem rezultātiem var secināt, ka enolāzi, pienskābes dehidrogenāzi un L-glutamīnskābes dehidrogenāzi var analizēt, lietojot vienādu kustīgās fāzes gradienta profilu. Gradienta profila izvēle ir atkarīga no molekulas izmēra, piemēram, proteīnu ar molekulu izmēru 50 kDa – 290 kDa var analizēt vienādos hromatogrāfiskos apstākļos. Tas atvieglo hromatogrāfista darbu, piemeklējot optimālus analīzes apstākļus. Proteīnu molekulu analīzei, kuru izmērs < 50 kDa, jāizmanto kustīgās fāzes, kuras satur mazāku organiskā šķīdinātāja daudzumu.



3.12. att. Citohroma C (A), Enolāzes (B), Pienskābes dehidrogenāzes (C) un L-glutamīnskābes dehidrogenāzes (D) izdalīšanās laiks no dažādas funkcionalitātes Zorbax kolonnām

Kolonnas sorbenta ietekme uz proteīnu joslas platumu ($w_{0,5}$). Attēlā 3.13. ir parādīta sorbentu ietekme uz L-glutamīnskābes dehidrogenāzes joslas platumu augstuma pusē.



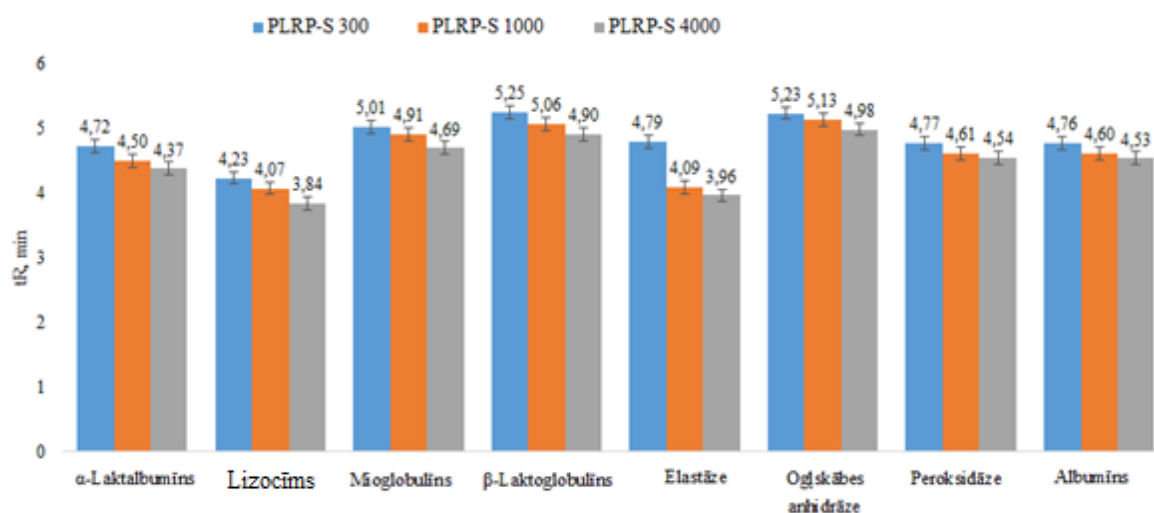
3.13. att. L-glutamīnskābes dehidrogenāzes hromatogramma ar acetonitrilu kā organisko šķīdinātāju uz kolonnas *Poroshell 300SB-C18* (A) un *PLRP-S 300* (B) T=60 °C, kustīgā fāze: acetonitrils/ūdens/0,1% TFA (25-75%, 5min)

Šim nolūkam izvēlētas četras dažādas kolonnas: *Poroshell 300SB-C18*, *PLRP-S 300*, *Poroshell 300SB-C3* un *Zorbax 300SB-CN*. Proteīnus galvenokārt veido hidrofobās mijiedarbības ar sorbentu, tā kā uz polimēru bāzes kolonnas sorbenta virsma ir hidrofoba tas varētu ietekmēt proteīnu ķēdes stāvokli. Iespējams, ka L-glutamīnskābes dehidrogenāzes ķēde

ir atlocītā veidā uz polimēru bāzes kolonnas, un tas rada joslu paplašināšanos, bet uz -C18, -C3 un -(CH₂)CN proteīnu ķēde ir salocītā veidā un, līdz ar to, joslas ir šaurākas.

Sorbenta poru izmēra ietekme uz proteīnu sorbciju. Attēlā 3.14. ir parādīta proteīnu sorbcija uz polimēru bāzes kolonnām, kuras atšķiras ar poru izmēru (300, 1000 un 4000 Å). No iegūtiem datiem tika novērots, ka proteīni stiprāk sorbējas uz kolonnas, kuras poru izmērs ir 300 Å. Palielinoties sorbenta poru izmēram samazinās proteīnu sorbcija (skat 3.14. att.). Iespējams, ka to varētu skaidrot ar to, ka sorbenta poru izmērs ir ļoti liels (>300 Å) un proteīnu molekulas var brīvi pārvietoties cauri porām.

Ja poru izmērs ir ~100 Å, tad proteīnu molekulām nav iespējas iekļūt sorbenta porās un veidot mijiedarbību ar hidrofobo sorbenta virsmu. Poru izmērs ~300 Å ir pietiekošs, lai proteīnu molekulas varētu iekļūt porās un veidot mijiedarbības, kā rezultātā var novērot to sorbciju. Proteīnu, kuru molekulārā masa ir >30 kDa (ogļskābes anhidrāze, peroksidāze un albumīns) sorbciju poru izmērs praktiski neietekmē (skat. 3.14. att.). Kolonnas ar poru izmēru >300 Å būtu piemērotākas proteīniem, kuru molekulārā masa >30 kDa.



3.14. att. Proteīnu izdalīšanās laiks uz polimēru bāzes kolonnām ar atšķirīgu poru izmēru (PLRP-S 300, 1000 un 4000Å), kustīgā fāze: acetonitrils/ūdens/0,1% TFA, 25-80%B 10min, T=60 °C

Gradients laika ietekme uz proteīnu joslas platumu. Proteīni ir jutīgi pret kustīgās fāzes sastāva izmaiņām. Tabulā 3.5. parādīts kā albumīna izdalīšanās laiku un joslas platumu ietekmē izvēlēta gradienta laiks. Palielinot gradienta laiku 6 reizes, joslas platums palielinās apmēram 3 reizes. Lai iegūtu šaurākas proteīnu joslas un panāktu efektīvāku joslu atdalīšanu, optimālam gradienta laikam jābūt robežās no 5-15 min.

To varētu izskaidrot ar to, kad proteīnu adsorbēšana/desorbcija ar sorbentu virsmas notiek vienu reizi un tiklīdz kolonnā ir sasniegta organiskā šķīdinātāja koncentrācija, kas ierosina šo procesu, tā proteīni atdalās no sorbenta virsmas veidojot vājas saites un sāk izdalīties no

kolonnas. Savukārt, ja gradienta profils ir lēzens, tad proteīnu izdalīšanās no kolonnas notiek lēni un var novērot joslu paplašināšanos, bet izmantojot stāvāku gradienta profilu proteīnu joslu paplašināšanās praktiski netiek novērota.

3.5. tabula

Albumīna izdalīšanās laiks, joslas platums uz kolonnas *Zorbax 300SB-C8* (gradienta profils 30-80%, KF: ūdens/acetonitrils/0,1% TFA)

Gradienta laiks, min	Izdalīšanās laiks, min	Joslas platums ($w_{0,5}$), min
5	1,66	0,088
10	2,32	0,161
15	3,09	0,170
20	3,80	0,203
30	5,20	0,289

Kolonnas sorbenta daļiņu izmēra ietekme uz proteīnu joslas platumu. Attēlā 3.15. parādīts kā sorbenta daļiņu izmērs ietekmē dažādu proteīnu joslu platumu pusaugstumā, izmantojot gan acetonitrilu, gan metanolu.

No literatūras ir zināms, ka, lietojot kolonnas ar mazāku sorbenta daļiņu izmēru (<2 μ m), mazmolekulāriem savienojumiem var iegūt šaurākas joslas un sasniegt augstāku izšķiršanu. Tika izvēlētas četras dažādas -C18, kā arī viena kolonna ar atšķirīgu ligandu dabu -(CH₂)CN, lai novērtētu sorbenta daļiņu izmēra ietekmi uz proteīnu joslas platumu. Proteīnu analīzēm ražotāji piedāvā kolonnas ar daļiņu izmēru no 1,7-10 μ m, bet biežāk ražotāji proteīnu analīzēm piedāvā kolonnas ar 5 μ m daļiņu izmēru.

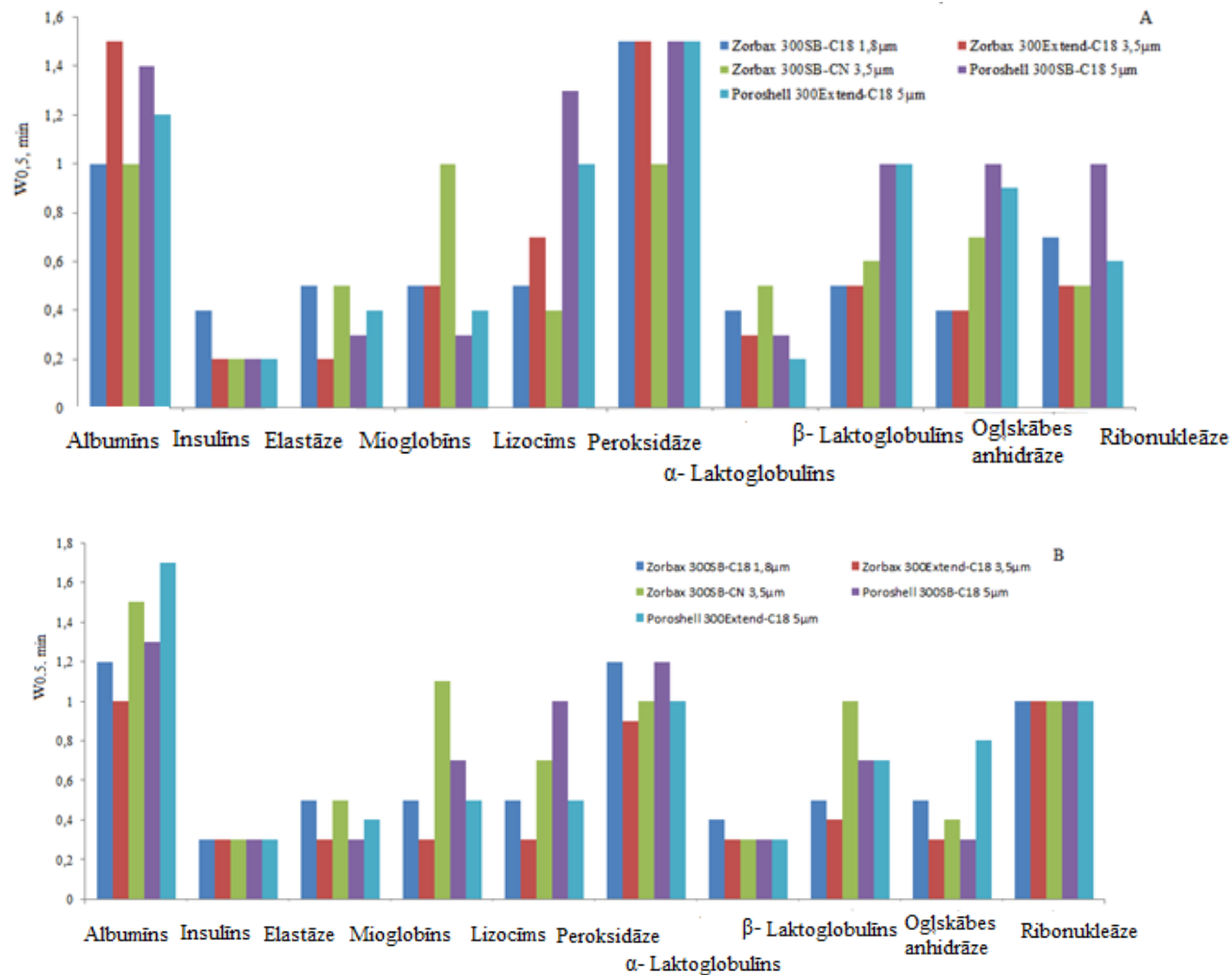
Izmantojot kolonnu ar mazākām daļiņām (1,8 μ m), tikai dažu proteīnu gadījumā (albumīna, α -laktalbumīna, lizocīma, ogļskābes anhidrāzes) tika novērotas šaurākas joslas (skat. 3.15. att. A) acetonitrila gadījumā.

Peroksidāzei šaurākas joslas tika novērotas uz -(CH₂)CN kolonnas ar daļiņu izmēru 3,5 μ m. Peroksidāzes standarts satur piemaisījumu (~5%), kas uz -C18 kolonnām neatdalās no tās. Tikai uz -(CH₂)CN kolonnas tika novērots peroksidāzes un tās piemaisījuma atdalīšanās, kā rezultātā tika iegūta šaurāka josla.

Insulīna, elastāzes un β -laktoglobulīna gadījumā tika novērots, ka joslas ir platākas uz kolonnas ar mazāku daļiņu izmēru (1,8 μ m).

Metanola gadījumā (skat. 3.15. att. B) piemēram, insulīna un ribonukleāzes gadījumā sorbenta daļiņu izmērs joslas formu neietekmē.

Var secināt, ka kolonnas daļiņu izmērs minimāli ietekmē proteīnu joslu platumu pusaugstumā.



3.15. att. Kolonnas sorbenta daļiņu izmēra ietekme uz proteīnu joslas platumu. Acetonitrils (A) un metanols (B). kustīgā fāze: acetonitrils/ūdens/0,1% TFA 25-80% B 10min, metanols/ūdens/ 0,1% TFA 30-90% B 10 min

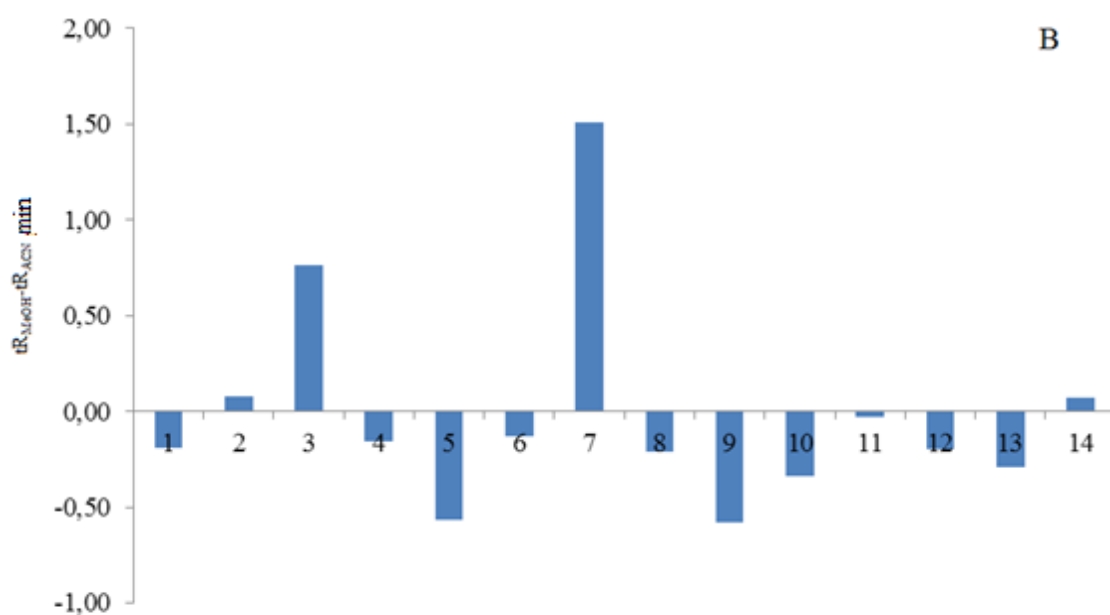
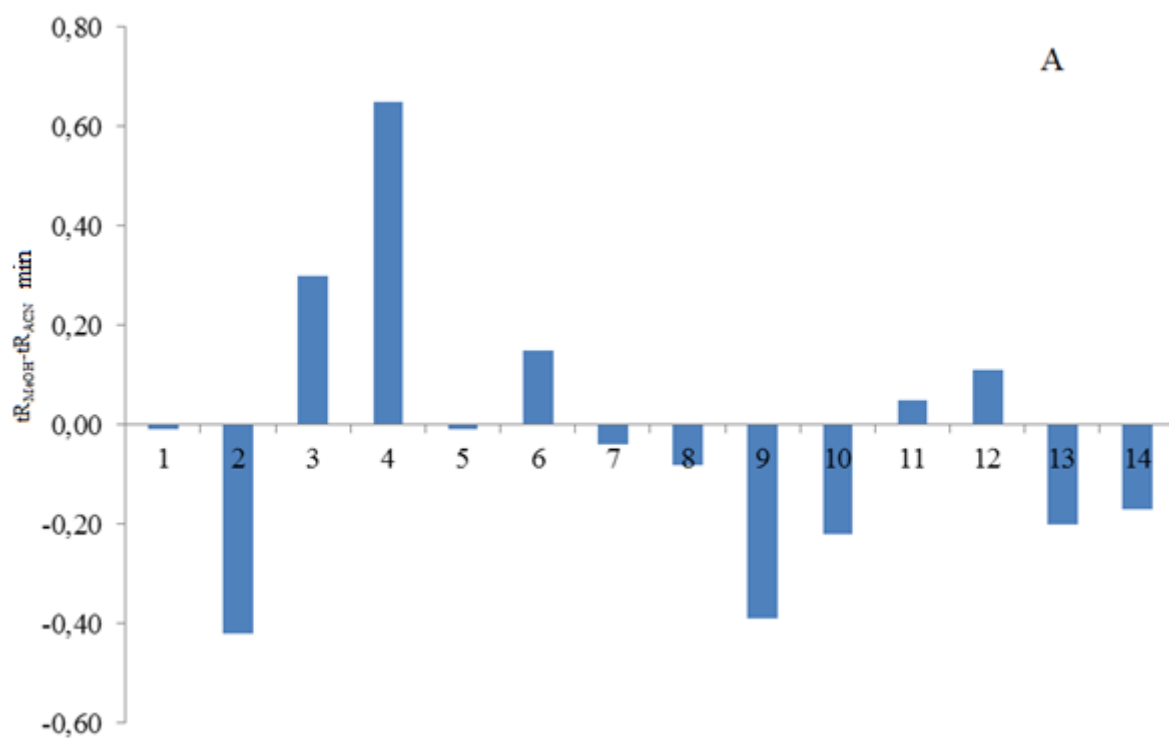
3.4. Kustīgās fāzes ietekme uz proteīnu sorbciju

Attēlos 3.16 (a un b) un 3.17 (a un b) ir parādīta proteīnu izdalīšanās laiku starpība starp metanolu un acetonitrilu uz četrām *-C18* kolonnām.

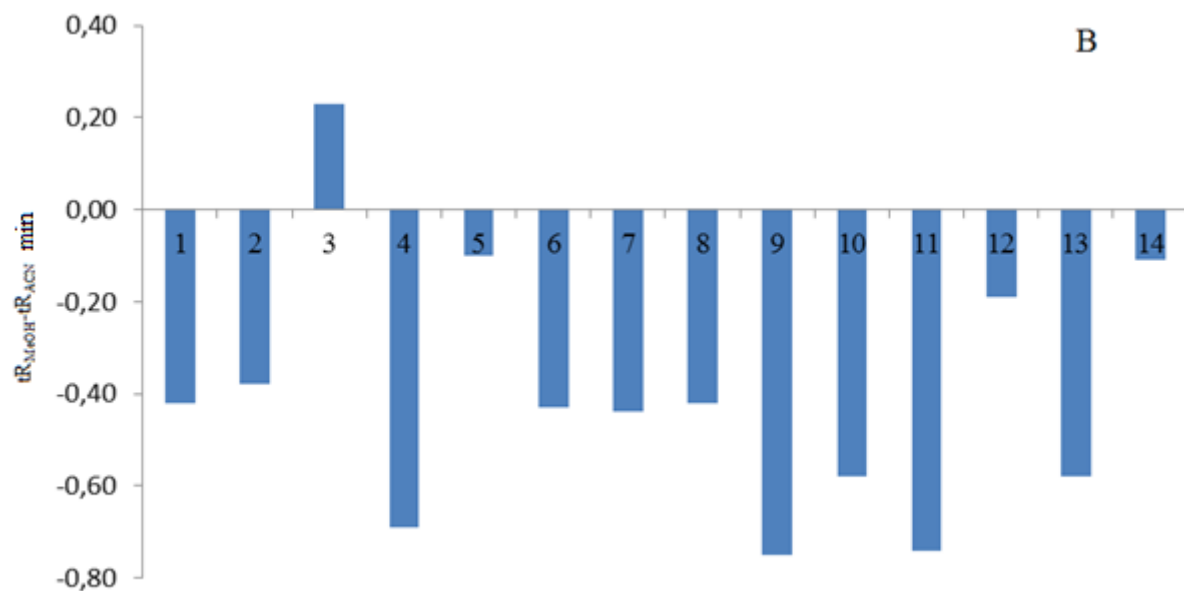
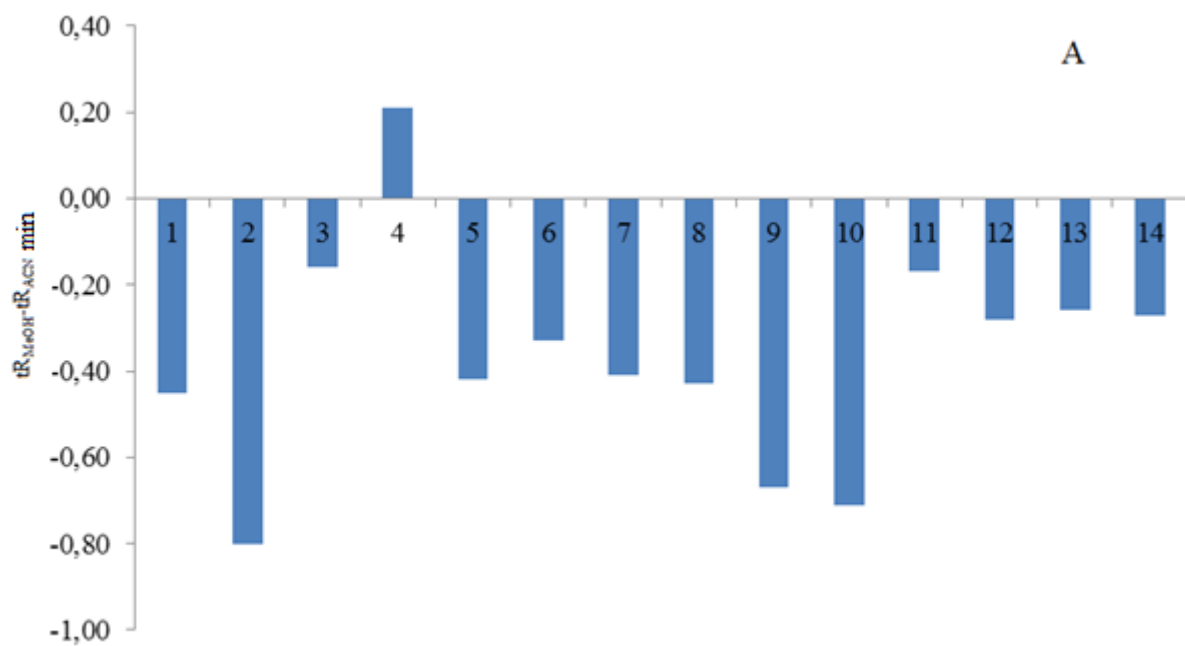
Insulīnam, β -laktoglobulīnam un elastāzei tika novērots, ka stiprāk sorbējas ar acetonitrilu uz izmantotajām *-C18* kolonnām.

Piemēram, aprotinīna un mioglobīna gadījumā uz *Zorbax 300SB-C18* sorbenta virsmas stiprāk sorbējas ar acetonitrilu, bet uz *Poroshell 300SB-C18* ar metanolu. Savukārt albumīna gadījuma tas ir otrādāk stiprāka sorbcija uz *Zorbax 300SB-C18* sorbenta virsmas ir ar metanolu, bet uz *Poroshell 300SB-C18* ar acetonitrilu. Organiskā šķīdinātāja ietekme uz proteīnu sorbciju ir atkarīga no kolonnas un proteīnu struktūras.

Tā kā praktiski visos gadījumos tika novērots, ka proteīnu sorbcija stiprāka ir ar acetonitrilu, var secināt, ka lai proteīni sorbētos uz *-C18* sorbenta par kustīgās fāzes organisko šķīdinātāju ir nepieciešams izvēlēties acetonitrilu. Acetonitrilam piemīt īpašības, kas veicina hidrofoobās mijiedarbības starp analizējamo vielu un sorbenta virsmu. Tā kā proteīni galvenokārt veido hidrofoobās mijiedarbības ar sorbenta virsmu un *-C18* grupas ir hidrofoobas, tad acetonitrils pastiprina šīs mijiedarbības. Tā kā metanolam piemīt hidrofilās mijiedarbības, tad uz *-C18* sorbentiem, tas pavājina proteīnu un sorbenta hidrofoobās mijiedarbības. Ļoti lielas proteīnu molekulas nav ieteicams analizēt uz *-C18* kolonnām, jo var notikt neatgriezeniska proteīnu sorbcija.



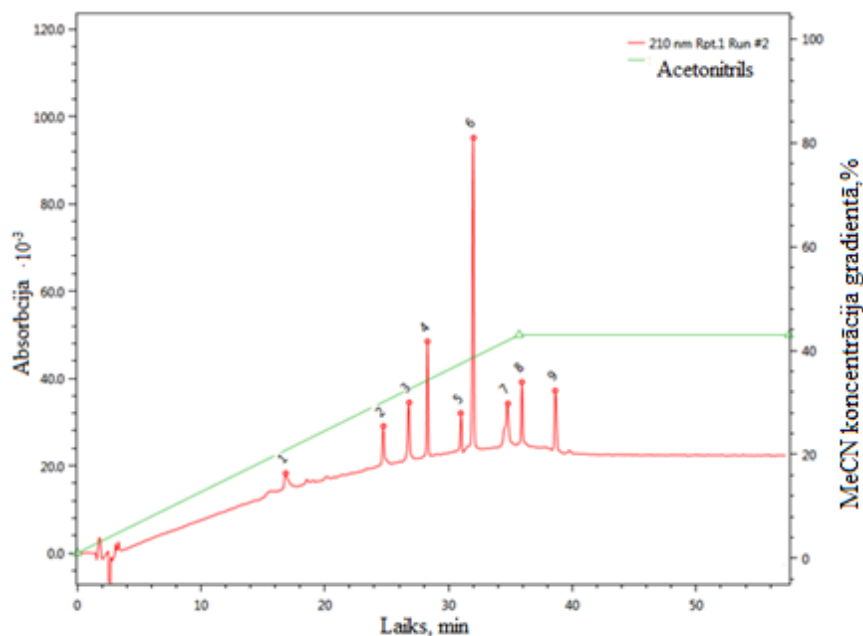
3.16. att. Proteīnu izdalīšanās laika starpība ($tR_{MeOH} - tR_{MeCN}$) uz kolonnas *Zorbax 300SB-C18* (A) un *Poroshell 300SB-C18* (B), kustīgā fāze: acetonitrils/ūdens/0,1% TFA 25-80% B, 10 min; metanols/ūdens/0,1% TFA 30-90% B, 10 min, $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$



3.17. att. Proteīnu izdalīšanās laika starpība ($t_{R_{MeOH}} - t_{R_{MeCN}}$) uz kolonnas *Zorbax 300Extend-C18* (A) un *Poroshell 300Extend-C18* (B), kustīgā fāze: acetonitrils/ūdens/0,1% TFA 25-80% B, 10 min; metanols/ūdens/0,1% TFA 30-90% B, 10 min, T= 60 °C

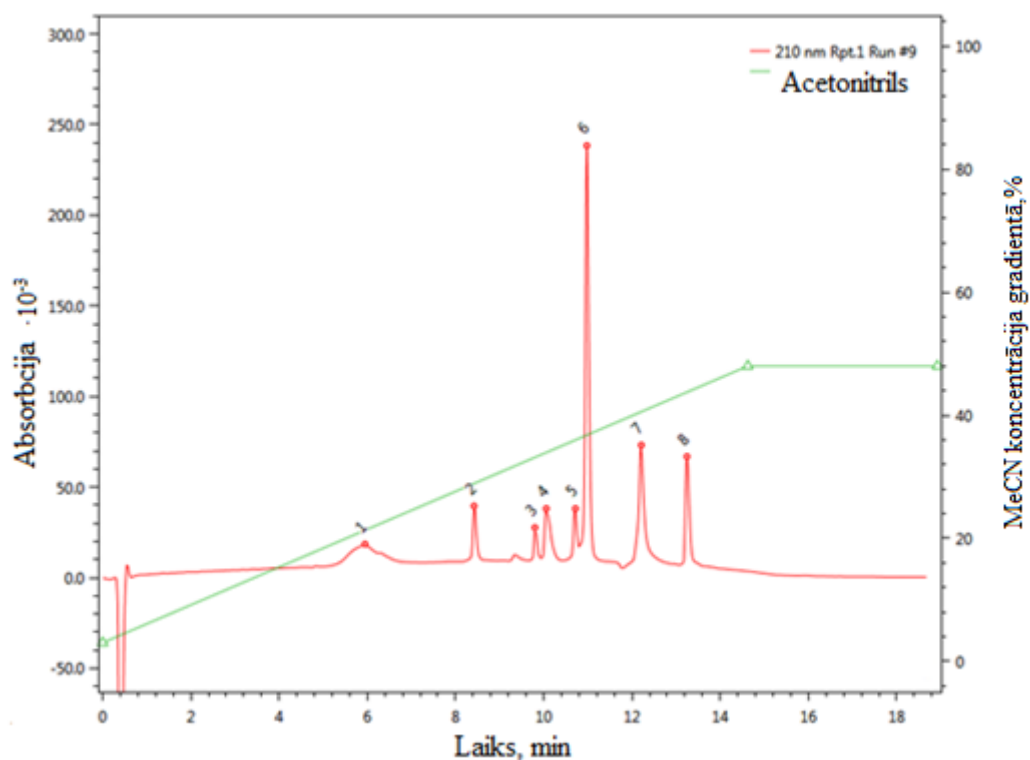
3.5. Proteīnu maisījumu atdalīšana apgrieztās fāzes AEŠH apstākļos

Attēlā 3.18. parādīta proteīnu standartvielu maisījuma atdalīšana uz *YMC-Pack C4* kolonnas, selektivitātes vērtības ir $> 1,5$ un joslu izšķiršana > 2 . Šādu metodi var lietot proteīnu maisījuma atdalīšanai, kā arī to kvantitatīvai noteikšanai. Proteīnu izdalīšanās secība tika identificēta izmantojot proteīnu standartvielas.



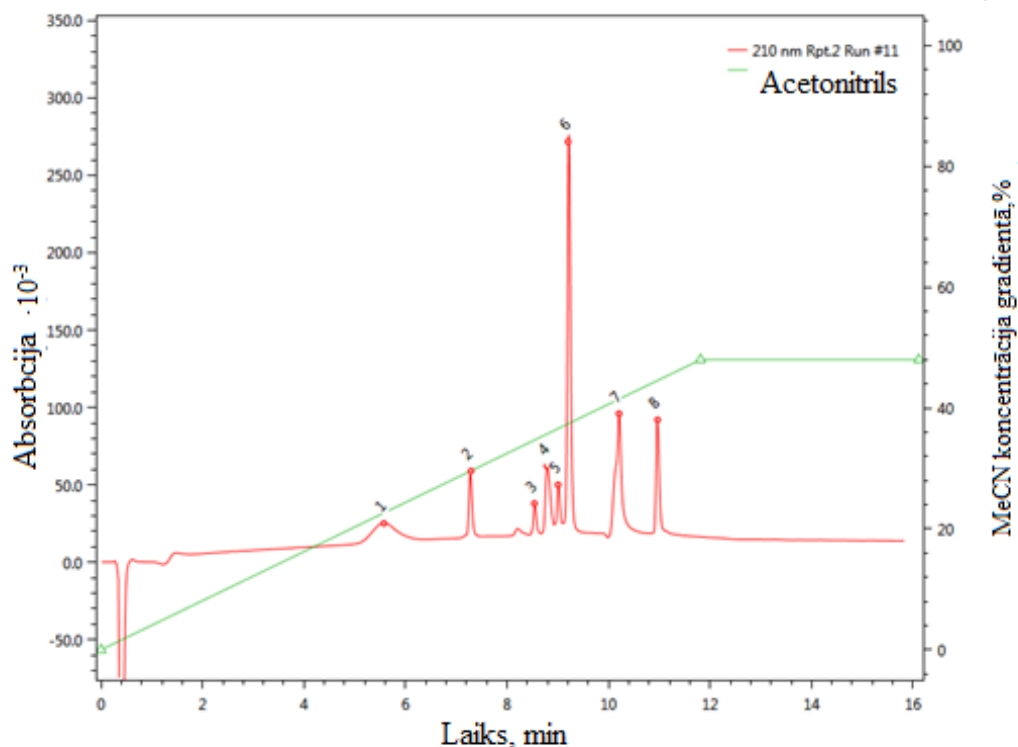
3.18. att. Proteīnu atdalīšana uz *YMC Pack C4* sorbenta ar kustīgo fāzi acetonitrils/ūdens/ 0,1% TFA, gradienta režīms 1-43% 0-35,7 min 43% 35,7-53,7 min. 1 – Aprotinīns, 2 – insulīns, 3 - ribonukleāze, 4 – elastāze, 5 – lizocīms, 6 – albumīns, 7 – α -laktalbumīns, 8- mioglobīns, T=40 °C, 20 μ L

Izmantojot dažādus gradienta profilus uz kolonnas *PLRP-S 4000* netika atrasti piemēroti hromatogrāfiskie apstākļi proteīnu maisījuma atdalīšanai (skat. 3.19. att.). Proteīnu pāru 3,4 un 5,6 selektivitāte un joslu izšķiršana $< 1,5$.



3.19. att. Proteīnu atdalīšana uz *PLRP-S 4000* sorbenta ar kustīgo fāzi acetnitrils/ūdens/ 0,1% TFA, gradienta režīms 3-48% 0-14,6 min 48% 14,6-18,9 min. 1 – Aprotinīns, 2 – insulīns, 3 - ribonukleāze, 4 – elastāze, 5 – lizocīms, 6 – albumīns, 7 – a-laktalbumīns, 8- mioglobīns, T=50 °C, 20 μL

Arī uz *Zorbax 300Extend-C18* (skat. 3.20. att.) joslas nav pilnīgi atdalītas līdz bāzes līnijai šajos hromatogrāfiskajos apstākļos. Proteīnu 3,4,5 un 6 selektivitāte ~ 1, joslu izšķiršana ir ~1,5.



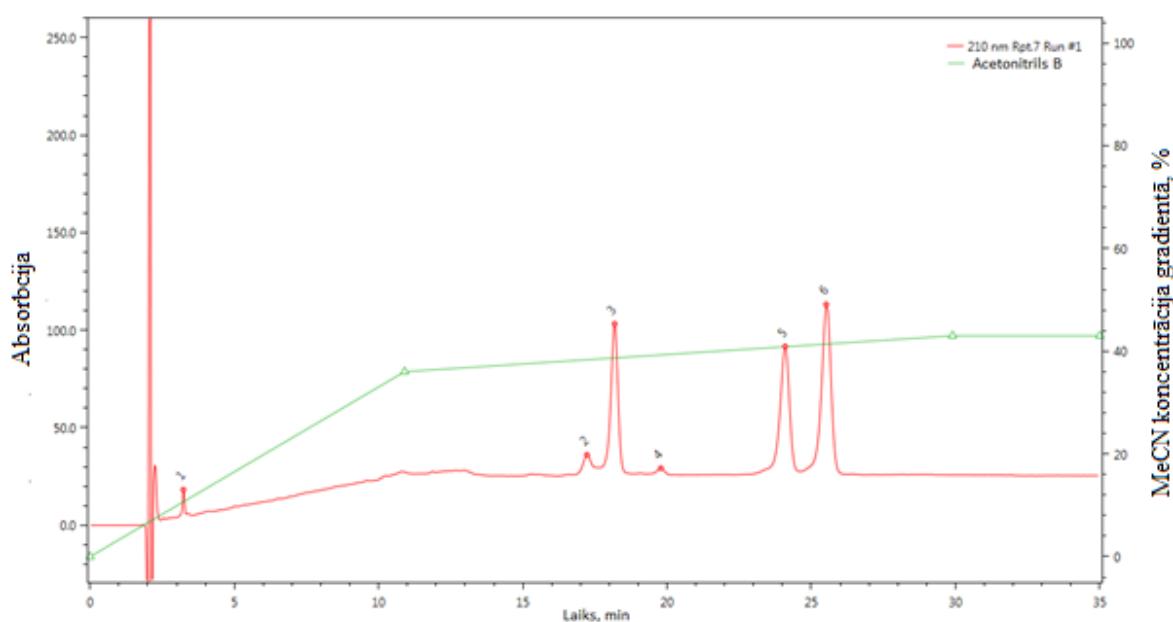
3.20. att. Proteīnu atdalīšana uz *Zorbax 300Extend-C18* sorbenta ar kustīgo fāzi acetoniitrils/ūdens/ 0,1% TFA, grādienta režīms 0-48% 0-11,8 min 48% 11,8-16,1 min. . 1 – Aprotinīns, 2 – insulīns, 3 - ribonukleāze, 4 – elastāze, 5 – lizocīms, 6 – albumīns, 7 – α -laktalbumīns, 8- mioglobīns T=50 °C, 20 μ L

3.6. Piena proteīnu noteikšana apgrieztās fāzes AEŠH apstākļos

No literatūras datiem ir zināms, ka piena paraugi satur α -laktalbumīnu (14200 Da), β -laktoglobulīns A (18276 Da) un B (18363 Da), kā arī nelielos daudzumos laktoferīnu, albumīnu un imunoglobulīnu G. Lai varētu noteikt proteīna daudzumu kompleksā maisījumā, pirmkārt ir nepieciešams atrast optimālus hromatogrāfiskus apstākļus to atdalīšanai. Mazmolekulāru vielu gadījumā, kad analizējamās vielas ir izomēri vai ar līdzīgu struktūrformulu, to atdalīšanai iesaka izmantot izokrātiskos apstākļus. Proteīnu molekulas ir jutīgas pret organiskā šķīdinātāja koncentrācijas izmaiņu, izokrātiskos apstākļus neiesaka izmantot, jo samazinot vai palielinot organiskā šķīdinātāja koncentrāciju par 1-2% proteīna izdalīšanās laiks var palielināties vai samazināties pat 2 reizes. Izokrātisko apstākļu piemeklēšana proteīnu atdalīšanai var būt ļoti laikietilpīga. Lai samazinātu laika un šķīdinātāju patēriņu, metodes izstrādei var izmantot programmas, kas prognozē teorētiskos izdalīšanās laikus. Darba ietvaros tika atrasti apstākļi β -laktoglobulīna B un β -laktoglobulīna A atdalīšanai, lai varētu to daudzumu noteikt piena paraugos.

Izmantojot α -laktalbumīnu, β -laktoglobulīnu A un B standartvielu maisījumu, tika veikti daži eksperimenti, lai atrastu hromatogrāfiskos apstākļus proteīnu atdalīšanai. Tika izvēlētas četras kolonnas, uz kurām tika veikts tests, lai noskaidrotu šo proteīnu atdalīšanas iespējas. Ar *-C4*, *-C3*, *-Diphenyl* un *-C18* kolonnām joslu izšķiršana (R_s) β -laktoglobulīna A un B attiecīgi ir 1,37; 0,50; 0,74; 0,77. Izvērtējot iegūtos datus, tālākiem eksperimentiem tika izvēlēta kolonna *-C4*, ar kuru tika veikta sākotnējo hromatogrāfisko apstākļu optimizācija, lai iegūtu pilnīgu proteīnu atdalīšanu.

Attēlā 3.21. parādīta proteīnu atdalīšana piena paraugā, joslu izšķiršana starp β -laktoglobulīnu A un B joslām ir 2,45. Lai atdalītu proteīnus β -laktoglobulīnu A un B tika izmantots lēzens gradienta profils.



3.21. att. Piena parauga hromatogramma. Proteīnu atdalīšana uz *YMC Pack-C4* sorbenta ar kustīgo fāzi acetonitrils/ūdens/ 0,1% TFA, gradienta režīmā 0-36% 0-10,9 min, 36-43% 10,9-29,9 min, 43% 29,9-35 min. 1,2 un 4 nezināmas vielas, 3 - α -laktalbumīns, 5 - β -laktoglobulīns B un 6 - β -laktoglobulīns A, $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $20\text{ }\mu\text{L}$, $\gamma = 0,1\text{ mg/ml}$

Tika novērots, ka piena proteīnu atdalīšanu ietekmē nelielas izmaiņas hromatogrāfiskajā metodē, jo, kā zināms, proteīni ir jutīgi pret kustīgās fāzes sastāva izmaiņām. Tabulā 3.6. parādīts, ka joslu izšķiršanu ietekmē kustīgās fāzes, temperatūras un plūsmas ātruma (F) izmaiņas.

Ir redzams, ka nelielas metodes izmaiņas minimāli ietekmē uz piena proteīnu atdalīšanu. Pāru 4 un β -laktoglobulīna (5) β -laktoglobulīna B (5) un β -laktoglobulīna A (6) un 3 un 4 atdalīšanu visvairāk ietekmē acetonitrila daudzuma palielināšana kustīgajā fāzē. Pāru 2 un 3

atdalīšanu visvairāk ietekmē temperatūras paaugstināšana un plūsmas ātruma samazināšana, neskatoties uz to, ka joslu izšķiršana ir 1,89, hromatogrammā ir redzams, ka joslas līdz bāzes līnijai netiek atdalītas (skat. 3.22. att.).

3.6. tabula

Joslu izšķiršana (Rs) piena proteīniem

Komponenta Nr. (skat. 3.22. att.)	+5°C	-5°C	+2%	-2%	-0,1ml/min	+0,1ml/min	Metode
	Joslu izšķiršana (Rs)						
2/3	1,86	1,92	1,89	2,03	1,87	1,70	1,95
3/4	3,23	3,33	2,82	3,25	3,30	3,05	3,28
4/5	7,50	7,57	6,01	7,59	7,23	7,12	7,58
5/6	2,32	2,24	2,14	2,29	2,26	2,24	2,30

Piena proteīnu atdalīšanai tika izvēlēti trīs dažādi piena paraugi, kuros tika noteikts to daudzums (skat. 3.7. tab.). No literatūras avotiem ir zināms, ka pasterizētam pienam minimālais kopējais β -laktoglobulīna daudzums ir 2600 mg/L. Piena paraugs Nr. 1 (pasterizēts govju piens) satur kopējo β -laktoglobulīna daudzumu 3600 mg/L, kas atbilst kvalitātes normām.

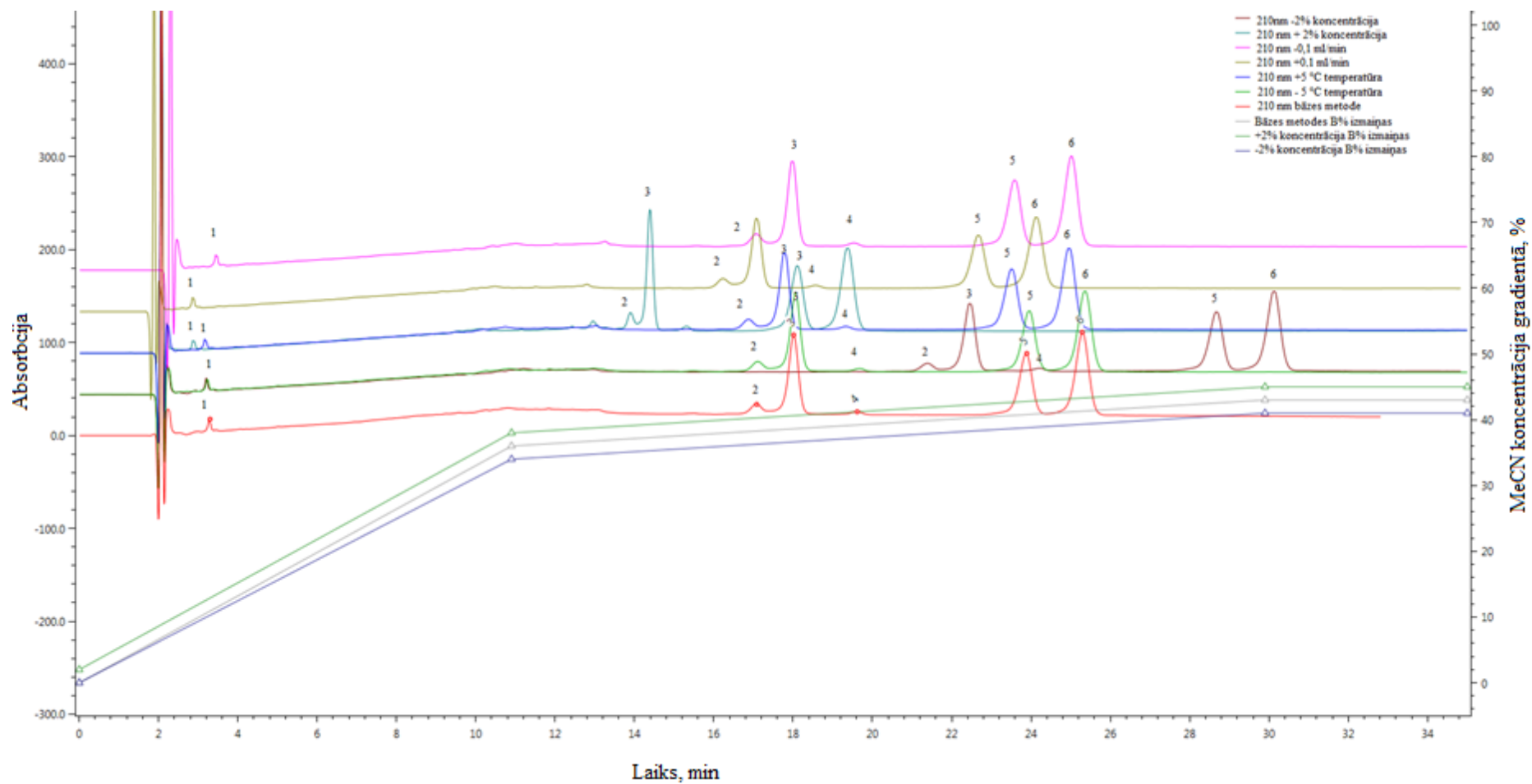
Paraugš Nr. 2 ir kazas piens, kas pasterizēts īpaši augstā temperatūrā (UHT). Tajā minimālajam kopējam β -laktoglobulīna daudzumam jābūt 50 mg/L. Šis piena paraugs satur tikai β -laktoglobulīnu B. Vismazākais piena proteīnu saturs bija piena paraugā Nr. 3 (govju piens, kas pasterizēts īpaši augstā temperatūrā, UHT), kur kopējais β -laktoglobulīna daudzums ir 94 mg/L.

3.7. tabula

Proteīnu daudzums piena paraugos

mg/L	Piens Nr. 1				Piens Nr. 2				Piens Nr. 3			
	LA	LG-B	LG-A	LG*	LA	LG-B	LG-A	LG*	LA	LG-B	LG-A	LG*
Vid.	1500	1700	1900	3600	-	450	-	450	800	49	45	94
RSN	1,2	2,1	1,8	0,46	-	1,7		1,7	1,3	2,6	2,3	1,3

LA – α -laktalbumīns; LG-B β -laktoglobulīns B; LG-A β -laktoglobulīns A; LG* - kopējais β -laktoglobulīns, SN – standartnovirze, relatīvā standartnovirze.



3.22. att. Piena parauga hromatogramma iegūta ar mainīgu kustīgās fāzes sastāvu, plūsmas ātrumu, temperatūru. Proteīnu atdalīšana uz *YMC Pack-C4* sorbenta ar kustīgo fāzi acetnitrils/ūdens/ 0,1% TFA, dažādi gradienta režīmi, 1,2 un 4 nezināmas vielas, 3 - α -laktalbumīns, 5 - β -laktoglobulīns B un 6 - β -laktoglobulīns A, 20 μ L

3.7. Proteīnu izdalīšanās laiku paredzēšana

Izmantojot lineāro sorbcijas modeli, kurš balstās uz diviem eksperimentāliem mērījumiem (izdalīšanās laiks un gradienta profils), var paredzēt proteīnu izdalīšanās laikus. No iegūtajiem eksperimentālajiem mērījumiem (izdalīšanās laiks un gradienta profils) tika konstruēti lineārās sorbcijas modeļi, kuri raksturo vielu sorbcijas koeficienta atkarību no kustīgās fāzes sastāva.

ChromSword programmā ievada eksperimentos izmantotās kustīgās fāzes procentuālā sastāva izmaiņas laikā (gradienta profilus) un proteīnu izdalīšanās laikus, lai iegūtu lineārās sorbcijas modeļus. Tika veikti eksperimenti, lai salīdzinātu paredzētos proteīnu izdalīšanās laikus ar eksperimentāli iegūtajiem un aprēķinātu prognozes kļūdu.

Sorbcijas modeļi *ChromSword* tiek definēti kā matemātiskie vienādojumi, kuri apraksta vielas sorbciju un tās īpašības, noteiktos hromatogrāfiskajos eksperimentos. *ChromSword* izmanto divas pieejas sorbcijas modeļa noteikšanai apgrieztās fāzes apstākļos.

- 1) Tradicionālā pieeja, izmantot lineāro, kvadrātisko un kubisko vai citu polinomisko modeli, lai aprakstītu izšķīdušās vielas sorbciju un organiskā šķīdinātāja koncentrāciju kustīgajā fāzē:

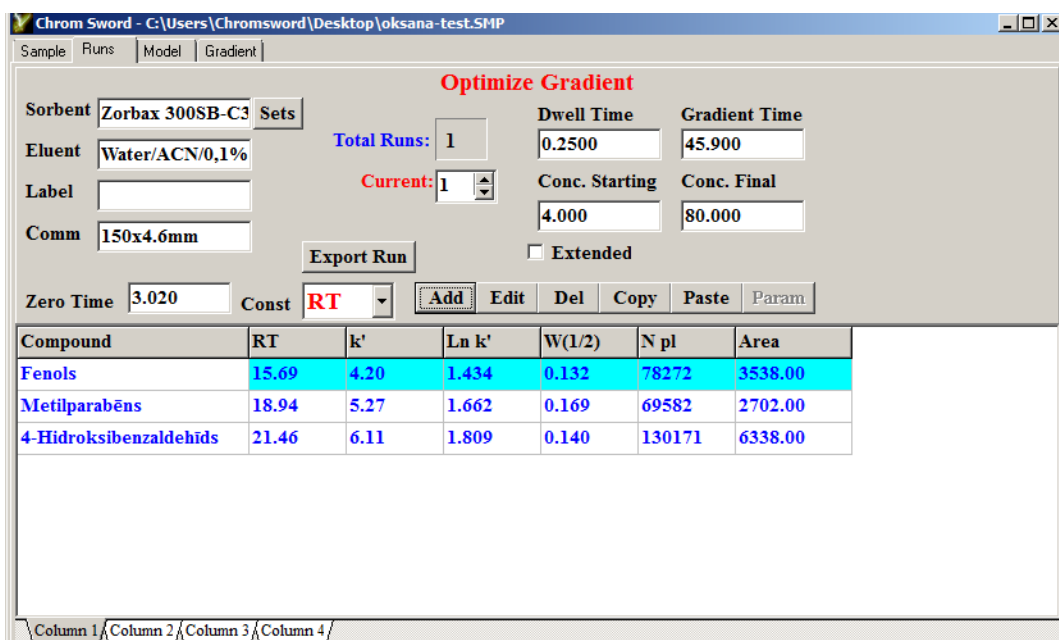
$$\ln k = a + b(C)$$

$$\ln k = a + b(C) + d(C)^2$$

$$\ln k = a + b(C) + d(C)^2 + e(C)^3$$

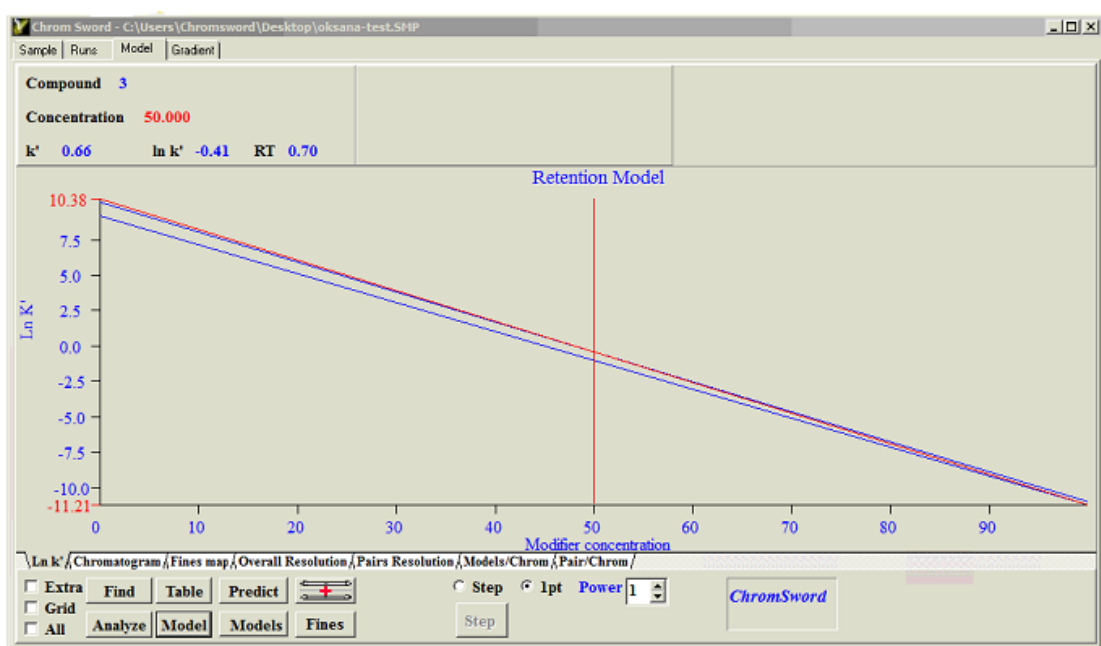
kur k sorbcijas faktors, C – organiskā šķīdinātāja koncentrācija kustīgajā fāzē, a , b , d un e ir vienādojuma parametri, kurus aprēķina programma katrai vielai no eksperimentāliem mērījumiem, kas iegūti ar dažādām organiskā šķīdinātāja koncentrācijām kustīgajā fāzē. Visvienkāršākais ir pirmais lineārais modelis, kur nepieciešami divi eksperimentāli rezultāti, lai prognozētu optimizētu hromatogrāfiskos apstākļus. Polinomos modeļus izmanto hromatogrāfisko apstākļu prognozēšanai, ja nav zināma vielas molekulārā struktūra.

Lai konstruētu lineāro modeli *ChromSword* programmā ir nepieciešami eksperimentālie mērījumi (izdalīšanas laiks, joslas platums, joslas laukums) no diviem gradienta profiliem (skat. 3.23. att.), kuriem organiskā šķīdinātāja koncentrācija ir vienāda, bet gradienta laiks mainās vismaz 2 reizes (piemēram, gradients 20-80%, 5 min un 20-80% 10 min).



3.23. att. *ChromSword* programmas logs, kurā ievada izdalīšanās laiku un gradienta profilu

3.24. un 3.25. Attēlos ir parādīts 3 testa vielu lineārais sorbcijas modelis, kur $\ln k'$ – vielas sorbcijas koeficienta logaritms, $\ln k'_0$ – sorbcijas koeficienta logaritms pie organiskā šķīdinātāja koncentrācijas $C=0$, a_0 lineārā polinoma faktors.

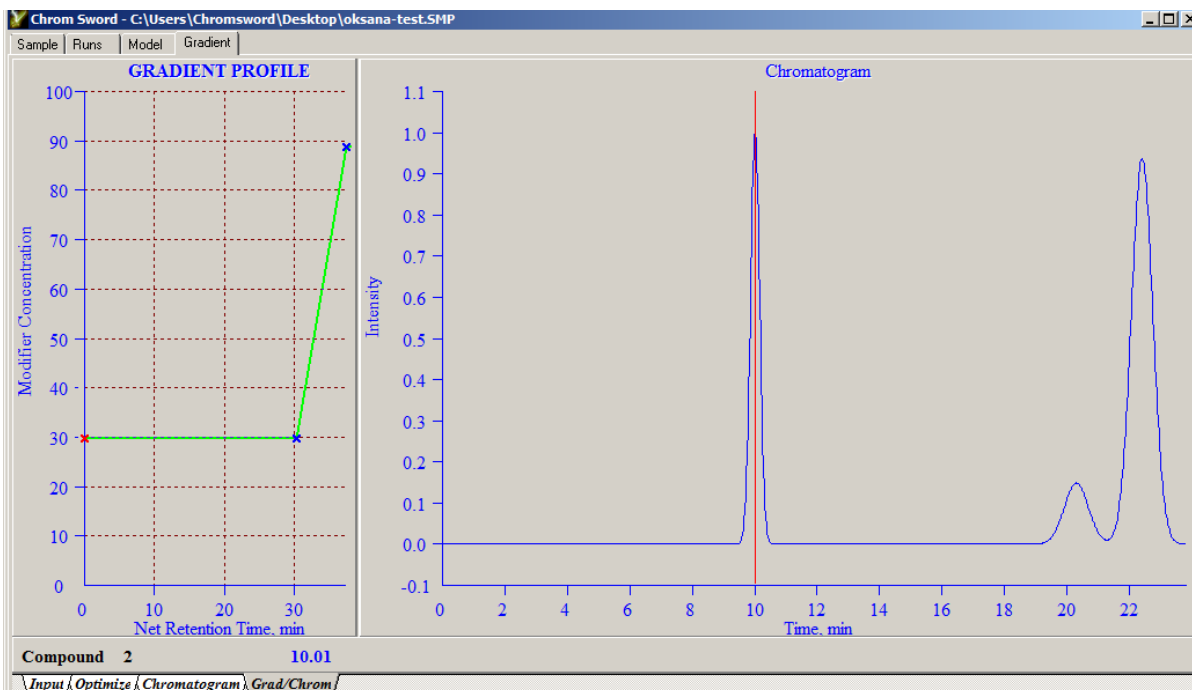


3.24. att. *ChromSword* programmā lineārās sorbcijas modelis (0-100% acetnitrila kustīgajā fāzē)

N	Compound	Ln k'0	a0
1	1	10.1406	-0.2112
2	2	9.1973	-0.2040
3	3	10.3764	-0.2158

3.25. att. Lineārās sorbcijas modelis *ChromSword* programmā

Eksperimentāli ir iegūti izdalīšanās laiki no diviem dažādiem gradienta profiliem izmantojot šos datus var paredzēt vielas izdalīšanās laiku atšķirīgā gradienta profilā (piemēram, 20%-60%, 10 min). Eksperimentāli piemeklēt piemērotu gradienta profilu vielu atdalīšanai bieži vien šis process ir laikietilpīgs, tāpēc izmantojot divus eksperimentālos datus var atrast gradienta profilu, kurā vielu maisījumu atdalīšana notiek līdz bāzes līnijai. Līdzīgā veidā var optimizēt ne tikai gradienta profilu, bet arī kustīgās fāzes pH vērtību un temperatūru. *ChromSword* programmā gradienta profilu var optimizēt manuāli bīdot krustiņus (skat. 3.26. att.) ir redzams kā mainās vielu atdalīšana no gradienta profila. Vai arī izmantojot pogu “optimize” programma automātiski piemeklē dažādus gradienta profilus. Ir iespējams iestatīt kritiskos parametrus, kuri ir svarīgi optimizācijas procesā (piemēram, gradienta laiks, gradienta profila sākumu un/vai beigu koncentrāciju), tas nozīmē, ka programma ņems vērā šos parametrus un piedāvās gradienta profilus, kuros ir ievēroti iestatītie parametri.

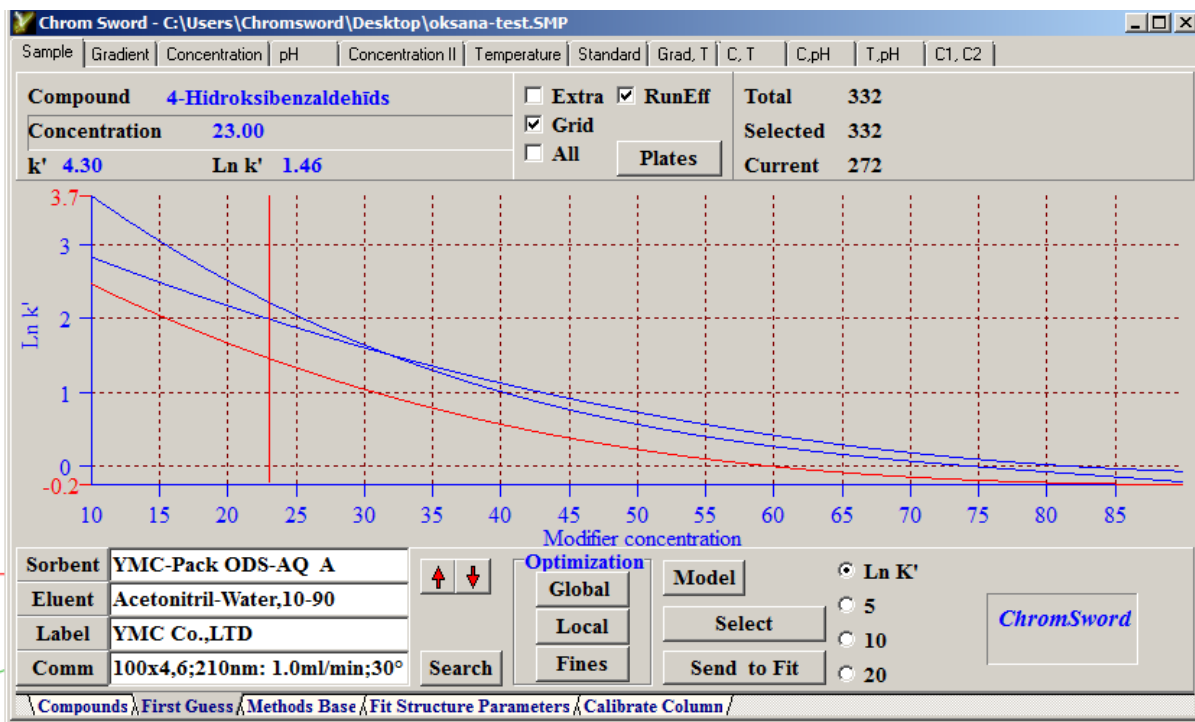


3.26. att. Gradientsa profila optimizācija izmantojot *ChromSword* programmu

2) Otrā veida pieeja, kas ņem vērā izšķīdušās vielas un kolonnas īpašības.

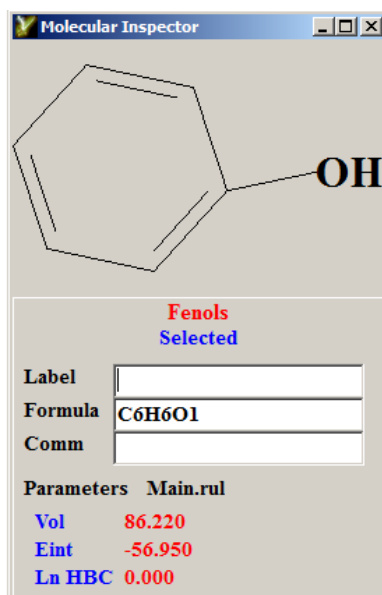
$$\ln k = a(V)^{2/3} + b(\Delta G_w) + c$$

kur V ir analizējamā parauga parciālais mola tilpums (cm^3/mol); ΔG_w ir analizējamā parauga mijiedarbības enerģija ar ūdeni (kJ/mol); a , b un c ir parametri, kurus nosaka apgrieztās fāzes sorbents ar izmantoto kustīgo fāzi. Izmantojot savienojuma struktūru ar datorprogrammas palīdzību var izrēķināt V un ΔG_w . Parametrus a , b un c var noteikt kalibrējot kolonnu ar references standartiem var izmantot šādu metodi sorbcijas parametra noteikšanai. Šāda tipa modelis ļauj precīzāk prognozēt hromatogrāfiskos apstākļus, bet pirms prognozēšanas ir jāveic kolonnu kalibrēšana ar standartiem. Mazmolekulāru savienojumu struktūrformulas var ievadīt *ChromSword* programmā un var izvēlēties kolonnu uz kuras nepieciešama vielu hromatogrāfisko apstākļu prognozēšana (skat. 3.27. att.). *ChromSword* datu bāzē ir apmēram 100 dažādas kalibrētas kolonnas uz kurām var veikt mazmolekulāru savienojumu izdalīšanas laika paredzēšanu izmantojot tikai struktūru gan izokrātiskoas, gan gradientsa apstākļos.



3.27. att. Vielu izdalīšanas laika prognozēšana *ChromSword* programmā izmantojot struktūrformulu

Ievadot *ChromSword* programmā vielas struktūrfomulu var iegūt vielas molekulas lielumu ūdenī, cm^3/mol (Vol) un mijiedarbību enerģiju ar ūdeni kJ/mol (Eint), šos parametrus *ChromSword* programma izmantot (skat. 3.28. att.), lai prognozētu vielas izdalīšanas laiku, ja ir zināma tikai vielas struktūrfomula.

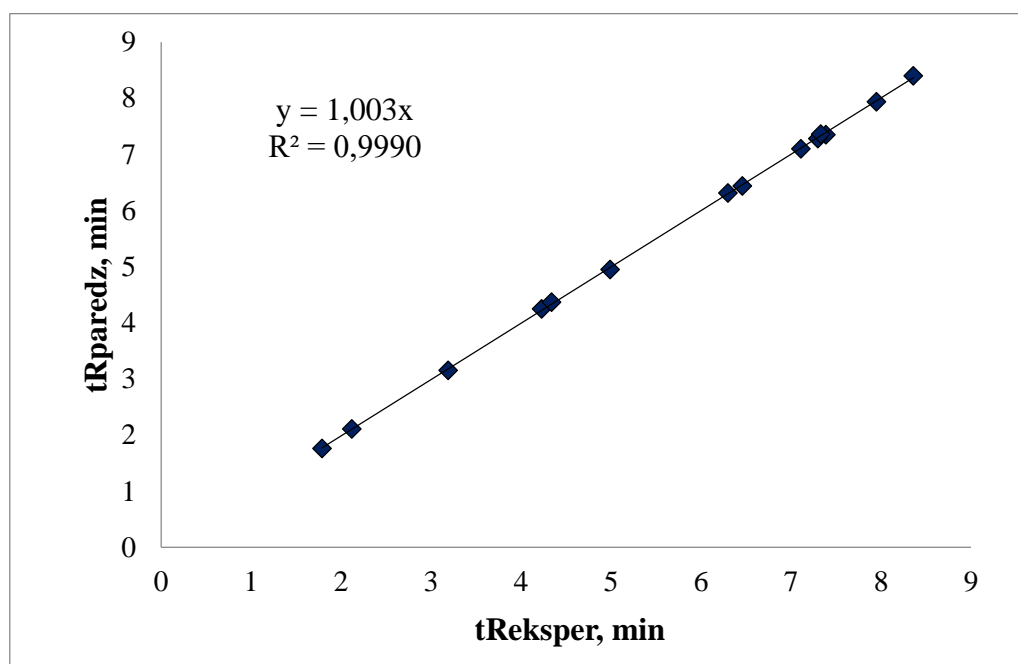


3.28. att. *ChromSword* molekulas datu logs

Prognozētie vielu izdalīšanās laiki izmantojot tikai struktūrformulu ir orientējoši un precīzus izdalīšanās laikus var iegūt *ChromSword* programmā ievadot vielas molekulāro formulu un izdalīšanās laiku no viena eksperimenta. Ir zināms, ka proteīni var mainīt savu konformāciju hromatogrāfiskajos apstākļos, tāpēc automatizētas datoru metodes nevar balstīties uz proteīnu struktūru, tomēr datorsimulācijas, kuru pamatā izmantot proteīnu sorbciju varbūt noderīgas metodes izstrādē.

Proteīni ir lielmolekulārie savienojumi, tāpēc izdalīšanās laiku paredzēšanu var izmantot lineāros sorbcijas modeļus. Paredzēto izdalīšanās laiku noteikšanai tika izmantota *ChromSword* programma un 3.29. attēlā parādītais vienādojums.

Lineārie sorbcijas modeļi uzrāda labu korelāciju starp proteīnu eksperimentālajām un paredzētajām vērtībām par organisko šķīdinātāju izmantojot acetonitrilu vai metanolu uz *Poroshell 300SB-C18*, *Poroshell 300Extend-C18*, *Zorbax 300SB-C18* un *Zorbax 300SB-C18*. Attēlos 3.29. un 1.-3. pielikumos parādīta proteīnu izdalīšanās laiku korelācija starp eksperimentālajām un paredzētajām vērtībām uz *Poroshell 300Extend-C18*, *Poroshell 300SB-C18*, *Zorbax 300Extend-C18*, *Zorbax 300SB-C18* ar metanolu un acetonitrilu kā kustīgās fāzes organisko šķīdinātāju.



3.29. att. Proteīnu (skat. 3.10. tab.) izdalīšanās laiku korelācija starp eksperimentālajām un paredzētajām vērtībām uz *Poroshell 300Extend-C18*, kustīgā fāze: acetonitrils/ūdens/0,1% TFA, gradienta režīmā 25-80% B 10 min, T=60 °C

Lai varētu lietot lineāro sorbcijas modeli ir nepieciešami divi eksperimentālie rezultāti pie diviem dažādiem gradienta profiliem. Šāda pieeja ļauj ietaupīt hromatogrāfista laiku un

samazināt eksperimentu skaitu, kā arī šķīdinātāja patēriņu, lai iegūtu optimālu metodi, ko var lietot proteīnu maisījumu atdalīšanai.

Tabulā 3.8. parādītas eksperimentālās un paredzētās proteīnu izdalīšanās laiku vērtības uz *Poroshell 300Extend-C18* ar acetonitrilu un metanolu kā organisko šķīdinātāju. No 3.8. tabulas ir redzams, ka starpība starp eksperimentālo vērtību un paredzēto ir minimāla (maksimālā $\Delta t_R = 0,04$). No tā var secināt, ka lineārās sorbcijas modeļus var izmantot proteīnu izdalīšanās laiku paredzēšanai, metodes optimizācijai.

3.8. Tabula

Eksperimentālās un paredzētās proteīnu izdalīšanās laiku vērtības uz *Poroshell 300Extend-C18*, kustīgās fāzes: acetonitrils/ūdens/0,1% TFA, gradienta režīmi 30-80% B 10 min, 30-80% B 5 min; metanols/ūdens/0,1% TFA gradienta režīmi 40-80% B 10 min, 40-80% B 5 min

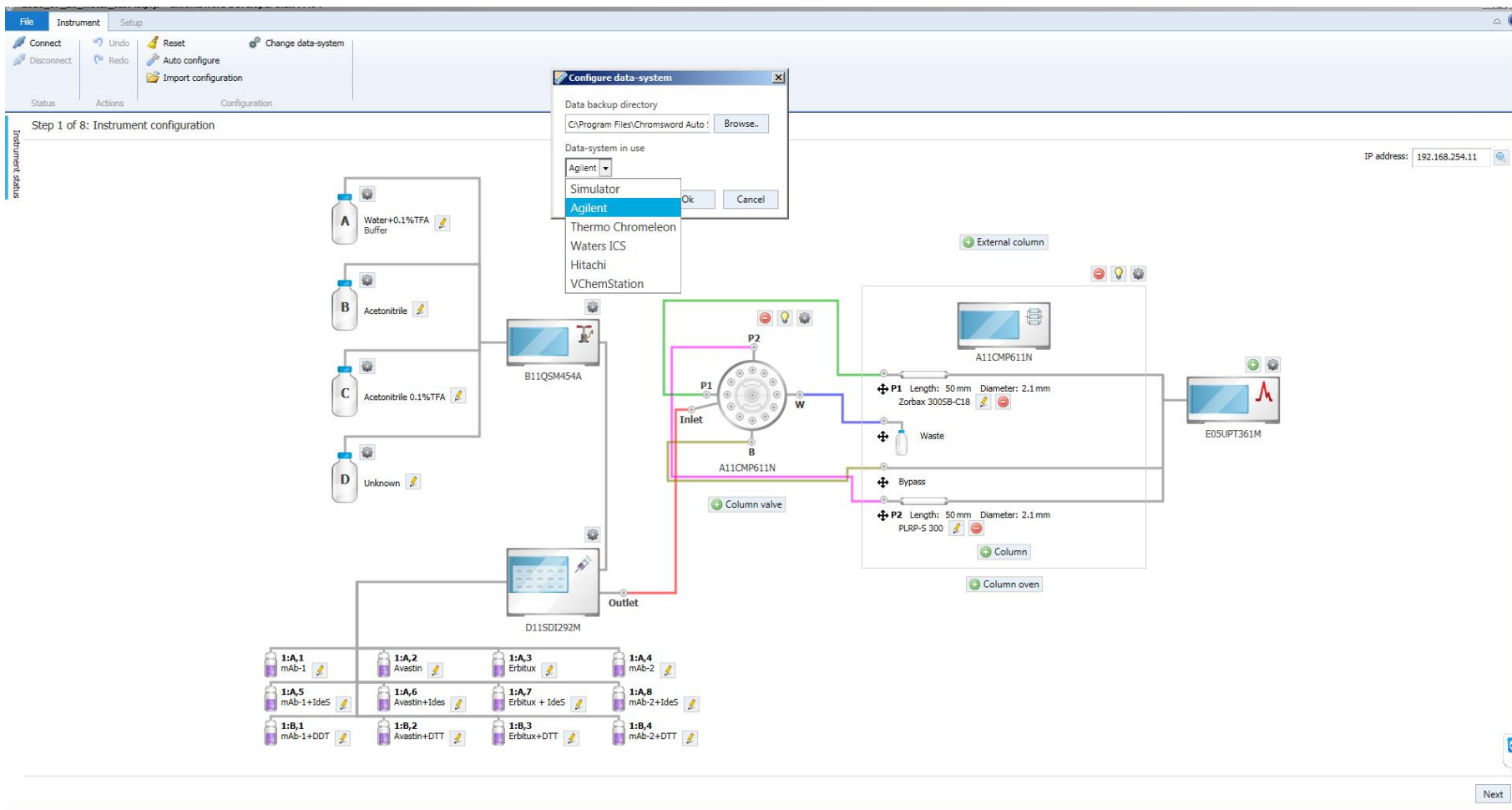
Organiskais šķīdinātājs Proteīnu nosaukums	Acetonitrils			Metanols		
	$t_{R\text{eksper}}^a$	$t_{R\text{paredz}}^b$	Δt_R	$t_{R\text{eksper}}^a$	$t_{R\text{paredz}}^b$	Δt_R
Insulīns	4,23	4,25	-0,02	3,32	3,30	0,02
Aprotinīns	1,79	1,76	0,03	0,83	0,87	-0,04
Citohroms C	4,34	4,37	-0,03	4,86	4,87	-0,01
Ribonukleāze	3,19	3,15	0,04	1,86	1,90	-0,04
α -Laktalbumīns	6,30	6,31	-0,01	6,15	6,11	0,04
Lizocīms	4,99	4,95	0,04	4,04	4,00	0,04
Mioglobīns	7,11	7,10	0,01	6,26	6,28	-0,02
β -Laktoglobulīns	7,39	7,35	0,04	6,80	6,82	-0,02
Elastāze	2,12	2,11	0,01	0,94	0,97	-0,03
Ogļskābes anhidrāze	7,95	7,94	0,01	6,82	6,83	-0,01
Peroksidāze	7,30	7,28	0,02	5,58	5,60	-0,02
Albumīns	6,46	6,44	0,02	6,14	6,17	-0,03
Enolāze	8,36	8,40	-0,04	7,22	7,25	-0,03
L-glutamīnskābes dehidrogenāze	7,33	7,36	-0,03	7,13	7,15	-0,02

^a eksper – eksperimentālais proteīnu izdalīšanās laiks

^b paredz – paredzētais proteīnu izdalīšanās laiks

Izmantojot eksperimentālos datus, tika izstrādāts papildinājums *ChromSword* programmai kā arī izstrādāti matemātiskie modeļi, kas ļauj lielmolekulāriem savienojumiem atrast optimālus apstākļus. Izstrādātie matemātiskie modeļi ir konfidenciāli. *ChromSwordAuto®Developer* ir inovatīva hromatogrāfijas metožu izstrādes programma, kas ļauj izstrādāt un optimizēt HPLC un UPLC metodes automātiski. *ChromSwordAuto®Developer* spēj kontrolēt dažādu ražotāju hromatogrāfus (piemēram,

Agilent, Waters, Hitachi u.c.) 3.30. Attēlā ir parādīts pirmais solis pirms maisījuma metodes optimizācijas. Izvēlās iekārtu uz kuras veiks hromatogrāfiskās analīzes, ievada paraugu, kolonnu, kustīgās fāzes nosaukumus.



3.30. att. Iekārtu konfigurācijas ekrāns

Pirms veikt hromatogrāfiskās metodes optimizāciju izvēlas metodes izstrādes uzdevumu.

ChromSwordAuto®Developer ietilpst dažādi automatizēti metodes izstrādes uzdevumi:

- *Rapid* optimizācija mazmolekulāriem savienojumiem (3-4 dažādi gradienti),
- *Rapid* optimizācija lielmolekulāriem savienojumiem (3-4 dažādi gradienti),
- Parauga sorbcija un optimizācija izokrātiskos apstākļos (12-20 izokrātiskas metodes),
- Parauga sorbcija un optimizācija gradienta apstākļos mazmolekulāriem savienojumiem (12-20 dažādi gradienti),
- Parauga sorbcija un optimizācija gradienta apstākļos lielmolekulāriem savienojumiem dažādi gradienti.

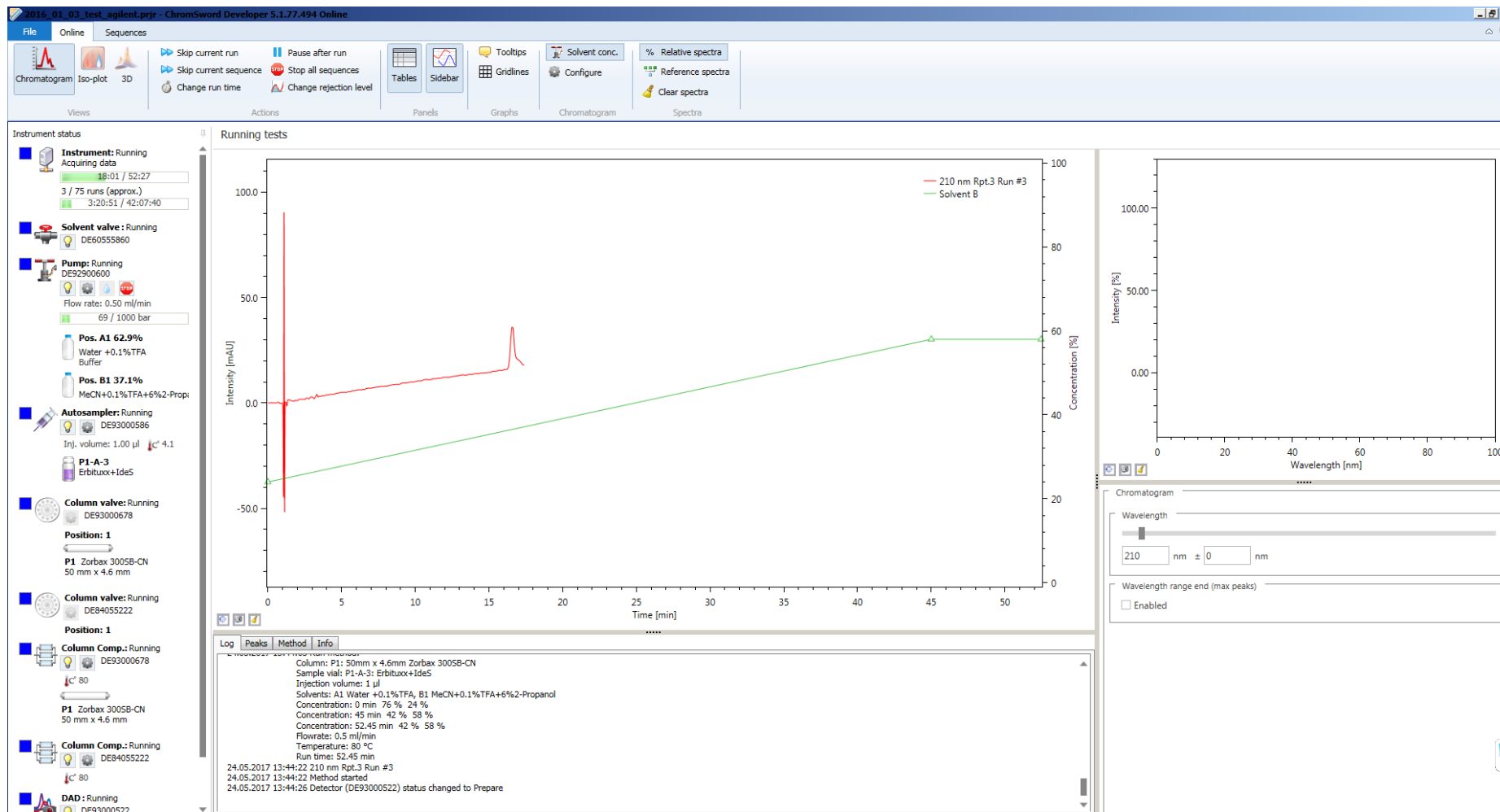
3.31. Attēlā ir parādīts summārais eksperimentu plāns, kur izvēlas kustīgo fāzi, paraugu, kolonnu, plūsmas ātrumu, kolonnas temperatūru, injekcijas tilpumu un viļņa garumu. Pārejot pie nākošā etapa (3.32. att.) ir parādīts online hromatogrāfiskās iekārtas statuss.

The screenshot shows the 'Planned tests / Sequences' window in the ChromSword software. The window title is 'Step 5 of 8: Planned tests / sequences'. The table below lists two test sequences with their respective parameters.

#	Enabled	Buffer	Solvent	Vial	Column	Flow, ml/min	Dw. time	Zero time, min	Eq. time, min	Temp., °C	Inj.vol, µl	Rejection level	Int.delay, min	WL				
1	<input checked="" type="checkbox"/>	A Water+0.1%TFA	C Acetonitrile 0.1%TFA	1:A,1: mAb-1	P1: 50mm x 2.1mm Zorbax 300SB-C18	0.25	2.4 min	0.42	10	80	1	0	0	210				
2	<input checked="" type="checkbox"/>	A Water+0.1%TFA	C Acetonitrile 0.1%TFA	1:8,4: mAb-2+DTT	P2: 50mm x 2.1mm PLRP-S 300	0.25	2.4 min	0.42	10	80	1	0	0	210				

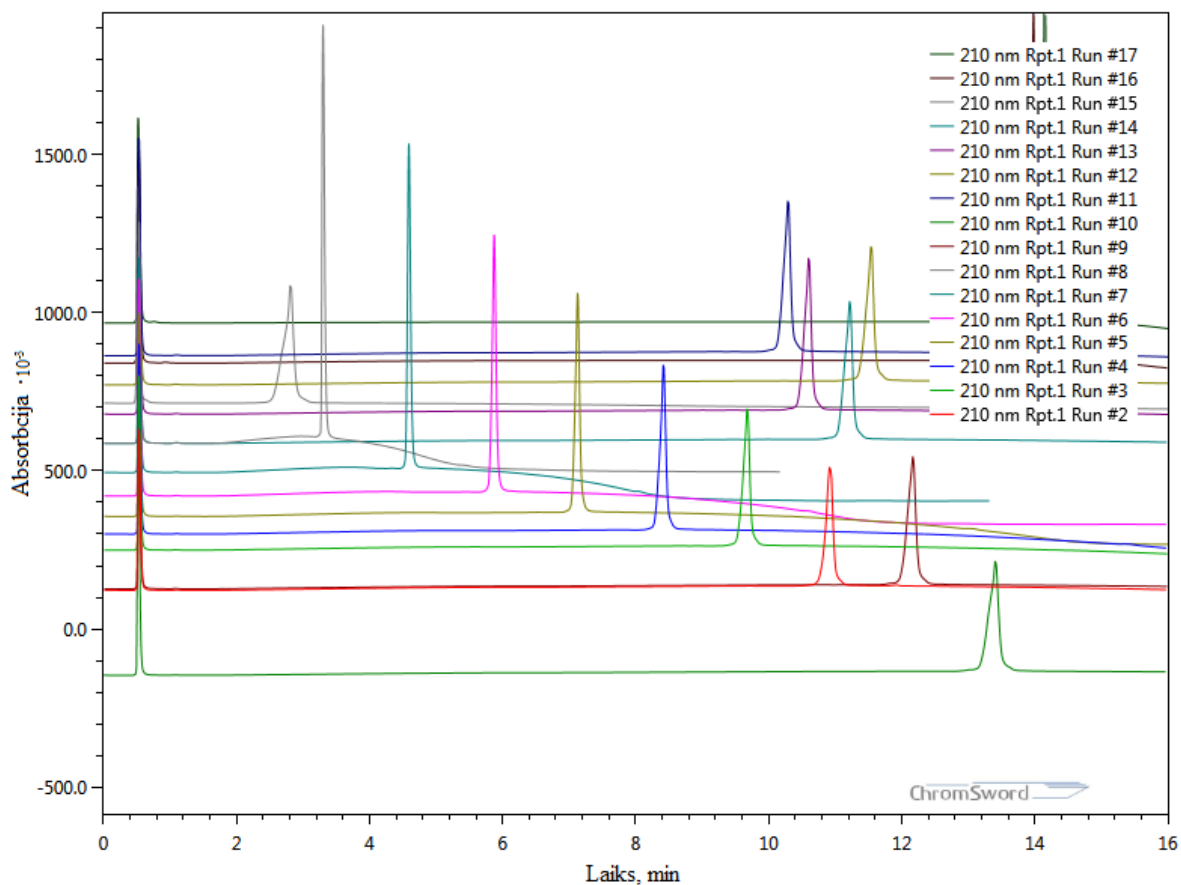
Below the table is an 'Add sequence' button.

3.31. att. Summārais eksperimentu plāns



3.32 att. Online hromatogrāfiskās iekārtas statuss

Attēlā 3.33. parādītas hromatogrammas izmantojot *ChromSwordAuto®Developer* programmas automatizētu metodes izstrādes uzdevumu lielmolekulāriem savienojumiem. Tiek veikti dažādi gradienta profili, kā rezultātā ir iespējams atrast piemērotāko ar īsāku analīzes laiku un šaurāku joslu platumu. Programma izmanto izstrādātos modeļus, lai atrastu piemērotu gradienta profilu.



3.33. att. Albumīna hromatogrammas uz kolonnas *Zorbax 300-SB Diphenyl*, kustīgā fāze: acetnitrils/ūdens/0,1% TFA, (dažādi gradienta profili), $F=0,25$ ml/min, $T=70$ °C, 1 μ l

No 3.9. tabulas datiem var redzēt, ka gradienta profila izvēle ietekmē uz albumīna izdalīšanās laiku un joslu platumu.

3.9. Tabula

Albumīna izdalīšanās laiks, joslas platums pusaugstumā, laukums, augstums, asimetrijas faktors. Kolonna: Zorbax 300-SB Diphenyl, kustīgā fāze: acetonitrils/ūdens/0,1% TFA, (dažādi gradienta profili), F=0,25 ml/min T=70 °C, 1 µl

Inžekcijas Nr.	tR, min	w _{0,5} , min	Laukums, mA*s	Augstums, A	Asimetrijas faktors	Gradienta profils, B % izmaiņas laikā
#2	10,9	0,111	2960	0,38	1,3	12-77% 0-22,1 min, 77% 22,1-29,0 min
#3	9,68	0,104	3070	0,44	1,4	12-77% 0-18,9 min, 77% 18,9-25,8 min
#4	8,42	0,089	3190	0,52	1,3	12-77% 0-15,8 min, 77% 15,8-22,7 min
#5	7,13	0,070	3370	0,70	1,0	12-77% 0-12,6 min, 77% 12,6-19,5 min
#6	5,87	0,063	3480	0,81	1,1	12-77% 0-9,5 min, 77% 9,5-16,4 min
#7	4,59	0,050	3360	1,0	1,4	12-77% 0-6,3 min, 77% 6,3-13,2 min
#8	3,30	0,041	3510	1,3	1,8	12-77% 0-3,2 min, 77% 3,2-10,1 min
#9	12,2	0,137	3570	0,39	1,3	12-77% 0-25,2 min, 77% 25,2-32,1 min
#10	13,4	0,160	3540	0,34	1,5	12-77% 0-28,4 min, 77% 28,4-35,3 min
#11	10,3	0,112	3460	0,47	1,4	12-77% 0-20,5 min, 77% 20,5-27,4 min
#12	11,5	0,124	3550	0,43	1,4	12-77% 0-23,6 min, 77% 23,6-30,5 min
#13	10,6	0,114	3670	0,48	1,3	12-77% 0-21,3 min, 77% 21,3-28,2 min
#14	11,2	0,132	3700	0,43	1,3	12-77% 0-22,8 min, 77% 22,8-29,7 min
#15	2,81	0,149	3950	0,38	1,8	36-53% 0-7,2 min, 53-59% 7,2-16,0 min, 59-61% 16,0-20,7 min
#16	13,9	0,052	3830	1,1	1,3	16-30% 0-4,4 min, 30-32% 4,4-11,5 min, 100% 11,5-17,4 min, 100% 17,4-21,4 min
#17	14,2	0,051	3820	1,1	1,3	23-28% 0-3,7 min, 28-32% 3,7-11,6 min, 100% 11,6-17,4 min, 100% 17,4-21,4 min

SECINĀJUMI

1. Iegūtie eksperimentālie dati rada priekšnosacījumus optimālu apstākļu atrašanai proteīnu maisījumu atdalīšanai, ļaujot samazināt veicamo eksperimentu skaitu un analīzes metožu izstrādes izmaksas.
2. Kā kustīgās fāzes organisko šķīdinātāju analīzēm var izmantot acetonitrilu, metanolu vai 2-propanolu.
3. Sorbenta daba ietekmē gan proteīnu izdalīšanās laiku, gan joslu formu. Apgrieztās fāzes AEŠH apstākļos proteīnu noteikšanai ir piemērotas visas testētās kolonnas (-C18, -C8, -C4, -C3, -(CH₂)CN, -Diphenyl, PLRP-S un Protein-RP). Daļiņu izmērs (intervālā no 1,8 līdz 5,0 μm) proteīnu hromatogrāfisko joslu platumu pusaugstumā būtiski neietekmē. Bet ietekmē sorbenta poru izmērs, tika noskaidrots, ka proteīnu izdalīšanās laiks samazinās, ja palielina sorbenta poru izmēru.
4. Proteīni zaudē savu sākotnējo struktūru (notiek denaturācija), ja tos iztur 80°C temperatūrā vismaz 10min. Tika pārbaudīta proteīnu stabilitāte kustīgajā fāzē: 50%acetonitrils/ūdens/0,1%TFA 24 stundu laikā netika novērota proteīnu hromatogrāfiskā laukuma vai hromatogrāfiskās joslas platumā izmaiņas.
5. Lineāro sorbcijas modeli var izmantot proteīnu izdalīšanās laika prognozēšanai, jo paredzētās izdalīšanās laiku vērtības ir tuvas eksperimentālajām.
6. Piena proteīnu maisījumu iespējams pilnīgi atdalīt apgrieztās fāzes hromatogrāfijas apstākļos ar -C4 tipa sorbentu, par kustīgo fāzi lietojot acetonitrila/ūdens/0,1% TFA šķīdumu gradienta režīmā 30 minūšu laikā. Gradienta profila izvēle ir atkarīga no proteīnu molekulu izmēra. Šaurākas joslas novērotas, izmantojot stāvākus gradienta profilus.
7. Ir izstrādāta programma, ar kuras palīdzību var atrast optimālus apstākļus proteīnu maisījumu sadalīšanai.
8. Izmantojot eksperimentālos datus par proteīnu sorbciju dažādos hromatogrāfiskos apstākļos ir izdevies uzlabot *ChromSword* algoritmu, lai to varētu pielietot lielmolekulāru savienojumu metožu izstrādē, samazinot metožu izstrādes laikus un izmaksas.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Jandera P., Kucerova Z., Urban J. Retention times and bandwidths in reversed-phase gradient liquid chromatography of peptides and proteins. *Journal of Chromatography A*. **2011**, 1218, 8784-8889.
2. Fekete S., Veuthey J.L., Guillarme D. New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: Theory and applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2012**, 69, 9-27.
3. Galushko S.V. The Calculation of Retention and Selectivity in Reversed-Phase Liquid Chromatography. Methanol-Water Eluents. *Chromatographia*. **1993**, 36, 39-42.
4. Fekete S., Veuthey J.L., McCalley D.V., Guillarme D. The effect of pressure and mobile phase velocity on the retention properties of small analytes and large biomolecules in ultra-high pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2012**, 1270, 127-138.
5. Getaz D., Hariharan S.B., Butte A., Morbidelli M. Modeling of ion-pairing effect in peptide reversed-phase chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2012**, 1249, 92-102.
6. Choudhary G. and Horvath C. *Ion-exchange chromatography*. Methods in Enzymology. vol. 270 (Karger, B. L. and Hancock, W. S., eds.). New York: Academic. 1996. 47–82.
7. Williams A. and Frasca V. *Ion-exchange chromatography*. Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F. M., Brent, R., et al., eds.). New York: Wiley. 1998. 1233.
8. Henry M. P. *Ion-exchange chromatography of proteins and peptides*, in HPLC of Macromolecules: A Practical Approach (Oliver, R. W. A., ed.). Oxford: Oxford University Press. 1989. 91–125.
9. Percin I., Khalaf R., Brand B., Morbidelli M., Gezici O. Strong cation-exchange chromatography of proteins on a sulfoalkylated monolithic cryogel. *Journal of Chromatography A*. **2015**, 1386, 13-21.
10. Marks M.S. . Determination of molecular size by zonal sedimentation analysis on sucrose density gradients, in *Current Protocols in Cell Biology*. New York: Wiley. 1998. 5.3.33.
11. Gooding K. M. and Regnier F. E. Size exclusion chromatography in *HPLC of Biological Macromolecules: Methods and Applications*. New York Dekker. 1990. 150.
12. Gooding K. M. and Freiser, H. H. High performance size exclusion chromatography of proteins, in *High Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation*. Boca Raton: CRC Press. 1990. 343.

13. Anspach B., Gierlich H.U., Unger K. K. Comparative study of Zorbax Bio Series GF 250 and GF 450 and TSK-Gel 3000 SW and SWXL columns in size exclusion chromatography of proteins. *Journal of Chromatographia*. **1998**, 443, 45–54.
14. Mant C.T., Parker J.M., Hodges R.S. Size-exclusion high performance chromatography of peptides. Requirement for peptide standards to monitor column performance and non-ideal behaviour. *Journal Chromatographia*. **1987**, 397, 99–112.
15. Hong P., Koza S., Bouvier E.S.P. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **2012**, 35, 2923-2950.
16. To B.C. Lenhoff A.M. Hydrophobic interaction chromatography of proteins II. Solution thermodynamic properties as a determinant of retention. *Journal of Chromatography A*. **2007**, 1141, 235-243.
17. Baumgartner K., Großhans S., Schütz J., Suhm S., Hubbuch J. Prediction of salt effects on protein phase behavior by HIC retention and thermal stability. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2016**, 128, 216-225.
18. Marchenko N.Y., Sikorskaya E.V., Marchenkov V.V., Kashparov I.A., Semisotnov G.V. Affinity chromatography of chaperones based on denatured proteins: Analysis of cell lysates of different origin. *Protein Expression and Purification*. **2016**, 119, 117-123.
19. Christians S., Denise van Treel N., Bieniara G., Eulig-Wien A., Hanschmann K.M., Giess S. Evaluation of capillary zone electrophoresis for the determination of protein composition in therapeutic immunoglobulins and human albumins. *Biologicals*. **2016**, 44, 234-241.
20. Rabe M., Verdes D., Seeger S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. **2011**, 162, 87-116.
21. HPLC Analysis of Biomolecules. Technical guide. Successful Separation of Peptides, Proteins and other Biomolecules. *Thermo Electron Corporation*. 2004. 48.
22. Carr D. A Guide to the Analysis and Purification of Proteins and Peptides by Reversed-Phase HPLC. *Advanced Chromatography Technologies*.
23. The handbook of analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC. *Grace Vydac*. Third Edition. 2003. 36.
24. Capriotti A.L., Cavaliere C., Foglia P., Samperi, R; Lagana A. Intact protein separation by chromatographic and/or electrophoretic techniques for top-down proteomics. *Journal of Chromatography A*. **2011**, 1218, 8760– 8776.

25. Staub A., Guillaume D., Schappler J., Veuthey J.L., Rudaz S. Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2011**, 55, 810-822.
26. Staub A., Zurlino D., Rudaz S., Veuthey J.L., Guillaume D. Analysis of peptides and proteins using sub-2 μm fully porous and sub 3- μm shell particles. *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218, 8903-8914.
27. Fekete S., Jensen D.S., Zukowski J., Guillaume D. Evaluation of a new wide-pore superficially porous material with carbon core and nanodiamond-polymer shell for the separation of proteins. *Journal of Chromatography A*, **2015**, 1414, 51-59.
28. Hayesa R., Ahmed, A., Edge T., Zhang H. Core-Shell Particles: preparation, fundamentals and applications in HPLC. *Journal of Chromatography A*, **2014**, 1357, 36-52.
29. Patil U.S., Osorno L., Ellender A., Grimm C., Tarr M.A. Cleavable ester-linked magnetic nanoparticles for labeling of solvent-exposed primary amine groups of peptides/proteins. *Analytical Biochemistry*. **2015**, 484, 18-20.
30. Bobály B., Guillaume D., Fekete S. Evaluation of new superficially porous particles with carbon core and nanodiamond-polymer shell for proteins characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2015**, 104, 130-136.
31. Geng X., Wang L.. Liquid chromatography of recombinant proteins and protein drugs. *Journal of Chromatography B*. **2008**, 866, 133-153.
32. 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. *Journal of Chromatography A*. **2005**, 1079, 213-220.
33. Everley R.A., Croley T.R. Ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry of intact proteins. *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1192, 239-247.
34. Iwata S. Recommended method of the Japanese Association of Medical Technologists for the determination of protein in urine by HPLC. *Clinica Chimica Acta*, **2001**, 303, 95-104.
35. Claessens H.A. Trends and progress in the characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *Trends in analytical chemistry*. **2001**, 20, 563.-582.
36. Claessens H.A. Characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *Column testing, classification and chemical stability*. Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven, 1999. – 283.
37. Koczian K., Haghedooren E., Dragovic S., Noszal B., Hoogmartens J., Adams E. Column selection for pharmaceutical analyses based on a column classification using four test parameters. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2007**, 44, 894-905.

38. Euerby M.R., Petersson P. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis. *Journal of chromatography A*. **2003**, 994, 13-36.
39. Forlay-Frick P., Fekete J., Heberger K. Classification and replacement test of HPLC systems using principal component analysis. *Analytica Chimica Acta*. **2005**, 536, 71-81.
40. Gilroy J.J., Dolan J.W., Snyder L.R. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography IV Type-B alkyl-silica columns. *Journal of chromatography A*. **2003**, 1000, 757-778.
41. Dolan J.W., Maule A., Bingley D., Wrisley L., Chan C.C., Angod M., Lunte C., Krisko R., Winston J.M., Homeier B.A., McCalley D.V., Snyder L.R. Choosing an equivalent replacement column for a reversed-phase liquid chromatographic assay procedure. *Journal of chromatography A*. **2004**, 1057, 59-74.
42. Sander L.C., Wise S.A. A new standard reference material for column evaluation in reversed-phase liquid chromatography. *Journal Separation Science*. **2003**, 26, 283-294.
43. Jandera P., Bunčková S., Halama M., Novotná K., Nepras M. Naphthalene sulphonic acids—new test compounds for characterization of the columns for reversed-phase chromatography. *Journal of chromatography A*. **2004**, 1059, 61-72.
44. Dolan J.W., Snyder L.R., Jupille T.H., Wilson N.S. Variability of column selectivity for reversed-phase high-performance liquid chromatography Compensation by adjustment of separation conditions. *Journal of chromatography A*. **2002**, 960, 51-67.
45. Ivanyi T., Vander Heyden Y., Visky D., Baten P., De Beer J., Lazar I., Massart D.L., Roets E., Hoogmartens J. Minimal number of chromatographic test parameters for the characterisation of reversed-phase liquid chromatographic stationary phases. *Journal of chromatography A*. **2002**, 954, - 99-114.
46. Visky, D., Heyden Y.V., Ivanyi T., Baten P., De Beer J., Kovacs Z., Noszal B., Roets E., Massart D.L., Hoogmartens J. Characterisation of reversed-phase liquid chromatographic columns by chromatographic tests. Evaluation of 36 test parameters: repeatability, reproducibility and correlation. *Journal of chromatography A*. **2002**, 977, 39-58.
47. Visky, D., Heyden Y.V., Ivanyi T., Baten P., De Beer J., Kovacs Z., Noszal B., Dehouck P., Roets E., Desire L., Massart D.L., Hoogmartens J. Characterisation of reversed-phase liquid chromatographic columns by chromatographic tests. Rational column classification by a minimal number of column test parameters. *Journal of chromatography A*. **2003**, 1012, 11-29.
48. Dehouck P., Visky D., Heyden Y.V., Adams E., Kovacs Z., Noszal B., Massart D.L., Hoogmartens J. Characterisation of reversed-phase liquid-chromatographic columns by

chromatographic tests. Comparing column classification based on chromatographic parameters and column performance for the separation of acetylsalicylic acid and related compounds. *Journal of chromatography A*. **2004**, 1025, 189-200.

49. Vervoort R.J., Ruyter E., Debets A.J., Claessens H.A., Cramers C.A., de Jong G.J. Characterisation of reversed-phase liquid chromatography stationary phases for the analysis of basic pharmaceuticals: eluent properties and comparison of empirical test methods. *Journal of chromatography A*. **2001**, 931, 67-79.

50. Borges E.M., Silva C.G.A., Collins H. Chromatographic evaluation of some stationary phases based on poly(methylcyclsiloxane) immobilized onto silica. *Microchemical Journal*. **2010**, 96, 120-125.

51. Lesellier E., West C. Description and comparison of chromatographic tests and chemometric methods for packed column classification. *Journal of chromatography A*. **2007**, 1158, 329-360.

52. Rogers S.D., Dorsey J.G. Chromatographic silanol activity test procedures: the quest for a universal test. *Journal of chromatography A*, **2000**, 892. - 57-65.

53. Euerby M.R., Petersson P. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing polar embedded groups/amino endcappings using principal component analysis. *Journal of chromatography A*, **2005**, 1088, 1-15.

54. Silva C.R., Collins C.H., Jardim I.C., Airoidi C. Chromatographic and column stability at pH 7 of a C18 dimethylurea polar stationary phase. *Journal of chromatography A*. **2004**, 1030, 157-166.

55. Vervoor R.J.M., Debets A.J., Claessens H.A., Cramers C.A., de Jong G.J. Optimisation and characterisation of silica-based reversed-phase liquid chromatographic systems for the analysis of basic pharmaceuticals. *Journal of chromatography A*. **2000**, 897. 1-22.

56. Mapihan K.L., Vial J., Jardy A. Reversed-phase liquid chromatography column testing and classification: Physicochemical interpretation based on a wide set of stationary phases. *Journal of chromatography A*. **2007**, 1144, 183-196.

57. Scholten A.B., Claessens H.A., de Hann J.W., Cramers C.A. Chromatographic activity of residual silanols of alkylsilane derivatized silica surfaces. *Journal of chromatography A*. **1997**, 759, 37-46.

58. Durcekova T., Boronova K., Mocak J., Lehotay J., Cizmarik J. QSRR models for potential local anaesthetic drugs using high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2012**, 59, 209-216.

59. Hancock T., Put R., Coomans D., Heyden Y.V., Everingham Y. A performance comparison of modern statistical techniques for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic QSRR studies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **2005**, 76, 185-196.
60. Porto L.C., Souza E.S., Junkes Bda S., Yunes R.A., Fonseca Heinzen V.E. Semi-empirical topological index: Development of QSPR/QSRR and optimization for alkylbenzenes. *Talanta*. **2008**, 76, 407-412.
61. Souza E.S., Kuhnen C.A., da Silva Junkes B., Yunes R.A., Fonseca Heinzen V.E. Quantitative structure–retention relationship modelling of esters on stationary phases of different polarity. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. **2009**, 28, 20-27.
62. Bodzioch K., Baczek t., Kaliszan R., Vander Heyden Y. The molecular descriptor logSumAA and its alternatives in QSRR models to predict the retention of peptides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2009**, 50, 563-569.
63. Baczek t., Kaliszan R., Novotna K., Jandera P. Comparative characteristics of HPLC columns based on quantitative structure–retention relationships (QSRR) and hydrophobic-subtraction model. *Journal of chromatography A*, **2005**, 1075, 109-115.
64. Goodarzi M., Jensen R., Vander Heyden Y. QSRR modeling for diverse drugs using different feature selection methods coupled with linear and nonlinear regressions. *Journal of chromatography B*. **2012**, 910, 84-94.
65. Bodzioch K., Durand A., Kaliszan R., Baczek T., Vander Heyden Y. Advanced QSRR modeling of peptides behavior in RPLC. *Talanta*. **2010**, 81, 1711-1718.
66. Plenis A., Oledzka I., Baczek T. Classification of LC columns based on the QSRR method and selectivity toward moclobemide and its metabolites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2013**, 78-79, 161-169.
67. Heberger K. Quantitative structure–(chromatographic) retention relationships. *Journal of chromatography A*. **2007**, 1158, 273-305.
68. Cirera-Domenech E., Estrada-Tejedor R., Broto-Puig, F., Teixido J., Gassiot-Matas M., Comellas L., Lliberia J.L., Mendez A., Paz-Estivill S., Delgado-Ortiz M.R. Quantitative structure–retention relationships applied to liquid chromatography gradient elution method for the determination of carbonyl-2,4-dinitrophenylhydrazone compounds. *Journal of chromatography A*. **2013**, 1276, 65-77.
69. Kaliszan R., Wiczling P., Markuszewski M.J., Al-Haj M.A. Thermodynamic vs. extrathermodynamic modeling of chromatographic retention. *Journal of chromatography A*. **2011**, 1218, 5120-5130.

70. SRM 870, Column Performance Test Mixture for Liquid Chromatography, Certificate of Analysis, 2000, NIST, Gaithersburg, MD 20899.
71. Wilson N.S., Nelson M.D., Dolan J.W., Snyder L.R., Wolcott R.G., Carr P.W. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. A general quantitative relationship. *Journal of chromatography A*. **2002**, 961, 171-193.
72. Snyder L.R., Dolan J.W., Carr P.W. The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. *Journal of chromatography A*. **2004**, 1060, 77-116.
73. Wilson N.S., Nelson M.D., Dolan J.W., Snyder L.R., Carr P.W. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. Effect of a change in conditions. *Journal of chromatography A*. **2002**, 961, 195-215.
74. Wilson N.S., Dolan J.W., Snyder L.R., Carr P.W. Sander L.C. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. The physic-chemical basis of selectivity. *Journal of chromatography A*. **2002**, 961, 217-236.
75. Gilroy J.J., Dolan J.W., Snyder L.R. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. Type-B alkyl-silica columns. *Journal of chromatography A*. **2003**, 1000, 757-778.
76. Gilroy J.J., Dolan J.W., Carr P.W., Snyder L.R. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. Higher metal content (type-A) alkyl-silica columns. *Journal of chromatography A*. **2004**, 1026, 77-89.
77. Lee J.W., Row K.H. Determination of Retention Factors of Aromatic Compounds by Gradient-Elution Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography. *Korean Journal of Chemical Engineering*. **2002**, 19, 978-985.
78. Baeza-Baeza J.J., Ortiz-Bolsico C., Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C. Approaches to model the retention and peak profile in linear gradient reversed-phase liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. **2013**, 1284, 28-35.
79. Nikitas P., Pappa-Louisi A. New approach to linear gradient elution used for optimization in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. **2005**, 1068, 279-287.
80. Nikitas P., Pappa-Louisi A., Agrafiotou P., Mansour A. Multilinear gradient elution optimization in reversed-phase liquid chromatography based on logarithmic retention models: Application to separation of a set of purines, pyrimidines and nucleosides. *Journal of chromatography A*. **2011**, 1218, 5658-5663.
81. Song J.Z., Qiao C.F., Li S.L., Zhou Y., Hsieh M.T. Xu H.X. Rapid optimization of dual-mode gradient high performance liquid chromatographic separation of Radix et Rhizoma

- Salviae Miltiorrhizae by response surface methodology. *Journal of chromatography A*. **2009**, 1216, 7007-7012.
82. Concha-Herrera V., Vivo-Truyols G., Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C. Limits of multi-linear gradient optimisation in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. **2005**, 1063, 79-88.
83. Wiczling P., Kaliszan R. Retention time and peak width in the combined pH/organic modifier gradient high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. **2010**, 1217, 3375-3381.
84. Vivo-Truyols G., Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C. Enhanced calculation of optimal gradient programs in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. **2003**, 1018, 183-196.
85. Vivo-Truyols G., Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C. Error analysis and performance of different retention models in the transference of data from/to isocratic/gradient elution. *Journal of chromatography A*. **2003**, 1018, 169-181.
86. Li J., Cai B. Evaluation of the retention dependence on the physicochemical properties of solutes in reversed-phase liquid chromatographic linear gradient elution based on linear solvation energy relationships. *Journal of chromatography A*. **2001**, 905, 35-46.
87. Roses M., Subirats X., Bosch E. Retention models for ionizable compounds in reversed-phase liquid Chromatography. Effect of variation of mobile phase composition and temperature. *Journal of chromatography A*. **2009**, 1216, 1756-1775.
88. Neue U.D., Kuss H.J. Improved reversed-phase gradient retention modeling. *Journal of chromatography A*. **2010**, 1217, 3974-3803.
89. Baczek T., Markuszewski M., Kaliszan R., van Straten M.A., Claessens H.A. Linear and Quadratic Relationships between Retention and Organic Modifier Content in Eluent in Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography: A Systematic Comparative Statistical Study. *Journal of Separation Science*. **2000**, 23, 667-676.
90. Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Rose M., Bosch E. Prediction of the retention in reversed-phase liquid chromatography using solute–mobile phase–stationary phase polarity parameters. *Journal of chromatography A*. **2002**, 955, 19-34.
91. Nikitas P., Pappa-Louisi A., Tsoumachides S., Jouyban A. A principal component analysis approach for developing retention models in liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. **2012**, 1251, 134-140.
92. Gritti F., Felix G., Achard M.F., Hardouin F. Laterally attached liquid crystalline polymers as stationary phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography.

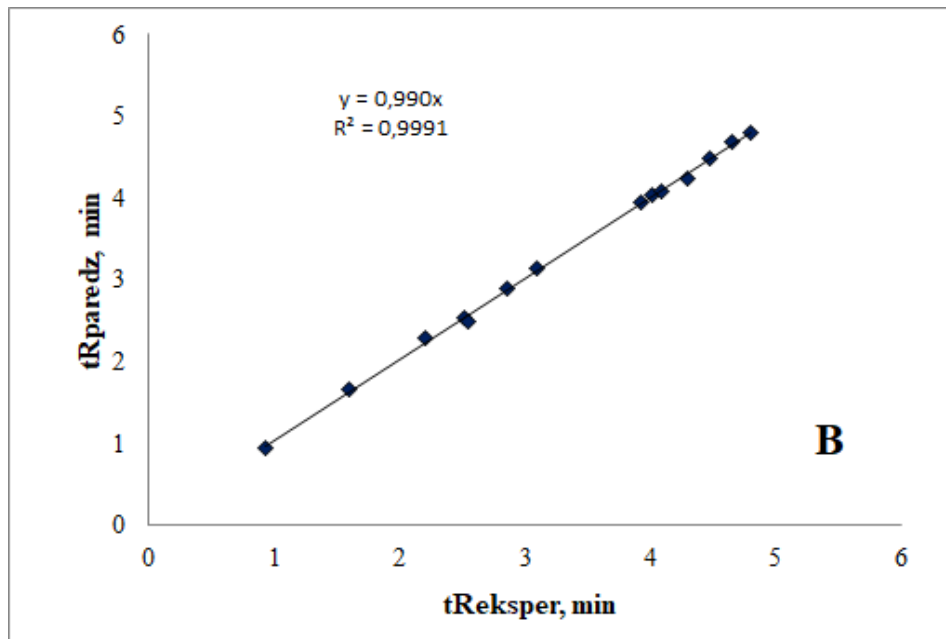
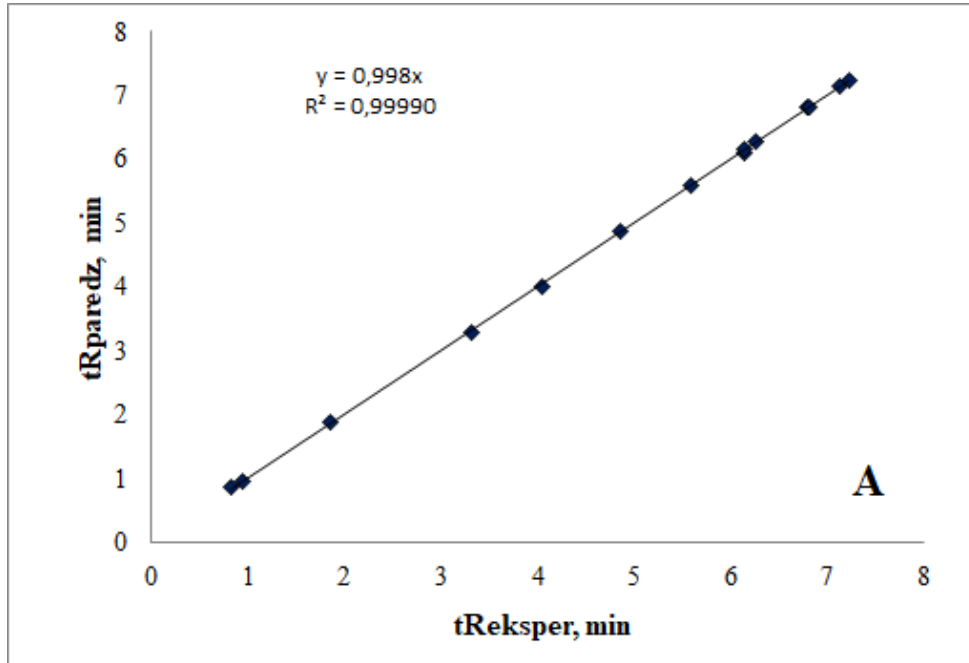
- Study of retention mechanism using linear solvation energy relationships. *Journal of chromatography A*. **2001**, 922, 51-61.
93. Fatemi M.H., Abraham M.H. Poole C.F. Combination of artificial neural network technique and linear free energy relationship parameters in the prediction of gradient retention times in liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. **2008**, 1190, 241-252.
94. Wang A., Carr P.W. Comparative study of the linear solvation energy relationship, linear solvent strength theory, and typical-conditions model for retention prediction in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. **2002**, 965, 3-23.
95. Fields P.R., Sun Y., Stalcup A.M. Application of a modified linear solvation energy relationship (LSER) model to retention on a butylimidazolium-based column for high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. **2011**, 1218, 467-475.
96. Poole C.F., Ahmed H., Kiridena W., Dekay C. Koziol W.W. Contribution of Steric Repulsion to Retention on an Octadecylsiloxane-Bonded Silica Stationary Phase in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Chromatographia*. **2005**, 62, 553-561.
97. Espinosa S., Bosch E., Roses M. Retention of ionizable compounds on high-performance liquid chromatography Global linear solvation energy relationships for neutral and ionizable compounds. *Journal of chromatography A*. **2002**, 945, 83-96.
98. Li J. Prediction of internal standards in reversed-phase liquid Chromatography. Evaluation of an alternative solvation parameter model to correlate and predict the retention of ionizable compounds. *Journal of chromatography A*. **2002**, 982, 209-223.
99. Galushko S.V., Kamenchuk A.A., Pit G.L. Calculation of retention in reversed-phase liquid chromatography. ChromDream software for the selection of initial conditions and for simulating chromatographic behavior. *Journal of chromatography A*. **1994**, 660, 47-59.
100. Galushko S.V. Calculation of retention and selectivity in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. **1991**, 552, 91-102.
101. Sinanoglu O., Fernandez A. The denaturation maxima of proteins and of drug-biomolecule complex formation in a wide range of methanol/water mixtures solvophobic theory predictions as compared to experiments. *Biophysical Chemistry*. **1985**, 21, 157-162.
102. Dolan J.W., Snyder L.R., Blanc T., Van Heukelem L. Selectivity differences for C₁₈ and C₈ reversed-phase columns as a function of temperature and gradient steepness: I. Optimizing selectivity and resolution. *Journal of chromatography A*. **2000**, 897, 37-50.
103. *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. 6 Edition. Purdue Pharma. 1900, 70.
104. Ruprichova L., Kralova M., Borkovcova I., Vorlova L., Bedanova I. Determination of whey proteins in different types of milk. *Acta Veterenaria Brno*. **2014**, 83, 67-72.

105. Boitz L.I., Fiechter G., Seifried R.K., Mayer H. K. A novel ultra-high performance liquid chromatography method for the rapid determination of β -lactoglobulin as heat load indicator in commercial milk samples. *Journal of Chromatography A*. **2015**, 1386, 98-102.
106. Mayer H.K., Raba B., Meier J., Schmid A. RP-HPLC analysis of furosine and acid-soluble β -lactoglobulin to assess the heat load of extended shelf life milk samples in Austria. *Dairy Science Technology*. **2010**, 90, 413-428.
107. Chr Lorenzen P., Klavin-Radecker I., Einhoff K., Hammer P., Hartmann R., Hoffmann W., Martin D., Molkentin J., G Walte H., Devrese M. A survey of the quality of extended shelf life (ESL) milk in relation to HTST and UHT milk. *International Journal of Dairy Technology*. **2011**, 64, 166-178.
108. Bonfatti V., Grigoletto L., Cecchinato A., Gallo L., Carnier P. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *Journal of Chromatography A*. **2008**, 1195, 101-106.
109. Veronika R.M. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 5th Edition, New York: Wiley. 2010. 426.
110. Kang K., LU D., Liu Z. Temperature-triggered Protein Adsorption and Desorption on Temperature-responsive PNIPAAm-grafted-silica: Molecular Dynamics Simulation and Experimental Validation. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. **2012**, 20, 284-293.

Pielikumi

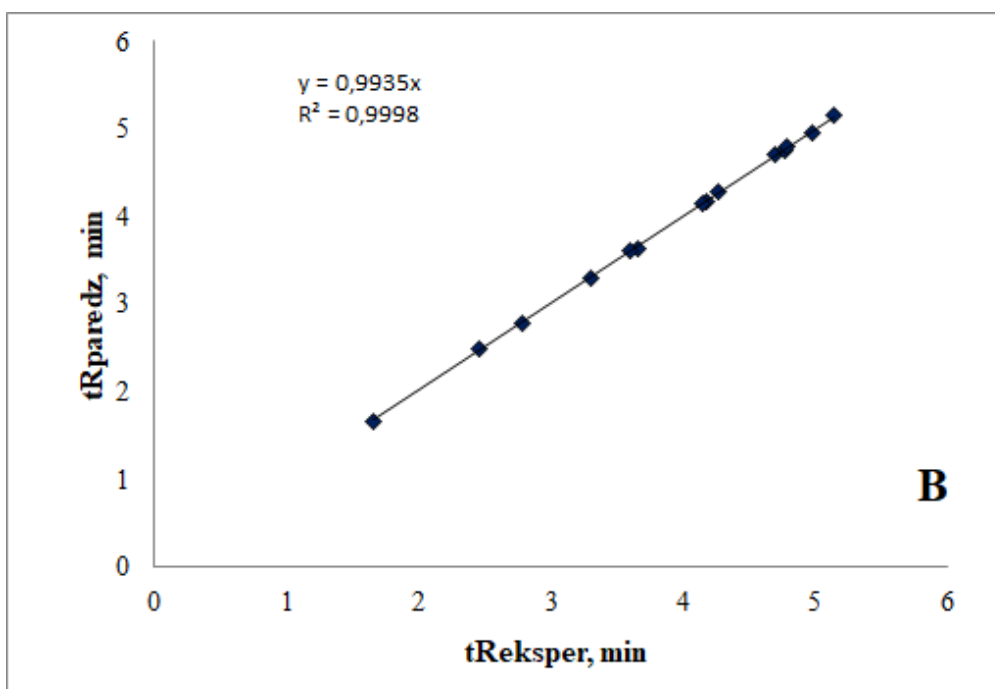
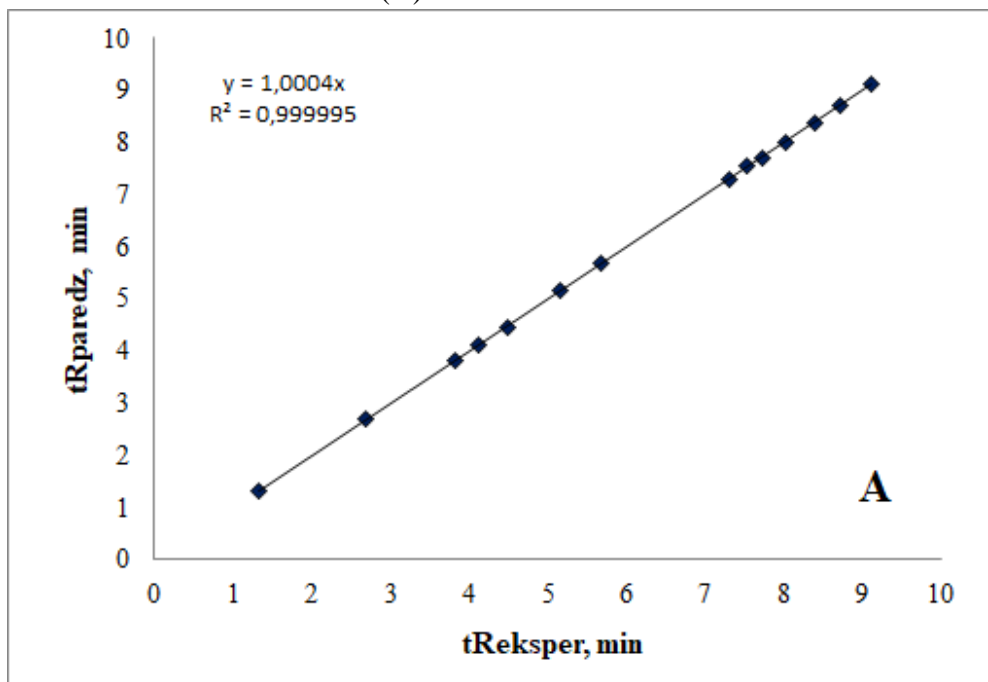
1. Pielikums

Proteīnu izdalīšanās laiku korelācija starp eksperimentālajām un paredzētajām vērtībām uz *Poroshell 300Extend-C18* ar metanolu (A) un *Zorbax 300Extend-C18* ar acetonitrilu (B)



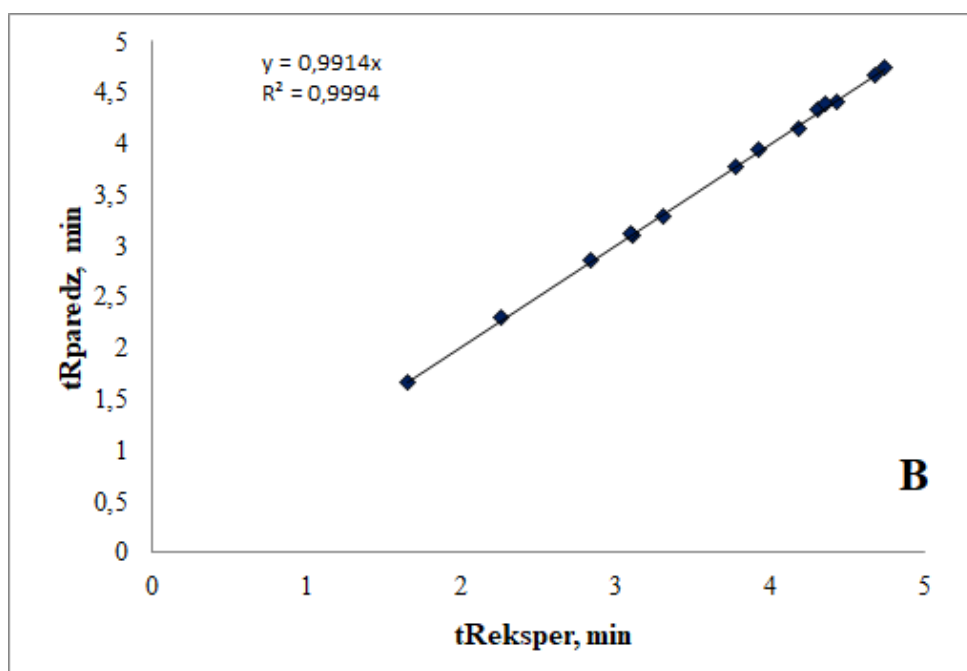
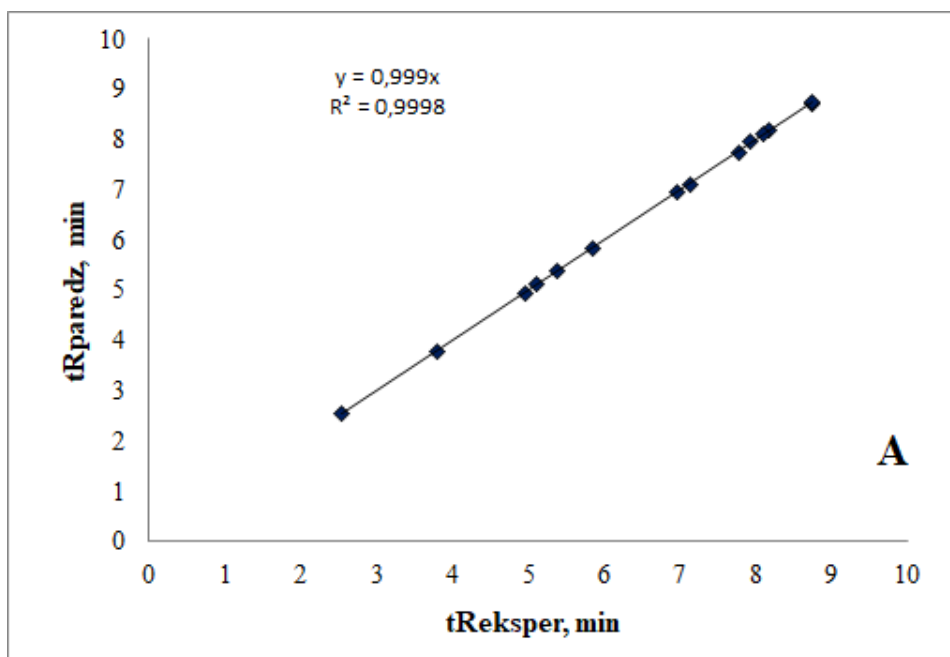
2. Pielikums

Proteīnu izdalīšanās laiku korelācija starp eksperimentālajām un paredzētajām vērtībām uz *Zorbax 300Extend-C18* ar metanolu (A) un uz *Poroshell 300SB-C18* ar acetonitrilu (B)



3. Pielikums

Proteīnu izdalīšanās laiku korelācija starp eksperimentālajām un paredzētajām vērtībām uz *Poroshell 300SB-C18* ar metanolu (A) un uz *Zorbax 300SB-C18* ar acetonitrilu (B)



Dokumentārā lapa

Promocijas darbs “Proteīnu hromatogrāfiskās izturēšanās izpēte apgrieztās fāzes augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas apstākļos” izstrādāts Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātē.

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

Autors: /Oksana Rotkāja/
(paraksts) (datums)

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: / Dr.chem., asoc. prof., Pēteris Mekšs/
(paraksts) (datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātes Promocijas padomē:
(datums)

Padomes sekretāre: /Dr.chem. Vīta Rudoviča/
(paraksts)

Darbs aizstāvēts LU Ķīmijas fakultātes Promocijas padomes sēdē:
20.12.2018. protokols Nr.

Padomes sekretāre: Dr.chem. Vīta Rudoviča/
(paraksts)