

A kémia újabb eredményei

1995

Szókán Gyula · Janáky Tamás

Nagyhatékonyságú folyadék-
kromatográfia a peptidkémiaiában

Akadémiai Kiadó · Budapest

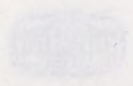
A KÉMIA ÚJABB EREDMÉNYEI

ÚJABB EREDMÉNYEI

50
AKADÉMIAI KIADÓ

A szerkesztőbizottság tagjai

BLOCKE TIBOR, BÜRGER KÁLMÁN, GÖRÖG SÁNDOR,
HARGITTAI ISTVÁN, HOLLÓ JÁNOS, PUNGOS ERNŐ,
SZANTAY CSABA, TUDÓS FERENC, VÉRTES ATTILA



AKADÉMIAI KIADÓ - BUDAPEST

A KÉMIA ÚJABB EREDMÉNYEI

79. kötet

Szerkeszti
CSÁKVÁRI BÉLA

A szerkesztőbizottság tagjai

BLICKE TIBOR, BURGER KÁLMÁN, GÖRÖG SÁNDOR,
HARGITTAI ISTVÁN, HOLLÓ JÁNOS, PUNGOR ERNŐ,
SZÁNTAY CSABA, TÜDŐS FERENC, VÉRTES ATTILA



AKADÉMIAI KIADÓ · BUDAPEST

A KÉMIA ÚJABB EREDMÉNYEI

79

SZÓKÁN GYULA
JANÁRY TAMÁS

1958. évi kiadás

1958. évi kiadás

1117 Budapest, Pálffy utca 19-21.

1958. évi kiadás

A kiadvány a Magyar Tudományos Akadémia és a Magyar Könyvtári Egyesület közösen kiadja.

A kiadvány a Magyar Tudományos Akadémia és a Magyar Könyvtári Egyesület közösen kiadja.

1958. évi kiadás

1958. évi kiadás

1958. évi kiadás

1958. évi kiadás

1958. évi kiadás

1958. évi kiadás



AKADÉMIAI KIADÓ · BUDAPEST

Megjelent a Magyar Tudományos Akadémia támogatásával

ISBN 963 05 6927 2

Kiadja az Akadémiai Kiadó
1117 Budapest, Prielle Kornélia u. 19–35.

© Szókán Gyula és Janáky Tamás, 1995

Minden jog fenntartva, beleértve a sokszorosítás, a nyilvános előadás, a rádió- és televízióadás, valamint a fordítás jogát, az egyes fejezeteket illetően is.

A kiadásért felelős az Akadémiai Kiadó és Nyomda igazgatója

A nyomást az Akadémiai Nyomda végezte

Felelős vezető: Zöld Ferenc

Budapest, 1995

Felelős szerkesztő: Nagy Tibor

Műszaki szerkesztő: Marton Andor

A fedéltervet készítette: Urai Erika

Megjelent 14 (A/5) ív terjedelemben

Kiadványszám: 1-94-90

HU ISSN 0075-5397

Printed in Hungary

NAGYHATÉKONYSÁGÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA A PEPTIDKÉMIÁBAN

SZÓKÁN GYULA
JANÁKY TAMÁS

1. BEVEZETÉS	11
2. RÖVIDÍTÉSEK JELEI	13
3. GLOSSÁRIUM	19
4. KROMATOGRAFIAI MÓDSZEREK A PEPTIDKÉMIÁBAN	24
4.1. Bevezetés	24
4.2. Anioncserés kromatográfia	27
4.3. Molekulás kromatográfia	29
4.3.1. Folyadékfázisú kromatográfia	30
4.3.1.1. Anioncserés kromatográfia	32
4.3.1.2. Polarisztionos kromatográfia	43
4.3.1.3. Kötés kromatográfia	44
4.3.2. Adsorpció mechanizmusa	45
4.3.3. Működés	51
4.3.3.1. A kromatográfiai paraméterek	53
4.3.3.2. pH szerepe, kapacitásfaktora	58
4.3.4. Ionpárosítás	64
4.3.5. Az HPLC hatékonysági befolyásoló tényezők	69
4.3.5.1. Adagolási sebesség	69
4.3.5.2. Adagolási mód	70
4.3.5.3. Gázfázisú hűtés	70
4.3.5.4. Pufferkapacitás ("memory")	72
4.3.6. Adagolási technikák	73
4.3.6.1. Az HPLC Cseppenkénti Adagolás	74
4.3.6.2. Az HPLC Adagolás	76
4.4. Szilárdfázisú kromatográfia (HPLC)	75
4.5. Elektrokromatográfia	80
4.6. Négatívioncserés kromatográfia (HPLC)	81
4.7. Kötés kromatográfia (HPLC)	85

TARTALOM

1. BEVEZETÉS	11
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	15
3. GLOSSZÁRIUM	19
4. KROMATOGRÁFIÁS MÓDSZEREK A PEPTIDKÉMIABAN	24
4.1. Bevezetés	24
4.2. Adszorpciós kromatográfia	27
4.3. Megoszlási kromatográfia	29
4.3.1. Kémiaileg kötött állófázis	30
4.3.1.1. Apoláris állófázisú töltetek	32
4.3.1.2. Poláris kötött állófázisú töltetek	43
4.3.1.3. Kötött peptidfázisú töltetek	44
4.3.2. Az elválasztás mechanizmusa	45
4.3.3. Mozgófázis	51
4.3.3.1. A mozgófázis összetétele	53
4.3.3.2. pH Szepe, ionvisszaszorítás	58
4.3.4. Ionpárképzés	64
4.3.5. Az RP-HPLC hatékonyságát befolyásoló tényezők	69
4.3.5.1. Átfolyási sebesség	69
4.3.5.2. Hőmérséklet szerepe	70
4.3.5.3. Gradiens elúció	70
4.3.5.4. Peptidvisszanyerés ("recovery")	72
4.3.6. Általános következtetések	73
4.3.6.1. Az RP-HPLC-re vonatkozó általános tapasztalatok	74
4.3.6.2. Az RP-HPLC értékelése	74
4.4. Ioncserés kromatográfia (HP-IEC)	75
4.5. Kromatofókuszálás	80
4.6. Nagyhatékonyságú gélkromatográfia (HP-GPC)	81
4.7. Hidrofób kölcsönhatási HPLC (HIC)	85

4.8.	Hidrofil kölcsönhatási HPLC (HILIC)	86
4.9.	Kiszorításos kromatográfia	87
4.10.	Nagyhatékonyságú affinitás kromatográfia (HP-AC)	89
4.11.	Preparatív kromatográfia	90
5.	DETEKTÁLÁSI MÓDSZEREK PEPTIDEK HPLC-JÉBEN	96
5.1.	Ultraibolya-spektrofotometria	96
5.2.	Peptidek fluorimetriás detektálása	101
5.3.	Peptidek elektrokémiai detektálása	103
5.4.	Törésmutató detektorok	105
5.5.	LC/MS-Tömegspektrometriás detektálás	106
5.6.	Kiroptikai detektálás	107
5.7.	Radiokémiai detektálás	108
5.8.	Egyéb detektálási módszerek	110
6.	SZÁRMAZÉKKÉPZÉS A DETEKTÁLÁSBAN	111
6.1.	Danszil-klorid	112
6.2.	Fluoreszkamin	115
6.3.	Aromás aldehidek	118
6.4.	Fluorenil-metil-kloroformát	123
6.5.	Aromás nitrocsoportot tartalmazó reagensek	124
6.6.	Izocianátok	126
7.	A HPLC ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEI A PEPTIDKÉMIÁBAN	128
7.1.	HPLC Alkalmazása a peptidszintézisben	128
7.1.1.	Kiindulási anyagok, intermedierek vizsgálata	129
7.1.2.	Kapcsolások nyomonkövetése	136
7.1.3.	Védőcsoport eltávolítások ellenőrzése	138
7.1.4.	Mellékreakciók kimutatása	140
7.1.4.1.	Oxidáció: Met → Met(O)	140
7.1.4.2.	Deszulfatálás: Tyr(SO ₃ H) → Tyr	141
7.1.4.3.	Dezamidálódás	143
7.1.4.4.	Transzpeptidáció	143
7.1.4.5.	Alkileződés	146
7.1.4.6.	Ciklizáció, N-terminális gyűrűzáródás	147
7.1.4.7.	Kapcsolási mellékreakciók	149
7.1.5.	Hibás szekvenciájú peptidek kimutatása	149
7.1.6.	Szintetizált peptidek tisztaságvizsgálata	152
7.2.	Peptidek optikai tisztaságvizsgálata	155
7.2.1.	Diasztereomer peptidek szétválasztása	156
7.2.2.	Racemizációs tesztek	159
7.2.3.	Királis elválasztások	161

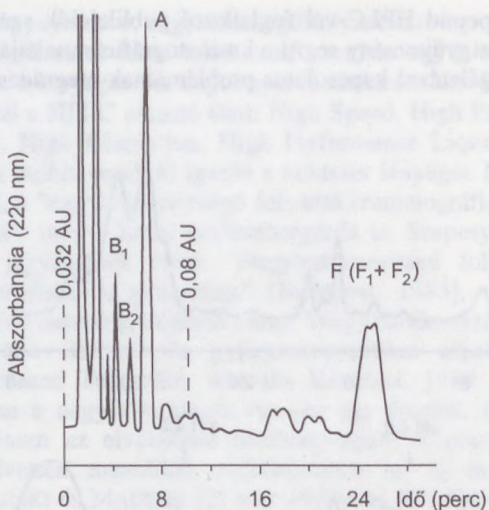
1. BEVEZETÉS

A modern peptidkémia metodikai fegyvertárában előkelő helyet foglal el a kromatográfia. Tudománytörténetének sok állomása fűződik aminosavak és peptidek vizsgálatához (1948: aminosavak papírkromatográfiája, 1951-4: aminosavak ioncserés kromatográfiája, 1958: automatizált aminosavanalízis stb.). Nem meglepő, hogy a folyadékkromatográfia fejlődése serkentőleg hatott a peptidkémia analitikai, izolálási és tisztítási feladatainak megoldására is: "új elválasztási és vizsgálati módszerek felismerése gyakran váltja ki egy vagy több tudományág rohamos fejlődését. Fokozott mértékben érvényes ez a kromatográfiára, mely a természetes anyagok szerves kémiájának egészen új és járatlan útjait nyitotta meg" [Vámos, 1959]. "A fehérjekémiában a nagy előrelépést a kromatográfiás technikák hozták" [Turba, 1954]. Azt is mondhatjuk, hogy a peptidkémia töretlen fejlődése ma már elképzelhetetlen modern folyadékkromatográfia nélkül; elég csak a szilárdfázisú peptidszintézis és a preparatív RP-HPLC elválaszthatatlan együvé tartozására gondolnunk. Ugyanakkor azt sem szabad elhallgatni, hogy a modern folyadékkromatográfia fejlődésének kezdetét az jelentette, amikor az aminosavak ioncserés elválasztásainak fejlesztése során HAMILTON már 1960-ban javasolta az oszloptöltetek részecskeméretének csökkentését [1]. Ennek ellenére csak jóval később, 1969 körül vezetett a kromatográfiás elmélet és gyakorlat szintézise a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (= HPLC) megvalósításához és széles körű bevezetéséhez.

1978-ban jelent meg az e területen alapvető jelentőségűnek számító L.R. SNYDER, J.J. KIRKLAND: Introduction to Modern Liquid Chromatography [1974, John Wiley et Sons, Inc.] c. könyv magyar nyelvű kiadása [Vígh Gy.-Veszprémi Vegyipari Egyetem, fordításában] "Bevezetés az intenzív folyadékkromatográfiába" címmel [Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1979]. Már a cím fordítása is mutatja, hogy a szakmai szótárt illetően nem egyértelmű a helyzet: intenzív,

modern, nagy nyomású, nagysebességű folyadékkromatográfia kifejezések használatával lehet találkozni, azonban egyik sem fejezi ki tökéletesen a lényegét. Az angol nyelvű szakirodalom is több kifejezést használ a HPLC címszó alatt: High Speed, High Pressure, High Efficiency, High Resolution, High Performance Liquid Chromatography. Ez utóbbi emeli ki igazán a módszer lényegét. Magyar megfelelőjénél, a "nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia" elnevezésben egyezett meg a hazai szakembergárda is. Szepesy László műegyetemi jegyzetének címe: "Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata" [Budapest, 1983], vagy Szepesi Gábor kitűnő összefoglalójának címe: "Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) és gyógyszeranalitikai alkalmazása" [A Gyógyszerészeti Tudomány Aktuális Kérdései, 1987, 1. szám]. A lényeg nem a nagy nyomáson van (ez egy feltétel, ill. következmény), hanem az elválasztás hatékonyságán. A peptidkémikusok hamar felvették metodikai eszköztárukba az új módszert. Bár RZESZOTARSKI és MAUGER [2] már 1973-ban HPLC-vel választotta szét az aktinomicint 3 komponensre, először TSUJI [3,4] bacitracinnal végzett vizsgálatait irányították igazán a figyelmet a HPLC peptidkémiai alkalmazhatóságára. A kereskedelemben hozzáférhető bacitracin, melyet a *Bacillus licheniformis* törzs termel, több komponens keveréke. Már ellenáramú megoszlással és ioncserével 7 komponensre szeparálták (1. ábra, II). TSUJI 1974-ben HPLC segítségével (Bondapak C₁₈/Corasil oszlopon) 22 komponenset mutatott ki benne (1. ábra, I), ha a csúcselektromos nem is voltak a legjobbak [3]. Rövidesen az az elválasztást is tökéletesítette lineáris acetonnitril gradiens alkalmazásával (metanol-vizes foszfát puffer eluens rendszerben) [4].

E nagyon demonstratív eredmények hatására indult meg a HPLC alkalmazása többek között az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén, a MTA Peptidkémiai Kutatócsoportjában és a SZOTE Orvosi Vegytani Intézetében is. A HPLC rohamos peptidkémiai térhódítására utal az a tény is, hogy az 1974-es izraeli peptidszimpoziumon már "keresztal megbeszélést" tartottak a világ vezető peptidkémikusai a HPLC-ről [7]. Terjedését jól dokumentálja, hogy 1980-ig már több mint 450 cikk jelent meg peptidok HPLC-jéről, melyekben kb. 3000 peptid és aminosavszármazék nagyfelbontású kromatogramját közölték. A számok exponenciálisan növekedtek tovább, s a J. Liquid Chromatography-nak már a 3. évfolyama (1980) egy különszámot



2. ábra. Bacitracin-kromatogram 1990-ből [6]

Oszlop: Nucleosil C18-5 μm , 150 x 4,6 mm
 Eluens: 0,05 M KH_2PO_4 -(MeOH- CH_3CN 1:1) 51:49 (v/v)
 Sebesség: 1,4 ml/perc

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Ac _m	acetamidometil
AcOH	ecetsav
ACTH	adrenokortikotróp hormon
Adpoc	1-(1-adamantil)-1-metiloxi-karbonil
APS	aminopropil-szilika
AU	abszorbancia egység
Boc	<i>tert</i> -butoxikarbonil
Bom	benzil-oxi-metil
Bzl	benzil
C ₁₈	oktadecil
C ₈	oktil
CBQA	3(4-karboxi-benzil)-2-kinolinkarboxaldehyd
CCK	kolecisztokinin
CDNFB	2-karboxi-4,6-dinitro-fluor-benzol
CM-	karboximetil
CPS	cianopropil-szilika
CRF	corticotropin releasing hormone, kortikotropin felszabadító hormon
CZE	kapilláris zóna elektroforézis
D	Dalton
Dbs-	dabszil (dimetil-amino-azo-benzol-szulfonil)
DCC	<i>N,N'</i> -dicklohexil-karbodiimid
DEPC	dietil-foszforocianidat
DMF	dimetilformamid
DNP-	dinitro-fenil
Dns-	danszil
DNTP	3,6-dinitro-ftálsavanhidrid
dp	szemcseméret (átmérő, μm)
DPPA	difenil-foszforil-azid
DSIP	delta sleep inducing peptide
EC	elektrokémiai detektor

EEDQ	2-etoxi-1-etoxikarbonil-1,2-dihidrokinolin
FAB	fast atom bombardment, gyors atomokkal történő bombázás
FD	field-desorption
FMDV	száj- és körömfájás vírus
Fmoc	fluorenil-metil-oxi-karbonil
FPLC	fast peptide, protein and polynucleotide liquid chromatography, gyors peptid, fehérje és polinukleotid folyadékkromatográfia
FQCA	3-(2-furoil)kinolin-2-karbaldehid
GC	gázkromatográfia
HETP	"height equivalent of theoretical plate", "egy elméleti tányérnak megfelelő oszlopmagasság"
HFBA	heptafluorvajsav
HIC	hydrophobic interaction chromatography, hidrofób kölcsönhatás kromatográfia
HILIC	hydrophylic interaction chromatography, hidrofil kölcsönhatás kromatográfia
HOBt	1-hidroxi-benzotriazol
HONSu/NHS	<i>N</i> -hidroxi-szukcinimid
HP	high performance, nagy hatékonyságú
HP-AC	high performance affinity chromatography, nagyhatékonyságú affinitáskromatográfia
HP-GPC	high performance gel permeation chromatography, nagyhatékonyságú gélkromatográfia
HP-IEC	high performance ion-exchange chromatography, nagyhatékonyságú ioncserés kromatográfia
HPLC	high-pressure (high performance) liquid chromatography, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
LLD	legkisebb detektálható mennyiség
LH-RH	luteinizizing hormone-releasing hormone, luteinizáló hormon-felszabadító hormon
MA	vegyes anhidrid (mixed anhydride)
MDPF	2-metoxi-2,4-difenil-3(2H)furanon
MeCN	acetonitril
MeOH	metil-alkohol
MPLC	középnomású folyadékkromatográfia
Ms	móltömeg

MS	mass spectrometry, tömegspektrométer, tömegspektrometria
MSH	melanocita stimuláló hormon
Mtr-	4-metoxi-2,3,6-trimetil-benzolszulfonil-
NBD-	nitro-benzol-diazol
NMM	<i>N</i> -metil-morfolin
NMR	nuclear magnetic resonance spectroscopy, magmágneses rezonanciaspektroszkópia
NPC	normál fázisú kromatográfia
Nps-	nitro-szulfenil
OBu ^t	<i>terc</i> -butilészter
OBzl	benzilészter
ODP	oktadecil-polimer
ODS	oktadecil-szilika
OPA	<i>o</i> -ftál(di)aldehid
OPh	fenilészter
OT	oxitocin
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PFPA	pentafluor-propionsav
PITC	fenil-izotiocianát
Pmc-	pentametil-kromán szulfonil
PPh ₃	trifenil-foszfín
PTH	fenil-tiohidantoin
QSRR	quantitative structure-retention relationship, kvantitatív szerkezet-retenció összefüggés
QSAR	quantitative structure-activity relationship, kvantitatív szerkezet-aktivitás összefüggés
RI	törésmutató index
RIA	radioimmunoassay
RIU	törésmutató index egység
RP	reversed-phase (fordított fázisú)
RP-IPC	reversed-phase ion-pair chromatography, fordított fázisú ionpár kromatográfia
RPC	fordított fázisú kromatográfia
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SPPS	solid phase peptide synthesis, szilárdfázisú peptidszintézis
TEA	trietyl-amin
TEAA	trietyl-amin-acetát
TEAF	trietyl-amin-formiát

TEAP	trietyl-amin-foszfát	MS
TFA	trifluor-ecetsav	MS
THF	tetrahidrofurán	MS
TLC	thin layer chromatography, vékonyréteg-kromatográfia	MS
TNP	trinitro-benzolszulfonsav	MS
Tos	tozil-	MS
TRH	thyrotropin releasing hormone, tirotropin felszabadító hormon	MS
UV	ultraibolya hullámhossztartomány	MS
VP	vazopresszin	MS
VRK	vékonyréteg-kromatográfia	MS
WRK	Woodward-reagens	MS
Z	benzil-oxi-karbonil-	MS

3. GLOSSZÁRIUM

A HPLC-s gyakorlatban használt fontosabb fogalmak:

alapvonal: a detektor jele, amikor minta nem, csak eluens áramlik át a cellán

alapvonal-elválasztás: nincs átfedés a csúcsok között

alapvonal-sodródás (drift): gradiens kromatográfia során gyakran fellépő alapvonal-vándorlás, mely eluensek eltérő abszorpciós tulajdonságaival, ill. az eluensekben előforduló szennyezésekkel magyarázható

aszimmetria: a kromatográfiai csúcs jellemző adata, mely a csúcs középvonalától (10% csúcsmagasságnál) a csúcs leszálló száráig, ill. a felszálló száráig mért távolságok aránya. Ha értéke >1 , a csúcsnak "farka" van ("tailing"), ha <1 , a felszálló ág húzódik el ("leading")

átfolyási sebesség: a mozgófázis áramlási sebessége a kromatográfiai oszlopban (ml/perc)

biokompatibilis HPLC rendszer: a HPLC oszlop, ill. készülék folyadékkal érintkező részei olyan anyagból készültek (Ti, kerámia), melyek egyrészt oldhatatlanok (biológiai minták, pl. fehérjék tisztításakor fémionok nem fogják szennyezni a terméket), másrészt rajtuk irreverzibilis adszorpció nem történik

borítottság: a kémiai kötött állófázis mennyiségére utaló adat; $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ -ben vagy a szén százalékában fejezik ki

csúcshúzódás (tailing): a normál Gauss-görbétől való csúcsalak eltérés

csúskapacitás: a kromatográfia során az elválasztható komponensek száma

csúcsmagasság: csúcsmaximum és az alapvonal közötti távolság

csúcshélesség (ω): az alapvonalon mért csúcshélesség

ellenion: ioncserés kromatográfiaiban a mintát az ioncserélő kötőhelyeiről leszorító ion. Ionpár kromatográfiaiban az eluenshez

adott, a mintával ellentétes töltésű, azzal semleges terméket adó ion

elméleti tényérekvivalens (H, HETP): egy elméleti tényérnek megfelelő kolonnahossz, mely az oszlophossznak és az elméleti tényérszámnak (N) a hányadosa

elméleti tényérszám (N): az elválasztás hatékonysága, a kromatográfiás oszlopok jellemző adata:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{\omega_{1/2}} \right)^2$$

eluens: a mozgófázis, amivel az elválasztást végezzük

"end capping": fordított fázisú töltetek nemkívánatos szilanolcsoportjainak megszüntetése pl. trimetil-klórszilánal történő szililezéssel

felbontás (R_s): két csúcs relatív elválasztásának mértéke (a teljes csúcsalakot figyelembe veszi):

$$R_s = \frac{2(t_{R1} - t_{R2})}{\omega_1 + \omega_2}, \text{ vagy } R_s = \frac{1}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{k'}{1 + k'} \sqrt{N},$$

$$\text{ahol } k' = \frac{k'_1 + k'_2}{2}$$

félértékszélesség ($\omega_{1/2}$): a kromatográfiás csúcs szélessége 50%-os csúcsmagasságnál

fordított fázis ("reversed phase", RP): apolárossá tett állófázis; kötött fázisú töltet: az állófázis felületéhez kémiai kötéssel, tehát stabilan rögzítünk felületi tulajdonságot megszabó anyagot

gradiens elúció: az elválasztás idejét csökkentő kromatográfiás technika, melynek során a mozgófázis összetételét az eluálóképesség fokozása érdekében változtatjuk. A gradiens lehet folyamatos (lineáris, konvex, konkáv) és lépcsős

hidrofil: poláris csoportokat tartalmazó "vizet kedvelő" molekulák vagy állófázisok

hidrofób: általában apoláris molekulákat (pl. szénhidrogén) tartalmazó "víztaszító" anyagok, ill. állófázisok

holttérfogat: az oszlopon belüli oldószertérfogat, valamint a kromatográfiás rendszer (injektor, detektor, összekötő kapillárisok és csatlakozók) térfogatának összege

ionpár kromatográfia: az ioncsere változata. A töltéssel bíró mintakomponenst pozitív vagy negatív elleniont tartalmazó oldószerral semleges formában eluáljuk

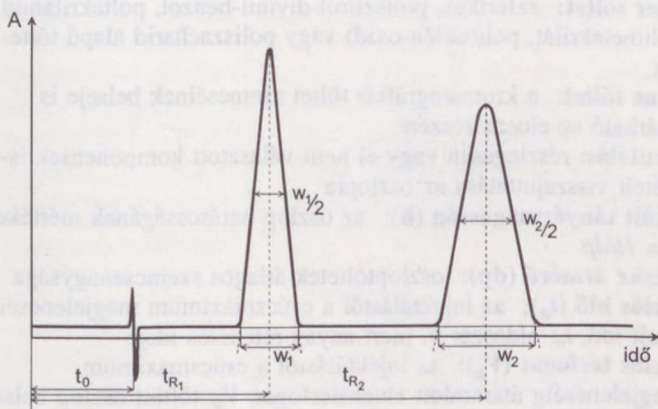
ionvisszaszorítás: puffer segítségével az eluens pH-ját olyan értéken tartjuk, hogy a komponensek ne ionos formában legyenek jelen

irreguláris töltet: olyan oszloptöltet, melyben a szemcsék szabálytalan alakúak

izokratikus elúció: a kromatográfiás művelet során az eluens összetétele és sebessége állandó

kapacitás: az a mintamennyiség, mely túlterhelés nélkül az oszlop-ra vihető

kromatogram: a kromatográfia során rögzített detektor jel



3. ábra. Egy teoretikus kromatogram és jellemző paramétere

t_0 az oldószertartó térfogat ideje

t_{R1} peptid₁ retenció ideje

t_{R2} peptid₂ retenció ideje

kapacitás faktor (k'): egy komponens eluálásához szükséges térfogat (V_R) mértéke az oszlop saját eluens térfogatában (V_0) vagy retenció idejével kifejezve

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0}, \text{ vagy } k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

- lineáris sebesség:** az oldószerfront terjedési sebessége (cm/perc)
- megoszlási hányados (K_d):** a komponens álló- és mozgófázisbeli koncentrációjának hányadosa
- multidimenzionális kromatográfia:** több különböző HPLC oszlop vagy kromatográfias technika egymás utáni alkalmazása jobb szeparáció elérése érdekében (pl. IEC, majd RP-HPLC)
- normál fázis:** poláros állófázis, pl. módosítatlan szilika vagy kémiaiilag kötött poláros csoportokat (amino, ciano, hidroxil) tartalmazó töltet
- oszlop ellenállása (back pressure):** a kromatográfia során az oszlop tetején mért nyomás
- pellikuláris töltet:** olyan oszloptöltet, melyben egy szilárd magot vékony porózus réteg vesz körül
- polimer töltet:** szférikus, polisztirol-divinil-benzol, poliakrilamid, polimetakrilát, poli(etilén-oxid) vagy poliszacharid alapú töltetek
- porózus töltet:** a kromatográfias töltet szemcséinek belseje is átjárható az eluens részére
- recirkulálás:** részlegesen vagy el nem választott komponensek ismételt visszajuttatása az oszlopra
- redukált tányérmagasság (h):** az oszlop hatásosságának mértéke:
 $h = H/dp$
- részecske átmérő (dp):** oszloptöltetek átlagos szemcsenagysága
- retenciós idő (t_R):** az injektálástól a csúcsmaximum megjelenéséig eltelt idő, t_0 : oldószer v. inert anyag retenciós ideje
- retenciós térfogat (V_R):** az injektálástól a csúcsmaximum megjelenéséig átáramlott eluens térfogat, V_0 : töltött oszlop belső, saját (eluens) térfogata
- szelektivitás (α):** két egymást követő csúcs elválasztásának mértéke adott álló és mozgófázis esetén:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

szerves módosító: vízzel jól elegyedő szerves oldószer, mely RP-HPLC-ben befolyásolja az elválasztást

szférikus töltet: gömb alakú töltet

szilanolcsoport: szilikagél felszínén lévő Si-OH csoportok; ioncserélő hatásuk miatt befolyásolják a fordított fázisú kromatográfiát

"vak" futtatás: kromatográfiás futtatás minta injektálása nélkül, csak eluens v. oldószer beadásával

visszanyerés (recovery): az oszlopról visszanyert, és az oszlopra injektált anyagmennyiség hányadosa (%-ban kifejezve)

4. KROMATOGRÁFIÁS MÓDSZEREK A PEPTID-KÉMIÁBAN

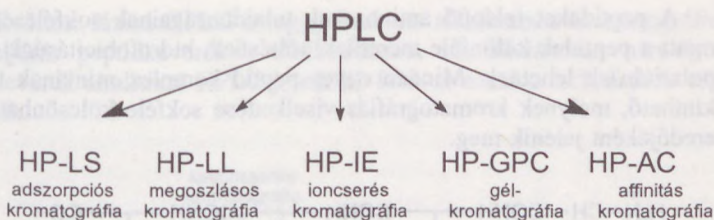
4.1. BEVEZETÉS

A modern kromatográfiai eljárások lehetővé teszik a minták egymáshoz nagyon hasonló viselkedésű alkotórészeinek elválasztását. Valamennyi kromatográfiai módszer megegyezik abban, hogy az eljárás folyamán az elválasztandó komponensek két, egymással érintkező fázis között oszlanak meg. Az alkotórészek eltérő fizikai-kémiai tulajdonságainak következtében a minta összetevői különbözőképpen oszlanak meg az álló és mozgófázis között. Megoszlásuk arányától függően az egyes komponensek eltérő sebességgel vándorolnak a mozgófázissal. A kialakuló egyensúlyra — az adott rendszerre érvényes mechanizmusnak (adszorpció, megoszlás, ioncsere, stb.) megfelelően — a minta és a fázisok dinamikus kölcsönhatása jellemző, melyet a következő módon szemléltethetünk:



A kromatográfiai módszerek összehasonlítására vonatkozó adatokat az 1. táblázat tartalmazza.

Aminosavak, peptidek és fehérjék folyadékkromatográfiai analízisére a kutatók a folyadékkromatográfia majd minden változatát kipróbálták, s kifejlesztették a megfelelő nagyhatékonyságú (high performance, "HP") változatot is:



1. táblázat

Kromatográfias módszerek összehasonlítása

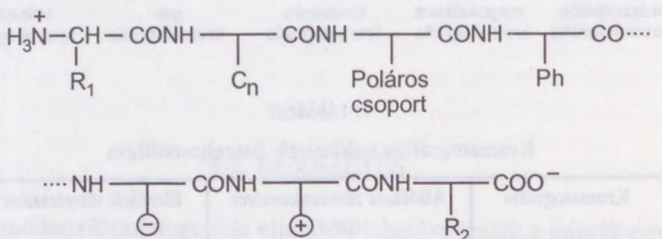
Kromatográfia	Állófázis részecskeméret (μm)	Elméleti tányérszám (N)
VRK(TLC)	5-50	100-500
LC	60-200	100
GC	2-400	2-50000
HPLC	3-10	5-20000

2. táblázat

A klasszikus oszlopkromatográfia és a HPLC összehasonlítása

Paraméter	Klasszikus LC	HPLC
oszlophossz (L) cm	25-150	5-30
oszlop belső átmérő (mm)	10-50	3-5
részecskeméret (μm)	20-300	3-10
sebesség (cm/s)	0,01	0,3-3,0
nyomás (bar)	1-2	10-300
mintatér fogat (μl)	100-5000	5-100
elválasztási idő	órák, napok	5-40 perc
elméleti tányérszám (N)	100	5000-20000
felbontás	kicsi	nagy
csúscapacitás	kicsi	nagy
detektálás	frakciónként	átáramlásban
automatizálhatóság	részben	teljes
azonosítás	belső standard	retenciós adatok
	UV, IR, MS, NMR, TLC	szelektív detektorok
	lassú, "nem hatékony"	modern, "hatékony"

A peptideket felépítő aminosavak tulajdonságainak sokfélesége miatt a peptidek különféle méretűek, töltésűek, hidrofobicitásúak és polaritásúak lehetnek. Minden egyes peptid komplex mintának tekinthető, melynek kromatográfiás viselkedése sokféle kölcsönhatás eredőjeként jelenik meg.

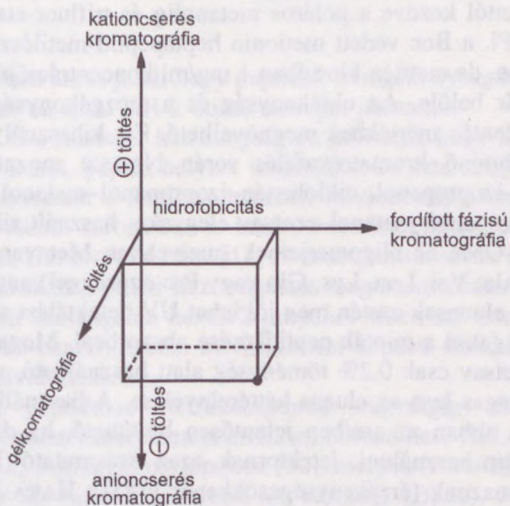


A peptidek aminosavösszetétele, szekvenciája (aminosavsorrendje), töltése, molekulamérete (nagysága) és konfigurációja alapjaiban határozza meg a kromatográfiás tulajdonságokat, ami viszont megszabja, hogy milyen kromatográfiás technikák használhatók fel vizsgálatukra.

Egy komplex peptidkeverék teljes szétválasztására, izolált vagy szintetizált peptidek tisztaságának eldöntésére ortogonális kromatográfiás módszereket célszerű alkalmazni. Ortogonalitás alatt a különböző kromatográfiás módszereknek azt a sajátosságát értjük, ha független fizikai paraméterek (töltés, méret, hidrofobicitás stb.) alapján rezolválódnak (4. ábra). Ez azt jelenti, hogy egy peptid tisztaságának fokmérője az, ha a különböző kromatográfiás eljárásokkal (géliszűrés, fordított fázisú és ioncserés kromatográfia) vizsgálva is homogénnek mutatkozik [854]. A 4. ábra a három általánosan használt peptidtisztítási lehetőséget jelzi. Más szempontból nézve a lehetőségeket, egy komplex peptidkeverék teljes szétválasztására a "vegyes" módszer adja a legtöbb esélyt.

Szabad peptidek kromatográfiás elválasztására eddig a klasszikus hagyományoknak megfelelően ioncserés kromatográfiát vagy gyenge ioncserélő rendszereket (pl. CMC-cellulóz), egészen kis peptidekre az aminosavanalizátorokat, sótlanításukra gélkromatográfiát használtak, míg védett peptideket szilikagél adszorpciós és megoszlási kromatográfiával tisztítottak. Egészen a 70-es évekig egy Sephadex-géliszűrés, majd az ezt követő ioncserés kromatográfia volt a leghasználatosabb módszer peptidek preparatív izolálására. Ma már a

fordított fázisú HPLC a leggyakrabban alkalmazott kromatográfiás eljárás peptidkeverékek elválasztására, sőt általánosan bármilyen keverék analitikai HPLC-jének 60-80%-át ezzel a technikával végzik.



4. ábra. Peptidkromatográfiában jelentkező ortogonalitás ábrázolása [854]

(●- hipotetikus peptid jellemző fizikai állandókkal. A kocka élei olyan peptidsorozatokat jelentenek, melyeknél a háromból két fizikai állandó azonos)

4.2. ADSZORPCIÓS KROMATOGRÁFIA

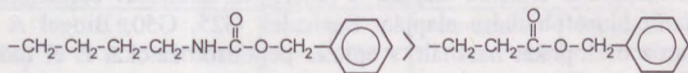
A peptidszintézis *N*-, *C*- és oldalláncvédett köztitermékeinek, a hidrofób aminosavakból álló és hidrofób védőcsoportokat tartalmazó peptidek, valamint védett oligopeptid homológ sorok, hidrofób polipeptidek, hidrofób vírusprotein fragmensek analízisére és tisztítására a normál fázisú kromatográfia szolgál megoldásként. A klasszikus folyadék-szilárd "adszorpciós" kromatográfia helyett célszerű a normál fázisú kromatográfia kifejezést használni. A leggyakrabban alkalmazott szilikagél tölteteken — az alkalmazott mozgófázistól füg-

gősen — mind adszorpciós, mind megoszlási folyamatok szerepet játszanak a komponensek elválasztásában.

A normál fázisú rendszerek alapját képező mikropartikuláris szilika oszlopok (pl. μ Porasil) kitűnően beváltak a fenti célokra. Az eluensként használatos oldószerek az apoláros kloroformtól vagy diklór-metántól kezdve a poláros metanolig és trifluor-etanolig terjedhetnek. Pl. a Boc védett metionin heptapeptid-metilészter oldhatatlan vízben, de metilén-kloridban 1 mg/ml koncentrációjú oldat készíthető már belőle. Az oldékonyság és a mozgékonyosság trifluor-etanollal jelentős mértékben megnövelhető. Ezt kihasználva, szilika oszlopon történő kromatografálás során NAIDER mozgófázisként ciklohexán–izopropanol, ciklohexán–izopropanol–metanol és ciklohexán–izopropanol–metanol–ecetsav elegyeket használt sikerrel [8]. Boc-(Met)_n-OMe és oligomerjeinek (melyekben Met van helyettesítve Gly, Ala, Val, Leu, Lys, Glu vagy Pro egységgel) analízisében. Az említett eluensek esetén még jól lehet UV-detektálást alkalmazni 220 nm-nél (ahol a minták peptidkötése abszorbeál. Megjegyzendő, hogy az ecetsav csak 0,2% töménység alatt használható, máskülönben igen magas lesz az eluens háttérelnyelése. A használható oldószerek sora abban az esetben jelentősen bővíthető, ha differenciál refraktométert használunk detektornak, azaz törésmutató (RI) detektálást alkalmazunk (érzékenységsökkenés [115]). HARA közölt [9] biner oldószerek rendszereket, melyek benzol, diklór-metán, kloroform, etil-acetát és acetontól készülnek. Amíg 2-20 μ g peptid igen intenzív elnyelést mutat UV-ben 220 nm-nél, addig RI használat esetén átlag 250 μ g peptid kellett intenzív csúcs eléréséhez. A szilika oszlopok nagy felületi aktivitását a víz is csökkenti (moderátorként alkalmazható), ezért az egyes oldószerek víztartalma (ppm-ben) is jelentősen befolyásolja a retenciós időt.

Gyakori, hogy kevés ecetsav hozzáadásával a csúcsszimmetriát javítani lehet. NAIDER [10] igazolta, hogy Boc-X-Met-OMe, Boc-Met-X-OMe, Boc-X-Met-Met-OMe, Boc-Met-X-Met-OMe és Boc-Met-X-X-Met-Met-OMe peptidek (ahol X = Gly, Ala, Pro, Val, Leu, Met, O-Met, Lys(Z) és Glu(OBzl)) mozgékonyága az X hidrofobicitás sorrendjével egyezik, tehát Leu > Val > Met > Glu(OBzl) > Lys(Z) > Pro > Ala > Gly. Az erősen hidrofób peptidek kevésbé retardálódnak az oszlopon (kis *k'*-értéket mutatnak), a Gly tartalmúak pedig legjobban (magas *k'*-érték). Az uretán típusú védőcsoportot tartalmazó vegyületek is erősen retardálódnak. Ez azt jelzi, hogy az uretáncsoport NH-ja erős kölcsönhatásba lép a szilikagéllel,

ezért sokkal polárosabbnak mutatkozik a Glu(OBzl) tartalmú peptid-
deknél:



Ez egyben azt is jelzi, hogy peptidok mozgékonyságának meghatározásában az amid NH-k döntő szerepet játszanak.

A HPLC-s rendszer hatékonyságára jellemző, hogy homo-oligo-peptid sorozatot, peptid helyzet izomereket és sztereoizomereket is el lehet választani a fenti rendszerben (ciklohexán-izopropanol). A γ -metil-glutamát sorozatban is hasonló eredményekre jutottak [10].

GÖRÖG, HERÉNYI és LÖW [11] *N*-védett aminosavak és aktívészter származékaik optikai tisztaságának meghatározására Lichrosorb Si-60 10 μ m szilikagélen hexán/2-propanol eluenssel érte el D vagy L-*O*-(4-nitro-benzil)-tirozin metilészterrel képzett diasztereomer dipeptidok elválasztását.

Védett peptidekre (tetradekapeptid nagyságig) GABRIEL és mtársai preparatív méretben is kitűnően használható HPLC-rendszert dolgoztak ki szilikagél oszlopokon [12], melyek *N*-benzil-oxi-karbonil (Z), *N*-2(*p*-bifenilil)-2-propil-oxi-karbonil (Bpoc), *N*-*terc*-butil-oxi-karbonil (Boc), *O*- és *S*-*terc*-butil- (Bu^t), és *S*-acetamidometil (Acm) védőcsoportokat tartalmazva jelentős oldékonyságot mutattak kloroformban, alkoholban (etanol, metanol, izopropanol), ecetsavban és ezek keverékében. Az eluenseket az izokratikus és gradiens elválasztásokhoz ezen oldószerekből optimálták és 254 nm-nél még UV-detektálást is lehetett alkalmazni. A mintafelvitelre dimetilformamidot használtak.

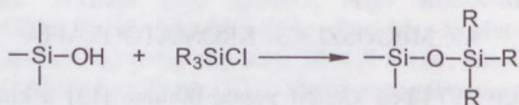
4.3. MEGOSZLÁSI KROMATOGRÁFIA

WÜNSCH 1974-ben kiadott peptid-bibliája [13] a klasszikusnak számító szilika oszlopokon kidolgozott megoszlási technikákat sorolja első helyre védett peptidok tisztítási műveleteiben, melyekben *n*-butanol–ecetsav–víz, etil-acetát–piridin–ecetsav–víz, *n*-butanol–piridin–ecetsav–víz, és hangyasav, benzol, kloroform, alkoholok, valamint vizes puffer oldatokból álló keverék eluenseket használnak. Az előrelépést ezen a területen egyrészt a Sephadex-gélek felhasználása

nálása jelentette, másrészt az a tény, hogy YAMASHIRO — első-
sorban szabad peptidekre — részletesen kidolgozta a megoszlási
kromatográfia elméleti alapjait is [14,15] az aminosav építőelemek
relatív hidrofobicitása alapján. Sephadex G25, G50, Biogel A és
agaróz oszlopokat használt, s epimer peptidsorozatokat is el tudott
választani. Védett peptidekre a "fordított fázisú" gélnek tekinthető
Sephadex LH 20 és LH 60 váltak be GALPIN munkáiban [16,17],
mivel dimetilformamidban is lehet velük dolgozni. *N*-metil-pirroli-
don eluenssel még 37 tagú, teljesen védett (Adpoc, OBut, Acm,
OPh, Bu¹ csoportokkal) peptidet is tudott kromatografálni (preparatív
méretben is) (l. még 4.6. fejezet: Nagyhatékonyságú géلكromato-
grafiája, 84. oldal).

4.3.1. Kémiaailag kötött állófázis

A megoszlásos folyadékkromatográfia néhány hátrányának (a
csak fizikai erővel kötött állófázisok használatából eredő alacsony
stabilitás, reprodukálhatóság hiánya stb.) megszüntetése céljából, a
töltetek területén végzett kutatások legfőbb eredménye a kémiaailag
kötött — azaz a hordozószemcse felületén kémiai reakcióval kötött
— állófázisok megjelenése [18]. Az állófázis stabil lett és egyféle
hordozó felületének polaritása széles skálán belül változtatható (3.
táblázat). A legelterjedtebbek a kémiaailag kötött fordított fázisok
(RP-HPLC). Ebben az esetben a szilikagél felületét pl. alkilszilánnal
módosítva (kémiai kötések révén) hidrofóbbá tesszük. Az eluens
poláros, vizes oldószerkeverék lesz. A minta komponenseinek eluá-
lási sorrendje megfordul: a normál fázisú szilikagélen tapasztal-
takhoz képest az erősebben apoláros vegyületek fognak később eluá-
lódni.



PRYDE [19], a kémiaailag kötött töltetek előállításának egyik
nagy mestere analógiát látott — helyesen — az üvegporon végzett
Merrifield-féle szilárdfázisú peptidszintézis "töltetei" és a HPLC-ben
forradalmat jelentő új típusú állófázisok között.

3. táblázat

Kémiailag kötött állófázisú HPLC töltetek

R	Név	Rövid név	Márkanév
/			
-Si-O— (CH ₂) ₁₇ -CH ₃	oktadecil-	C ₁₈ -, RP-18	ODS-
/			
-Si-O— (CH ₂) ₇ -CH ₃	oktil-	C ₈ -, RP-8	MOS-
/			
-Si-O— (CH ₂) ₄ -CH ₃		C ₄₋₆ -, RP-6	SAS-
/			
-Si-O— CH ₂ -CH ₃	etil-	C ₂ -, RP-2	
/			
-Si-O— C ₆ H ₆	fenil- difenil-		PHENYL-
/			
-Si-O— (CH ₂) ₃ -NH ₂	aminopropil-		APS-
/			
-Si-O— (CH ₂) ₃ -C≡N	cianopropil-		CPS-
/			
-Si-O— CH-OH	"diol-"		DIOL-
/			
-Si-O— CH-OH			
/			
-Si-O— H	szilika		Chromsil, Hypersil, Partisil, ...
/			

Kémiailag kötött állófázis leggyakrabban használt hordozója a porózus szemcséjű szilikagél. Gömb alakú, kis átmérőjű szemcsékből (3-10 μm) hatékonyabb oszlopok készíthetők, mint a szabálytalan alakúakból. A különböző cégek azonos jellegű töltetei (pl. szilikagél) lényeges eltéréseket mutatnak a fajlagos felület, szemcseméret, pórusátmérők stb. tekintetében.

A legtöbb, kereskedelemben hozzáférhető oszloptöltet 60-300 Å átlagos pórusátmérőjű szférikus vagy irreguláris szilika mikrorészecskékből (3-10 μm) készül (lásd 4. táblázat). Ezek a töltetek 50-es tagszámú peptidek vizsgálatáig is elegendőek. Nagyobb molekulák már kizáródnak, és az elválasztás mértéke csökken, mert véges kölcsönhatás lép fel az állófázis és az elválasztandó, nagy molekulatömegű peptidek között. Az utóbbi időben már nagyobb pórusátmérőjű tölteteket is forgalomba hoztak (330-500 Å), s ezek kiterjesztik az alkalmazhatósági határt 100 000 D molekulatömegű fehérjékre is. Peptidek vizsgálatában leggyakrabban a C₁₈-, (oktadecil)- és C₈-, (oktil)-szilika oszlopokat használják.

Alumínium-oxid alapú fordított fázisú (C₁₈, polibutadién) töltetek peptidkémiai alkalmazására is vannak példák [20,21], bár az elválasztások mechanizmusa még nem teljesen tisztázott.

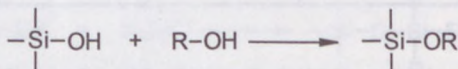
Fordított fázisként szóba jöhetnek még polimer alapú töltetek* és grafit, ill. grafitizált porózus szén használata is, melyek adott esetben előnyt jelenthetnek (alacsony pH alkalmazása, stabilitás stb.).

Az elmúlt évtizedben számos, kémiailag kötött állófázisú töltet (leginkább RP töltet) került kereskedelmi forgalomba. A 4. táblázat a peptidek elválasztásában használatos oszloptölteteket tartalmazza.

4.3.1.1. Apoláris állófázisú töltetek

A kémiailag kötött apoláros állófázisok úgy készülnek, hogy a szilikagél felületére apoláros funkciós csoportot tartalmazó molekulát kötnek [23].

a) Az észter típusú állófázisok szilika és alkohol reakciójával állíthatók elő:



*Porózus polimer bázisú töltetek alkalmazásával kialakult egy új típusú kromatográfiai technika, az ún. perfúziós kromatográfia [22]. A töltet szemcséinek különleges szerkezete (500-1500Å átmérőjű pórusokkal átszőtt 6000-8000Å átmérőjű pórusok) 10-100-szor nagyobb átfolyási sebesség alkalmazását teszi lehetővé, miközben a feloldás nem változik.

4. táblázat

A gyakorlatban használatos kötött állófázisú HPLC töltetek

Kereskedelmi név	Szemcseméret (μm)	Funkciós csoport	Gyártó cég	Speciális alkalmazás
Aquapore	5, 10	alkil- (300 Å)	BrownLee	hidrofób peptidek
μ Bondapak C18	10	oktadecil-	Waters	
μ Bondapak	10	cianopropil-	Waters	
cyanopropyl				
μ Bondapak	10	alkilfenil-	Waters	hidrofil peptidek
alkyl-phenyl				
BioRad ODS	10	oktadecil-	BioRad	PTH aminosavak
BioSil ODS	10	oktadecil-	BioRad	
C ₁₈ Corasil	10	oktadecil-	Waters	
C ₁₈ -LP-1	10	oktadecil-		
Econosphere		C ₄ , 300 Å	Alltech	
Hypersil SAS	5, 7, 10	alkil- (3, 8, 18)	Shandon	
MOS				
ODS				
Hytech C ₁₈	2	oktadecil-	Glycotech	hidrofil peptidek
Lichrosorb RP2	5, 10	alkil- (2, 8, 18)	Merck	hidrofób peptidek
RP8				
RP18				
diol		diol-		
Nucleosil C ₈	3, 5, 10	alkil- (100, 120,	Macherey-Nagel	
Nucleosil C ₁₈		300, 500 Å)		

4. táblázat folytatása

Kereskedelmi név	Szemcseméret (µm)	Funkciós csoport	Gyártó cég	Speciális alkalmazás
Nucleosil Protein	7	alkil- (300 Å)	Macherey-Nagel	
Nucleosil 5 CN	10	alkilnitril-	Whatman	hidrofób peptidek
Partisil ODS-1	10	oktadecil- (különböző borítottóság)	Whatman	hidrofób peptidek sztereoizomerek nem bázikus peptidek
Partisil 10-VAP	10	peptid (Val-Ala-Pro)		
Partisil 10-VPV	10	peptid (Val-Phe-Val)		
Phenyl-SIL-X-1		stírol-vimil vegyes kopolimer		
Poragel PN		piridin		
Poragel PS		peptid		
Silica CT-VAS	10	(Val-Ala-Ser)		
Silica-Diamine				
Spherisorb ODS	5, 10	oktadecil-	Phase Separation	bázikus peptidek
Zorbax C-18	6, 8	alkil-	Du Pont	
Zorbax ODS		C ₈ , -CN, fenil-	MACMOD	PTH-aminosavak
Ultrasphere C ₈		alkil- (8-9 nm pórusátmérő)	Beckman	hidrofil peptidek
C ₁₈		alkil- (C ₁₈)(30 nm pórusátmérő)	Beckman	PTH-aminosavak nagy peptidek
Ultrasphere RPSC	5	oktadecil-	The Separation Group	nagy peptidek
Vydac 218 TP	5, 10	C ₄		
Vydac 214 TP	5, 10	difenil-		
Vydac 219 TP	5, 10			

4. táblázat folytatása

Kereskedelmi név	Szemcseméret (µm)	Funkciós csoport	Gyártó cég	Speciális alkalmazás
Vydac 228 TP	5, 10	octadecil-	The Separation Group	
Vydac 201 HS	5, 10		Synchrom	
SynChropak RP	5, 6, 7, 10	alkil- (100-300-1000-4000 Å porúsátmérő)	Kyoto Co.	ideális peptidekre és
Cosmosil 5 C ₁₈	5	oktadecil-	Waters-	proteinekre
Deltapak	5, 15	oktadecil-, C ₄ - (100, 300 Å)	Millipore	nagy peptidek
RS pak D series		porózus polimerek	Waters-	
			Millipore	
D 18-613		polimetakrilát-C ₁₈	Bischoff	pH 2,2-nél is használhatók!
Polyencap	3	poliakrilvajsavészter- szilika (120 Å)		
Hypersorb	7	grafit (200 Å)	Shandon	
Poly F	20	teflon (300 Å)	Du Pont	
PPP	4	polisztirol-	Hamilton	
		divinil-benzol		
Toyo Soda-butil	2	polimetakrilát-butil	Toyo Soda	hidrofób kölcsönhatás kromatográfia
Yale-butil	2	polisztirol-butil	Chem. Eng. Yale	hidrofób kölcsönhatás kromatográfia
PLRP-S	5, 8, 10	polimer (100 Å)	Polymer Labs.	hosszú igénybevétel

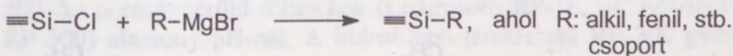
4. táblázat folytatása

Kereskedelmi név	Szemcseméret (μm)	Funkciós csoport	Gyártó cég	Speciális alkalmazás
Poly-HYDROXY-ETHYL PolyCAT-A	5, 12, 30 5, 12, 30	polihidroxietyl- aszpartamid poliaszparginsav szilikán	PolyLC PolyLC	hidrofil kölcsönhatás kromatográfia ioncsere
Poly WAX LP PolySULFO-ETHYL A PolyPROPYL Aspartamide	5, 12, 30 5, 12, 30	poli(etilén-amin) szilikán poli-szulfóetyl- aszpartamid	PolyLC PolyLC	ioncsere ioncsere
PolyETHYL Aspartamide PolyMETHYL Aspartamid BST C18	5, 12, 30 5, 10	120-400 Å (300 Å standard) oktadecil-	PolyLC Bio-Szeperációs Technikai Kft. Merck Asahi Chem.	hidrofób kölcsönhatás kromatográfia pH stabil
Polyspher RP18 Asahipak ODP	5	polimer vinil-alkohol kopolimer C-4, C-8, C-18		

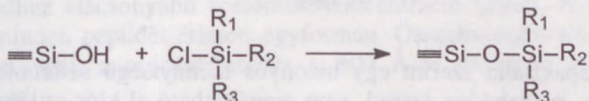
b) A stabilabb amin típusúak tionilkloriddal aktivált szilikából készülnek:



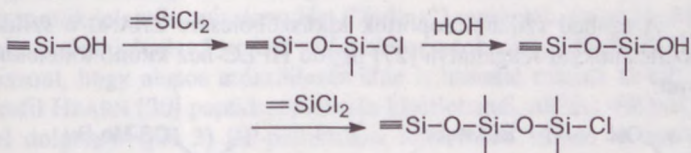
c) Az Si-C kötést tartalmazó típusokat az előző köztitermék és Grignard-reagens vagy Li-organikus vegyület reakciójával lehet létre hozni:



d) A sziloxán típusú töltetek a szilika és különböző klór-szilánok reakciójával készíthetők:

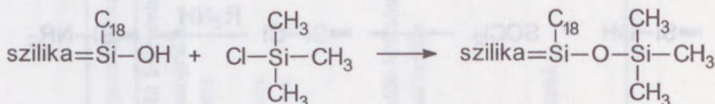


Polimer réteg (ún. "multilayer") képződik, ha a szilika diklór-szilánnal reagál, amit hidrolízis és további klór-szilanozás követ:

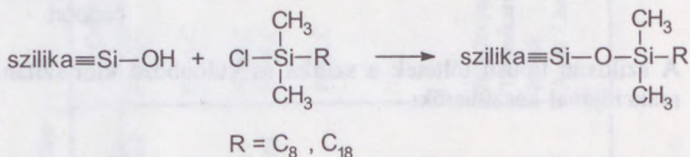


A kereskedelmi forgalomban a legnagyobb mennyiség C_8 és C_{18} szilika tölteteből áll rendelkezésre. Kezdetben a szilikagélt triklór-alkil-szilánokkal reagáltatták, ma már inkább di- és trifunkciós szilánokat alkalmaznak. Sztérikus okokból szabad szilanolcsoportok, ill. elreagálatlan haloszilán részek maradhatnak, vizes oldatban ezek a részek "előhívódnak" és számos problémát okoznak, pl. váratlan adszorpció, ioncsere stb. (l. 56. oldal).

A peptid HPLC-ben is a szabad szilanolcsoportokat utólagos klór-trimetil-szilános kezeléssel lehet lefedni (ún. "endcapping") [24]:

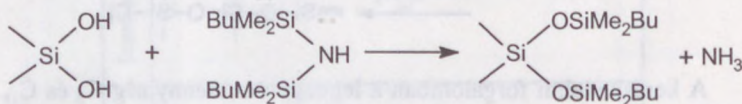


Egyszerűbb megoldás, ha a szilikát rögtön dimetil-klór-alkil-szilánnal kezelik:



A tapasztalat szerint egy bizonyos mennyiségű szilanolcsoport még így is szabadon marad, nem reagáltatható el klór-szilánnal. (A maradék szilanolcsoportok IR spektroszkópia, T₂O-val történő izotópcseré és metilvörös adszorpció alkalmazásával kimutathatók.) A nem poláros láncok árnyékoló hatása pedig a borítottság mértékétől és a láncok méretétől függ [25,26].

e) A szabad szilanolcsoportok kiküszöbölésére ZHANG a szilikát diszilazánokkal reagáltatva [27] peptid HPLC-hez kitűnő töltetekhez jutott:



RP - C₄ töltet

Már PEARSON megállapította [28], hogy a kereskedelemben kapott különféle szilika eredetű oszlopok értékelése nem oldható meg, mert annyira változhat a borítottság és a töltés minősége, hogy lehetetlen egzakt véleményt adni arról, hogy a szilika mátrix mennyiben

járul hozzá a szelektivitáshoz és feloldáshoz. Peptidek és proteinek HPLC-jében a 200 Å-nál kisebb pórusátmérőjű szilikák alacsonyabb értékűek feloldás és visszanyerés szempontjából, mint a nagyobb pórusátmérőjűek. A legjobb feloldást a 300 Å pórusátmérőjű szilikák mutatták. A pórusátmérő nagyságából még nem következik az, hogy az illető szilika minden esetben jó elválasztást fog biztosítani. Például az *n*-alkilezett Spherosil XOB 075 nem megfelelő töltet RP-elválasztásokra, a Spherisorb SG 30F és a Lichrospher Si 300 igen. PEARSON [28] vizsgálatai arra hívják fel a figyelmet, hogy a kritikus fizikai paraméter inkább a pórustérfogat, mint a pórusátmérő.

WILSON albumin triptikus peptidjeit kromatografálta [29] 100 és 300 Å pórusátmérőjű tölteteken (Lichrosorb RP-18, ill. Aquapore RP 300) alacsony pH-nál. A hidrofílebb természetű RP 300 gyorsabb peptid elúciót mutatott. A feloldás nem volt azonos a két oszlopon, mert két peptid akadt, melyet nem lehetett elválasztani a 300 Å-s oszlopon, viszont a 100 Å-s kolonnán igen. A pufferek pH-ját emelve, a peptidek gyorsabban eluálódtak, ugyanakkor az elúciós sorrendhez alacsonyabb acetónitril-koncentráció kellett. A változás nem minden peptidet érintett egyformán. Összehasonlítva a 100 Å-ös oszloppal, a csúcshélesedés a 300 Å-ös oszlopon jelentősen csökkent.

Pellikuláris tölteteket (pl. Corasil C₁₈) sikeresen használtak peptid HPLC-ben, de a kapacitásuk kisebb. Így a nagy szelektivitású, hatékony és nagy kapacitású, teljesen porózus RP-töltetek (pl. µBondapak C₁₈) használata került előtérbe. A pellikuláris töltetek (Corasil C₁₈, fenil-Corasil) hatékonysága sokszor azért kisebb, mert a kromatogramok jelentős csúcstorzulást ("tailing") mutatnak, ez pedig feltételezhetően jelenlevő szabad szilanolcsoportoknak köszönhető. Tény viszont, hogy alapos utószililezés után is hasonló maradt az elúciós profil HEARN [30] peptidszeparációs kísérleteinél, aki foszfát pufferrel dolgozott (pH 3) RP-pelliculáris töltetekkel. Ebben az esetben más hatásoknak kell fellépni, mint szabad szilanolcsoportok esetén.

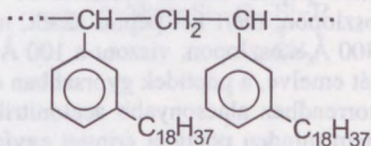
Gyakorlati szempontból (az oszlopok élettartamát tekintve) figyelembe kell venni, hogy az -Si-O-X kötések (erős) savas, bázisos hidrolízisre érzékenyek. Magas pH-nál (> 7) a szilika mátrix kezd kioldódni az eluensbe. A peptidválasztásoknál legjobban bevált TFA tartalmú oldószerek (pH 2,2-2,4!) a -Si-O-C- kötés hidrolízisével csökkentik az alkilcsoportok számát, s ezáltal a borítottságot. A jelzett két változás csúcstorzulást, váratlan elúciós sorrend változásokat, bázikus peptideknél alacsony anyag visszanyerést és ioncserélt

hatásokat okozhat. A (peptid)kromatográfiás gyakorlatban ezért pH 3,5-7 az ajánlott tartomány, továbbá huzamosabb használat esetén az oszlopokat időnként minősíteni és ellenőrizni kell a szilanolcsoportok jelenlétére vonatkozóan.

Az RP-HPLC-ben savas pH-jú eluensek használata a leggyakoribb, ezért stabilabb töltetek gyártására is törekedtek. Egyik lehetőség az, hogy a felszíni sziloxán kötéseket sztérikusan védik a hidrolízis ellen: a kötött fázisokat diizopropil-organoszilánokkal készítik [31].

A másik megoldás [32], hogy szilika alapú töltetek helyett pH 1-12 között is stabil, fordított fázisként viselkedő anyagokat, mint sztírol-divinil-benzol kopolimereket [33, 34], teflont [32], grafitot [35, 36] vagy polimer borítású szilika vagy alumínium-oxid fázisokat [37] használnak.

Új típusú anyagként került forgalomba a Merck cég Plyspher töltete, valamint az Asahipak Ltd. C₁₈-kötött vinil-alkohol kopolimerje (ODP töltet), melyek bázikus és savas eluensekkel szemben is kémiaiilag stabilak [34]. Összehasonlításuk a peptid szeparációkra kiváló RP-18, RP-8 anyagokkal ma már rendelkezésre áll [32, 37].



Szelektivitásban gyakorlatilag nincs különbség C₈ és C₁₈ töltetek között. A kötött fázisok lánchossza csekély hatással van nonapeptidok elválasztására [38]. Nagyobb molekulatömegű peptidek és fehérjék esetében azonban kedvezőbb C₈-as töltetet használni (C₁₈ helyett), mert kevesebb organikus oldószert tartalmazó eluens kell az elúcióhoz (konformációváltozás, biológiai aktivitás veszteség, denaturálódás lehetősége lecsökken, oszlopterhelési kapacitás magasabb stb.). Lichrosorb RP-8 és Lichrosorb RP-18 oszlopon kromatografálva az oxitocin szintézisben szereplő peptideket, nem találtak szelektivitásban eltérést [39]: 1-propanol oldószer rendszerrel minimálisak voltak az elúciós különbségek a két oszlop között. Hidrofil peptidek esetében már jelentkezik változás [40]. C₂-lánchosszú töltetek szelektivitása csökkent mértékű, ez az állófázis poláros jellegének tulajdonítható [41].

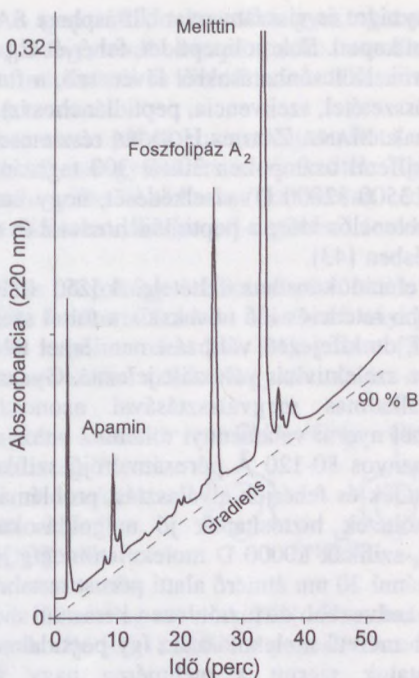
NICE C₁-C₁₈ lánchossz közötti, maximális borítottságú alkilszilán kötött tölteteket vizsgált szisztematikusan fehérjéket kromatografálva [42]. C₆-nál kisebb esetben voltak sikeresek az elválasztások. Opti-

mális hatékonyságot és visszanyerést Ultrasphere SAC-C₃ szén lánc-hosszú tölteten kapott. Sok polipeptidet, fehérjét C₁₈ töltetről lehetetlen visszanyerni. Kölcsönhatásokról lévén szó, a futtatott peptid tulajdonságai (összetétel, szekvencia, peptidlánc-hossz) ugyancsak döntően számítanak. MANT, ZOU és HODGES részletesen vizsgálták C₄, C₈, C₁₈ és alkilfenil oszlopokon 30-tól 300 tagszámig terjedő polipeptidek (Ms 3500-32000 D) viselkedését, hogy korrelációt állapítsanak meg a retenciós időre a peptidlánc-hossztól és a hidrofobicitástól való függésben [43].

Gradiens elúció konstans feltételei között (CH₃-CN, pH 2,1, NaCl) a legtöbb retenciós idő növekszik a töltet szénláncának hosszabbodásával, de kifejezett változást nem lehet találni elúciós sorrendben, ami a szelektivitás változást jelezné. Gyakorlatilag a gradiens profil alkalmas megválasztásával azonos elúciós képet ("pattern") lehet nyerni valamennyi tölteten.

A hagyományos 80-120 Å pórusátmérőjű szilika töltetekkel ellentétben peptidek és fehérjék elválasztási problémáira a 300 Å pórusátmérőjű töltetek biztosítanak jó megoldásokat. Hatékonyság terén C₄ és C₈-szilikák 80000 D molekulatömegig jól használhatók, ha csak kis számú 20 nm átmérő alatti pórust tartalmaznak. A szélesebb pórusok kedvezőbb diffúziót, ezen keresztül megoldást biztosítanak nagyobb méretű molekuláknak, így peptideknek is.

Tapasztalataink szerint a méhméreg nagy molekulatömegű peptidjei (melittin, apamin, MCD-peptid, foszfolipáz A₂ stb.) a megszokott ODS-Hypersil-100 Å töltetekhez képest 300 Å pórusátmérőjű Econosphere C₄ töltetű oszlopon nagyon szépen szeparálhatók (5. ábra). Több szilika nem bírja a magasabb nyomást (2000 psi) és széttöredezhet. Nagyobb viszkozitású (pl. propanol tartalmú) eluens használata esetén ez komoly hátrányt jelenthet, mivel nem teszi lehetővé az optimális áramlási sebesség nyújtotta elválasztási hatékonyság elérését. A Vydac TP töltetek 8000 psi-nél magasabb töltési nyomást is elviselnek. PEARSON [28] mellett egy japán kutatócsoport végzett szisztematikus vizsgálatokat [44] a pórusátmérő és szénlánc-hossz hatására szilika és polimer alapú, polipeptid szeparáló RP töltetek minőségét illetően. WILSON [45] azt tapasztalta a 100 és 300 Å pórusátmérőjű töltetek összehasonlítása során, hogy az utóbbiak enyhén hidrofilabb jellegűek, aminosav- és peptidszármazékokra azonos vagy jobb feloldást mutatnak, mint a 100 Å átmérőjűek és kb. 15000 D-nál nagyobb Ms esetén pedig jóval kedvezőbbek a feloldási tulajdonságaik.



5. ábra. Szárított méhméreg HPLC képe

Oszlop: Econosphere 300 C4, 7 μ m
 Eluens: A. 0,1% TFA vízben,
 B. 80% CH₃CN-0,1% TFA
 Gradiens: lineáris 0-90% B, 55 perc
 Sebesség: 2 ml/perc
 Minta: 100 μ g

Összefoglalva, peptid (és fehérje) HPLC-ben leginkább öt kémiai-lag kötött állófázis használatos: C₄, C₈, C₁₈ és difenil- 300 Å porus-átmérőjű szilika és C₁₈ kisebb porúsú szilika (80-120 Å).

A C₃-szilika nagyobb peptidek kromatográfiájára ajánlatos (20-30-nál nagyobb tagszámú peptidek, valamint fehérjék és BrCN hasításból eredő fragmenseik). Különösen hasznos hidrofób polipeptidek (pl. vírusfehérje fragmensek) esetén.

A C₈-töltet peptidterképek, natív és szintetikus peptidek és kisebb, hidofil proteinekre megfelelő állófázis.

A C_{18} -fázis enzimatiszus peptidterképek készítésére és kis peptidok szeparálására a legmegfelelőbb.

A difenil-szilika szelektivitási változatot jelent polipeptidek, különösen az aromás oldalláncú aminosavakat tartalmazókra.

A hagyományos pórusátmérőjű C_{18} -töltetek kisebb hidrofíli peptidoknál (2-10 tagszámú) váltak be leginkább.

4.3.1.2. Poláris kötött állófázisú töltetek

A kémiai kötött poláris fázisú töltetek a normál fázisokhoz hasonlóan, hiszen a szilikagélhez kapcsolt cianopropil-, alkilamin- és diolsoportok csak módosítják a szilikagél felszínének polaritását, de nem teszik azt apolárossá. A diol- és aminofázisok eredendően bázikusak, míg a cianofázisok dipoláros karakterűek. Az alkalmazott elúció rendszerint fordítottja az RP-kromatográfiában használtaknak, azaz nagyobb szerves módosító koncentrációtól az alacsonyabb felé halad a gradiens. Ezen töltetokről általános információ nem áll rendelkezésre, de a különféle oszlopok hatékonyságát sokan összehasonlították. Dipeptidek elválasztását LUNDANES és GREIBROCK [46] például a következő porózus tölteteken tanulmányozta: Phenyl-Sil-X-1, 13 μm , $\mu\text{Bondapak-NH}_2$, Nucleosil-5 CN, Spherisorb S5W-ODS, Spherisorb S5 Phenyl, ODS-Hypersil*. Az $-\text{NH}_2$ oszlop nagy eltérést mutat az RP esetektől. A nitrilfázis meglepően konstans fordított fázisú viselkedéssel bír; hatásossága és szelektivitása azonban alacsonyabb, mind az ODS (tehát C_{18}) töltetké. A feniloszlopok azonosan szerepeltek, de az 5 μm -es Spherisorb töltet nagyobb hatékonyságot és szelektivitást mutatott. E tekintetben jobbak, mint a nitriloszlopok, de elmaradnak az ODS oszlopoktól. Bázikus peptidok a fenil és Spherisorb ODS-oszlophoz irreverzibilisen kötődtek, míg Hypersil-ODS töltet kitűnően bevált ilyen természetű anyagok tisztításában és analízisében NH_4OAc eluens puffert használva.

WILSON triptikus peptidok elválasztását hasonlította össze [50] cianopropil (6 μm) és C_{18} -as (10 μm , Lichrosorb RP-18, 100 \AA

*Az ODS-Hypersil tölteteket KNOX és munkacsoportja fejlesztette ki a 70-es évek közepén [47]. Alkalmam volt részt venni a peptidkémiai alkalmazások kidolgozásában [48]. Tapasztalataim alapján az ELTE Peptidkémiai HPLC laborjában az elmúlt tizenöt év során a legtöbbet és legszéleskörűbben használt alaptöltet volt [49].

pórusátmérőjű) tölteteken. A nagyobb hidrofobicitású C_{18} oszlop jobb feloldást adott a peptidekre 3-15 tagszámig. A CN fázis poláros tulajdonsága miatt kevésbé tartja vissza vissza a peptideket, de nagyobb és hidrofób peptidekre is várhatóan jobb visszanyerést ad.

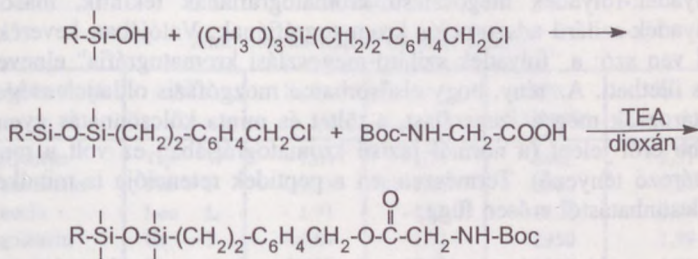
A Lichrosorb dioloszlopok hidrofób proteinek szeparálásában váltak jól be [51]. A csak nagy szerves oldószer koncentrációjú (pl. 80%-os propanol) eluensben oldódó fehérjék, polipeptidek, normál fázisú módon szeparálhatók Lichrosorb dioloszlopon, csökkenő *n*-propanol gradiens mellett (80%-ról 50%-ra), ahogy azt RUBINSTEIN szérumfehérjék szeparációjánál tapasztalta [52].

RIVIER is azt találta, hogy peptidkeverékeknél alkilfenil vagy μ Bondapak C_{18} oszlopokon jóval szebb elválasztásokat ér el, mint μ Bondapak-cianopropil tölteten [53]. HANSEN a peptidek viselkedését μ Bondapak fenil-Corasil, Poragel PN (35-75 μ m) és Poragel PS (35-75 μ m) oszlopokon tanulmányozta [54]. HANSEN a két első töltetet tartotta a legmegfelelőbbnek nem bázikus peptidek HPLC-jére [54]. Bázikus aminosavakat tartalmazó peptidek elválasztására a Poragel PS töltet megfelelő, ezen az oszlopon savas peptidek viszont erősen kötődnek [54]. A fenil-Corasilon kapott csúcsok torzultak (tailing) és a Poragel PN-tölteten lassan kialakuló csúcsok nyerhetők (gyenge "fronting"). A csúcsszimmetria és a retenció terhelésfüggése túlterhelési jelenségnek ("overloading") is tekinthető, bár ezek a hatások a HANSEN által alkalmazott kis mennyiségű mintáknál nem jöhetnek számításba. (Néha 50 μ g peptid egy 100 cm x 3 mm-es oszlopon túlterhelést jelentett, tehát a kromatográfiai feltételek távol álltak az optimálistól). Met és Leu-enkefalin peptidek jobban retartálódnak és szeparálhatók μ Bondapak fenil-alkil tölteten [55].

4.3.1.3. Kötött peptidfázisú töltetek

KITKA és GRUSHKA gondolata volt, hogy peptidek kromatográfiájában a peptidekhez hasonló szerkezetű tölteteket kellene alkalmazni [56]. Ennek megfelelően GRUSHKA és SCOTT aminosavakat, ill. peptideket kapcsolt szilikához vagy más szilárd mátrixhoz és igazolta, hogy ezek a töltetek alkalmasak peptidek és aminosavszármazékok szeparálására [57].

Porasil C és Corasil II szilikákat klórmetiliztek 1-trimetoxiszilil-2-(4-klórmetilfenil)-etánnal, majd Boc-glicinnel a tervezett anyaggá alakították:



Tovább építve Boc-Gly-(Gly)_n-Porasil (ill. Corasil) készült [56, 57]. Izomer dipeptidok kémialag kötött, optikailag aktív állófázison kitűnően elváltak a szilikagélen tapasztalt elválasztáshoz képest [56, 57]. Gly-Val-Phe, Val-Ala-Val és Val-Ala-Ser tripeptideket is kapcsoltak szilikagélhez, melyeken 1%-vizes citromsav, ill. Na-citrát eluensekkel érték el izomer dipeptidok elválasztását [58, 59]. Az oszlophatékonyság elég alacsony volt ezekben az esetekben. Az eredmények azt mutatták, hogy a peptidok elúciós sorrendjét a kötött peptidfázis szabályozta. A retenciós mechanizmusban anioncserre és hidrofób kölcsönhatások kombinálódnak. Ha a peptid védőcsoporttal rendelkezik, lényegesen megváltozik a retenciója. A peptidok retenciós sorrendje általában követi a mintában levő szénhidrogén oldalláncok hidrofobicitásának sorrendjét, hasonlít a dipeptideket alkotó aminosavak elúciós sorrendjéhez.

Partisil-10 szilikához kapcsolt tripeptid-tölteteken végzett tanulmányok azt mutatják, hogy ezek az állófázisok aminosavak, PTH aminosavszármazékok és izomer peptidok elválasztására alkalmasak [58, 59].

A peptidlánc alapját képező savamid funkciót tartalmazzák a poliamid töltetek is (pl. Polyamid-6, Macherey-Nagel). Laboratóriumi munkában α-MSH fragmenseket kromatografáltunk rajta. Jelentős szelektivitásnövekedést az RP-töltetekhez képest nem tapasztaltunk [60].

4.3.2. Az elválasztás mechanizmusa

Az RP-HPLC szeparálási mechanizmusa nem mutat egységes képet, tulajdonképpen nincs klasszikus megfelelője. Egyes iskolák

folyadék-folyadék megoszlású kromatográfiának tekintik, mások folyadék-szilárd adszorpciós kromatográfiának. Valójában keverékről van szó: a "folyadék szilárd-megoszlási kromatográfia" elnevezés illetheti. Az tény, hogy elsősorban a mozgófázis oldatjelenségei határozzák meg a szeparálást, a töltet és minta kölcsönhatás gyengébb erőt jelent (a normál fázisú kromatográfiában ez volt a meghatározó tényező). Természetesen a peptidek retenciója is mindkét kölcsönhatástól erősen függ:

- megoszlás a töltet szénhidrogén felülete és a mozgófázis között,
- megoszlás a mozgófázis és a módosított felületű töltet között (az eluens módosítja a töltet felületét),
- adszorpció a töltet szénhidrogén rétegén,
- adszorpció a "szabad" szilanol részeken.

A peptideket alkotó aminosavak különböző oldalláncai miatt (melyek az apoláros szénhidrogén láncoktól kezdve, aromás gyűrűket, és ionizálható poláros csoportokat is tartalmazhatnak) a peptidek polaritása rendkívül széles skálán mozog. Mindez azt jelenti, hogy nem poláros interakciók (aromás gyűrűk diszperziós hatásai), a hidrofób kölcsönhatások, ionos kapcsolatok mellett más tényezők, pl. H-híd kötés kialakulása (savamid kötések, peptidoldallancok) is szerepet játszanak. Peptidek retenciója és elválasztásuk kémiaiilag kötött állófázisú oszlopokon a különböző kölcsönhatások hozzájárulási mértékétől függ. Közülük a hidrofób kölcsönhatások a meghatározó jellegűek. Napjainkban a szolvofób elmélet a legelfogadottabb a retenció értelmezésére peptidek esetében is. Gyakorlatilag a vízdoldékonyság és az alifás szerkezeti elemek jelenléte a felelős a retenció sajátosságokért: kisebb vízdoldékonyság peptidek esetében is erős kötődést jelent egy fordított fázisú oszlophoz.

Az aminosavak hidrofobicitása kvantitatíve jellemezhető a vízből etanolba vagy dioxánba történő átmenet szabadenergia-változásával (20 °C-on), víz-oktanol megoszlási hányadossal, vagy az oldallancok hidrofób fragmens konstansaiival (6. táblázat) (Rekker-konstansok; [61-63]).

Ennek megfelelően a peptidek hidrofobicitása kvantitatíve megadható az egyes aminosavak hidrofób fragmens konstansainak összegével ($\sum f$ = Rekker-összeg) [64-66].

5. táblázat

Aminosavak hidrofobicitási adatai

Aminosavak	Jel	$\log P$	p	Δf_i (kal/mól)	Σf
triptofán	Trp W	-1,04	-1,75	3400	2,31
fenilalanin	Phe F	-1,43	-1,63	2500	2,24
leucin	Leu L	-1,71	-1,61	1800	1,99
izoleucin	Ile I	-1,69	-1,72	2950	1,99
tirozin	Tyr Y	-2,26	-2,42	2300	1,70
valin	Val V	-2,10	-2,08	1500	1,46
cisztin	(Cys) ₂	—	—	—	1,11
metionin	Met M	—	-1,84	1300	1,08
prolin	Pro P	—	-2,50	2600	1,01
cisztein	Cys C	—	-2,49	1000	0,93
arginin	Arg R	-2,59	-4,20*	750	-0,82
alanin	Ala A	-2,94	-2,89	500	0,53
lizin	Lys K	-2,82	-3,31	1500	0,52
glicin	Gly G	-3,03	-3,25	0	0,00
aszparaginsav	Asp D	—	-3,38	0	-0,02
glutaminsav	Glu E	—	-2,94	0	-0,07
hisztidin	His H	-2,86	-2,84	500	-0,23
treonin	Thr T	—	-2,91	400	-0,26
szerin	Ser S	—	-3,30	-300	-0,56
aszparagin	Asn N	—	-3,41	—	-1,05
glutamin	Gln Q	—	-3,15	—	-1,09

$\log P$, p : oktanol-víz megoszlási hányados [68, 69]

Δf_i : szabadenergia (25°C); az oldallánc tiszta oldószerből tiszta vízbe kerül (dioxán vagy etanol) [70]

Σf : oldalláncok relatív lipofilicitása: Rekker-összeg (hidrofób fragmens konstansokból) [63]

Felületi feszültségük mérése alapján BULL és BREESE hasonló hidrofobicitás skálát állított fel a peptideket felépítő aminosavakra, melyek segítségével a peptidek elúciós sorrendjét meg lehet becsülni [67].

MOLNÁR és HORVÁTH [61], akik növekvő CH₃CN-koncentrációt használva eluáltak peptideket LiChrosorb RP-18 oszlopról, megállapították, hogy Phe és oligomerjeinek retenciós ideje (pontosabban a $\log k'$) lineáris összefüggést mutat a tagszámmal. Jó egyezést

találtak a retenciós idők és az oldalláncok Rekker-féle hidrofobicitás értékei között.

A peptidek elúciós sorrendje a Rekker-konstansok összegeinek sorrendjével egyezik, ill. O'HARE és NICE megállapítása szerint a peptidek leghidrofóbabb aminosavai Rekker-konstansainak összegével függ össze [64]. Minél inkább hidrofób tulajdonságú a peptid, annál nagyobb retenciós idővel eluálódik az RP oszlopról (6. ábra).

Az α -amino-csoport nagymértékben hozzájárul a peptidek retenciós viselkedéséhez, melyet az N-terminális aminosav oldallánc hidrofobicitásának befolyásolásával ér el (növelheti, ill. csökkentheti azt). E ténytet SEREDA, MANT, QUINN és HODGES [856] állapította meg.

6. táblázat

Az aminosav oldalláncok alkotóelemeinek hidrofobicitás értékei (fragmens konstansok) [69]

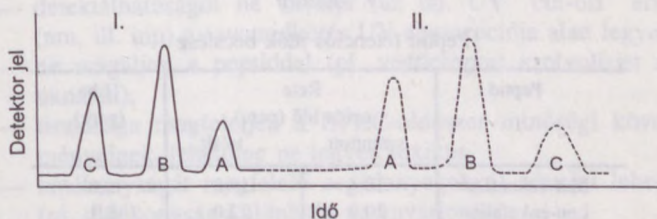
Fragmens	Π_r (aa)
CH ₃	0,42 ± 0,03
CH ₂	0,41 ± 0,02
CH	0,35 ± 0,06
C	0,39 ± 0,09
fenil	1,22 ± 0,04
OH (alifás)	-0,46 ± 0,04
OH (aromás)	-0,50 ± 0,09
NH ₂	-1,19 ± 0,19
NH ₃ ⁺	-2,12 ± 0,20
NHCONH ₂	-1,37 ± 0,08
guanidinium	-2,13 ± 0,07
imidazol	-0,29 ± 0,05
imidazol kation	-1,26 ± 0,06
indol	1,43 ± 0,05
indolkation	0,56 ± 0,13
pirrolidin	0,77 ± 0,07
COOH	-0,41 ± 0,06
COO ⁻	-1,51 ± 0,05
CONH ₂	-0,86 ± 0,04
SH	0,32 ± 0,05
S ⁻	-0,92 ± 0,05
SCH ₃	0,59 ± 0,05

7. táblázat

Retenciós idő és a hidrofobicitás összefüggése [71]

Peptid	Aminosav szám	Retenciós idő (perc)		Σf	
(glycine) ₅	5	2,59 ^a	2,61 ^b	(0)	0
Leu-Gly	2	3,05	3,00	(1,99)	1,99
angiotenzin III	7	6,42	12,70	(8,40)	8,17
Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe					
Met-enkefalin	5	7,77	8,06	(3,94)	5,02
Tyr-Gly-Gly-Phe-Met					
(des-Tyr) ¹ -Leu-enkefalin	4	8,43	10,39	(4,23)	4,23
Gly-Gly-Phe-Leu					
α -endorfin (humán)	16	9,98	13,69	(5,93)	6,95
Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-					
Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-					
Pro-Leu-Val-Thr					
Leu-enkefalin	5	10,64	14,64	(5,93)	5,93
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu					

Oszlop: RP-C18 10 μ m ^a-C18 ^b-HC-ODS
 Eluens: 15% CH₃CN 0,1% H₃PO₄-ban (pH 2,4)
 Gradiens: 1% CH₃CN/perc



6. ábra. Retenciós idő függése a minták hidrofobicitásától

I. fordított fázisú RP-C18 (apoláros) töltet II. normál fázis (poláros) töltet
 eluens polaritása \longrightarrow csökken eluens polaritása \longrightarrow nő
 peptid mintakomponensek hidrofobicitása: A > B > C

Egy adott oszlop, ill. HPLC rendszer esetén a gyakorlat szempontjából hasznosabb percben megadott retenciós koefficienseket megállapítani és azokkal dolgozni. MEEK [65, 66] alapvető munkái

szerint alakult ki a 8. táblázat C-18 oszlopra vonatkozóan. E táblázat adatainak használhatóságát a 9. táblázat mutatja be.

8. táblázat

Aminosavak retenciósi koefficiensei

Aminosav	Retenciósi koefficiens (perc)		Aminosav + csoportok	Retenciósi koefficiensek (perc)	
	pH 7,4	pH 2,1		pH 7,4	pH 2,1
Trp	14,9	18,1	Cys	-6,8	-2,2
Phe	13,2	13,9	Lys	0,1	-3,2
Ile	13,9	11,8	Ser	1,2	-3,7
Leu	8,8	10,0	Asn	0,8	-1,6
Tyr	6,1	8,2	Gln	-4,8	-2,5
Met	4,8	7,1	Asp	-8,2	-2,8
Val	2,7	3,3	Glu	-16,9	-7,5
Pro	6,1	8,0	-NH ₂	2,4	-0,4
Thr	2,7	1,5	-COOH	-3,0	6,9
Arg	0,8	-4,5	-CONH ₂	7,8	5,0
Ala	0,5	-0,1	Glp	1,1	-2,8
Gly	0,0	-0,5	H ₃ CO-	5,6	3,9
His	-3,5	0,8	Tyr szulfát	10,9	6,5

9. táblázat

Peptid retenciósi idők becslése

Peptid	Retenciósi idő (perc)		Hiba (perc)
	számított	talált	
Met-enkefalin	18,4	19,0	-0,6
Leu-enkefalin	20,9	22,0	-1,1
ACTH ₃₄₋₃₉	27,0	31,0	-4,0
ACTH ₄₋₁₁	33,1	30,0	3,1
Angiotenzin II	27,4	23,0	4,4
Substance P ₄₋₁₁	33,1	33,0	3,1
Oxitocin	27,4	23,0	4,4
α-MSH	27,3	26,0	1,3
Gasztrin	26,8	28,5	-1,7
Glukagon	39,7	36,0	3,7
β-Endorfin	41,5	34,0	7,5

A retenció idő ("prediction") előrejelzés, ill. számolás azóta további pontosítást nyert és ma már komoly szerepe van az ismeretlen peptidkeverékek analízisében [73-80], melyet számítógépes programok is segítenek [81, 82].

4.3.3. Mozgófázis

A fordított fázisú HPLC-ben a mozgófázis víznek és egy, a polaritást módosító szerves oldószernek, az ún. "organic modifier"-nek a keveréke. Mivel az elválasztásban a hidrofób kölcsönhatás a döntő, a peptidok retenció idejét (k') a szerves oldószer mennyisége határozza meg. A $\log k'$ egyébként a minta vízdoldékonyságával ($S_{\text{víz}}$) arányos. Szerves oldószer hozzáadásával k' értéke csökken.

Általános gyakorlati szabály, hogy az organikus komponens koncentrációjának 10%-os növelése a k' értékének 2-3-szoros csökkenését vonja maga után.

Az eluenssel szemben támasztott követelmények:

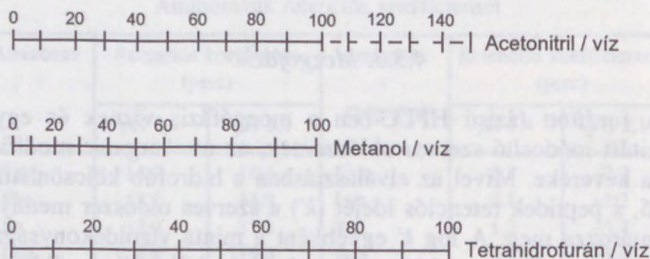
- max. 4 komponensű lehet (leggyakoribb a két részből álló, ún. biner oldószerkelet),
- a peptidet megfelelően oldja (nagy oldékonyság),
- illékony legyen (elsősorban preparatív munkánál fontos),
- detektálhatóságot ne zavarja (az ún. UV "cut-off" értéke (nm, ill. μm) a savamidkötés UV-abszorpciója alatt legyen),
- ne reagáljon a peptiddel (pl. védőcsoport szolvólízist sem okozhat),
- tisztasága megfelelően a HPLC-oldószer minőségi követelményeinek, lehetőleg ne legyen toxikus,
- hatékonyságát megfelelő segédanyagokkal növelni lehessen (pl. oldékonyság-különbség ne zavarjon).

Az oldószerek sok esetben jól helyettesíthetők egymással. Az oldószerezőségeket figyelembe véve, például:

$$V_{\text{THF}} = 0,66 \times V_{\text{MeOH}}$$

$$V_{\text{CH}_3\text{CN}} = 0,32 \times V_{\text{MeOH}}^2 + 0,57 \times V_{\text{MeOH}}$$

azaz ugyanolyan retenciós idő eléréséhez kisebb térfogatú (V : térfogat ml-ben) tetrahydrofuránra, ill. acetonitrilre van szükség, mint metanolra.



7. ábra. Nomogram izoelutróp eluensekre

(pl. 50% CH_3CN -t, 60% MeOH -t vagy 37% THF -t tartalmazó vizes eluens ad hasonló retenciós időt)

10. táblázat

RP-HPLC-ben használt oldószerek tulajdonságai

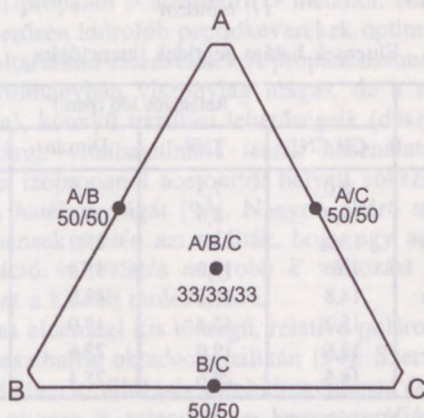
Oldószerek	P^*	S_{RP}^+
H_2O	10,2	0,0
MeOH	5,1	3,0
EtOH	4,3	3,6
CH_3CN	5,8	3,1
acetone	5,1	3,4
dioxán	4,8	3,5
izopropanol	3,9	4,2
<i>n</i> -propanol	4,0	4,3
tetrahydrofurán	4,0	4,4

* polaritás index

+ fordított fázisú oldószer erősség paraméter

Az oldószer-optimálás, azaz a szeparáláshoz legmegfelelőbb mozgófázis kiválasztása a Snyder-féle oldószer-optimálási háromszög segítségével manuálisan vagy komputer segítségével történhet

[83-86]. Az izokratikus feltételek optimumát egy gradiens futtatásból [84, 87] vagy lépésenként összetétel-változtatás segítségével állapíthatjuk meg [88,89].



8. ábra. Optimalíási háromszög

A, B, C csúcsok izoelutróp mozgófázisok (különböző szelektivitás eléréséhez)

4.3.3.1. A mozgófázis összetétele

Az RP-HPLC-ben legfőképpen acetonitril-víz vagy metanol-víz keverék eluensek használatosak, amelyek alacsony viszkozitással és UV átlátszósággal ("transparency") rendelkeznek. Nagyobb peptidek elúciója magasabb szerves oldószer-koncentrációt igényel, viszont sok polipeptid nem oldódik már ezekben az oldószerekben: kis koncentrációjú *n*-propanol jól tudja helyettesíteni a magas CH₃CN-koncentrációkat a kicsapódás veszélye nélkül [90]. Pl. az α -endorfin (Ms = 1750) 5% *n*-propanollal, illetve 20% CH₃CN vizes oldattal eluálható ugyanarról az oszlopról. A β -endorfin (Ms = 3500) és a β -lipotropin (Ms = 11500) 20% propanollal kromatografálható. A propanol hátránya, hogy nagy viszkozitású, s így használata nem tesz lehetővé nagyobb áramlási sebességeket, melyek esetleg az optimális feloldáshoz szükségesek. Nagy polipeptideknél ez nem jelent

korlátozást, mert diffúziójuk aránylag lassú, és így alacsonyabb eluensáramlási sebességet igényel a maximális feloldás elérésére.

11. táblázat

Eluensek hatása peptidek retenciójára

Peptid	Retenció idő (perc)			
	CH ₃ CN	THF	Dioxán	MeOH
L-Trp	8,0	7,3	8,8	13,2
AVP	10,0	8,5	10,2	18,6
Met-enkefalin	13,2	14,3	15,2	23,6
ACTH ₁₋₂₄	13,6	13,0	15,4	26,0
Leu-enkefalin	14,8	16,6	18,0	34,8
α-MSH	15,2	15,4	18,0	28,4
inzulin	12,6	19,0	23,6	40,4
ACTH ₁₋₃₉	18,5	20,6	25,4	35,4

Oszlop: Hypersil-ODS, 100 x 5 mm

Eluens: A: 0,1 M NaH₂PO₄-H₃PO₄, B: 1. táblázat

Gradiens: lineáris, 2%B/perc

HEARN és GREGO [91] C₁₈-as tölteten részletesen tanulmányozták oligo- és polipeptidek retenció viselkedését alacsony pH-nál foszfát puffer, víz, vizes metanol és vizes acetonitril eluenseket használva izokratikus, szakaszos és gradiens elúciók alkalmazásával. Lineáris acetonitril gradiensek jobb feloldást szolgáltatottak, mint az exponenciális gradiensek. Néhány peptid kapacitás tényezőjében (k') drámai változást lehet elérni viszonylag kis metanol- vagy acetonitril-koncentráció változtatással a mozgófázisban. Elsősorban hidrofób peptideknél lép fel ez a jelenség, ahol izokratikus körülmények között hatékony kromatográfia csak egy korlátozott organikus oldószerkoncentráció tartományban vitelezhető ki, ha az egyes peptidek k' -értékét egy ésszerű határon belül akarjuk tartani ($k' < 10$). Oldószertől függő szelektivitás változásokat lehet tapasztalni metanollal és acetonitrillel.

A széles körben használt μ Bondapak C₁₈ oszlop hatékonyságát erősen befolyásolják a mozgófázis összetételének változásai. Kis peptidek kromatografálásánál szélesebb csúcsokat kapunk, ha a viszkózusabb izopropanol-tartalmú eluenseket használunk MeOH vagy CH₃CN eluensek helyett [92]. Polipeptidek RP oszlopon történő

elválasztásában acetonitrilre a lineáris gradiens, metanolra és izopropanolra az enyhén konvex típus jelenti az optimális gradiens profilt. Adott puffertartalom esetén egy peptidre az elúciós oldószer sorrend a következő: 1-propanol > acetonitril > metanol. Nagy peptid fragmensek vagy erősen hidrofób peptidkeverékek optimálisan szeparálhatók propanoltartalmú eluensekkel. A propanolizomerek elnyelése a távoli UV tartományban viszonylag magas, de a nagy feloldóképesség (l. fenn), könnyű tisztítási lehetőségeik (desztilláció) és alacsony toxicitásuk vitathatatlaná teszik használatukat. Hidrofób peptideknél az izopropanol acetonitril helyett sokszor megnöveli a kromatográfia hatékonyságát [93]. Nagyon eltérő molekulatömegű peptidkomponensek esetén azt találták, hogy egy adott %-os oldószer-koncentráció változtatás nagyobb k' változást jelent nagyobb peptidekre, mint a kisebb molekulákra.

Tiszta vizes eluenssel kis tömegű, relatíve poláros biomolekulák gyakran elválaszthatók oktadecil-szilikán [94]. Szerves eluenskapens távollétében az állófázis szénhidrogénlánc és a minta közötti kölcsönhatás okozza a retenciót: a kromatográfias folyamatot a hidrofób (szolvofób) hatás irányítja. Kétkomponensű vizes-organikus eluenseknél a minta $\log k'$ értéke lineáris összefüggést mutat az eluens összetételével. A peptidek azonban nem mindig a szolvofób hatás alapján várt szabályos viselkedést mutatják. BIJ például Boc-védett hidrofób peptidetilészterek retencióját tanulmányozva (G_7 -glycophorin fragmens: Val-Met-Ala-Gly-Val-Ile-Gly; Boc- G_7 , védett, NH_2 - G_7 a szabad N -terminálisú peptid, Supelcosil LC-8 oktil-dimetil-szilika oszlop, eluens: vizes metanol vagy acetonitril tartalmú foszfát puffer (pH 2,25)) azt találta, hogy NH_2 - G_7 esetén a $\log k'$ — eluens-összetétel függvénygörbe minimumot mutat viszonylag alacsony vízkoncentrációnál [95]. A Boc- G_7 minta ezzel szemben lineáris függést mutatott. Az adatok (a minimum megjelenése) arra utalnak, hogy a szabad peptid kettős retenciós mechanizmus szerint retardálódott: a szolvofób hatáson kívül szilanofil kölcsönhatás is fellépett a szabad NH_2 -csoporttal [94].

Hasonló eredményeket kapott HEARN és GREGO is [92], akik azt találták, hogy a széles tartományú szerves komponens arányon túl védőcsoport nélküli peptidek nem lineáris $\log k'$ összefüggést mutatnak μ Bondapak C_{18} tölteten: minimum görbe jelent meg. Növekvő vízkoncentrációval a felületi szilanols csoportokat "maszkírozni" lehet, s ez legyengíti a szilanofil kölcsönhatásokat úgy, hogy a peptidek megfigyelt viselkedése szabályossá válik. Másrészt viszont a kémi-

ailag kötött fázisok felületi szilanolcsoportjai lényegesen lehetnek megfelelő szelektivitás elérésében is. A vizes eluensekkel szilikán, ill. alkilszilikán (C_8 és C_{18}) nyert retenciós adatok hasonlósága azt mutatja, hogy a mozgó- és állófázis relatív polaritása a döntő tényező a különböző kromatográfiás rendszerek osztályozásában.

Az oldószerek eluáló erősségét jól mutatja RP-tölteten való viselkedésük (12. táblázat).

12. táblázat

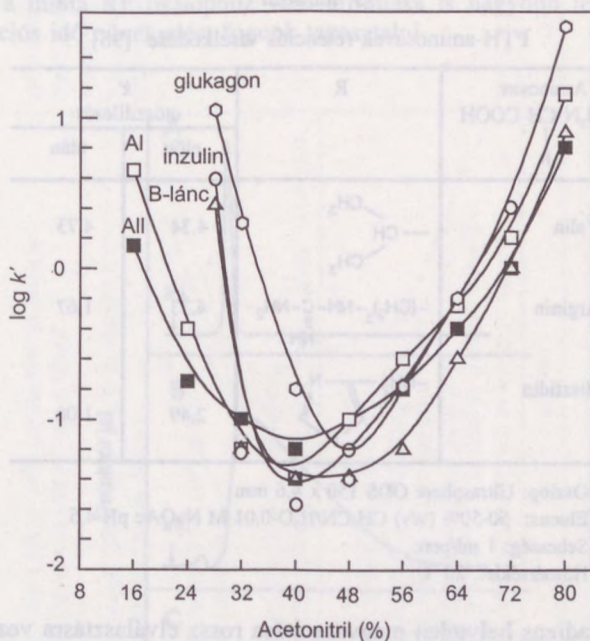
Oldószerek retenciója C_{18} tölteten
(eluens: H_2O) [85]

Oldószer	t_R (perc)
MeOH	1,0
EtOH	3,1
CH_3CN	3,1
izopropanol	8,3
aceton	8,8
<i>n</i> -propanol	10,1
dioxán	11,7

A peptid RP-HPLC legnagyobb problémája, ha *szilanofil* kölcsönhatás is fellép a kromatográfiás folyamatban és a peptid anomális viselkedést mutat [96]. Ez abban mutatkozik meg, hogy a $\log k'$ érték a szerves oldószer koncentrációjának növelésével csak egy kritikus értékig csökken, azután ismét emelkedik [85] (9. ábra). Mivel a görbe alakja peptidenként változik és meredeksége a peptid nagyságával nő, optimális elúciót csak egy nagyon keskeny szerves oldószerkoncentráció-tartományban lehet elérni, az ún. elúciós ablak szűk.

(Poli)peptidek HPLC-jében a szerves oldószer koncentrációjának kismérvű megváltoztatásával drámai különbségek mutatkozhatnak a retenciós viselkedésben. Ez a tény magyarázatot ad arra is, hogy, gradiens elúcióval peptideknél rendszerint jobb eredményeket lehet elérni, mint izokratikusan és a komponensek viszonylag éles csúcsokban jelentkeznek. Ugyanakkor azt is figyelembe kell venni, hogy a szerves oldószer mennyisége befolyásolja a peptidek oldékonyságát és konformációját is.

A konformációs változás a peptid-töltet kölcsönhatást befolyásolhatja. ZHOU [96] kimutatta, hogy egy helikális peptidben a a retenciós idő alakulása szempontjából a hidrofób részek elhelyezkedése a fontos.



9. ábra. Proteinek kapacitási tényező értékeinek "anomális" változása, az eluens acetonitril- koncentrációjának függvényében [85]

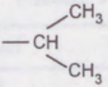
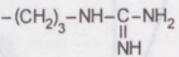
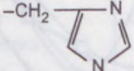
Oszlop: μ Bondapak C18
 Eluens: acetonitril-vizes puffer (pH 2,95)
 Komponensek: AI: angiotenzin I, AII: angiotenzin II,
 inzulin B-lánc, glukagon.

A szabad szilanolcsoportok következtében fellépő szilanofil kölcsönhatás [97] különösen bázikus aminosavszármazékok és bázikus peptidek esetén erős [98], és tulajdonképpen szekunder retenciós hatásként lép fel: ioncsere és H-híd kötés révén csúcshúzódást ("tailing"), adszorpciót okozhat [99-106]. A PTH-aminosavak retenciós viselkedése is jól mutatja, hogy a szilika dezaktiválása (a

szabad szilanolcsoportok megszüntetése, "endcapping") Arg esetén milyen retenciós idő csökkenést jelent, míg semleges aminosavaknál nincs változás a kétféle tölteten [98] (13. táblázat).

13. táblázat

PTH-aminosavak retenciós viselkedése [98]

Aminosav H ₂ N-CH-COOH R	R	k' utószililezés	
		előtt	után
Valin		4,34	4,73
Arginin		4,33	1,67
Hisztidin		2,49	1,08

Oszlop: Ultrasphere ODS 150 x 4,6 mm

Eluens: 50-50% (v/v) CH₃CN/H₂O-0,01 M NaOAc pH 4,5

Sebesség: 1 ml/perc

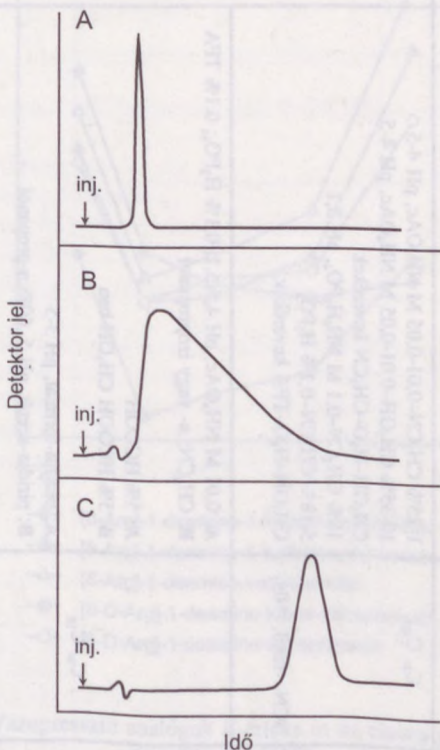
Hőmérséklet: 20 °C

A gradiens helytelen megválasztása rossz elválasztásra vezethet. Tanácsos enyhe, lineáris gradienseket használni (1%/perc alatti sebességgel) és kerülni kell a magas szerves oldószer-koncentrációkat.

4.3.3.2. pH szerepe, ionvisszaszorítás

A peptidkromatográfiában az oldószer-kiválasztásnál kedvező feltételeket kell találni kis peptidok jó retenciójára és a nagy peptidok eluálhatóságára is. A peptidok amfoter természete miatt a kromatográfus előnyösen használhatja az ion-visszaszorításos és az ionpárkromatográfiát is. Kis peptidok, aminosavak, ill. származékaik ionizációjának mértéke a mozgófázis pH-jának megfelelő változtatásával

csökkenthető, s ezen keresztül a retenció növelhető. Például, alacsony pH-nál (4-4,5) a terminális COOH-csoportok disszociációja visszaszorul, így egyrészt a csúcsstorzulás, másrészt pedig a minta poláros jellege csökken. Ez hidrofobicitás-növekedést jelent, ami által a minta RP oszlophoz való affinitása is nagyobb lesz, tehát retenciós idő növekedést fogunk tapasztalni.



10. ábra. A pH hatása peptidsavak csúcsalakjára

„A”: teljesen disszociált formának megfelelő pH-jú eluens,

„B”: közbülső pH-jú eluens,

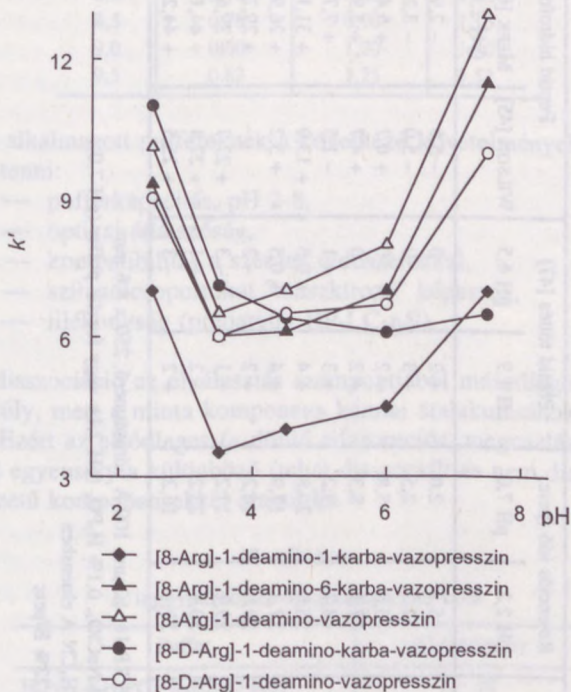
„C”: disszociálatlan formának megfelelő pH-jú eluens

14. táblázat

Peptidek HPLC-jében leggyakrabban alkalmazott kromatográfias rendszerek

Mód	Oszlop	Eluens	Detektálás
Izokratikus	C ₈ , C ₁₈ -CN, -fenil, -NH ₂	1-25% CH ₃ CN-0,01-0,05 M NH ₄ OAc, pH 4-5 10-35% CH ₃ OH-0,01-0,05 M NH ₄ OAc, pH 4-5 CH ₃ OH-H ₂ O-CH ₃ CN keverékek 18% CH ₃ CN-0,1 M NH ₄ H ₂ PO ₄ , pH 3,1 5-18% CH ₃ CN-0,1% H ₃ PO ₄ CH ₃ OH-H ₂ O-TFA keverékek	205-280 nm (UV)
Gradiens	C ₈ , C ₁₈	A: 0,01 M NH ₄ OAc, pH 4,5-6,1; 0,1% H ₃ PO ₄ ; 0,1% TFA B: CH ₃ CN; <i>n</i> - vagy izopropanol A: 5% HCOOH B: 5% HCOOH CH ₃ OH-ban A: piridin-formiát, pH 3-5 B: piridin-acetát, pH 5, 60% <i>n</i> -propanol A: 0,01-0,1 M NaClO ₄ , 0,1% H ₃ PO ₄ B: 60% CH ₃ CN, vagy izopropanol A eluensben	fluoreszkaminos, vagy <i>o</i> -ftálaldehides származékképzés 200-220 nm, vagy fluoreszcencia

A pH-nak lényeges szerepe van kritikus elválásokban. A szintetikus Arg-Lys-Asp immunstimuláló peptid fő szennyező komponenseként jelen levő Arg-Lys-D-Asp meghatározása folyamán HERÉNYI és GÖRÖG [107, 108] C₁₈ oszlopon azt találta, hogy a diasztereomerek szeparálásában fontos tényező a pH.



11. ábra. Vasopresszin analógok k' -értéke és az eluens pH közötti összefüggés [852]

Oszlop: Separon S1-C₁₈, 250 x 4 mm
 Eluens: 0,05 M foszfát puffer-MeOH (60:40 v/v)
 Sebesség: 1,5 ml/perc

15. táblázat

A mozgófázis pH-jának hatása a peptid retencióra*

Peptid szekvencia	Retenció idő (perc)		Peptid töltés [47]		Peptid hidrofobicitás**		
	pH 2,2	pH 7,0	pH 1,9	pH 6,5	WILSON [45]	MEEK [66] (pH 2,1)	MEEK [65] (pH 7,4)
ETK	5,1	2,0	+ 2	0	- 5,8	- 2,9	- 14,1
SADDVKK	12,2	2,5	+ 3	0	- 5,0	- 3,2	- 11,8
LSAK	13,8	5,8	+ 2	0	+ 0,7	+ 5,4	+ 2,4
GFSSDAR	17,1	8,3	+ 2	0	+ 4,7	+ 5,9	+ 8,7
TLMAAGDKDGOGK	18,7	9,2	+ 3	- 1	- 1,5	+ 7,7	- 7,1
VFHILDKDK	26,0	20,8	+ 4	+ 0,5	+ 13,0	+ 31,1	+ 18,9
AIGAFTAADSFHDHKK	27,3	17,9	+ 4	+ 0,5	+ 5,2	+ 26,9	+ 26,5
Ac-SMTDLLSAEDIKK	29,0	16,2	+ 2	- 2	—	+ 29,2	+ 14,4
IGVEEFSTLVAES	29,7	17,2	+ 1	- 3	+ 27,7	+ 39,6	- 3,8
FFQMVGLK	30,5	22,2	+ 2	+ 1	+ 27,4	+ 44,1	+ 38,0
SGFIEEDELGSILK	31,1	16,2	+ 2	- 3	+ 25,5	+ 44,2	+ 2,2

* Oszlop: Lichrosorb RP-18, 10 µm, 100 Å pórusátmérő, 250 x 4,6 mm

Eluens: A: 0,01 M NaClO₄, 0,1% H₃PO₄ (pH 2,1), vagy foszfát puffer (pH 7,0);B: 60% CH₃CN A eluensben

Gradiens: lineáris, 2,22% B/perc

Sebesség: 1 ml/perc

Detektálás: UV, 220 nm

** Az aminosav oldallánccok hidrofobicitás értékeinek összegei, a jelzett táblázatokban közölt adatok alapján

16. táblázat

Peptidek retenciójának függése a pH-tól

pH	$k'_{\text{Arg-Lys-Asp}}$	$k'_{\text{Arg-Lys-D-Asp}}$	α
7,0	0,75	0,75	1,00
7,5	0,75	0,75	1,00
8,0	0,76	0,80	1,05
8,5	0,78	0,90	1,15
9,0	0,80	1,20	1,50
9,5	0,82	1,25	1,52

Az alkalmazott puffereknek a következő követelményeknek kell eleget tenni:

- pufferkapacitás, pH 2-8,
- optikai átlátszóság,
- kompatibilitás a szerves oldószerekkel,
- szilanolcsoportokat "maszkírozó" képesség,
- illékonyág (preparatív RP-LC-nél).

A disszociáció az elválasztás szempontjából másodlagos kémiai egyensúly, mert a minta komponens kémiai átalakulásához kapcsolódik. Ezért az elsődleges (a döntő adszorpció, megoszlási és ioncserés) egyensúly a különböző (tehát disszociált és nem disszociált) szerkezetű komponensekkel alakul ki.

17. táblázat

A leggyakrabban alkalmazott pufferek

Puffer	pH tartomány
$\text{H}_3\text{PO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$	2 – 12
AcOH–NaOAc	3 – 6
AcOH– NH_4OAc – NH_4OH	5 – 9
$\text{NH}_4\text{HCO}_3\text{-(NH}_4)_2\text{CO}_3\text{-NH}_4\text{OH}$	8 – 10
$\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3\text{-NaOH}$	9 – 11
$\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_3\text{BO}_3\text{-NaOH}$	7 – 11
Piridin–piridin–acetát–AcOH	3 – 6
TEA–foszfát	2 – 8
TEA–formiát	2 – 8
$\text{NH}_4\text{-formiát}$	7 – 8
TEA–karbonát–hidrokarbonát	8 – 10
TEA–trifluor–acetát	2 – 8

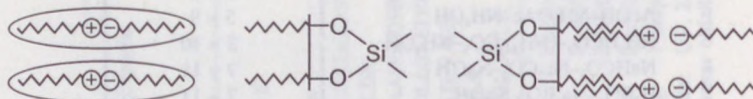
4.3.4. Ionpárképzés

A pH-beállításon keresztül történő ionvisszaszorításos megoldás mellett úgy is növelhetjük a retenciós időt, hogy szerves elleniont (pl. alkilszulfonát) adunk a mozgófázishoz, mely ionpárt képez a protonált N-terminálissal és a szabad $-NH_2$ oldalláncokkal. A neutrális ionpár nagyobb affinitást mutat az állófázishoz, azaz retenciós idő növekedést tapasztalunk. Elsősorban kicsi ($n < 5$), hidrofil tulajdonságú peptidek RP-HPLC-je esetén használatos ez a változat. Ellenkező esetben: nagyobb ($n > 5$), hidrofób tulajdonságú peptideknél más típusú (hidrofil) ionpárképzővel érhetünk kedvező hatást: azaz retenciós idő csökkentést. Az ionpár-kromatográfia ma már széles körben elterjedt technika lett (elsősorban az RP-IP), bár ma sincs egységes modell elméleti magyarázatára. Tény, hogy a minta komponensek retenciója a párképző reagens koncentrációján keresztül szabályozható.

ionos peptid + párképző reagens $\xrightarrow[\text{hidrofil}]{\text{hidrofób (ellenion)}}$ semleges ionpár

peptid minta polaritása $\left| \begin{array}{c} \text{csökken} \\ \text{nő} \end{array} \right.$, a retenció $\left| \begin{array}{c} \text{nagyobb} \\ \text{kisebb} \end{array} \right.$ lesz

Az RP-IPC-ben egyrészt a minta komponens az ellenionnal ionpárt képez a mozgófázisban, és ez a töltés nélküli ionpár oszlik meg az álló- és a mozgófázis között, másrészt az ellenion megkötődik a tölteten, ionos csoportja a felületre orientálódik, és így az oszlop ioncserélőként is működik:



A módszer kémiai kötött állófázisok révén (RP-IPC) ionos és nem ionizálható komponensek keverékének szétválasztására is alkalmazható, így szabad, részlegesen és teljesen védett peptidek esetén is használható (ami ioncserés kromatográfiánál nem valósítható meg).

HANCOCK úgy találta, hogy 10 μm -nél kisebb részecskeméretű RP állófázisokon ismert peptidek nagyon hosszú és nehezen reprodukálható retenciós időt mutatnak. Azt tapasztalta, hogy néhány reagenssel, pl. foszforsavval, meg lehet "javítani" az eluent: jelentős javulás állt be retencióban és reprodukálhatóságban is [109]. A H_3PO_4 -nak tehát kettős hatása van, egyrészt a pH-t (és ezen keresztül a csúcsalakot), másrészt az ionos peptidek egyensúlyát befolyásolja. $\alpha\text{-NH}_2$ - és oldallánc *N*-védett peptidek, (melyek csak a C-terminális -COOH-t tartalmazzák ionizálható csoportonként) tanulmányozása vezette HANCOCK-ot arra a felismerésre, hogy a peptid R-NH_3^+ kationból és H_2PO_4^- hidrofil anionból létrejövő ionpár a felelős a peptidminta polaritásnövekedéséért, és így a retenciós idő csökkenéséért. Amíg a hidrofil ionpárképzők csökkentik a peptidek kapacitás tényezőjét (k'), addig hidrofób ionpárképzők megnövelik azt [110]. Részletes elemző vizsgálatai során megállapította, hogy kis peptidek analízisekor rövid láncú ($\text{C}_1\text{-C}_2$) alkil-ammónium agensek növelik a peptid retencióját, míg hosszabb alkil-láncok (C_4) csökkentik azt. Ez azzal a ténnyel magyarázható, hogy egy valódi ionpár-mechanizmus (rövid C-láncú ionpárképző esete) és a dinamikus ioncsere (hosszabb C-láncú ionpárképzőnél) is kialakul az állófázissal való kölcsönhatás során [111, 112]. WILSON 2-65 tagszámú tartományban kromatografált peptideket alacsony pH-nál foszfát-acetonitril, ill. foszfát-izopropanol rendszerekben [113]. Ha NaClO_4 -ot adunk a foszfát pufferekhez, jelentősen megjavul a hidrofób peptidek kromatográfiás viselkedése, ahogy ezt MEEK és ROSETTI közölte [66, 114, 115]. A ClO_4^- , kaotróp ion lévén, segíti elő a minta kedvezőbb kölcsönhatását vizes eluenssel [116].

NH_4OAc és formiát pufferek liofilezéssel könnyen eltávolíthatók (a preparatív HPLC-nél fontos szempont [117]).

Trietil-ammónium-foszfát puffer használata esetén RIVIER nagy elválasztási hatékonyságot talált alacsony pH értékeknél (pH 2,5 - 3,5) [118]. Ebben a tartományban a peptidek savas funkciós csoportjai disszociálatlan állapotban vannak, a bázisos csoportok protonáltak, a savas közeg ugyanakkor a szabad szilanolcsoportok kedvezőtlen hatását is kivédi. A jelzett pH-tartomány még megfelel az RP oszlopok használhatósági tartományának (fenti esetben egy oszlop több mint 1000 futtatás után is jó feloldást mutatott, adott peptid tesztkeverék esetén). A nevezett puffer hátránya, hogy nem illékony. Trietil-ammónium-formiátra áttérve a kedvező hatás megmarad, az illékonyság elősegíti a preparatív célú felhasználást is, viszont

LOFFET tapasztalatai alapján a formiát pufferek esetén nemkívánatos mellékreakcióként a szabad NH_2 -csoportok formileződése léphet fel [119]. Nagyobb tagszámú neuropeptidek esetén BENNETT, DUNLOP és munkatársaik a trifluor-ecetsavat részesítették előnyben nemcsak az illető anyagok (β -endorfin és rokon vegyületei) RP-HPLC-jében, hanem extrakciós kinyerésében is [120, 121]. A szilárdfázisú extrakciót is ők vezették be a C_{18} -szilika "minioszlop" ("cartridge") kifejlesztésével, melyből aztán napjainkban a mintaelőkészítő oszlopok egész családja alakult ki [120, 122-124].

18. táblázat

Ionpároképző reagensek

	Pároképző reagens	Ellenion	Minta
Anionos	alkil-szulfonátok (metán, pentán, hexán, heptán szulfonátok)	$\text{R-SO}_2\text{O}^-$	aminosavak, bázikus peptidek
	kámforszulfonsavak	$\text{R-SO}_2\text{O}^-$	aminosavak
	perklórsav	ClO_4^-	aminosavak, bázikus peptidek
	trifluorecetsav	CF_3COO^-	peptidek
	perfluorsavak	$\text{R(F}_n\text{)-COO}^-$	peptidek
	foszforsav	$\text{H}_2\text{PO}_4^-, \text{HPO}_4^{2-},$ PO_4^{3-}	hidrofób peptidek aminosavak,
Kationos	alkilszulfátok, SDS sósav	R-OSO_2^- Cl^-	bázikus peptidek peptidek
	kvaterner ammóniumsók (tetrabutil-ammóniumsók)	Bu_4N^+	savas peptidek, aminosavak
	trioktilmetil-ammóniumsók) cetrimid	$\text{Oct}_3\text{N}^+\text{Me}$ $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}^+\text{Me}_3$	hidrofil peptidek hidrofil peptidek

Perfluor-alkilkarbonsav ionpároképzők hatását peptidek kapacitás faktorára SCHAPER vizsgálta részletesen a szekretin sorban [125-127]. Az ellenion láncosságának növekedésével nőtt a peptidek retenciója. Ez a hatás hexapeptidek esetén jóval nagyobb volt, mint pl. a teljes, 27 tagú szintetizált peptidnél. Az ionpároképző koncent-

rációjának növelése növelte a peptidek retencióját, de a szelektivitásra csak enyhe befolyással volt. Amikor TFA, pentafluor-propionsav (PFPA), heptafluor-vaajsav (HFBA) és undekafluor-kapronsav (UFCA)-t használtak hidrofób ellenionként egy 12 peptidből, ill. proteinből álló keverék RP-HPLC-je esetén, alapos különbségeket észleltek a retenciós időkben. A nyolc pozitív töltést hordozó ACTH₁₋₁₈ analóg trifluor-ecetsavban mutatta a legrövidebb retenciós időt; PFPA négyszeres, HFBA ötszörös, UFCA hétszeres időnövekedést mutatott [129].

Az ionpároképző reagens számára hozzáférhető pozitív töltések számától függően változott a peptidek elúciós helyzete. A trifluor-ecetsav hisztidin tartalmú peptidek esetén is viszonylagos hidrofobicitás, és így retenciós idő növelő faktor [130]. Hozzá hasonlóan viselkedik az 1-heptán-szulfonsav is, pl. TRH kromatográfiás analízise során a hisztidin imidazol nitrogénje és a szulfonsavcsoport ionpárja kiváló elválást biztosít [131]. RAGNARSSON és csoportja erősen hidrofil, bázisos peptidek RP-HPLC-jét oldotta meg szulfonsavak segítségével [132-135].

Számos bázisos timopoetin fragmens (TP4, TP5, Arg-Lys-Asp stb.) nem retardálódik C₁₈ oszlopon ($t_R = t_0$). Tapasztalataink szerint nátrium-dodecil-szulfát ionpároképző alkalmazásával és az eluens szerves oldószer tartalmának ("organic modifier") változtatásával széles skálán változtatható retenciót érhetünk el [136].

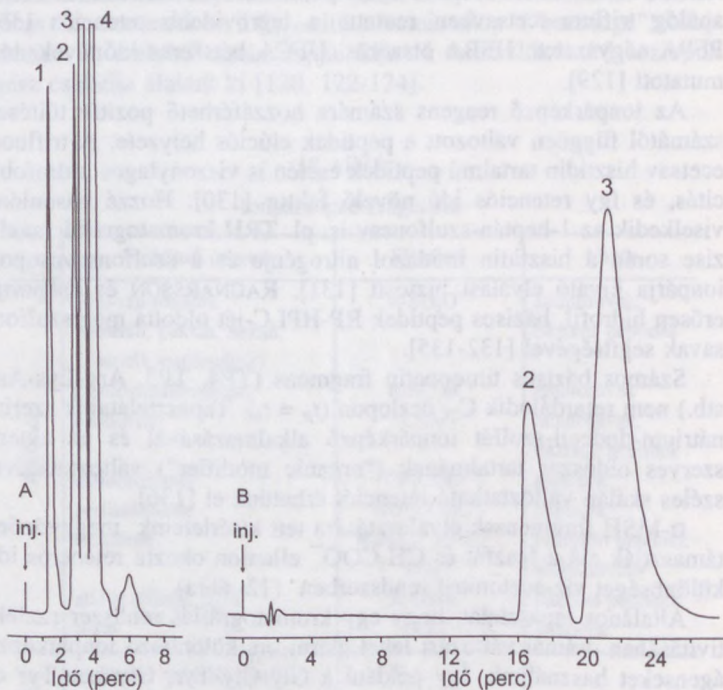
α -MSH fragmensek elválasztására tett kísérleteink meggyőzően támasztják alá a foszfát és CH₃COO⁻ ellenion okozta retenciós idő különbséget víz-acetonitril rendszerben (12. ábra).

Általános tapasztalat, hogy egy kromatográfiás rendszer szelektivitásában drámai változást lehet elérni, ha különböző ionpároképző ágenseket használunk. Így például a Gly-Gly-Tyr, Gly-Leu-Tyr és Arg-Phe-Ala peptid elúciós sorrend megfordítható, ha az eluensben a foszforsavat Na-dodecil-szulfáttal helyettesítjük [137].

Az ionpároképző megváltoztatása pl. 6 mM HCl-ről 0,1% TFA-ra váltásnál megváltoztatja a szelektivitást. Az elvárásnak megfelelően a peptidek kisebb retenciót mutatnak a HCl-t tartalmazó eluensekben, s a hatás több bázisos oldalláncot tartalmazó peptideknél erősebb.

IMOTO és YAMADA 0,1% sósavat tartalmazó eluens rendszerekkel dolgoztak, melyet a foszfát ionpároképzővel szemben illékonyasága, a TFA-val szemben pedig UV átlátszósága miatt részesítették előnyben [138].

Peptid HPLC területén szerzett első tapasztalataink szerint a már említett (12. oldal) bacitracinszármazékok kromatográfiájában nagyobb mértékű csúcsélesedést lehetett elérni akkor, ha az eluensek 0,1% Na-lauril-szulfátot is tartalmaztak [139].



12. ábra. α -MSH fragmenseinek elválasztása foszfát (A) és trifluor-acetát (B) ionpárképzők jelenlétében

Oszlop: ODS-Hypersil (125 x 4,0 mm)
 Eluens: A: CH_3CN -puffer (pH 2,0), (10-90 v/v)
 B: CH_3CN - H_2O -TFA (10-90-1, v/v/v)
 Detektálás: 220 nm
 Komponensek: 1. 5 μg H-11-13- NH_2 2. 5 μg 5-7-OH
 3. 1,5 μg H-8-10-OH 4. 9 μg H-1-4-OH

SCHÖNESHÖFER és FENNER részletesen tanulmányozták a fordított fázisú rendszerek alkalmazhatósági feltételeit biológiailag jelentős peptidek szeparálásában, különös tekintettel az elválasztást követő immunológiai tesztekre [140]. Az elválasztásokhoz elsősorban NH_4 -formiát és TFA ionpárképzőt használtak. Úgy tűnik, hogy a megfelelő ionerősség feltétlenül szükséges tényező peptidek elválasztásában, a pH csak az amfoter aminosavak és peptidek polaritását befolyásoló faktor.

Az ellenionok retenciót befolyásoló legfontosabb tulajdonságának a töltéssűrűség látszik. Kisméretű, poláros ionok (pl. H_2PO_4^- , ClO_4^- , $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ stb.) csak csekély mértékű kölcsönhatásba kerülnek az állófázissal és hidrofil ionpárképző mechanizmus szerint hatnak a peptidek retenciójára. Közepes polaritású reagensek (pl. heptánszulfonsav, $(\text{C}_4\text{H}_9)\text{N}^+$ stb.) hidrofób ionpárt képezve növelik a peptidek retenció idejét [141].

Nagy szelektivitáskülönbségek megfelelő reagensek alkalmazásával érhetőek el (alkalmas alacsony pH-nál). Nem véletlen tehát, hogy ma már az ionpár-kromatográfia nagy népszerűségnek örvend. Ez természetesen a kémiai kötött állófázisok terén elért nagy fejlődésnek köszönhető. Ionos és nem ionizálható komponensek keveréke esetén is alkalmazható módszer áll így rendelkezésre, míg ioncserélő gyantákkal ilyen elválasztási feladatokat nem lehet megoldani.

4.3.5. Az RP-HPLC hatékonyságát befolyásoló tényezők

4.3.5.1. Átfolyási sebesség

Nagy elválasztási hatékonyság elérése céljából az eluens áramlási sebességét minden oszlopra optimálni kell. Molekulaméretben a TRH-től ($M_s = 362$) inzulinig ($M_s = 6000$) tíz peptidet Bio-Rad ODS oszlopon vizsgálva megállapították, hogy a hatékonyság a molekulatömeg és a sebesség emelkedésével rosszabbodott [66].

Izokratikus elúciónál nagy feloldáshoz 1 ml/perc vagy az alatti sebesség szükséges, kivéve a nagyon kis peptideket. A peptidek csúcshézaglásának fő oka a diffúzió, mivel az adszorpciót általában sók és savak adagolásával minimumra korlátozzák. A peptidméret tehát a diffúzió keresztül hat az oszlop hatékonyságára, ehhez még hozzá járhatnak adszorptív és más, nem ideális tényezők is. Gradi-

ens elúciónál a mozgófázis áramlási sebessége a feloldást viszonylag kismértékben befolyásolja, de lényegesen hat az érzékenységre, hiszen a nagyobb sebesség egyben nagyobb hígítást is jelent.

4.3.5.2. Hőmérséklet szerepe

Amíg gázkromatográfiában hőmérséklet programokkal biztosítják a nagyhatékonyságú elválasztásokat, a HPLC-ben az oldószerprogramok játsszák ezt a szerepet. Ennek ellenére nem szabad lebecsülni a hőmérséklet hatását, amit az alábbi összefüggés támaszt alá:

$$\log k' = \frac{\Delta H^\circ}{2,3RT} + \frac{\Delta S^\circ}{2,3RT} + \log \phi$$

ahol ϕ a fázisarány, ΔH° az entalpiaváltozás és ΔS° az entrópiaváltozás.

Gyakorlatilag 10 °C-os hőmérsékletemelés a van't Hoff-összefüggésnek megfelelően már lényegesen csökkenti a retenciót. A hőmérséklet emelésével a csúcshimmetria, az oszlop hatásossága, a diffúzió, és a kapacitás javul, az eluens viszkozitása viszont csökken. (Adott áramlási sebesség eléréséhez gyakran emelik az eluens hőmérsékletét (pl. víz-MeOH rendszerek 30%-os keverékénél a legnagyobb a viszkozitás).

Peptidterképek készítésénél kis triptikus peptidek és nagy, BrCN-es hasítással képződött fragmensek elválasztásánál azt tapasztalták, hogy a hőmérséklet emelésével csökken a retenciós idő, azonban a műtermékek (pl. felhasadt csúcsok) előfordulási valószínűsége megnő, s összességében a feloldás csökken [143].

Peptidminták oldékonyságának növekedése a jelzett mértékű hőmérséklet-változással jelentéktelen, így ezen keresztül nincs lényeges változás.

4.3.5.3. Gradiens elúció

Széles polaritás, ill. hidrofobicitás skálán mozgó, komplex peptidkeverékek szeparációja, pl. enzimes emésztés vizsgálata, preparatív izolálás, peptidterkép készítése ("peptide mapping") gyakran igényli izokratikus elúció helyett gradiens elúció alkalmazását. Gradiens

elúció esetén adott program szerint növeljük, ill. változtatjuk a szerves oldószer ("organic modifier") koncentrációját, lehetőleg széles tartományban. A gradiens elúciót izokratikus lépések sorozatával lehet modellezni. Ez azt jelenti, hogy a gradiens elválasztás kifejlesztéséhez jó előre tudni a módosító koncentrációjának hatását az egyes minta komponensekre. A koncentráció emelésével ugyanis a retenció (azaz a k' -érték) csökken, de csak az oldékonyság határáig. Ha egy adott peptidnél ezt elértük, a koncentráció további növelésére a k' ismét emelkedni fog. Ennek oka az, hogy az illető peptid oldékonysága az adott víz-szerves oldószer-összetételnél "leromlott". Ez a megállapítás minden oszlop és minden peptid esetében igaz. A fentiekből következtetni lehet a gradiens elúció feltételeire:

- a) Olyan koncentrációtartományt célszerű választani, melyben a peptidek 2-10 közötti k' -értékkel eluálódnak a méret, a szelvény, az állófázis és a puffer függvényében.
- b) Peptideknél a k' -módosító oldószer % görbe meredeksége kb. háromszor nagyobb, mint általában, ezért a peptidterkép éles csúcsokban jelenik meg a futtatás során.
- c) Különböző peptidekre a meredekség eltérő és a minimumhely is változik. Ebből következik, hogy peptidkeverék esetén nem biztos, hogy egy adott gradiensforma kedvező lesz valamilyeni komponens szép elválasztásához. Gyakorlatilag ez azt jelenti, hogy ismeretlen összetételű elegy esetén (pl. peptidterkép készítésénél) nehéz tervezni.
- d) A szelektivitás elvesztésének csökkentésére tanácsos lassú gradienst futtatni, továbbá általában kerülni kell a magas szerves oldószer-koncentrációt (60-80%). Ajánlatos egy másik módszerrel (elektroforézis, HPCZE) is tájékozódni a keverékben levő komponensek számáról.
- e) A csúskapacitás növelése érdekében sokszor célszerű egy gyors gradiensebbségről (5%/perc) lassú gradiensre (0,5%/perc) váltani. További tapasztalati tény, hogy a gradiensebbség csökkentése csökkenti az átlagos csúcsmagasságot, mely hatást minimálni lehet az áramlási sebesség csökkentésével.
- f) Kompromisszumot kell kötni a rövid analízis idő—maximális elválasztási hatékonyság követelményeket tekintve.

- g) A gyakorlatban leginkább CH_3CN gradienseket alkalmazunk. Etil-alkohol, propil-alkohol használata sok esetben nem előnyös [859].

$\mu\text{Bondapak C}_{18}$ oszlopon, polipeptid hormonok kromatográfiája során HEARN azt tapasztalta, hogy az áramlási sebesség csökkentése gradiens elúciót alkalmazva megnövelte az elválasztási hatékonyságot [144]. RIVIER tanulmányozta az áramlási sebesség hatását peptidok elválasztására úgy, hogy minden más paramétert változatlanul hagyott. $\mu\text{-Alkil-fenil}$ oszlopon a peptidok elúciós térfogata változatlan maradt, különböző mozgófázis sebességnél is. Minél kisebb volt a sebesség, annál könnyebben lehetett egy peptidkeveréket komponenseire bontani [142].

Gyakorlati szempontból további jelentőséget ad a gradiens elúciónak, hogy ismeretlen peptid vagy peptidkeverék futtatása lehetőséget ad az egyes komponensek izokratikus kromatografálási feltételeinek megtalálására, ill. visszaszámolására is [145].

4.3.5.4. Peptidvisszanyerés (hozam, "recovery")

Ma már az RP-HPLC a legelterjedtebb módszer peptidok kromatográfiájában. Hátrányos tulajdonságai közé tartozik azonban, hogy alkalmanként alacsony visszanyerési százalékot és irreverzibilis peptidadszorpciót tapasztalunk. E jelenség különösen fehérjék, ill. nagy molekulatömegű vagy hidrofób peptidok hidrofób állófázisokon történő kromatografálásakor lép fel (lásd a szabad szilanolcsoportok okozta problémákat: 1. 56 oldal). A jelenség tulajdonképpen negatív terhelési effektus (az ún. "loading effect"), mert csak kis peptid mennyiségek (1-30 μg injektálása) esetén jelentkezik (30% vagy kisebb visszanyerés is előfordult már!). Ez a viselkedés az állófázistól és az eluenstől is függ, s kvantitatív meghatározásoknál problémát okozhat [146].

Növelve a minta mennyiségét, elérhetjük a 100%-os visszanyerést is. A terhelés felső határa egyébként a feloldás mértékétől függ. Analitikai oszlopokat sokszor mg-os méretben is meg lehet terhelni: peptidok szemipreparatív HPLC-jére az analitikai RP oszlopok lehetőséget adnak [147].

Fenti szempontokra WEHR és mtsai [148] a ranatenzint (11 tagú peptid) vizsgálták C_{18} -as oszlopon úgy, hogy 100-szoros mérettar-

tományban változtatták az injektált anyag mennyiségét. Összehasonlításra MicroPak TSK 2000 SW gélszűrő oszlopot használtak, ahol adszorpció nem lép fel (a visszanyerés 100%), s a többi kromatográfiás feltétel azonos volt. 0,5 µg peptidből a C₁₈-as oszlopon csak 80%-ot tudtak mérni, sőt tovább csökkent az érték, ha még kevesebb peptidet injektáltak az oszlopra. Sokszor sikerült 10 mg peptidet vagy fehérjét a retenciós idők változtatása vagy a negatív terhelési hatás fellépése nélkül oszlopra vinni.

NICE [150] C₁-C₁₈ alkil-szilán tölteteken tanulmányozta a fehérje "recovery"-t. A rövid szénláncú oszlopok használatakor a polipeptidhozam megjavult. Hosszabb láncú töltetek esetén (beleértve a C₈-at is) sok anyagnál "szellem" csúcsok lépnek fel, melyek azonos feltételek mellett gradiens elúcióval csökkenthetők, C₃ tölteten pedig eltűnnek. Az ajánlott alkalmazhatósági sorrend C₃ > C₆ > C₈.

4.3.6. Általános következtetések

Annak ellenére, hogy az elmúlt tíz-tizenöt év alatt óriási fejlődésen ment keresztül a folyadékromatográfia, egy komplex peptidkeverék szétválasztása nem jelent rutinfeladatot. BÖHLEN és KLEEMAN [51] is alátámasztották, hogy teljes feloldást egyszeres RP-HPLC futtatásban nehéz elérni, különösen, ha például egy enzimátikus fehérje-emésztmény nagyszámú peptid-fragmens gyűjteményéről van szó. A gradiens elúció sem elégséges a kromatográfiásan hasonlóan viselkedő peptidok elválasztására. Optimális gradiens forma kiválasztása nem könnyű és időigényes feladat. Sokszor előnyösebb először lineáris gradienssel frakcionálni a keveréket, majd az elválasztott peptideket újra kromatografálni ("rechromatography"). Elterjedt módszer, hogy a részlegesen feloldott peptidzónákat izokratikusan, a szerves módosító oldószer koncentrációjának változtatásával, újrakromatografálva nyerjük az optimális elválasztást. Ha ez sem vezet eredményre, célszerű szelektivitást változtatni (RP-HPLC alapsorozaton belül). További lehetőség az egyre inkább elterjedő HPCE (nagyhatékonyságú kapilláris elektroforézis) technika használata. Ma már megkövetelhető, hogy egy mikroszekvenálásra kerülő ismeretlen vagy szintetizált peptid tisztaságát RP-HPLC és HPCE képe egyértelműen bizonyítsa.

4.3.6.1. Az RP-HPLC-re vonatkozó általános tapasztalatok

- Nagyobb hidrofobicitást mutató hosszabb ($C_n \leq 18$) láncú állófázisok peptidekre nagyobb retenciót és szelektivitást mutatnak, de hajlamosak irreverzibilis adszorpcióra, ami kisebb visszanyerést ("recovery") okoz.
- Általános az egyetértés abban, hogy a 15-nél kisebb aminosavtagszámú peptidek kromatográfiájára a C_{18} -as fázisú RP töltetek a leghasznosabbak.
- Rövidebb láncú állófázisok (C_8 , C_4 , alkilfenil, alkilnitril) hidrofób jellege kisebb, ezért kisebb retenciót és nagyobb peptidhozamot mutatnak. Ilyen oszlopokhoz az alkalmazott eluensben kevesebb organikus oldószer lehet. Ez olyan szempontból előnyös, hogy adott esetben a biológiai aktivitás csökkenése is kisebb lehet ezáltal (ami egyébként elfordul RP-HPLC-vel biológiailag aktív peptidek esetén) [154]. E téren az izopropanol előnyösebb, mint az acetonitril [154].
- Az alkil-fenil és alkil-nitril fázisok néhány esetben azonos szelektivitást mutatnak, amely az aromás és poláros kölcsönhatásokon alapszik. Használatuk különösen erősen hidrofób peptidek (sok apoláros oldalláncú aminosavat tartalmazó szekvenciák vagy védett peptidek) HPLC-je esetén ajánlott.
- Sóhatás: védett peptideknél a $\log k'$ lineárisan nő a sókoncentráció növelésével; ionos csoportokat (pl. szabad $-\text{COOH}$ vagy $-\text{NH}_2$) tartalmazó minták esetén bonyolultabb a kép [114, 115].
- Ionos komponensek esetén lényeges hatása van a pH-nak is: *N*-védett amino, ill. peptidsavak (szabad $-\text{COOH}$ csoporttal), ill. *C*-védett aminosavak ill. peptidek (szabad $-\text{NH}_2$ terminálissal) nem szimmetrikus csúcsokként jelennek meg a kromatogramon, ún. csúcs-"tailing"-et mutatnak, melyet az illető csoportok disszociációja okoz. Ezen megfelelő pH-érték kiválasztásával segíthetünk.
- A hőmérséklet $10\text{ }^\circ\text{C}$ -kal történő növelése 2-3-szoros faktoral csökkenti a retencióidőt.

4.3.6.2. Az RP-HPLC értékelése

Az RP-HPLC előnyei:

- a) egyszerű kezelhetőség,
- b) széles eluens spektrum,

- c) nagy hatékonyságú és szelektivitású nyomásstabil oszlopok,
- d) szerves oldószereknek és enyhe savaknak ellenálló töltetek,
- e) vizes eluensek, kompatibilisek biomolekulákkal is,
- f) gyors analízisidő, gyors ekvibrálás,
- g) másodlagos kémiai egyensúlyok felhasználása (ionizáció, ionpárképzés, ligand csere),
- h) detektálási lehetőségek a vizes eluens miatt kiterjedtek (elektrokémiai detektálás),
- i) kereskedelmi forgalomban sok RP-töltet kapható,
- j) fiziko-kémiai mérésekhez felhasználható (hidrofobicitás-mérés, ionizációs, komplex állandók mérése, QSAR-mérések stb.)

Az RP-HPLC korlátai:

- a) korlátozott pH-tartomány (pH 3-8),
- b) szabad szilanolsoportok jelenléte,
- c) a retenció "nem tiszta", nem egyértelmű,
- d) "kereskedelmi" oszlopok problémái,
- e) biológiai aktivitást néha csökkenti,
- f) recovery (visszanyerés) nem megfelelő, "loading effect" (terhelési) előfordul.

4.4. IONCSERÉS KROMATOGRÁFIA (HP-IEC)

A hetvenes évekig peptidek analízisében és tisztításában elsősorban a (Sephadex) géliszűrés és azt követő ioncserés kromatográfia állt az első helyen. Az RP-HPLC (főleg ionpár változata) fokozatosan kiszorította az ioncserét (bár ezen a területen indult a HPLC kialakulása!), és a megfelelő HP-IEC nemcsak az aminosavak, hanem a peptidek területén is szép eredményeket mutatott fel. A módszer ortogonalitása és az ioncserélő oszlopok nagy kapacitása (nagyobb, mint a fordított fázisú tölteteké) miatt azonban ma is hasznos eszköznek tekinthető peptidek tisztításában. Preparatív eljárásokban kisebb költségigénye ugyancsak előnyössé teszi. Polimer ioncserélő gyanták (melyek a modern aminosavanalizátorokból jól ismertek) is alkalmasak peptidek szeparálására. DIZDAROGLU szabad peptideket olyan Micropak AX-10 gyenge ioncserélő oszlopon szeparált, mely töltet a Lichrosorb Si-60 10 µm-es szilika kémiaiilag kötött állófázisú változata [155-157]. Eluensként trietil-ammónium-

acetát puffer és acetonitril elegyét használta szekvenenciaizomer dipeptidek, diasztereomer dipeptidek és homooligopeptid-sorozatok elválasztására. Savas aminosavakat tartalmazó peptideknél (melyek nem tartalmaznak kompenzálásra alkalmas bázikus aminosavakat) híg hangyasavoldatot (pH 2,6) alkalmazott. Sikerrel kromatografált nagyobb peptideket is (30 aminosav), beleértve a szomatosztatint, ribonukleáz S-peptidet, α -endorfint, glukagont és bradikinineket, angiotenzineket és neurotensin diasztereomereket is. Legnagyobb eredménye, hogy módszereivel, melyek érzékenységekben, csúcsszimmetriában, reprodukálhatóságban, oszlopélettartam, visszanyerés tekintetében is kiválótt nyújtanak, sokkomponensű peptidkeverékek és közel azonos szerkezetű peptidek is elválaszthatók [155-157]. Az általa használt eluenseket könnyű elkészíteni és lehetővé teszi a detektálást 200-220 nm-es UV tartományban is. A nyert minták liofilizálással egyszerűen izolálhatók. ANDREWS [855] szulfatált Leu-enkefalint SynChrom AX300 gyenge anioncserélő oszlopon pH 3,0-nál tisztított és számos esetben kombinálta az RP-HPLC-t HP-IC-vel. Kationcserélőként a poly-SULFOETHYL-Aspartamide-t részesítette előnyben szabad aminocsoportot tartalmazó peptideknél.

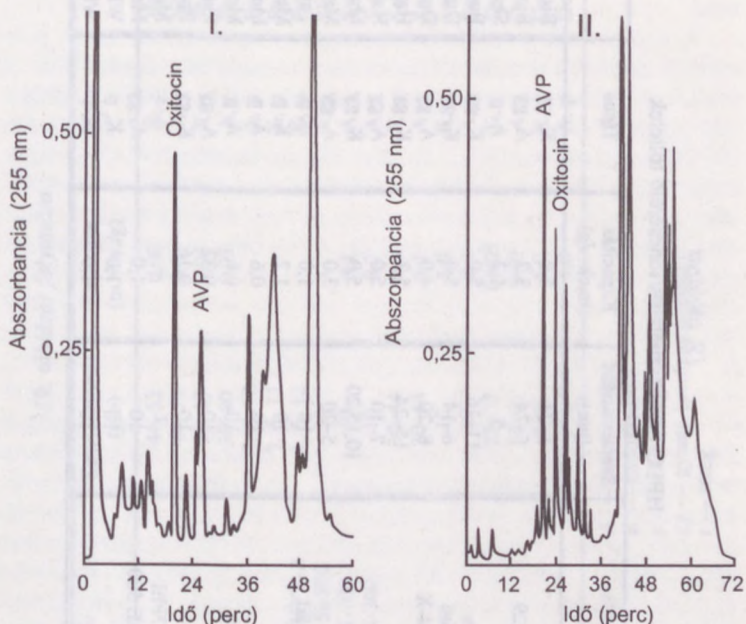
Fehérjék enzimatis lebonnással készült peptidtésképeinek elkészítésére szívesen használnak HP-IEC-t [855]. Ebben az esetben a nyert minták sóalanítását RP-HPLC-vel lehet elvégezni.

Peptidek nagyhatékonyságú ioncserés kromatográfiájának főbb jellemzői:

- töltetek mechanikai és kémiai stabilitása,
- gömb alakú (5-10 μm) szemcsék,
- magas ioncserélő kapacitás,
- változtatható pórusátmérő (100-500 Å),
- 95%-nál nagyobb visszanyerés,
- hidrofil jelleg,
- szilika alapúak (Toyo Soda, Synchron) vagy
- organikus polimerek (Pharmacia).

WELINDER és LINDE [158] az inzulin példáján hasonlította össze az RP-HPLC és a HP-IEC teljesítőképességét. Azt találták, hogy a kromatográfiás kép nagyon hasonló, de az ioncserés kép kevésbé csúcsgazdag a kisebb szennyeződésekkel illetően (proinzulin, inzulin-dimer, arginin-inzulin stb.), s a legnagyobb szennyezőcsúcs a dezamidoinzuliné. A monojódozott inzulinnál is azt tapasztalták, hogy a Mono Q ioncserélő oszlop csak a töltéskülönbség alapján szeparált.

A 13. ábrán jól látható az ioncserés és fordított fázisú vizsgálat különbözősége. Gyakran előfordul, hogy az RP-HPLC kép egy szimmetrikus csúcsa ioncserés kromatográfiában több csúcsra hasad fel és viszont.



13. ábra. HP-IEC és RP-HPLC összehasonlítása marha agyalapi mirigy savas extraktumának vizsgálatában

I. Oszlop:

SCX (4,6x200 mm), 5 μ m, 300 Å

Eluens:

A: 5 mM foszfát puffer (pH 3,0) -
25% CH₃CN

B: A + 1,0 M KCl

Gradiens: 0 → 18% B/60 perc

Sebesség: 0,7 ml/perc

II. Oszlop:

SynChrom RPC-8 (4,6x250 mm)

Eluens:

A: 0,1% TFA

B: 0,1% TFA CH₃CN-ben

Gradiens: 0 → 50% B/60 perc

Sebesség: 0,7 ml/perc

19. táblázat

HPLC-ben használatos ioncserélő töltetek

Név	Szemcseméret (μm)	Kapacitás (m.ekv./g)	Típus	Gyártó cég
Aminex A 4-a	5-24	5,0	K, gy	Bio Rad
Aminex A 14-A29	5-24	3,2	A, gy	Bio Rad
APS-Hypersil	5	1,2	A, p	Shandon
Beckman AA	11-16	5,0	K, gy	Beckman
Chromax DC-16-6	6-14	5,0	K, gy	Durrum
Chromax DA X4-X	8-20	4,0	A, gy	Durrum
Hamilton HP	15-24	5,2	K, gy	Hamilton
Hamilton HA	7-10	5,0	A, gy	Hamilton
Ionex SA	10,15,20	5,0	K, gy	Macherey-Nagel
Ionex SB	5-20	3,0	A, gy	Macherey-Nagel
IEX 545 PEAE Sil	10	1,0	A, p	Toyo Soda
Lichrosorb KAT	10	1,2	K, p	Merck
Lichrosorb AN	10	0,6	A, p	Merck
MicroPak AX-10	10	0,6	A, p	Merck
Mono Q	10	0,32	A, gy	Pharmacia
Mono S	10	0,16	K, gy	Pharmacia
Nucleosil 4000-7PEI	7	-	A, r	Macherey-Nagel
Nucleogen DEAE 500	10	1,0	A, gy	Macherey-Nagel
Partisil SCX-10	10	1,0	K, p	Whatman
Partisil 10 SAX	10	1,0	A, p	Whatman

19. táblázat folytatása

Név	Szemcseméret (μm)	Kapacitás (m.ekv./g)	Típus	Gyártó cég
Pellionex SCX	44-53	0,06	K, r	Whatman
Pellionex SAX	44-53	0,01	A, r	Whatman
Perisorb KAT	30-40	0,05	K, r	Pharmacia
Perisorb AN	30-40	0,03	A, r	Pharmacia
Poly WAX LP	3, 5, 12		A, p	Poly LC, Inc.
Poly CAT-A	3, 5, 12		K, p	Poly LC, Inc.
Poly SULFOETHYL-A	3, 5, 12		K, p	Poly LC, Inc.
SERVA DEAE Si-500	10		A, p	SERVA
SynChropak AX-100	10	0,1	A, r	SynChropak
SynChropak AX-300	10	0,1	A, r	SynChropak
Vydac 401 SA	30-44	0,1	K, r	Separations Group
Vydac 301 SB	30-44	0,1	A, r	Separations Group
Vydac TP Cation	10	1,0	K, p	Separations Group
Vydac TP Anion	10	1,0	A, p	Separations Group
Zipax SCX	25-37	0,005	K, r	Du Pont
Zipax SAC	25-37	0,01	A, r	Du Pont
Zorbax SCX	6-8	5,0	K, p	Du Pont
Zorbax SAX	6-8	1,0	A, p	Du Pont

Magyarázat:

A — anioncserező

K — kationcserező

p — szilika alapú ioncserező

gy — gyanta (porózus polimer)

r — réteg

A HP-IEC-ben enyhébb körülmények között (vizes oldatban, szerves módosító oldószerek nélkül) lehet kromatografálni, ami a biológiai aktivitás szempontjából fontos lehet. Sok esetben nagy sókoncentrációjú eluensekkel kell dolgozni, ami károsítólag hat a HPLC rendszer elemeire (pumpa, fém csatlakozások, oszlop, szűrő stb.).

A rozsdamentes acél helyettesítésére a feniléter-éter-keton polimerből (PEEK) készült alkatrészeket, oszlopokat vezettek be. A fentiek miatt terjedt el a gyakorlatban a Pharmacia cég által kidolgozott gyors peptid, fehérje és polinukleotid folyadékromatográfia (FPLC) módszer. Az FPLC az első biokompatibilis HPLC rendszer, napjainkban a biotechnológia HPLC-je. Emellett olyan rendszer, ahol nincs szükség nagynyomású pumpákra, hogy a kívánt, kiváló elválasztási hatékonyságokat elérjék. Az új töltet peptidterképek készítésére is kitűnően bevált [159].

4.5. KROMATOFÓKUSZÁLÁS

Az ioncserélők lehetőséget adnak arra is, hogy polipeptideket, fehérjéket izoelektromos pontjuk szerint szeparáljuk. A külső elektromos feszültség nélküli izoelektromos fókuszálást az ún. kromatofókuszálást SLUTERMAN és mtársai [160, 161] dolgozták ki. Az ioncserélőn, annak részvételével alakítottak ki pH gradienst, amit egyébként egy gradien képző segítségével két különböző pH-jú pufferoldat fokozatos keverésével tudunk előállítani és az oszlopra küldeni. A minták izoelektromos pontjuknak megfelelő sorrendben elúálódnak, ugyanakkor fókuszáló hatás is fellép, ami csúcsélesedésben, a minta koncentrációadásában és nagy feloldóképességben nyilvánul meg. Összességében a töltés alapján működő szeparálás egy nagyhatékonyságú (kromatográfiás) változata áll rendelkezésünkre. Az optimális hatékonysághoz lineáris pH gradiens szükséges, a pufferoldatnak és az ioncserélőnek széles pH-tartományban nagy pufferkapacitással kell rendelkeznie. A Pharmacia cég pufferrendszereket és ioncserélőket dolgozott ki erre a célra. A csúcshatár 0,04-0,05 pH egység és néhány száz milligramm fehérjekeverék kromatografálható egy lépésben. Ha az ioncserélőnél az eluens (az izoelektromos felhasználásnál jól ismert) hordozó amfolitokat tartalmaz, amfolitkiszorításos kromatográfiáról beszélünk, melyet először LAABECK és

ROBINSON [162] valósított meg. Az említett új módszerek elsősorban a fehérjekémikusoknak nyújtanak segítséget.

4.6. NAGYHATÉKONYSÁGÚ GÉLKROMATOGRÁFIA (HP-GPC)

Gélkromatográfiában a töltet ideális esetben kizárólag a komponensek oldatbeli molekulamérete alapján szeparál (size exclusion chromatography). A gélek olyan molekulaszűrőt jelentenek, ahol a csökkenő méret sorrendjében hagyják el a komponensek az oszlopot. PORATH és FLODIN [163] munkái alapján keresztkötéses dextránt vagy poliakrilamid gélt felhasználva fejlődött ki a Sephadex (ill. Sepharose) kromatográfia (GPC). A technika ma széles körben elterjedt hidrofíli (és hidrofób) makromolekulák (így elsősorban peptidek, fehérjék) analízisében, izolálásában és tisztításában. A kromatográfiához vizes eluensrendszereket, pufferoldatokat alkalmaznak, melyet szerves oldószer módosító komponensekkel kombinálhatnak. A Sephadex azonban mechanikailag nem stabil, ezért az eluens áramlási sebességét (s ezzel a nyomást) nem lehet tetszőlegesen emelni. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy a GPC időigényes. Az előrelépést, a HP-GPC kialakulását olyan töltetek kifejlesztése tette lehetővé, melyek nyomásállósága megfelelő, nagy feloldóképességgel bírnak, kis szemcseméretűek (5-7 μm -es is van már), szabályozott pórusmérettel, ill. megfelelő pórusméret-eloszlással rendelkeznek, és nem adszorbeálják a polipeptideket. Ezekben a kémiai módosított felületű (pl. diol, *N*-acetilpropilamin stb. csoportok), porózus szilika alapú tölteteken a komponensek elválasztása főleg molekulaméret alapján történik (melyet a pórusok hozzáférhetősége befolyásolhat), ha az ionos kölcsönhatásokat (ioncsere, ionkizárás) minimalizálni tudjuk, s ha a hidrofób kölcsönhatások elhanyagolhatók. A töltetek előállításánál arra is törekedtek, hogy a kisebb molekulatömegű (< 1000 D) tartományokban is jól működjenek. Globuláris fehérjéket (5000-500 000 D) különböző pórusátmérőjű TSK-GEL SW oszlopokon jól lehet szeparálni [164]. A TSK-G 2000 SW 30.000 D alatti, a 3000SW 30-500 000 D közötti, a 4000SW pedig 500 000 D feletti tartományban működik jó elválasztási hatékonysággal.

Kis peptidek molekulatömegét Bio-Sil TSK 20 és Biogel TSK 125 oszlopokon határozták meg [168]. A TSK 20 oszlop jó szeparálást mutat 1000-10000 D molekulatömegű peptidekre, és a log Ms

fordítottan arányos a retenciós idővel. Peptidek móltömege a 800 és 3500 D tartományban két TSK 125 oszlop kombinációjával jól meghatározható volt. SHIOYA [169] kb. 50 peptid (Ms 200-10000 D) kromatográfiáját tanulmányozta TSK-G 2000SW oszlopon. Az elúciós térfogatok (a kapacitás faktorok) oldószerenként változtak az egyes peptidekre, de mindegyik rendszerben a molekulatömegek sorrendjében eluálódott a peptidsorozat nagy része. Egy csoport peptid (Gly-Trp, angiotenzin I és II, inzulin A és B lánc, S-szulfonátok) adszorbeálódott a gyantához és a vártnál később eluálódott; egy másik csoport (melittin, mastoparan) viszont a vártnál sokkal gyorsabban tette ugyanezt. SHIOYA mindezekből azt a következtetést vonta le, hogy a peptidek molekulatömegének GPC-vel történő meghatározása nem túl meggyőző, ezért modell peptidek felhasználásával (melyek közel azonos móltömegűek, de különböző elúciós térfogattal rendelkeznek) részletesen tanulmányozták az áramlási sebesség és az elméleti tényérmagasság összefüggését [169]. Közel azonos molekulatömegű peptidekre az optimális HETP-hez tartozó eluens sebesség ugyanaz, annak ellenére, hogy a HETP értékek eltérőek az egyes peptidekre az elúciós mechanizmus különbözősége miatt. Az adszorbeálódó peptidek kisebb HETP értékkel és nagyobb elúciós idővel rendelkeznek. A log Ms és az optimális áramlási sebesség közötti összefüggés lineáris és inverz (mindegyik peptidre); s ez foszfát-fiziológiás sóoldat eluensben is igaz. A fentiek alapján meghatározott móltömegértékek jobban megfeleltek a valóságnak, mint a konvencionális meghatározások értékei.

Polipeptidek méret szerinti elválasztása csak az eluens pH-jának és ionerősségének megfelelő beállításával lehetséges. Nem illékony pufferekből aránylag magas koncentrációt lehet felhasználni az ionerősség növelésére, hogy minimálisra csökkentsük a pozitív töltésű minták és a negatív töltésű töltetfelszín ionos kölcsönhatásait. Ez ugyanakkor csökkenti a negatív töltésű fehérjék elektrosztatikus repulzióját a negatív felszínnel és az elméletileg becsült értéknél nagyobb elúciós térfogat jöhet így létre. Alacsony ionerősség általában gyenge feloldást és visszanyerést eredményez széles skálájú izoelektromos ponttal rendelkező vagy hidrofób karakterű fehérjék esetén.

RIVIER biológiailag kompatibilis, UV-átlátszó, lehetőleg illékony puffert keresett, amely jó rezolválást tesz lehetővé peptidek és fehérjék széles körében. A peptidek RP-HPLC-jében jól bevált trietilammónium-formiát (TEAF) és trietilammónium-foszfát (TEAP)

pufferek itt is megfelelőnek mutatkoztak [170]. Adott mennyiségű acetonitril jelenlétében ezek kompatibilisek voltak a PAC I-125 fehérjeelemző oszloppal.

TRH-től a globulinokig lineáris összefüggést kapott a log Ms és a retenciós idő között, izoelektromos ponttól függetlenül [170]. Nagyobb fehérjék szeparációjához kevesebb acetonitril-, míg kisebb peptidekhez magasabb acetonitril-koncentráció kedvező, továbbá alacsony pH-jú vizes puffer (pH 3) ajánlatos az elválasztásokhoz.

RIVIER szerint a fenti típusú molekulatömeg-meghatározás előnyei a nagy érzékenység, pontosság és gyorsaság [171].

Fehérjék GPC-s vizsgálataiban általában nem használunk denatúrálódtat előidéző oldószereket, hogy a fehérje "natív" konformációja megmaradjon (antigén és enzimatis sajátságaival együtt) [174]. Előfordul, hogy az oszlop feloldóképessége növelhető denatúráló szerrel, pl. Na-dodecil-szulfát (SDS) vagy guanidinhidroklorid használatával. Jelenlétük növeli az Ms-meghatározás pontosságát (5-7%), mert a konformáció egységesebb és a gélmátrixszal való kölcsönhatása minimális.

SCHNEIDER [175] és mtsai nagy nehézségekbe ütköztek tarantula pókból származó enzimes emésztéssel kapott peptidkeverékek kromatografálásánál, mert erős aggregációt tapasztaltak, kivéve, ha nagyon rövid oszlopot használtak. 8 M karbamidoldatot adtak az eluenshez a probléma megoldására.

A GPC a hidrodinamikus térfogat alapján szeparálja a molekulákat. Ezért az oszlopnak lehetőleg neutrálisnak kell lennie és jó, ha polaritása közel egyenlő a mozgófáziséval. Ha nem így van, akkor a különféle egyensúlyi folyamatok révén a méretelválasztáson kívül az oszlopnak is jelentős szerepe lesz a kromatográfiás folyamatban. Ezáltal a meghatározás hibája jelentősen megnő. KOPACIEWICZ és REGNIER [176] számos fehérjét kromatografált SynChrom GPC-100, TSK-G 2000 SW és TSK-G 3000 SW oszlopokon, alacsony ionerősségnél. A fehérje szelektíve adszorbeálódhatott, ion "kizáródhatott", vagy ideálisan méret "kizáródhatott" a mozgófázis pH-jának változtatásával az izoelektromos ponthoz (pI) képest. A hatások a fehérjék és a töltet szilanolcsoportjainak elektrosztatikus kölcsönhatásaival magyarázhatók.

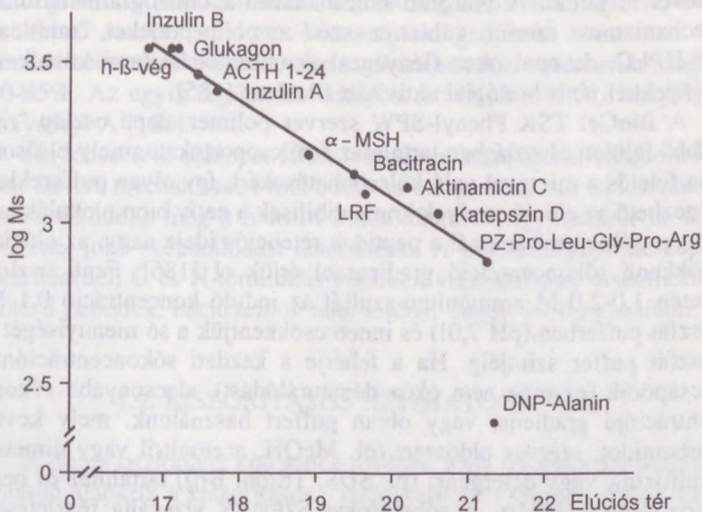
HANSEN [177] Hydrogel IV oszlopon (mely vizes oldószerekkel kompatibilis poláros organikus polimer), négy különböző peptidet vizsgált. A töltet 5000-40000 D tartományban működik jól, az alkalmazott peptideknek 40%-os acetonitrilben az oszlop oldószertérfoga-

tán belül kellett volna eluálódniuk. A víznél erősebb eluensben azonban 2 peptidnél fordított fázisú viselkedést tapasztaltak: a csúcszélesedés más tényezőkre is utalt, mint a molekulaméret. A legerősebben retardáló komponensek a bázikus tulajdonságú, nagy peptidok voltak.

Preparatív szempontból fontos, hogy a gélkromatográfia kitűnően használható védett peptidok tisztítására is [181, 182]. WÜNSCH peptid "bibliája" [13] hatalmas gyűjteményt tartalmaz erről a területről.

A Sephadex gélek (G-sorozat) nagyon hatékonyak bizonyultak széles M_s -tartományban peptidok kromatográfiájára általában vizes puffer eluensekkel. Ezek a rendszerek a védett peptid esetében oldékonysági problémák miatt rendszerint használhatatlanok. A fejlődést a Sephadex LH-20 (majd LH-60) gélöltet jelentette, mely a Sephadex G-25 hidroxipropilezett változata és dimetilformamidban, valamint más szerves oldószerben (alkohol, $CHCl_3$, etil-acetát, tetrahidrofurán, acetonitril stb.) is használható. Hidrofil és lipofil tulajdonságokkal is rendelkezik. Sokan az LH-60-al együtt "fordított fázisú" gélnak nevezik. 2500-3000 D kizárási határig alkalmazható peptidokra; nagyobb védett peptidokra a Sephadex G-50 és G-75 5% vizet tartalmazó hexametil-foszforsav-triamiddal, ill. a belőlük készült Sephadex LH-60-ban dimetilformamidos eluens rendszerekkel használható. GALPIN [181, 182] nagyon szép eredményeket ért el védett peptidok tisztításában (l. Megoszlási kromatográfia, 30. oldal): Enzacryl K_2 gél esetén dimetilformamidot és *N*-metil-pirrolidont használt 10000 D-ig szintetikus, védett peptidok tisztítására. Sokszor változó oszlophatékonytságot talált, különösen gyenge oldékonyságot mutató peptidok esetén. A Sephadex LH-60-nál (mely az LH-20 magasabb homológja) a DMF és *N*-metil-pirrolidon általánosan használható volt jó feloldással és viszonylag nagy áramlási sebesség mellett. A védett peptidok nagy többsége kielégítően kromatografálható ebben a rendszerben, de néhány esetben aggregáció előfordulhat. Az IVANOV-csoport is a HP gélkromatográfiát használta védett peptidok tisztításában [183].

Peptidok móltömegének meghatározására RICHTER [184] BioSil TSK 20 (hidroxilezett poliéterekkel módosított szilika) és BióGel TSK 125 oszlopokat használt. A TSK 20 1000 és 10000 D között 5% pontossággal, két kombinált TSK 125 oszlop 800 és 3500 D között adott jó meghatározásokat.



14. ábra. Peptidek Ms kalibrációs görbéje két kombinált TSK 125 használata esetén [184]

A "SynChropak GPC Peptide" egy új töltet peptidek gélkromatográfiájára, melyet kis peptidekre is (Ms 100-30000 D) használni lehet.

Peptid- és fehérjetartalmú anyagok vizsgálata során a mintákban lévő sókoncentráció sok esetben (biológiai minták, tömegspektrometriás analízis, ioncserés aminosavanalízis, szekvenálás stb.) gondot okoz. Sók eltávolítására legtöbbször gélkromatográfiát, ioncserés vagy fordított fázisú oszlopot ("cartridge") lehet használni.

4.7. HIDROFÓB KÖLCSÖNHATÁSI HPLC (HIC)

RP-HPLC használata esetén polipeptidek, fehérjék hidrofobicitásuk mértékének megfelelően szeparálódnak, a mátrix hidrofób csoportjai és a polipeptid apoláros oldalláncai közötti kölcsönhatás révén. A töltet nagy felületi hidrofobicitása miatt erős a kölcsönhatás, ezért az elúcióhoz szerves oldószerek szükségesek, melyek konformációváltozást okoznak a mintában (pl. enzim "unfolding", denatu-

rálódás stb.), ami biológiai aktivitás csökkenéssel vagy teljes elvesztésével is járhat. A hidrofób kölcsönhatási kromatográfia hasonló mechanizmus szerint választja szét a polipeptideket, mint az RP-HPLC, de nem okoz (lényeges) denaturálódást (ami következményekkel jár a biológiai aktivitást illetően) [185].

A BioGel TSK Phenyl-SPW szerves polimer alapú oszlop "ritkább" felületi eloszlásban tartalmaz fenilcsoportokat, amely elsősorban felelős a mintával való kölcsönhatásokért, így olyan pufferekkel végezhető az elúció, melyek kompatibilisak a natív biomolekulákkal. Magas sókoncentrációnál a peptidek retenciós ideje nagy, az elúciót csökkenő sókoncentráció gradienssel érjük el [186]. Fenti oszlop esetén 1,0-2,0 M ammónium-szulfát az induló koncentráció 0,1 M foszfát pufferben (pH 7,0!) és innen csökkentjük a só mennyiségét a foszfát puffer szintjéig. Ha a fehérje a kezdeti sókoncentrációnál kicsapódik (ez még nem okoz denaturálódást), alacsonyabb sókoncentrációjú gradienst vagy olyan puffert használunk, mely kevés karbamidot, szerves oldószert (pl. MeOH, acetonitril vagy dimetil-szulfoxid), vagy detergenst (pl. SDS, Triton, Brij) tartalmaz és nem okoz denaturálódást. A sóhatásokat SZEPESY vizsgálta részletesen [853].

Ezen röviden jellemzett módszer alkalmazásakor az állófázis gyengébb kölcsönhatásba lép az elválasztandó polipeptidekkel, így azok biológiai aktivitása kevésbé károsodik az elválasztás során. A hidrofób kölcsönhatási kromatográfiának nagy jelentősége van az érzékeny biológiai minták (enzimek, fehérjék) HPLC-s tisztításában [185].

4.8. HIDROFIL KÖLCSÖNHATÁSI HPLC (HILIC)

Hidrofil, neutrális töltetű kromatográfiás oszlopokon hidrofób (azaz sok organikus oldószert tartalmazó) eluenssel dolgozva ALPERT [187] azt tapasztalta, hogy a mintakomponensek hidrofobicitásával a retenciós idő növekszik. A normál fázisú kromatográfia ezen változata aminosavak, peptidek, fehérjék, oligonukleotidok és szénhidrátok esetén akkor használatos a gyakorlatban, amikor az RP-HPLC csődöt mond. Egyébként a nyert elúciós sorrend éppen fordítottja az RP-HPLC-ben vártaknak. Asn, Ser peptidek, valamint foszforilezett aminosavak és peptidek, továbbá bázikus peptidek

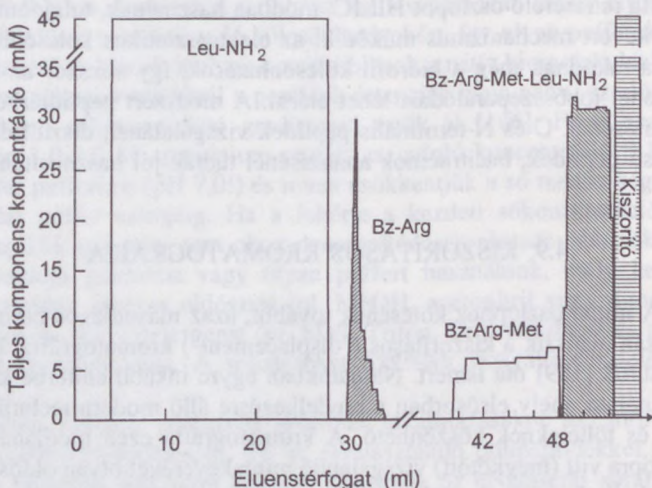
esetén alkalmazták már. Gradiens elúció esetén növekvő sókoncentráció gradienst (K-metil-foszfát, NaClO_4 , trietil-amin-foszfát) vagy csökkenő szerves oldószer koncentráció gradienst használnak. A kezdeti acetonitril- vagy izopropanolkoncentráció rendszerint magas: 70-85%. Az egyik legújabban kifejlesztett HILIC-töltet a PolyHydroxyethyl A [188].

Ha ioncserélő oszlopot HILIC módban használnak, tulajdonképpen kevert mechanizmus működik: az elektrosztatikus kölcsönhatásokra rakódnak még a hidrofil kölcsönhatások, így sokszor az ioncserénél jobb szeparálódást lehet elérni. A módszert peptid térképek készítésénél, C és N-terminális peptidok vizsgálatánál, diszulfidhíd-kötésű peptidok, bacitracinok analízisének tudták jól hasznosítani.

4.9. KISZORÍTÁSOS KROMATOGRÁFIA

A minta oszlophoz kötésének további, azaz másodlagos befolyásolásán alapszik a kiszorítós ("displacement") kromatográfia. Elve TISELIUS [189] óta ismert. Napjainkban egyre inkább előtérbe kerül használata, mely elsősorban a rendelkezésre álló modern technikáknak és tölteteknek köszönhető. A kromatográfia ezen módjánál az oszlopra vitt (megkötött) vizsgálandó mintakeveréket olyan oldószerrel eluáljuk az oszlopról, mely az összes szétválasztandó komponensnél jobban kötődő anyagot ("kiszorító" vagy "előhívó", "displacer") tartalmaz. A kiszorító anyag maga előtt tolja a komponenseket. Ha az oszlop elég hosszú, az elmozdult komponensek zónákba rendeződnek. Az egyes zónák a tiszta komponenseknek felelnek meg. A komponensek sorrendje az egyes komponensek állófázishoz való affinitásától függ. A legkisebb affinitású komponens halad legerősebb, minél nagyobb a komponensek affinitása, annál hátrább helyezkednek el. Ennek a zónasorozatnak legutolsó tagja a kiszorító anyag. Töltéssel rendelkező kiszorító anyag használata (pl. benzil-dimetilhexadecil-ammónium-klorid előnyös, mert az eluens pH-jának változtatásával lemosható az oszlopról. Töltéssel rendelkező minta, pl. peptid esetén a "displacer" kölcsönhatásba léphet a komponenssel, ezért ilyenkor semleges molekulát (pl. 2-(2-butoxi-etoxi)-etanol) használnak segédanyagként, vagy a pH megválasztásával zárják ki a kölcsönhatást: bázikus peptidból savas pH-nál a fenti kvaterner só megfelelő kiszorító lehet.

CRAMER és HORVÁTH [190-195] peptidek preparatív tisztítására használták az RP-HPLC-t kizorítós módszerrel. A technika számos biomolekula, többek között fehérjék tisztításában is sikeres alkalmazásra talált [196-198]. Peptidszintézisnél "tandem" használják karboxipeptidáz-Y-reaktorral [199].



15. ábra. Bz-Arg-Met-LeuNH₂ nyerstermék tisztítása kizorítós kromatográfiával [190]

Minta: Bz-Arg-Met-Leu-NH₂ 5,0 mM, Bz-Arg-Met 0,9 mM,
Bz-Arg 0,2 mM, Leu-NH₂ 4,5 mM (22 ml)
Oszlop: 250 x 4,6 mm, 5 μm, Zorbax C-18
Hordozó: 0,1 M foszforsav pH 2,2
Kizorító: 40 mM decil-trimetil-ammónium-bromid 15% MeOH –
0,1 M foszforsav (pH 2,2) keverékében
Sebesség: 0,5 ml/perc, hordozó: 0,1 ml/perc
Hőmérséklet: 22 °C

Peptidek kizorítós kromatográfiájában a következő előhívó, "displacer" anyagok használatosak: izopropanol, izobutiléter, benzil-dimetil-pentadecil-ammónium-klorid, acetilpiridinium-klorid ("cetrimid"), benzil-dimetil-hexadecil-ammónium-bromid és 2-(2-butoximetoxi)-etanol.

FELLEGVÁRI [200] inzulin és méhmemeg komponensek (melittin, apamin) analitikai és preparatív kizorításos kromatográfiáját oldotta meg fordított fázisú rendszerekben.

A preparatív folyadékkromatográfia alapjait szolgáltató, a tölteten és az eluensben levő mintakomponens koncentráció közötti összefüggéseket a Langmuir-féle izotermák írják le. Ezekből nyerhetünk felvilágosítást az anyagok retenciós idejére, telítési értékére és (az izoterma alakjából) a kromatográfiás csúcs alakjára. Az adszorpciós izotermák ismerete esetén meg lehet jósolni a mintakomponensek retenciós idejét és a preparatív kromatográfia legkedvezőbb elválasztási körülményeit, mely nem jelenti szükségszerűen csak az analitikai elválasztások egyszerű méretnövelését [200].

A preparatív méréseket nagy anyagmennyiséggel végezzük, amelyekhez tartozó koncentrációk az adszorpciós izotermák nemlineáris szakaszára esnek. A csúcsok nem szimmetrikusak (mint az analitikai elválasztásoknál), a csúcsmaximumok retenciós ideje és a csúcs szélesség függ a komponensek mennyiségétől is. Peptidek, fehérjék és aminosavszármazékok preparatív tisztításánál egyre kiterjedtebben alkalmazzák a kizorításos kromatográfiát [190-192, 201].

4.10. NAGYHATÉKONYSÁGÚ AFFINITÁS KROMATOGRÁFIA (HP-AC)

A biotudományokban jól ismert, hogy biomolekulák kromatografálására a leghatékonyabb módszer az affinitás kromatográfia. A módszer azon alapul, hogy a minta reverzibilis, biospecifikus kölcsönhatásba (affinitás, pl. enzim-szubstrát vagy immunhatás) lép a mátrix-szal (töltet) a biológiai funkció és/vagy a speciális kémiai szerkezet (konstitúció + konfiguráció + konformáció) alapján [202]. Az adszorpciós kromatográfia speciális esetéről van szó, melyet a gyakorlatban gélkromatográfiás körülmények között valósítanak meg. A nagyhatékonyságú affinitás kromatográfia a konvencionális affinitás kromatográfia és a HPLC szintézise. Így a HP-AC mindkét technika előnyeit egyesíti magában és csökkenti egyenkénti korlátait [203-209].

Az ideális HP-AC töltet tulajdonságai:

- porózus (átjárható, nagy móltömegű vegyületek részére is),
- hidrofil (nem specifikus hidrofób kölcsönhatású lehetőségektől mentes),

- töltött csoportot nem tartalmaz (nem specifikus ionos kölcsönhatás kizárható),
- könnyen kapcsolható specifikus liganddal (eredeti tulajdonságait megőrizve),
- kémiai és mechanikailag stabil (élettartama vizes pufferek használata esetén, nyomás alatt is nagy)
- lehetőleg "olcsó".

Ezek alapján a porózus szilika (2, 5, 10 μm részecskeméret 60-300-500 Å pórusátmérővel) kitűnően megfelel a célra [202].

A szilikafelület REGNIER szerint γ -glicidoxipropil-szilánnal [210-212] könnyen módosítható úgy, hogy alkalmas lesz specifikus ligand hozzákapcsolására. Az affinitás kromatográfia ligandjai: enzim inhibitorok, koenzimek, enzim szubsztrátok, antitestek, antigének stb. $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ vagy $-\text{SH}$ csoportjuk révén enyhe körülmények között kapcsolhatók a módosított szilikához.

OHTA [213] az enzimatikusan inert tripszinszármazékot, az anhidrotripsint kötötte diol-szilikához 2,2,2-trifluor-etánszulfonil-kloridos (trezil-klorid) aktiválással. Ez utóbbi reagens az affinitás töltetek készítésében használatos bróm-cián hátrányos tulajdonságait küszöböli ki. AHT-diolszilika oszlopot a C-terminálison lizint vagy arginint tartalmazó peptidek szelektív elválasztására lehet használni, pl. tuftszin, bradikinin jól retardálódik rajta, más peptid (mely nem tartalmazza a megfelelő C-terminálist) viszont az oldószerekkel együtt halad rajta keresztül [213].

Affinitás kromatográfiában a HPLC használatát rigid gélekkel SPORTSMAN és WILSON vezette be [214]. A nagyhatékonyságú immunoaffinitás kromatográfiát (HP-IAC) antigén-antitest kötődések meghatározására használták. Az ellenanyagot kovalens kötéssel immobilizálták a módosított hidofil szilikához (pl. LiChrosphere Si-1000), mely az antigént (pl. inzulin vagy IgG) a mintából megkötötte, majd a mozgófázis megváltoztatásával eluálni lehetett.

4.11. PREPARATÍV KROMATOGRÁFIA

A gyógyszeripar és a biotechnológiai ipar növekvő elválasztási igényei nagymértékben hozzájárultak a preparatív folyadékkromatográfia utóbbi években tapasztalt jelentős fejlődéséhez. Ezt a változást elősegíti az a tény is, hogy a biopolimerek tisztításánál igen

gyakran csak kis mennyiségű (néhány gramm tömegű) anyagról van szó, ami preparatív HPLC módszerekkel ma már könnyen elérhető. Elvileg minden analitikai HPLC elválasztás felnagyítható szemipreparatív vagy preparatív méretre. Az összehasonlítást a 20. táblázat mutatja.

20. táblázat

HPLC körülmények összehasonlítása

	Analitikai	Szemipreparatív	Preparatív
Oszlop: hossz (cm)	10 - 20	20 - 50	20 - 100
átmérő (mm)	2 - 5	5 - 10	20 - 50
töltet	valamennyi típus		
Méret (µm)	3 - 5	5 - 10	20 - 40
Nyomás (bar)	50 - 180	30 - 150	10 - 40
Áramlási sebesség (ml/perc)	1 - 2	3 - 8	10 - 40
Terhelés	100 µg	10 - 500 mg	1 - 200 g

Az alábbi általános összefüggések segítséget nyújtanak az analitikai oszlopokon kidolgozott elválasztási eljárások méretnövelésére:

$$sebesség_{prep} = sebesség_{anal} \times \frac{D_{prep}^2}{D_{anal}^2}$$

$$terhelés_{prep} = terhelés_{anal} \times \frac{D_{prep}^2 \times L_{prep}}{D_{anal}^2 \times L_{anal}}$$

ahol D az oszlopátmérő, L az oszlophossz.

Az analitikai HPLC eredményei megmutatják, hogy egy klasszikus vagy modern szilárdfázisú szintézissel készült peptid nyerstermék milyen további tisztítást igényel. A kutatómunka során gyakran kis mennyiségű, fiziológiailag aktív anyagnak egy bonyolult biológiai mátrixból történő izolálása a cél, ami ugyancsak preparatív kromatográfiai feladat [45, 215, 216, 558-561]. Nyilvánvaló törekvés, hogy a HPLC szolgáltatna nagy elválasztási hatékonyságot a prepara-

tív tisztítások során is szeretné megőrizni minden gyakorló peptidvegyész. A preparatív kromatográfia hatékonyságának növelése során számos változat alakult ki a méretnövelt HPLC mellett: "flash", "bio-flash", MPLC (medium pressure LC, Büchi Co.), túlterheléses ("overloading"), kiszorításos ("displacement") kromatográfia.

21. táblázat

Oszlopkapacitás és ajánlott eluens áramlási sebességek peptidekre (RP-18 töltet)

Oszlopméret	Optimális kapacitás	Gyakorlati kapacitás	Sebesség (ml/perc)
1,0 x 25 cm	1 - 5 mg	40 - 200 mg	3 - 5
2,2 x 25 cm	5 - 25 mg	0,2 - 2 g	15 - 30
5,0 x 25 cm	25 - 125 mg	1 - 5 g	50 - 100

A leggyakrabban használt preparatív oszlopok gyűjteményét a 22. táblázat mutatja.

A HPLC "Bermuda háromszöge", a sebesség-kapacitás-elválasztási hatékonyság háromszög igen élesen jelentkezik a preparatív elválasztások során, hiszen a gazdaságosságot a nagy oldószerigény miatt mindig figyelembe kell venni.

Peptidek esetében a méretnövelést legcélszerűbb úgy végezni, hogy már az analitikai oszlop terhelhetőségét ellenőrizzük és utána előbb szemipreparatív oszlopra váltunk, majd utána dolgozunk preparatív körülmények (min. 2-4 cm oszlopméret) között.

A szilárdfázisú szintézissel készült DSIP peptid tisztítása jól példázza a fentieket (16. ábra).

A különböző kromatográfias tényezők hatását a preparatív kromatográfiában is kimérték [217-232]. Ennek egyik alapvető oka az, hogy ma már a modern, automatizált szilárdfázisú peptidszintézisen alapuló készülékek rutinszerűen készítik, sőt ontják a különböző peptideket. Nem szabad viszont figyelmen kívül hagyni azt a tényt sem, hogy ez a módszer csupán az ugyancsak rutinszerűen alkalmazott HPLC-s tisztítással együtt jelent jó minőségű, preparatív segítséget.

A nyerstermék szennyezései a következők lehetnek:

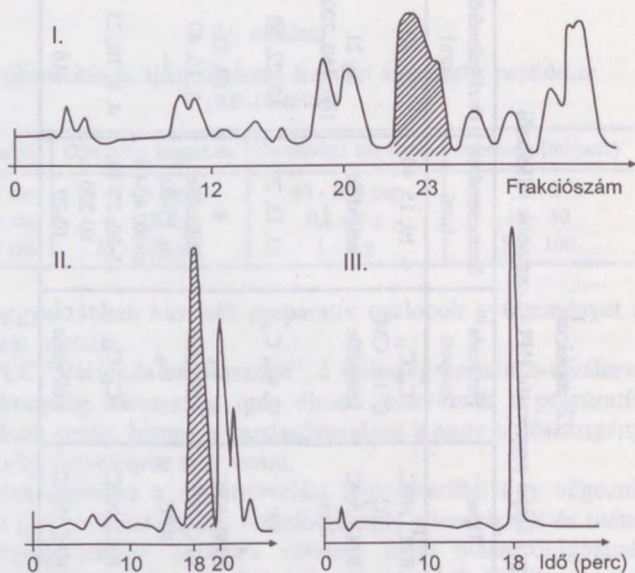
- hibás szekvenciájú peptidek,
- rövidebb szekvenciájú peptidek,
- védőcsoportokat tartalmazó peptidek,

22. táblázat

Szilikagél alapú preparatív HPLC oszlopok jellemzői

Név	Gyártó cég	Típus	Funkciós csoport	Szemcseméret (µm)	Oszlopátmérő (mm)	Oszlophossz (cm)
PrepPak (DeltaPak)	Waters	RPC, NPC, IEC	C ₈ , C ₁₈ , QMA, CM	6, 10, 15, 40	25, 40	100
Varioprep	Macherey-Nagel	RPC, NPC	különféle	különféle	10, 21	200
Prepchrom	Prepchrom	üres	—	—	100, 150, 200	300, 600, 1000
process LC	The Separation Group	RP	C ₄ , C ₈ , C ₁₈	10, 15, 20	10, 22, 50	250
Vydac	Shandon	RPC, NPC	C ₈	8	10, 22	250
Hyperprep	Knauer	RPC, NPC	különféle	különféle	8, 16, 40	30, 50, 80
Knauer	Crossfield Co.	RPC	C ₁₈	10, 15-20, 20-40, 40-60	—	—
Sorbil C200	Merck	RPC, NPC	C ₈ , C ₁₈	15-20, 25-40, 60-200	4, 8, 10, 25	25, 50
Lichroprep	BST	RPC, NPC	különféle	10-20	16	25, 30
BST Chromlab						

- nem peptid jellegű melléktermékek (a gyantáról történő lehasításnál keletkeznek),
- savérzékeny oldalláncok károsodása miatt átalakult peptidek stb.



16. ábra. Szilárdfázisú szintézissel készült DSIP-analóg kromatográfiás tisztítása [549]

Szekvencia: H-Trp-AcA-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-OH

I. 150 mg nyerstermék MPLC tisztítása	II. 200 µg (23-frakció) szemipreparatív HPLC tisztítása
Töltet: Lichrosorb RP-18 (25 – 40 µm)	Oszlop: Hypersil ODS-6, 250 x 4 mm
Oszlop: 600 mm x 8 mm (Merck)	Eluens: CH ₃ CN–0,01 M NH ₄ OAc
Eluens: A: 0,1 M NH ₄ OAc (pH 6,5)	(pH 4), 17:83 (v/v)
B: 60% CH ₃ CN az A-ban	Sebesség: 1,2 ml/perc
Gradiens: 2% B/perc	Detektálás: 280 nm
Sebesség: 3,2 ml/perc	Minta: 200 µl
Detektálás: 254 nm	Frakció: I. (10-20 ismétlés)
Frakció: 3 ml	

III. Analitikai HPLC azonos feltételek mellett

Mindezek a termék heterogenitását eredményezik, s így a tisztítás HPLC módszert követel. Peptidlaboratóriumokban tipikus eljárásnak számít, hogy a nyersterméket egy gélkromatográfiás eljárással (pl. BioGel P vagy Sephadex oszlopon) megszabadítják a nem peptid jellegű anyagoktól, melléktermékektől), s ezután egy ioncserés és egy fordított fázisú tisztításnak vetik alá [222]. A leghasználatosabb eljárás szerint C_{18} -as oszlopon (5-15 μm) trifluor-ecetsav jelenlétében acetonitril gradienst alkalmaznak [233]. Az ioncserés HPLC-t fehérjéknél is jól tudták alkalmazni [234-238].

Sok esetben célszerű a szintézis intermedierjeit tisztítani. Védett peptidek preparatív tisztítása során a MEIENHOFER-csoport tette meg az első nagy lépéseket a preparatív HPLC alkalmazásával, szilikagél 60 oszlopokon [239-241].

Ma már több cég készüléke használatos a preparatív gyakorlatban (Beckman, Jobin-Yvon, Knauer, Merck, Shimadzu, Waters stb.) és olyan is akad közöttük (Gilson, Knauer stb.), melyek a pumpa fejcserejével kettős feladat (analitikai és preparatív) ellátására is alkalmasak.

Nyers peptidtermékek tisztításának leginkább elfogadott stratégiája a következő:

1. gélkromatográfiás vagy ioncserés előtisztítás,
2. fordított fázisú analitikai elválasztás optimalizálása,
3. a méretnövelési ("felnagyítási") faktor megállapítása,
4. elválasztás, frakciógyűjtés,
5. frakciók analízise,
6. rekromatográfia (ha szükséges),
7. járulékos műveletek (sómentesítés, liofilizálás, sőtípus kialakítás).

Peptidlaboratóriumokban leggyakrabban a Vydac C_{18} preparatív tölteteket (300 Å pórusátmérő) használják, melyekkel a RIVIER-csoport rutinszerűvé fejlesztette peptidek preparatív tisztítását [242-252]. CH_3CN -0,1% TFA (H_2O) eluens mellett a vizes trietil-ammónium-foszfát (TEAP) (pH 2,25)- CH_3CN rendszert fejlesztették ki [253].

Savérzékeny peptidek esetén (pl. CCK peptidek) magasabb pH-jú (6,5-7,0) TEAP-ot lehet használni [219]. A sómentesítés megkönnyítése érdekében illékony NH_4OAc -ra tértek át [254]. Sok esetben a TFA \rightarrow acetát ellenion cserét gyors gradiensű, nagy eluens sebességű RP-HPLC-vel oldják meg (NH_4OAc - CH_3CN), majd liofilizálás következik [242].

5. DETEKTÁLÁSI MÓDSZEREK PEPTIDEK HPLC-JÉBEN

A folyadékkromatográf egyik legfontosabb egysége az érzékeny detektor, melynek feladata az oszlopot elhagyó eluensben az elválasztott komponensek mennyiségének, ill. koncentrációjának folyamatos követése. A korszerű detektorok kijövő elektromos jele széles tartományban arányos a komponens koncentrációjával, ill. mennyiségével. A készülékeknek nagy érzékenységeknek, pontosnak és stabilnak kell lenniük. A HPLC-ben a minta és a mozgófázis fizikai tulajdonságai gyakran hasonlóak, s ez nehezíti teszi a komponensek detektálását. A folyadékkromatográfiában ezért többféle, speciális detektort fejlesztettek ki. A detektálási módszer kiválasztása mindig a megoldandó feladat, s a rendelkezésre álló technika alapján történik.

A folyadékkromatográfiás detektorok két csoportra oszthatók:

- a) univerzális vagy nem szelektív, tömegérzékeny detektorok, melyek az oszlopról eluálható valamennyi komponens jelenlétét érzékelik egy bruttó tulajdonság alapján (pl. törésmutató),
- b) a szelektív detektorok a minta komponenseinek specifikus tulajdonságát (fény-abszorpció, elektroaktivitás stb.) mérik, s csak az ilyen tulajdonságokkal rendelkező komponensekre reagálnak.

A 23. táblázat a különböző detektálási módszereket hasonlítja össze.

5.1. ULTRAIBOLYA SPEKTROFOTOMETRIA

A peptidek és fehérjék folyadékkromatográfiás detektálására legelterjedtebb módszer előnyei a következők:

23. táblázat
 Detektortípusok főbb jellemzői

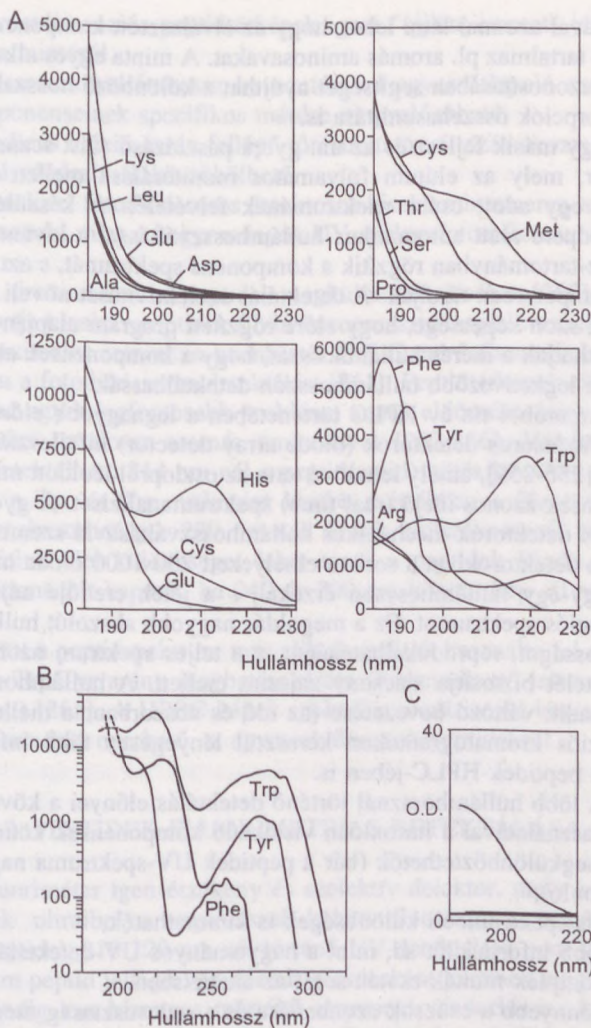
	UV (AU)	FL (AU)	Elektrokémiai (μ Amp)	Konduktivitás (μ S)	RI (RIU)	IR (AU)	MS (D)
Szelektivitás	+	+	+	—	—	+	—
Gradiens összeférhetőség	+	+	—	—	—	+	—
Lineáris tartomány	10^5	10^3	10^6	10^4	10^4	10^4	10^6
Zajszint (N_D)	10^{-5}	10^{-7}	10^{-4}	—	10^{-8}	10^{-4}	10^{-7}
L.L.D. egy kedvező komponensre (g/cm^3)	10^{-10}	10^{-12}	10^{-12}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-12}
Érzékenység: sebesség	—	—	+	+	+	—	—
hőmérséklet	+	—	+	+	+	—	—

- a kívánt komponenseket nagy érzékenységgel méri,
- a detektor jele széles tartományban lineárisan változik a koncentrációval,
- viszonylag érzéketlen az áramlási sebesség változásaira és a hőmérséklet ingadozásaira,
- a mérőcella térfogata igen kicsi,
- gradiens elúció követésére jól használható,
- spektrumok felvételével minőségi elemzésre is alkalmas.

Az aminosavakból peptidkötéseken keresztül felépült polipeptidok legfőbb kromofórja éppen maga a peptidkötés ($\lambda_{\max} = 188 \text{ nm}$) [255]. Ez a hullámhossz azonban – bár rendkívül érzékeny detektálást tenne lehetővé – az RP-HPLC-ben leggyakrabban használt eluensek optikai tulajdonságai miatt (önabszorpció, "cut off") nem alkalmas folyadékkromatográfiás UV-detektálás céljára. A gyakorlatban használt 210-220 nm hullámhossztartományban a különböző szerkezetekben lévő peptidkötések egyforma mértékben, additíve járulnak hozzá az abszorpcióhoz (moláris extinkciós koefficiens $\epsilon \sim 10^3 \text{ l/M/cm}$). Peptidek és fehérjék UV-spektruma nagymértékben függ az őket alkotó aminosavak spektrumától. Az aromás aminosavak (His, Phe, Tyr, Trp) kivételével a többi aminosav spektruma nagyon hasonló (17. ábra). Csak a Phe, Tyr és Trp-nek van kellő intenzitással mérhető maximuma 250-300 nm között, de ezek is széles, átlapolódó maximumok. A maximumok helye és a moláris extinkciós koefficienseik nagysága függ az oldószer összetételétől és pH-jától. Közel semleges oldatban a sorrend a következő: $\epsilon_{\text{Trp}, 280} > \epsilon_{\text{Tyr}, 280} > \epsilon_{\text{Phe}, 254}$. Bár ezen hosszabb hullámhosszon való detektálás a peptidek azonosítása szempontjából hasznos, nem szabad elfelejteni, hogy 210 nm-en legalább tízszer nagyobb érzékenységgel lehet mérni. Védett aminosavak és peptidek (Z-, OBzl stb.), aromás aktívészterek, danszil-, PTH- származékok 254 nm történő mérését az aromás csoportok jelenléte teszi lehetővé.

A hagyományos, rögzített hullámhosszon (206, 254, 280 nm) működő szűrős UV-fotométerekkel és a változtatható hullámhosszú UV-spektrofotométerekkel igen nagy érzékenységgű detektálás valószínűsíthető meg (0,005-10 μg peptid).

Az elmúlt években új típusú UV-detektorok jelentek meg, melyek bővítették a kromatográfia során a komponensekről on-line nyerhető információk körét. A két különböző hullámhosszon (pl. 220 és 280 nm) történő detektálást lehetővé tevő fotométerek hasz-



17. ábra. Aminosavak és a Gly-Gly dipeptid UV-spektrumai [857].

A felvételek az aminosavak vizes oldataiban (pH 5-6, ill. pH 3 (Cys)) készültek (A, B). (Az amid-kötésnek és a terminális aminos- és karboxilcsoportoknak a peptidek és fehérjék UV-spektrumaihoz való hozzájárulását az oldallánc nélküli Gly-Gly dipeptid példája mutatja (C))

nálatával azonnal látni lehet, hogy az elválasztott komponensek melyike tartalmaz pl. aromás aminosavakat. A minta egyes alkotórészeinek azonosításában segítséget nyújthat a különböző hosszakon mért abszorpciók összehasonlítása is.

Egy másik fejlesztés az ún. gyors pásztázású (fast scanning) detektor, mely az elútum folyamatos monitorálása mellett lehetővé teszi egy adott csúcs spektrumának felvételét. A készülékek 1-2 másodperc alatt automatikus hullámhosszváltással a kívánt hullámhossz-tartományban rögzítik a komponens spektrumát, s azt a vezérlő komputerben tárolják. A detektálás szelektivitását növeli a készülékek azon képessége, hogy előre rögzített program alapján megváltoztathatják a mérés hullámhosszát, hogy a komponensek abszorpcióját a legkedvezőbb hullámhosszon detektálhassák.

Az utóbbi tíz év HPLC történetében a legnagyobb előrelépést a fotodiódasoros detektorok (diode array detector) kifejlesztése jelentette [256-259], amely lehetővé tette az oszlopról leoldott mintakomponensek azonos idejű (real time) spektrumanalízisét. A gyors pásztázású detektorok mechanikus hullámhosszváltásával szemben ezekben a detektorokban a sorban elhelyezett 200-1000 dióda mindegyike egy-egy hullámhosszon érzékel, s a jelek eredője adja az abszorpciós spektrumot. Ez a megoldás nagyobb abszolút hullámhossz pontosságot, reprodukálhatóságot, s a teljes spektrum azonos idejű felvételét biztosítja alacsony zajszint mellett. A hullámhossz, mint harmadik változó bevezetése (az idő és abszorbancia mellett) 3 dimenziós kromatogramokon keresztül lényegesen több információt nyújt peptidek HPLC-jében is.

- A több hullámhossznál történő detektálás előnyei a következők:
- használatával a hasonlóan viselkedő komponensek könnyebben megkülönböztethetők (bár a peptidek UV-spektruma nagyon hasonló),
 - kis spektrumbeli különbségek is kimutathatók,
 - több információt ad, mint a hagyományos UV-detektálás,
 - komplex minták esetén segít az analízisben,
 - könnyebb a csúcsok azonosítása és a csúcstisztaság megállapítása,
 - a nem peptid jellegű szennyezések is jól detektálhatók,
 - aromás aminosav, ill. ezeket tartalmazó peptidek megkülönböztetésére is alkalmas és kvantitatív mérésük is lehetséges,
 - peptid- és fehérjetisztítások ellenőrzése több hullámhossznál mért HPLC képpel biztonságos,

- a háromdimenziós peptid térképek igazi "ujjlenyomatot" jelentenek a mintáról,
- a referencia hullámhossz bevezetésével egyes átlapoló csúcsok komponenseinek specifikus mérése megvalósítható,
- a gradiens elúció során fellépő törésmutató-változás okozta alapvonal-vándorlás kiküszöbölhető,
- az "on-line" fotodiódásoros detektorok kisebb mintamennyiséggel dolgoznak, mint a hagyományos UV-spektrofotométerek.

FELL tirozin tartalmú peptidek megkülönböztetésében [260], RAO és csoportja bioaktív peptidek (lizin-vazopresszin, arginin-vazopresszin és oxitocin) szimultán kvantitatív HPLC mérésében alkalmazta sikeresen a fotodiódásoros detektálást [261]. Peptid térképek elkészítésénél az egyik legfontosabb probléma annak eldöntése, hogy mely peptidcsúcs tartalmaz aromás aminosavat [262-266]. Valamennyi peptid detektálható 214 nm-nél a peptid(amid) kötés jelenléte miatt, de csak a Tyr és Trp, valamint kisebb mértékben a Phe-tartalmú peptidek abszorbeálnak 280 nm-nél. E két hullámhossznál történő HPLC felvétellel különbséget lehet tenni a peptidek között. Még több információt kapunk, ha 240 és 300 nm közötti kép áll rendelkezésre.

COHEN a peptidspektrum második deriváltját használta fel a Trp, illetve a Trp/Tyr arány meghatározására (ha mindkettő jelen van a peptidben) [265]. A HPLC képek spektrális analízisével lényegesen több információ nyerhető az egyes elválasztott peptidekről.

5.2. PEPTIDEK FLUORIMETRIÁS DETEKTÁLÁSA

A fluoriméter igen érzékeny és szelektív detektor, mely a komponensek ultraibolya sugárzással keltett fluoreszcens sugárzását méri. Peptidek 210-220 nm-nél történő UV-detektálása nem szelektív, a nem peptid jellegű vegyületek is csúcsként jelennek meg, valamint mindig van bizonyos mértékű alapvonal-vándorlás is. A fluoreszcens detektálás ezzel szemben a gerjesztési és emissziós hullámhosszak alkalmazása miatt sokkal szelektívebb, s csak a fluoreszkáló csoporttal rendelkező komponensek adnak detektor választ.

Peptidkeverékek analízise során a tirozin és triptofán egységek natív fluoreszcenciáját SCHLABACH és WEHR [267] használta fel az őket tartalmazó peptidek azonosításában (gerjesztés: 220 nm, emiszió:

szió: 330 nm), s kb. hatszoros érzékenységnövekedést értek el az UV-detektáláshoz képest. Mivel a Tyr és Trp erős fluoreszcenciát mutat, a detektálási határ jóval alacsonyabb, mint a 254 nm-nél mért értékek, továbbá a Tyr és Trp között is különbséget lehet tenni. (Az aromás aminosavak, ill. peptidjeik 254 nm-nél végzett UV-detektálásának hátránya, hogy kis érzékenységgű és nehéz megkülönböztetni őket.) A nyert kromatogram hasonlít az 254 nm-nél felvett képhez, azonban a Phe-tartalmú peptideket nem jelzi, így szelektívebb módszert jelent. Az alapvonal kevésbé zajos, és a Trp-peptidek uralják a kromatogramot.

Ha a peptid nem tartalmaz Tyr és Trp egységet, fluorogén reagensek segítségével oszlop előtti, illetve oszlop utáni származékképzéssel lehet érzékeny fluorimetriás detektálást megvalósítani. Ma leginkább a fluoreszkamin és az *o*-ftáaldehid használatosak erre a célra (l. Származékképzés a detektálásban c. fejezet) "off line" vagy "on line" megoldásban.

CREASER és HUGHES [268] 5-10 μmol peptidet szeparáltak kationcserélő gyantán (Beckman PA 35) illékony piridin puffer gradienssel. Megosztószelep segítségével az elutum egy részét gyűjtőték, másik részét OPA-merkaptotanol segítségével fluorimetriásan detektálták.

Az OPA $\alpha\text{-NH}_2$ csoportokkal lassan, de Lys ϵ -amino csoporttal nagy sebességgel reagál (Lys-peptidek 50-szer nagyobb fluoreszcenciát mutatnak, mint a Lys-mentesek). JOYS és KIM [269] szerint az OPA származékképzés nem ideális peptidek detektálására, mert a különböző peptidek nem egyformán viselkednek a reagenssel szemben. FLURAM használata esetén ilyen probléma nincs és a fluoreszcencia is lineárisan változik a koncentrációval. (A gyorsan reagáló FLURAM csak acetóban oldódik, vizes pufferekben nem, így alkalmazása más kiegészítést is igényel.) FREI [270-272] a FLURAM-ot oszlop utáni származékképzésre használta fontos gyógyszeripari termékek, mint oxitocin, Lys⁸-vazopressin és orniressin vizsgálatában. A fluoreszkamin ezen nonapeptidek szabad aminocsoportjaival – beleértve az $\alpha\text{-NH}_2$ terminálist is – reagál. A származékok fluoreszcenciája nagymértékben függ a használt organikus oldószertől, s koncentrációjának növelésével csökken.

A Pro, HyPro vagy α -amino védett peptidek hidrolízis nélkül nem adnak fluorofór származékot (szekunder aminocsoport közvetlenül nem reagál OPA-val).

Származékképzéssel a fluorimetriás mérések érzékenységét pikomólos szintig lehet növelni. Az érzékenységet a háttér nagysága befolyásolja, s így a technika nagyon kényes az oldószer tisztaságára. Az alkalmazott oldószerek amin és más reaktív szennyezéseket nem tartalmazhatnak, ezért CH_3CN helyett inkább más oldószert (pl. MeOH, EtOH) alkalmaznak. (Amin szennyezések ninhidrinről történő desztillációval távolíthatók el.)

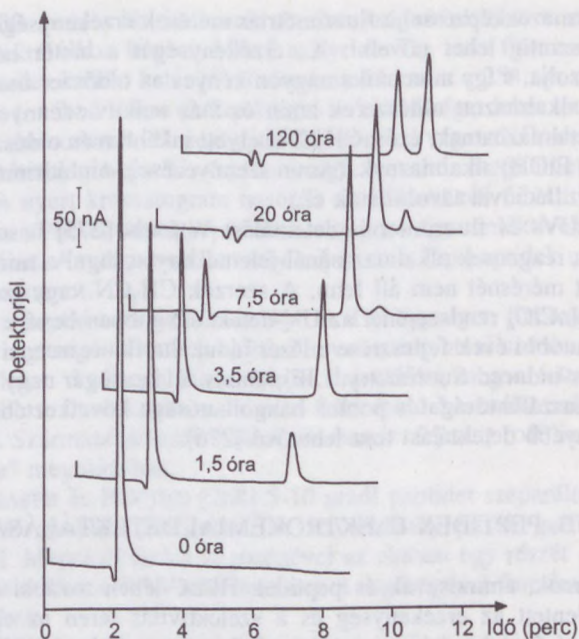
Az UV- és fluorimetriás detektálást WILSON [275] hasonlította össze: a reagens alkalmazásánál jelentékenyen hígul a minta, ami a direkt mérésnél nem áll fenn. A szerzők CH_3CN vagy izopropanol— NaClO_4 rendszerénél az UV-detektálás jobban bevált.

Az utóbbi évek fejlesztése a lézer indukálta fluoreszcencia mérése (laser-induced fluorimetry, LIF), amely a lézersugár nagy energiája, fókuszálhatósága és pontos hangolhatósága következtében még érzékenyebb detektálást tesz lehetővé [276].

5.3. PEPTIDEK ELEKTROKÉMIAI DETEKTÁLÁSA

Aminok, aminosavak és peptidek HPLC-jében további előrelépést jelentett az érzékenység és a szelektivitás terén az egyszerű kivitelezésű elektrokémiai detektorok bevezetése. Az LC/EC módszert FLEET és LITTLE [277] alkalmazták aminosavak detektálására az α -amino-csoportok elektroaktivitása révén. A szabad N-terminálisú peptidek ugyancsak elektroaktívak. A fenil, indol, tiol vagy metilmerkaptó oldallánccal rendelkező Tyr, Trp, Cys és Met jóval elektroaktívabbak a csak primer aminocsoportot tartalmazó vegyületeknél, s így kisebb potenciálon, egyszerűbb [278-284] vagy kémiaiilag módosított [285-287] grafitalapú elektródon jól mérhetők. Az LC/EC módszer ezen aminosavak jelenléte esetén rutinszerűen alkalmazható. Megjegyzendő, hogy megfelelő reagenssel valamennyi aminosav elektroaktív származéka elkészíthető (l. MEEK munkáit [288] a Származékképzés c. fejezetben) [289, 290].

Specifikus módszer lévén az elektrokémiai detektálás aminosavak és származékaik, neuro- és opioid peptidek, valamint biogén aminok esetén is használható. Alkalmazását MEFFORD és ADAMS közölték először glutationra [291], és más elektroaktív peptidszármazéokra. Az említett aminosavakat tartalmazó peptideket az elektroaktív oldallánccok miatt szelektíven, nagy érzékenységgel lehet detektálni [292, 293].



18. ábra. Gly-Gly-NH₂ hidrolízisének követése HPLC-EC-vel rézelektrod detektorral [317]

Oszlop: Dionex Carbo Pac PA1
 Eluens: 0,1 M NaOH
 Sebesség: 0,5 ml/perc
 E: +0,58 V (Ag/AgCl-ra)
 Elúciós sorrend: Gly-Gly-NH₂, Gly-Gly-OH, Gly

A tirozin, ill. Tyr-peptidek (oxitocin, enkefalinok, endorfinok, angiotenzin, vazopresszin, CCK stb.) analízisére az elsők között dolgoztak ki LC/EC módszert [294-301]. MOUSA és COURI [302, 303] enkefalinok és β -endorfin vizsgálatához használta az elektrokémiai detektálást, mely HPLC-ben legalább 100-szor érzékenyebbnek bizonyult, mint az UV-detektálás. Segítségével neuropeptideket agyi szövetekben származékképzés nélkül is jól lehetett mérni [294]. WHITE az oxitocin meghatározást oldotta meg elektrokémiai detektálás segítségével [295]. Az UV-detektáláshoz képest előnye, hogy használatával nagyobb szelektivitás érhető el az érzékenységgel elvesz-

tése nélkül. Tyr és Trp tartalmú peptidok UV-ben 280 nm-nél szelektíven detektálhatók, de az elektrokémiai detektálás jóval érzékenyebb.

Az α -aminocsoportok elektroaktivitása megfelelő elektród-potenciálnál kizárható. A Leu-enkefalin és a (des-Tyr¹)-enkefalin UV-ben 220 nm-nél jól detektálhatók. Az utóbbi peptid α -aminocsoportja révén elektroaktív, a Leu-enkefalin egy további Tyr egység miatt alacsonyabb elektródpotenciálnál is detektálható, így 0,9 V-nál csak ez utóbbi látható elektrokémiailag. A két peptid így szelektíve megkülönböztethető egymástól.

A detektorválasz nagysága függ az eluens összetételétől is [294]. A pH, sók, szerves oldószerek lényeges hatással bírnak, pl. citrát pufferek érzékenységsökkenést okoznak, helyettük célszerű foszfát puffereket használni.

A detektálási határ függ a csúcs alakjától is, hosszú retenciós idő széles csúcsokkal jár együtt, melyet nem lehet megkülönböztetni az alapvonalától. Célszerű ezért rövidebb retenciós időkre törekedni. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy Tyr-peptidok EC detektálása érzékenyebb, mint az UV 280 nm-en; a detektálási határ azonos vagy jobb, mint ami 220 nm-en, noha az érzékenység ez utóbbi esetben a szereplő aminosavegységek számától függ.

Fémelektrodok alkalmazásával nyomnyi mennyiségek váltak detektálhatóvá származékképzés nélkül is. JOHNSON és csoportja Au- és Pt-elektrodokat használt [304-306]. A fejlődés a Ni- és Cu-elektrodok felé vezetett [307-312]. BALDWIN és munkatársai [313-317] rézelektrodon megoldották valamennyi aminosav direkt detektálását és a módszert peptidokra is kiterjesztették (érzékenység: amperometriás méréssel 1-10 pmól).

Nem elektroaktív dipeptidok és dipeptidamidok biuret komplexszé történő átalakítása elektroaktív vegyülethez vezet, melyek így elektrokémiailag detektálhatóvá válnak [318].

5.4. TÖRÉSMUTATÓ DETEKTOROK

Peptidok kromatográfiájában ritkán használnak törésmutató detektorokat, bár preparatív elválasztásoknál mint érzéketlen, nem szelektív detektálási módszerént alkalmazható. Hátránya, hogy gradiens elúció mellett nem, vagy csak korlátozottan használható, valamint érzékeny a hőmérséklet ingadozására. Olyan eluensek esetében, me-

lyek UV-ben erősen abszorbeáló komponenst is tartalmaznak (pl. a Schwyzer eluensek védett peptidek szilikán történő preparatív tisztítása esetén; *n*-BuOH-piridin-jégecet-víz), a törésmutató különbség mérések használatával oldható meg a detektálás. Magas szénhidrát-tartalmú glikopeptidek és gliko-proteinek HPLC analízisére a cukor-részhez hasonlóan törésmutató detektálással követhetjük.

5.5. LC/MS-TÖMEGSPEKTROMETRIÁS DETEKTÁLÁS

A tömegspektrométerek (MS) megjelenése új dimenziót nyitott a kromatográfiában is [319, 320]. Nem véletlen az sem, hogy a nem gázkromatografálható anyagok (pl. szabad peptidek) HPLC-jében is sor került az MS detektálás bevezetésére. A tömegspektrometria bevezetése döntő szerepet játszott a biológiailag aktív peptidek szerkezetmeghatározásában. Használatával különösen a neuroendokrinológiában és neurokémiaiában értek el korszakos jelentőségű eredményeket.

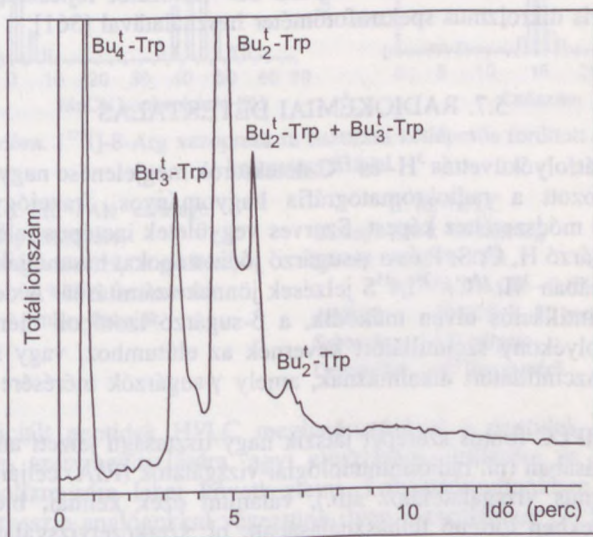
Az alkalmazási eredmények BIEMANN munkáival [321] kezdődtek, aki a peptidek redukálásával kapott poli-aminoalkoholokat vizsgálta GC/MS-sel. Később a szép eredményeket felmutató peptid-HPLC és a különböző ionizációs módszerekkel (FD, FAB, electrospray, kémiai ionizáció stb.) nyert protonált peptid molekulaionok kombinálása jelentették a meghatározások alapját. Az MS-sel olyan módszerhez jutottak a szakemberek, melynek segítségével a neuro-peptidek biológiai szintjén, tehát pikomól vagy fmól tartományban tudnak kvantitatív méréseket végezni (származékképzés nélkül 600 fmól alatt tudtak dolgozni).

A tömegspektrometriás detektálás előnye, hogy univerzális módszer, valamint szerkezeti bizonyosságot ad a mért peptidről (l. molekula-ion), ami egy biológiai aktivitás mérésnél nem mindig áll fenn.

DESIDERIO és csoportja [322-326] a neuropeptidek területén végzett úttörő munkát. A HPLC-MS módszerhez megfelelően illékony puffer (0,04 M trietil-ammónium-formiát) bevezetésével agyalapi mirigy, fog és agyi szövetek peptidjeit izolálták, tisztították és határozták meg [327].

A kezdeti "off-line" módszereket felváltotta a közvetlen, "on-line" módszer alkalmazása, amikor is az elútum tört része kerül kémiai ionizációra [328]. A kromatográfia és a spektrométer közötti kapcsolat ("interface") különbözősége többféle módszert alakított ki

aminosavak és peptidok LC/MS vizsgálatában [332-341]. A jelenlegi legmodernebb tömegspektrométerekhez (ioncsapda, kvadrupól) "electrospray" ("ion-spray") egységen keresztül kapcsolják a kromatográfokat [329-331]. Nagy előny, hogy HPLC/MS segítségével nagy peptidok szekvenálását is meg lehet oldani [342-347]. A származékképzés vagy jelölés (acetilezés, metilezés, OPA-reakció, FLURAM-reakció) a szerkezetkutatást is segíti (N-terminális, szilárdfázisú szintézis téves szekvenciáinak meghatározása) [338, 348]. Az LC/MS előtérbe került triptikus peptidterképek felvételénél [349-354], a direkt szekvenciaanalízisben [355-359] és komplex peptidkeverék analízisében is [360].



19. ábra. *tert*-Butilezett triptofánkeverékek LC/MS szeparálása [328]

Oszlop: Lichrosorb NH₂ (200 x 4,6 mm)

Eluens: 95% MeOH

Sebesség: 1,5 ml/perc

5.6. KIROPTIKAI DETEKTÁLÁS

Átfolyókvettás nagy érzékenységű (10⁻⁴ fok) polariméterek (ún. kiralitásdetektorok) kifejlesztésével lehetőség nyílik minden optikai-

lag aktív vegyület, így aminosavak, peptidek és származékaik detektálására. Segítségükkel nemcsak az optikai forgatóképességgel rendelkező komponenseket azonosíthatjuk, hanem a forgatás előjelét is látjuk a kromatogramon. (A detektort ugyanakkor nagyérzékenységű polariméterként is használhatjuk anyagaink jellemzésére.) Az elválasztott enantiomerek vagy diasztereoizomerek HPLC képe változatos előjelű csúcsgyűteményt mutathat. UV-detektorral sorbakötött ún. "chiramonitor"-ral (standardok segítségével) elválasztás nélkül is meghatározhatjuk a sztereokémiai tisztaságot, továbbá a racemizáció mértékét [361-364]. Triptikus peptidterképek készítésénél e kétdimenziós detektálást már használják [365].

Konformációs analízisre HPLC-CD változatot fejlesztettek ki cirkuláris dikroizmus spektrofotométer használatával [361].

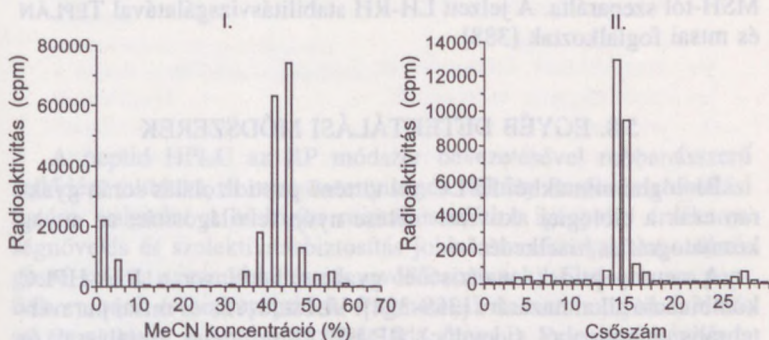
5.7. RADIOKÉMIAI DETEKTÁLÁS

Az átfolyókvettás ^3H - és ^{14}C -detektorok megjelenése nagy fejlődést hozott a radiokromatográfia hagyományos, frakciógyűjtést igénylő módszeréhez képest. Szerves vegyületek izotópos jelölésére a β -sugárzó H, C, S, P és a γ -sugárzó jódizotópokat használják; peptidkémiaiában ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{35}S jelzések jönnek számításba. A detektálás szcintillációs elven működik, a β -sugárzó izotópok mérésénél vagy folyékony szcintillátort kevernek az elútumhoz, vagy szilárd fázisú szcintillátort alkalmaznak, amely γ -sugárzók mérésére is alkalmas.

A HPLC fontos szerepet játszik nagy tisztaságú jelzett anyagok előállításában (pl. radioimmunológiai vizsgálatok (RIA) céljára, metabolizmus vizsgálatokhoz stb.), valamint ezek kémiai, biológiai kísérletekben történő felhasználásában: pl. szerkezetvizsgálatokhoz (mikroszekvenálás), biológiai felezési idők mérésére, szerv-elosztások megállapítására, metabolizmusok nyomon követésére stb.

Peptidek RIA mérésénél csaknem kivétel nélkül a ^{125}I -izotóppal történő jelzést használják. A nyomjelzőként ^{125}I -tel jelzett peptidek tisztítására többen dolgoztak ki HPLC módszert [366-373]. Igen elterjedt a gyakorlatban a SZOTE Endokrinológiai laboratóriumában kidolgozott kombinált módszerünk [374], mely egy rövid C_{18} oszlopon ("cartridge") történő előtisztítást és egy HPLC-s tisztítási lépést foglal magában. Segítségével nagy specifikus aktivitású, és >98% tisztaságú jelzett peptideket (vazopresszin, oxitocin, ACTH, α -MSH,

szomatosztatin, gasztrin) állítottunk elő. Hasonló elv szerint dolgoztak GUY, SEIDAH és LAMBERT angiotenzinnel, ill. calcitoninnal [367-369].



20. ábra. [¹²⁵I]-8-Arg vazopresszin tisztítása kétlépcsős fordított fázisú kromatográfiával

I. SEP-PAK "cartridge"

C₁₈ oszlop (Millipore)
 Elúció: lépcsős CH₃CN gradiens,
 0,1% TFA tartalommal
 1 ml-es frakciók

II. RP-HPLC

Oszlop: 250 x 4,6 mm C₁₈
 Eluens: A: 0,1% TFA,
 B: 70% CH₃CN—0,1% TFA
 gradiens: 20-40% B, 20 perc
 Sebesség: 1,0 ml/perc
 Detektálás: off line γ-mérő

Triciált peptidek HPLC meghatározásával a peptidek felezési idejére, szervmegosztására, agyi eloszlására, ürülésére és in vivo metabolizmusára lehet következtetni. Laboratóriumunkban triciált vazopresszin analógokkal végeztünk ilyen vizsgálatokat [375-380].

Peptidek mikroszekvencia analízisében nagy szolgálatot tesznek a radioaktív jelzésre alkalmas reagensek. Használatuk nagyon megnöveli a detektálhatóság érzékenységét, és így csökkentik a vizsgálathoz szükséges mintamennyiséget (gyakran 0,1 pmól minta is elegendő) [381]. Az Edman-lebontásnál ¹⁴C- és ³⁵S-fenilzotiocianátot is lehet használni. Cys (¹⁴C-jódacetát), His és Tyr [382, 383] és Met [384] egységeknél specifikus radiojelzést alkalmaznak. A radiokromatogramon az azonosításokat "hideg" PTH-aminosavszármazék standardok UV-detektált HPLC képének segítségével végzik.

HPLC segítségével [C13,S35]-ciszteín-tartalmú oxitocinok diasztereomerjeinek elválasztása is megoldható volt [385, 386]. BUCKLEY [387] RP oszlopokon *n*-propanol-vizes piridinacetát (pH 5,5) eluenssel a triciált α -MSH-t prekursorától, a [3,5-dijód Tyr]³ α -MSH-től szeparálta. A jelzett LH-RH stabilitásvizsgálatával TEPLÁN és mtsai foglalkoztak [388].

5.8. EGYÉB DETEKTÁLÁSI MÓDSZEREK

Biológiai mintákból HPLC-vel történő peptidizolálás során gyakran csak a biológiai aktivitás mérése nyújt felvilágosítást az anyag kromatográfiás viselkedésére.

A neuropeptidek analízisének gyakran kerül sor a RIA-HPLC kombináció alkalmazására [389-394]. VECSENYÉS és mtsai paravertebrális ganglionból (idegdúc) RP-HPLC-n történő izolálással és RIA detektálással oxitocint mutattak ki [395].

Az ún. biodetektorok kifejlesztésében IDEI végzett kiemelkedő munkát [396].

6. SZÁRMAZÉKKÉPZÉS A DETEKTÁLÁSBAN

A peptid HPLC az RP módszer bevezetésével robbanásszerű fejlődést mutatott. A mintamennyiségek néhány nmólos detektálási határa, valamint a biológiai minták analízise igényelte érzékenységnövelés és szelektivitásbiztosítás jobb kromofórokat tett szükségessé, mint a savamid kötés (és a védőcsoportok). Elsősorban a peptidhormonok és neuropeptidek, fragmenseik és metabolitjaik izolálása és nyomon követése vezetett oda, hogy a származékképzés a HPLC-ben is kiterjedten alkalmazott technikává vált [272, 397-399].

A származékképzés a következő előnyökkel jár:

- jobb kromoforok révén javul a detektálhatóság,
- a detektálási érzékenység növelhető (nmól, pmól, fmól tartományok),
- a reagens választék nagy szelektivitást biztosíthat,
- a peptidminták kromatográfiás tulajdonságai a módosítással kedvezően alakíthatók,
- a változással az elválasztás is javulhat,
- a peptidlánc adott fragmensének jelölése is megoldható (MS-ben fontos lehet),
- a származékképzés a minta előtisztítását is jelenti,
- a konvencionális HPLC rendszer továbbra is használható (bár az oszlop utáni származékképzés egy "reaktort" igényel még a detektor elé).

Ha a származékképzés az elválasztás előtt történik, úgy oszlop előtti ("pre-column") származékképzésről, ha az elválasztás után végezzük, oszlop utáni ("post-column") származékképzésről beszélünk. Mindkét módszernek vannak előnyei és hátrányai is.

A peptidszármazékok detektálásánál valamennyi ismert módszer számításba jöhet, így UV, fluorimetriás, elektrokémiai és tömegspektrometriás detektálás a leggyakoribb, de vannak külön reakciódetektorok is.

Peptidkémiaiában a származékképzés alkalmazási területei igen változatosak:

- aminosavanalízis,
- szekvenálás, peptidterképezés,
- *N*-terminális meghatározás (Sanger),
- szerkezetvizsgálat,
- azonosítások, értékmérések ("assay"), izolálás,
- metabolizmus vizsgálatok,
- jelölések, nyomanalízis,
- peptidszintézis kontroll (Voelter féle peptidanalizátor),
- tisztaság ellenőrzés,
- fragmensek, analógok vizsgálata.

Aminocsoportot tartalmazó aminosavak és peptidek esetén származékképzésre a 24. táblázat reagentái használatosak. A sort vezető ninhidrin oszlop utáni származékképzőnek ismert, a fluoreszkamin és *o*-ftálaldehid mindkét kivitelezésében alkalmazható, míg a többi reagens az oszlop előtti származékképzés révén nyújt segítséget. Legtöbb esetben a fluorimetriás detektálásra való áttérés jelenti az érzékenységnövekedést.

6.1. DANSZIL-KLORID

A danszil-kloridot WEBER vezette be aminosavak detektálásánál [400]. Kitűnő reagens lett peptid, fehérje *N*-terminálisok jelölésére és meghatározására [401]. Enyhe körülmények között reagál (pH 7,5 - 8), és a származék nagyon stabil (savas hidrolízisnek is ellenáll). Spektrofotometrikan (254 nm-nél) és fluorimetriásan is (gerjesztés: 360 nm, emisszió: 480 nm) nagy érzékenységgel detektálható [402]. Széles körben alkalmazzák az analízisben és a szerkezetkutatásban.

Danszil-aminosavak HPLC elválasztását normál fázisú tölteteken BAYER és HSU dolgozták ki [403, 404]. WILKINSON [405] fordított fázisú oszlopokon (μ Bondapak C₁₈, Spherisorb ODS) acetonitril-foszfát puffer (közel netruális pH) lineáris gradienssel dolgozott. Danszil-aminosavak RP-HPLC elválasztásának tökéletesítésén még számos kutatócsoport tevékenykedett [406-413], és teljes aminosavanalízisre is használták (21. ábra).

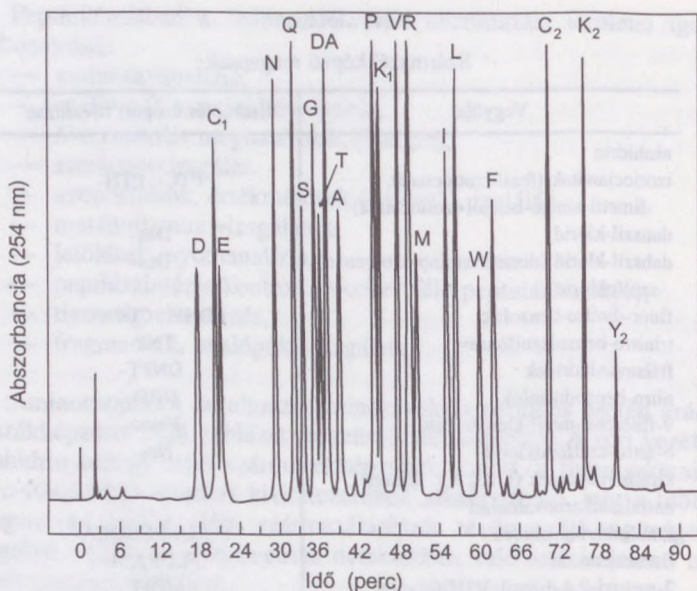
24. táblázat

Származékképző reagensek

Vegyület	Kromofór csoport rövidítése
ninhidrin	
izotiocianátok (fenil-izotiocianát, dimetil-amino-benzol-izotiocianát)	PTC-, PTH-
danszil-klorid	Dns-
dabszil-klorid (dimetil-amino-azo-benzol- szulfoklorid)	Dbs-
fluor-dinitro-benzolok	DNP-, CDNP-
trinitro-benzolszulfonsav	TNP-
ftálsavanhidridek	DNPT-
nitro-benzodiazolok	NBD-
9-fluorenil-metil-kloroformát	Fmoc-
<i>o</i> -nitro-szulfenilklorid	Nps-
királis reagensek (l. 8.2.3.3. fejezet)	
naftalindikarboxaldehid	
kinolinkarbaldehidek	FQCA-, CBQCA-
fluoreszkamin	FLURAM-
2-metoxi-2,4-difenil-3(2H)furanon	MDPF-
<i>o</i> -ftálaldehid	OPA-

Csoportunkban két izokratikus rendszert dolgoztunk ki Dns-aminosavak, többek között α és ϵ és bis-Dns-lizinek, valamint Dns-peptidek elválasztására. Alapvonal elválasztásokat értünk el ODS-Hypersil oszlopon MeOH-foszfát puffer eluenssel és Partisil-PAC 10 oszlopon 1% ecetsavat tartalmazó acetonitril-víz keverékkel [398, 399]. Az optimált módszert kitűnően tudtuk alkalmazni a szerkezetkutatásban is:

1. Izopeptidek (melyekben az aminosavak nem α -peptid kötéssel kapcsolódnak egymáshoz) primer struktúrájának azonosítása minőségéből következtettünk vissza α vagy izopeptid kötés jelenlétére [414]. Lizin esetében az ϵ -peptidek éles csúcsként α -Dns-lizint, míg az α -peptidek ϵ -Dns-lizint adtak (25. táblázat). A módszer segítségével igazoltuk, hogy a lizinben gazdag klavicepamin fehérjecsald alapvető szerkezeti egységét lizin izopeptidek képezik: klavicepamin mintából csak α -Dns-Lys mutatható ki a vizsgálat során, tehát az ϵ -NH₂ csoportjai vannak kötésben a poli- ϵ -lizinhez hasonlóan [414-416].



21. ábra. Dns-aminosavak elválasztása gradiens elúcióval [409]

Oszlop: Hypersil ODS-5 (150 x 4,6 mm)
 Eluens: A: 10 % CH₃CN–200 mM NH₄HCO₃, pH 7,8
 B: 45 % CH₃CN–200 mM NH₄HCO₃
 Gradiens: lineáris szakaszok: 0-30%B, 25 perc,
 30-45%B, 20 perc,
 45-100%B, 15 perc,
 100%B, 15 perc

Sebesség: 1,0 ml/perc

2. Módszerünk alkalmazható volt elágazó láncú, poli-lizin alapú immuno-polipeptidek felszíni topográfiájának analysisére is. Ezen kísérletben kvantitatív adatokat szolgáltatunk a minta polipeptid "fésűfogainak" szubsztitúciós fokáról, a terminális aminosavakról és a "fogban" levő aminosaveloszlásról [417].

Hasonló stratégiát alkalmazott LEVINA és NAZIMOV [416] Ultra-sphere ODS oszlopon acetonitril–Na-trifluor-acetát (pH 7,6) eluens segítségével, hogy a Dns-aminosav HPLC analízist peptidek tisztaságellenőrzésében felhasználja. Adott mintából N-terminális amino-

savat 2,5 óra alatt tudtak meghatározni, míg a 20 fehérjealkotó aminosav 23 mono és di-Dns származékának szétválasztása, azaz a teljes aminosavanalízis 26 percet vett igénybe. 254 nm-nél detektálva 100 pmólos érzékenységgel dolgoztak.

25. táblázat

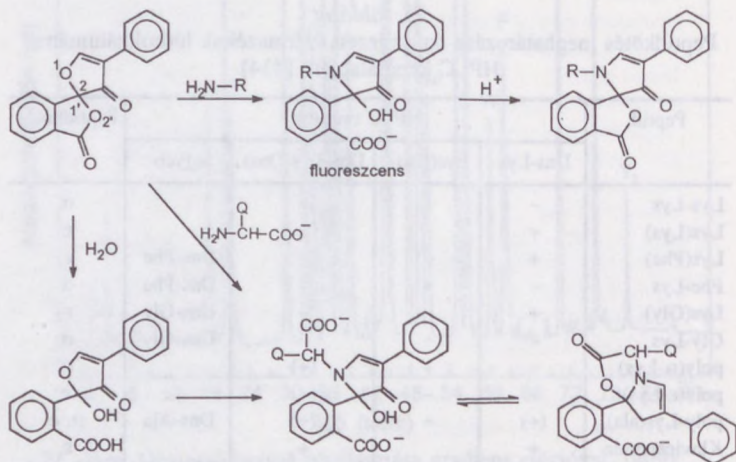
Peptidkötés meghatározása danszilezett származékok hidrolizátumának HPLC képe alapján [414]

Peptid	HPLC csúcsok				Peptidkötés
	Dns-Lys	Lys(Dns)	Dns-Lys(Dns)	egyéb	
Lys-Lys	-	+	+		α
Lys(Lys)	+	-	+		ϵ
Lys(Phe)	+	-	-	Dns-Phe	ϵ
Phe-Lys	-	+	-	Dns-Phe	α
Lys(Gly)	+	-	-	Dns-Gly	ϵ
Gly-Lys	-	+	-	Dns-Gly	α
poly(α -Lys)	-	+	(+)		α
poly(ϵ -Lys)	+	-	(+)		ϵ
poly-Lys(ala) _m	(+)	+	(+)	Dns-Ala	α, ϵ
Klavicepamin	+		+		ϵ

6.2. FLUORESCHKAMIN

A danszil-klorid hosszú reakcióideje miatt nem alkalmas oszlop utáni származékképzéssel történő detektálásra. A WEIGELE által kifejlesztett fluoreszkamin (FLURAM, 4-fenilspiro-[furán-2(3H)-1'-ftalán]-3,3'-dion) önmagában nem fluoreszkáló anyag [422]. Primer aminocsoportot tartalmazó vegyületekkel (aminosavakkal, peptidekkel, fehérjékkel) alkalikus pH-nál (pH 7–9), szobahőmérsékleten pillanatok alatt (reakció felezési ideje 200-500 ms aminosavakon) reagál, és fluoreszcens származékot ad (gerjesztés: 390 nm, emisszió: 475-490 nm) [419, 420]. Aminosavak esetében két fluoreszcens származék képződik egy szekunder gyűrűzárás következtében (22. ábra), melyek el is választhatók [421], ezért aminosavaknál oszlop előtti származékképzésre nem alkalmas. Az aminosavanalízist (23. ábra) oszlop utáni származékképzéssel, azaz egy FLURAM "reaktor" beiktatásával sokkal érzékenyebbé tették [422-426]. A feleslegben lévő reagens néhány másodperces felezési idővel elhidrolizál, s

egy nem fluoreszkáló, vízoldható anyagot ad [419, 420]. A fluoreszkamin szekunder aminokkal (Pro, Glp) nem reagál. Szabad NH₂-csoportok mind oszlop előtti, mind oszlop utáni származékképzéssel nagy érzékenységgel meghatározhatók.



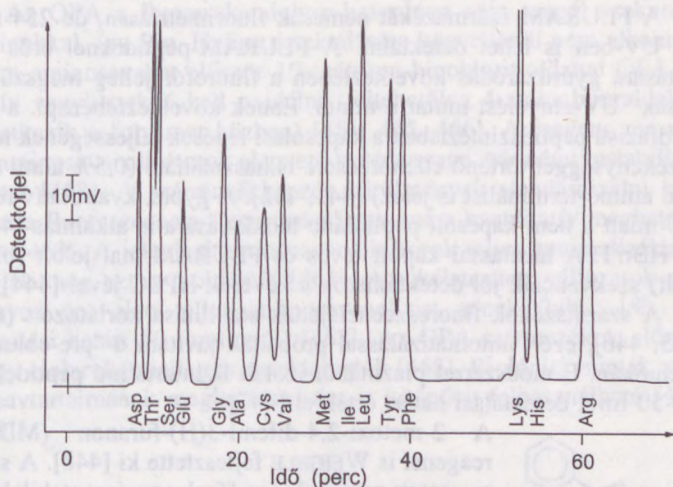
22. ábra. Fluoreszkamin reakciója aminosavakkal

A FLURAM kitűnően használható peptidok jelölésére és detektálására mindkét kivitelezési módban: a FREI-iskola az oszlop utáni felhasználást dolgozta ki peptidhormonokra [427-429], míg UDEFRIEND és csoportja oxitocin és vazopresszin analízisét oldotta meg "pre-column" reakció felhasználásával [430-432]. A származékokat pmól szinten Partisil ODS oszlopon, acetonitril gradienssel kromatografálták fluorimetriás detektálás mellett.

Natív kininek és metabolitjaik elemzésében a fluoreszkaminos jelzéssel 400-szoros érzékenységnövekedést értek el az UV-detektáláshoz képest [435]. FLURAM-jelzett kininek analógjaik és metabolitjaik HPLC analízisét NARAYANAN és GREENBAUM kvantitatív módszerre fejlesztették [436].

LIVE [423] az [Arg⁸]-vazopresszin, az oxitocin és 16 analógjuk FLURAM-származékának HPLC analízisét oldotta meg Whatman Partisil-10 ODS oszlopon. Ezen peptidok elválasztását és oszlop utáni fluoreszkaminos detektálását a FREI-csoport normál és ioncserés fordított fázisú feltételek mellett is megoldotta. A FLURAM

RP-HPLC használatát opioid peptidekre is kiterjesztették [433, 437]: α - és γ -endorfint (500 ng) mértek Lichrosorb RP18 oszlopon *n*-propanol-1 M piridin-0,5 M ecetsav eluenssel kromatografálva oszlop utáni származékképzéssel [431].



23. ábra. Aminosavanalízis fluoreszkaminnal

- Módszer: oszlop utáni származékképzés
 Oszlop : Micro Pak AA
 Minta: peptid hidrolizátum (5 nmól)
 Eluens: A: Varian puffer 1 (pH 3,5, 0,2 M)
 B: Varian puffer 2 (pH 7,4, 1,0 M)
 Reagens: A: 0,1 M K-borát
 B: 0,4 mg/ml FLURAM acetonban
 Sebesség: 0,3 ml/perc

WU a különböző enkefalinok FLURAM-származékainak elválasztását μ Bondapak C_{18} oszlopon Tris pufferben (pH 7,4), metanol gradiens alkalmazásával oldotta meg [438]. A fluoreszkaminos származékképzést nanogrammos érzékenysége teszi előnyösebbé a többi módszerhez képest.

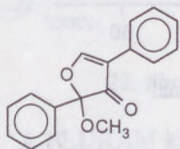
Laboratóriumunkban az α -MSH metabolizmus vizsgálat előkészítése során azt találtuk, hogy a FLURAM megfelelő reagens az α -MSH 12 fragmensének jelölésére is. A származékok elválasztásá-

ra ODS-Hypersil oszlopot használtunk acetonitril-víz-0,1% TFA gradiens elúcióval.

Fehérjék vizsgálatánál triptikus peptidterképek készítéséhez mindkét változatban használják e reagenst: YANG oszlop előtti [439], KOHR oszlop utáni [440] származékképzést használt.

A FLURAM származékát nemcsak fluorimetriásan, de 254 nm-en UV-ben is lehet detektálni. A FLURAM-peptideknél erős sav hatására gyűrűzáródás következtében a fluorofór jelleg megszűnik, "csak" UV-elnyelést mutat a minta. Ennek következtében pl. a szilárdfázisú peptidszintézisben a kapcsolási lépések teljességének nagy érzékenységgel történő ellenőrzésére is használható (0,5% alatti szabad amino-terminálist is jelez) [441, 442]. A gyors, kvantitatív reakció miatt a nem kapcsolt peptidlánc blokkolására is alkalmas [443]. A HBr/TFA hasítással kapott téves és FLURAM-mal jelölt (blokkolt) szekvenciák jól detektálhatók a keverék HPLC-jével [444].

A származékok fluoreszcenciájának stabilitása korlátozott [436, 445, 446], ezért automatizálással próbáltak javítani a "pre-column" technikán. E módszerrel plazmából izolált lizintartalmú peptideknél 30-50 fmól detektálási határt értek el [447].



A 2-metoxi-2,4-difenil-3(H)-furanon (MDPF) reagenst is WEIGELE fejlesztette ki [448]. A származtatott peptid-fluoro-fórok egyrészt stabilabbak a FLURAM- ból készülteknél (még szélsőséges pH-értékeknél is) [431], másrészt a vegyületek hidrofób karaktere is nagyobb (egy COOH és egy metoxicsoport különbség is van), mely kis peptideknél segíti az RP töltet alkalmazását [449]. RUBINSTEIN Met- és Leu-enkefalint választott szét fordított fázisú oszlopon MDPF származékokon keresztül pikomól mennyiségben [450].

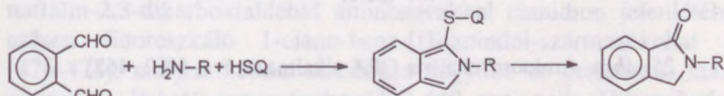
6.3. AROMÁS ALDEHIDEK

A ROTH által bevezetett *o*-ftálaldehid (OPA) szintén bázikus körülmények között, redukáló segédanyag (pl. merkaptóetanol) jelenlétében gyorsan (felezési idő 4 s) reagál aminocsoportot tartalmazó vegyületekkel. A termék szubsztituált izoindolszármazékok erős fluoreszcenciát mutatnak (gerjesztés: 340 nm, emisszió 455 nm) [451]. A reakciót és a származékok tulajdonságait SIMMONS és

JOHNSON vizsgálta részletesen [452-454]. A reagenst az oszlopkromatográfiába szintén ROTH vezette be [455].

Hamar kidolgozták az OPA-származékon alapuló aminosavanalízist is [456-464], melyek túlnyomó többsége oszlop előtti származékképzést és RP-HPLC-t használ (25. ábra).

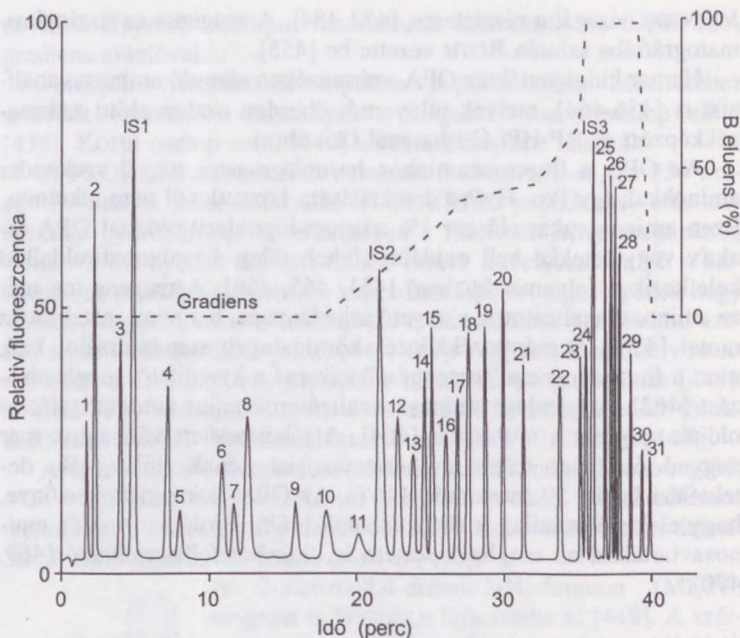
Az OPA a fluoreszkaminhoz hasonlóan nem reagál szekunder aminokkal, így Pro, HyPro detektálására közvetlenül nem alkalmas. Ezen aminosavakat először 1% nátrium-hipoklorit-oldattal OPA-reaktív vegyületekké kell oxidálni (feltehetőleg 4-aminobutiraldelhid keletkezik a folyamat közben) [451, 465, 466]. A reagens ma már az aminosavanalizátorok alapvető segédanyaga, bár némi instabilitást mutat [458]. A származékképzés körülményeit standardizálni kell, mert a fluoreszcencia "lecsengése" zavarná a kvantitatív meghatározást [463]. A jelenlegi aminosavanalizátorok teljes automatizálással oldják meg ezt a problémát [464]. A tökéletesített változatok már negyed óra alatt teljes aminosavanalízist adnak (hiba: 1%, detektálási határ: 50 femtomól) [467]. Az OPA-származékok előnye, hogy elektrokémiailag is detektálhatók [468]. Biológiai minták aminosavtartalmának meghatározására is kitűnően felhasználható [469, 470].



o-ftálaldehid

	R	Q
Simmons-vegyület	$-\text{C}_3\text{H}_7$	$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$
aminosavak	$-\underset{\text{R}'}{\text{CH}}-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$
peptidek	$-\text{NH}-\underset{\text{R}'}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{R}''}{\text{CH}}-\text{CO}-$	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$

24. ábra. *o*-Ftálaldehid reakciója aminocsoporttal



25. ábra. Aminosavanalízis OPA alkalmazásával [462, 463]

Oszlop : Ultrasphere ODS-5 (150 x 4,6 mm)

Eluens : **A**: H₂O–Na-foszfát pH 6,5–CH₃CN 72:20:8

B: H₂O–CH₃CN–MeOH–DMSO 42:30:25:3

Komponensek:

- | | | |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| 1. foszfoszerin | 12. glicin | 24. metionin |
| 2. aszparaginsav | 13. treonin | 25. triptofán |
| 3. glutaminsav | 14. citrullin | 26. fenilalanin |
| 4. cisztin | 15. arginin | 27. izoleucin |
| 5. α-amino-adipinsav | 16. 3-metil-hisztidin | 28. leucin |
| 6. aszparagin | 17. β-alanin | 29. hidroxilizin |
| 7. homocisztin | 18. alanin | 30. ornitin |
| 8. szerin | 19. taurin | 31. lizin |
| 9. hisztidin | 20. tirozin | IS1. homociszteinsav |
| 10. glutamin | 21. γ-aminovajsav | IS2. homoszerin |
| 11. etanol-amin-foszfát | 22. etanol-amin | IS3. norvalin |
| | 23. valin | |

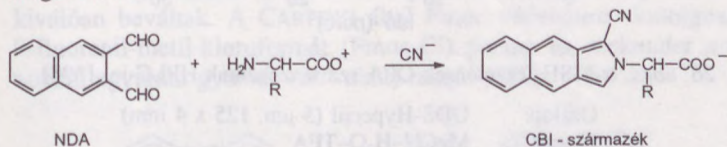
Cisztein* és cisztin megbízható meghatározására BARKHOLT és JENSEN dolgozott ki új módszert: 3,3'-ditiidipropionsavval előkezelt mintákat reagáltattak *o*-ftáldaldehyddel az előzőek szerint [471].

Hazánkban PINTÉR [469] dolgozott ki eljárást szabad aminosavak OPA-származék formájában történő meghatározására. Peptidek esetén kimutatták, hogy a fluorogén detektálás a peptidek lizintartalmától, azaz a szabad ϵ -amino-csoportoktól függ [473].

A reagenst triptikus peptidterképek készítésénél (5 nmól-10 mmól mérettartományban) oszlop utáni reakcióban is használják [474]. A peptid-OPA származékok szeparálás utáni tömegspektrometriás peptidszekvenciálásra is alkalmasak [475].

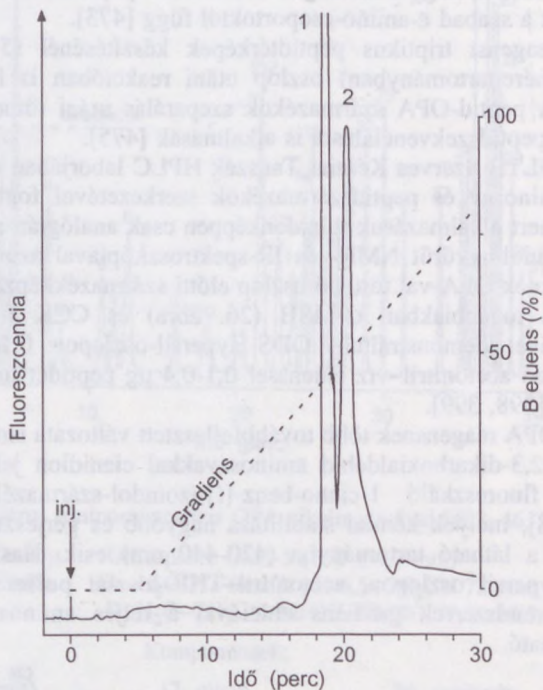
Az ELTE Szerves Kémiai Tanszék HPLC laborjában először az OPA-aminosav és peptidszármazékok szerkezetével foglalkoztunk [399], mert alkalmazásuk tulajdonképpen csak analógián alapult. Az izokinolingyűrűt NMR- és IR-spektroszkópiával azonosítottuk. Peptideknek OPA-val történő oszlop előtti származékképzési lehetőségeit a továbbiakban α -MSH (26. ábra) és CCK fragmensek analízisével demonstráltuk: ODS-Hypersil-oszlopon 0,1% TFA-t tartalmazó acetonitril-víz eluenssel 0,1-0,4 μ g peptidet tudunk detektálni [398, 399].

Az OPA reagensnek több továbbfejlesztett változata ismeretes. A naftalin-2,3-dikarboxialdehyd aminosavakkal cianidion jelenlétében erősen fluoreszkáló 1-ciano-benz-[f]-izoindol-származékokat ad [476-478], melyek kémiai stabilitása nagyobb és gerjesztési maximumuk a látható tartományba (420-440 nm) esik. Használatával ODS-Hypersil oszlopon, acetonitril-THF-foszfát puffer (pH 3,0) oldószerrendszerrel, gradiens elúcióval a teljes aminosavanalízis megoldható.



* Cys-peptidek szabad SH-csoportja egyébként oszlop előtti szelektív származékképzése kitűnően felhasználható. A fenti eset az SH közvetett kihasználását jelentette OPA reagensen keresztül. Tiotartalmú minták (glutation, ciszteamin, cisztein és származékai, "Captopril") meghatározásának érzékenységét *p*-nitro-benzil-bromiddal (UV-detektálás) vagy ammónium-7-fluor-benzo-2-oxa-1,3-diazol-4-szulfonáttal (fluoreszcenciás detektálás: gerjesztés 380 nm, emisszió 515 nm) való reakcióval növelték [472].

Peptidek közül pl. az enkefalinok plazmában és agyban történő meghatározására használták a módszert (0,31 nmol/ml koncentrációnál, 25 pmól injektálásnál, 4% hibával) [479, 480] az aminosavakra alkalmazott kromatográfiás körülmények között.



26. ábra. α -MSH fragmentek OPA-származékainak HPLC-je [398]

Oszlop: ODS-Hypersil (5 μ m, 125 x 4 mm)

Eluens: MeCN-H₂O-TFA

A: 15:85:0,1 B: 90:10:0,1

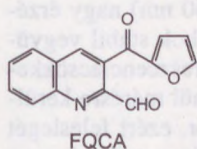
Sebesség: 1,4 ml/perc

Detektálás: Waters M20 fluoriméter

Csúcsazonosítás 1: 0,3 μ g H-9-10-OH,

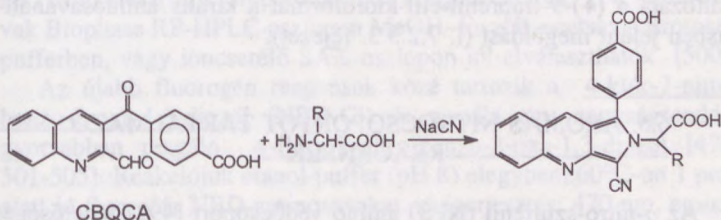
2: 0,2 μ g H-11-13-NH₂

Az eddigi fluorofór származék gerjesztési maximuma nem a rendelkezésre álló fényforrások optimumába esik, ezért újabb reagenseket is kifejlesztettek a detektálási érzékenység növelése céljából [481-485].



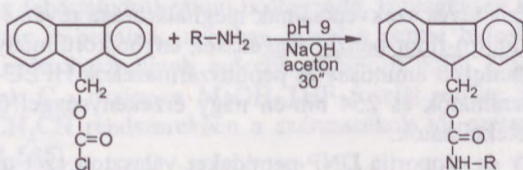
A 3-(2-furoil)kinolin-2-karbaldehid (FQCA) aminosavszármazékok lézer-indukált fluoreszcencia alapján (gerjesztés 488 nm) femtomólos detektálási határral mérhető C_{18} oszlopon acetonitril-trietil-ammonium-acetát gradiens rendszerben. A reagens jelentős hidrofób jellege miatt tripeptidnél nagyobb peptidekre nem vált be [484].

A 3(4-karboxibenzil)-2-kinolinkarboxaldehidet (CBQA) triptikus fragmensek mérésére használták (gerjesztés: 442 nm, emisszió: 550 nm), s 10^{-18} mól detektálhatósági szintet értek el [485].



6.4. FLUORENIL-METIL-KLOROFORMÁT

Vannak a peptidszintézisben amino védőcsoport kiépítésére használatos reagensek, melyek az oszlop előtti származékképzésben is kiválóan beváltak. A CARPINO által Fmoc védelemre kidolgozott 9-fluorenil-metil-kloroformát (Fmoc-Cl) primer és szekunder aminokkal egyaránt gyorsan (30" alatt) reagál [486]:



Enyhe körülmények között készíthető Fmoc-aminosavak HPLC-s mérése, elválasztása és meghatározása teljes aminosavanalízist is jelent. Az Fmoc-védőcsoport nem poláros jellege folytán kitűnő RP-HPLC-re (20 perc analízis idő), fluorimetriásan (gerjesztés: 270 nm, emisszió: 315 nm) és UV tartományban is (260 nm) nagy érzékenységgel (fmól) detektálható. A Fmoc származékok stabil vegyületek, csak a His-nél tapasztaltak időben lassú fluoreszcenciacsökkenést [487-489]. Az Fmoc-védett peptidek közvetlenül mérésre kerülhetnek! Megjegyzendő, hogy a reagens is fluorofor, ezért feleslegét a minta előkészítése során el kell távolítani (pentán extrakció vagy hidrofób aminnal való reagáltatás) [489]. Fiziológiás körülmények között előforduló szabad aminosavak mennyiségi meghatározására is megfelelő módszer [490]. A HPLC-s aminosavanalízisben sokszor OPA/Fmoc kombinációban alkalmazzák [491]. A reagens homológ változata a (+)-9-fluorenil-etil-kloroformát a királis aminosavanalízisben jelent megoldást (l. 7.2.3.3. fejezet).

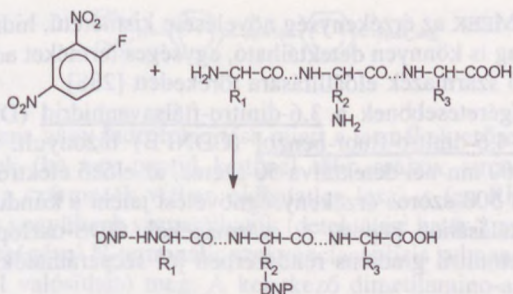
6.5. AROMÁS NITROCSOPORTOT TARTALMAZÓ REAGENSEK

Az *o*-nitro-szulfenil (NPS) amino védőcsoport [492] lehetőséget ad Trp tartalmú peptidek komplex enzimatikus bontással készült peptidkeverékekből történő szelektív izolálására és meghatározására. A reagens a Trp 2-es helyzetben [493] való módosításával hidrofobicitás és ezáltal kromatográfiás mozgékonyagsváltozást okoz (μ Bondapak C₁₈ oszlop, trifluor-ecetsav-tartalmú acetonitril gradiens, detektálás: UV (210 nm) és fluorimetria (gerjesztés: 287 nm, emisszió: 348 nm)).

A SANGER által bevezetett 2,4-dinitro-fenil-csoport [494] a szerkezetkutatásban tölt be fontos szerepet az N-terminális, a szabad lizin ϵ -aminocsoportok, a kötéstípus (α és izopeptid) és a szilárdfázisú szintézis téves szekvenciáinak meghatározása révén.

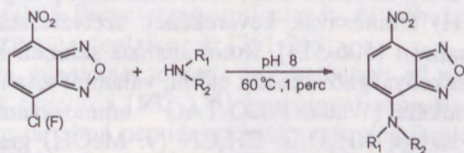
A 2,4-dinitro-fluor-benzol reagenssel, enyhe körülmények között keletkező acilezett aminosav és peptidszármazékok HPLC-vel könnyen szeparálhatók és 254 nm-en nagy érzékenységgel (nanogram szinten) detektálhatók.

SALLAY és csoportja DNP-peptideket választott szét μ Bondapak C₁₈ oszlopon, 1% ecetsavat tartalmazó acetonitril gradienssel [444, 495].



A fenti célokra 2,4,6-trinitro-fenil-csoport (TNP) is alkalmazható, melyet 1959 óta 2,4,6-trinitro-benzolszulfonsav segítségével építenek ki a molekulán [499]. Kvantitatív reakcióban jó kromofór (350 nm-nél) és jó elektrofor (amperometriás) származékot ad. TNP-aminosavak Biophase RP-HPLC oszlopon MeOH–foszfát–ecetsav–citromsav pufferben, vagy ioncserélő SAX oszlopon jól elválaszthatók [500].

Az újabb fluorogén reagensek közé tartozik a 4-klór-7-nitro-benzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) és a nála egy nagyságrenddel gyorsabban reagáló 4-fluor-7-nitro-benzo-2-oxa-1,3-diazol [472, 501-505]. Reakciójuk etanol-puffer (pH 8) elegyben, 60°C-on 1 perc alatt jó fluorofór NBD-aminosavakat ad (gerjesztés: 470 nm, emiszió: 530 nm):



Előnyük, hogy primer és szekunder aminocsoporttal is reagálnak, detektálási határ: 10 fmól aminosav. Egy aminosav-profil felvételéhez 1,5 µg fehérjehidrolizátum is elegendő. E reagensek kisebb peptidok esetén is beváltak, azonban mivel a peptid hidrofób jellegét növelik, ezért használatuk erősebb organofil erejű eluentot kíván. µBondapak C₁₈ oszlopon MeOH–THF–foszfát puffer, ill. puffer–MeOH–CH₃CN rendszerekben a származékok jól szétválaszthatók [472, 501-505].

Mivel a peptidok detektálási érzékenysége 210 nm-en túl alacsony ahhoz, hogy neuropeptideket szöveti extraktumokban mérni

lehesse, MEEK az érzékenység növelésére kisméretű, hidrofil, elektrokémiailag is könnyen detektálható, egységes terméket adó reagenssel történő származék előállítására törekedett [288].

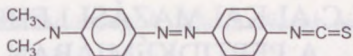
A legígéretesebbnek a 3,6-dinitro-ftálsavanhidrid (DNPT) és a 2-karboxi-4,6-dinitro-fluor-benzol (CDNFB) bizonyult. Az utóbbi UV-ben 360 nm-nél detektálva 50-szeres, az előző elektrokémiai detektálással 500-szoros érzékenységnövelést jelent a kiindulási peptid UV-detektálásához képest. A származékok ODS-oszlopon foszfát puffer-acetonitril gradiens rendszerben jól szeparálhatók és mérhetőek [288].

6.6. IZOCIANÁTOK

Az izocianát típusú származékképzők a peptidek és fehérjék szerkezetelemzésében és kutatásában kettős jelentőséggel bírnak: egyrészt érzékeny aminosavanalízist tesznek lehetővé, másrészt a szekvenanciaanalízisben, pontosabban fogalmazva: a mikroszekvenálásban kulcsszereppel rendelkeznek. Az első esetben karbamoilaminosavak, a másodikban a szekvenálás során keletkező hidantoinok HPLC elválasztását és mérését oldják meg. A leggyakrabban használt reagens a fenil-izotiocianát (PITC), melynek mindenképpen előnye e kétcélú alkalmazhatóság: aminosavanalízisben a megfelelő fenil-tiokarbamoil aminosavakat, szekvenálásnál pedig a fenil-tiohidantoin (PTH) aminosavak keverékének szétválasztása jelenti az ultramikroanalízist [506-514]. Rutin analízis szintjén is sikerült kb. 50-szeres érzékenységnövekedést elérni, valamint az analízis időt kb. 20 percre redukálni (Waters PICO-TAGTM aminosavanalizátor, C₈ v. C₁₈ szilika oszlop, NH₄OAc-CH₃CN (v. MeOH) gradiens elúció, 254 nm).

1-Naftil-izocianát alkalmazásával erősen fluoreszkáló (gerjesztés: 238 nm és 305 nm, emisszió: 385 nm), stabil, UV-ben 222 nm-en is detektálható naftilkarbamoil aminosavak keletkeznek, melyek érzékeny aminosavanalízist biztosítanak (C₁₈ szilika oszlop, acetonitril foszfát puffer gradiens) [516].

CHANG úgy módosította az Edman-reagenst, hogy a látható fényt is abszorbeálja [517]. A dimetilamino-azo-benzol-izotiocianát segítségével N-terminális szekvenancia-meghatározás és aminosavanalízis is megvalósítható.



A reagens nagy hidrofobicitása miatt a termékek erősen hidrofóbak lesznek (ha egy peptid kettőnél több reaktív aminocsoportot tartalmaz, a származék vízben oldhatatlan lesz), s így RP-kromatográfiával a vegyületek szeparálhatók (detektálási határ 2 pmól) [518-520]. Segítségével N-terminális szekvenciaanalízis subnanomól érzékenységgel valósítható meg. A keletkező dimetilamino-azo-benzothiohidantoinok maguk is színes vegyületek és RP-HPLCvel 1 pmól érzékenységgel meghatározhatók. Automatikus szekvenátor vagy radioaktívan jelzett reagens segítségével 1 nmólnál kevesebb peptid teljes szekvenciáját meg lehet így határozni [521].

A danszil-klorid analógiából kiindulva a megfelelő szulfonsav-klorid-származékot is elkészítették [522, 523]. A dimetil-amino-azo-benzolszulfoklorid reagens (DABS-Cl) danszil-klorid segítségével nagy érzékenységgű aminosavanalízis valósítható meg. C_{18} oszlopon mind a 19 természetes aminosav szeparálható két különböző gradiens rendszer (acetonitril-puffer) alkalmazásával. 436 nm-nél detektálva 2-5 pmól aminosav is jól mérhető, és így a teljes aminosavanalízishez csak 10-30 μg reagáltatott peptid hidrolizátumra van szükség. Egyszerűbb, de ugyanolyan érzékeny módszer, mint a fluorofor technikák és C-terminális meghatározásra is kitűnően bevált [524-526]. A megfelelő fluorescein-izotiocianát- és thiohidantoin-származékokkal TUZIMURA foglalkozott [261-262].

Az arginin guanidincsoportja is lehetőséget ad származékképzésre. KAI és csoportja [532-535] benzoinnal angiotenzineket, leupeptint és Arg-tartalmú peptideket határozott meg femtomólos érzékenységgel (Vydac C_{18} oszlopon, TEAP puffer (pH 8,5)-acetonitril gradiens, fluorimetriás detektálás (gerjesztés: 325, emisszió: 418 nm)).

A benzoin *N*-szubsztituált guanidinekkel 2-szubsztituált amino-4,5-difenil-imidazolt ad. A módszert TOMORI [861] véralvadásgátló Arg-tripeptidaldehidek vizsgálatánál alkalmazta.

7. A HPLC ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEI A PEPTIDKÉMIÁBAN

A peptidvegyész munkájának majdnem minden fázisában óriási segítséget jelenthet a HPLC. A teljesség igénye nélkül bemutatunk néhány példát és területet, ahol a HPLC sikeresen alkalmazható:

- kiindulási anyagok, intermedierek tisztaságvizsgálata,
- peptidkapcsolás nyomon követése (kvantitatív módon is),
- reakciók optimálása, kapcsolási intermedierek felderítése,
- védőcsoport eltávolítások ellenőrzése, peptidészter hidrolízisek,
- mellékreakciók (transzpeptidáció, oxidáció, deszulfatálás, alkileződés, dezamidálódás, racemizációk, epimerizációk, ciklizáció stb.) kimutatása,
- optikai tisztaságvizsgálat,
- szilárdfázisú szintézissel készült termékek hibás peptidjeinek kimutatása,
- preparatív tisztítások kromatográfiás feltételeinek optimálása és ellenőrzése,
- szemipreparatív és preparatív tisztítások,
- szintetizált peptid végtermékek tisztaságvizsgálata,
- szerkezetanalízis, szekvenálás,
- aminosavanalízis, jellemzés,
- új reagensek, kapcsolások minősítése (racemizációs tesztek).

7.1. HPLC ALKALMAZÁSA A PEPTIDSZINTÉZISBEN

VOELTER és mtsai azonnal felismerték a HPLC peptidkémiai alkalmazásában rejlő lehetőségeket [158-68]. Az ELTE Szerves Kémiai Tanszék és az MTA Peptidkémiai Kutatócsoport HPLC laboratóriumában 1978 óta használják a HPLC-t a szintetikus munka támogatására [547-550].

7.1.1. Kiindulási anyagok, intermedierek vizsgálata

A peptidszintézisek kiindulási anyagait jelentő amino-, ill. karboxil-védett aminosavszármazékok tisztasága RP-HPLC-vel jól ellenőrizhető.

A kiindulási aminosavakhoz képest a védőcsoportokkal (uretán típusú $-NH_2$, észter típusú $-COOH$ és változatos oldallánc védőcsoportokkal) ellátott származékok retenciós ideje nagyobb és detektálhatósági lehetőségei is javulnak. A Z, Boc, Tos mint amino védőcsoportok, és alkil (Me, Et, Bu¹) és benzilészter mint karboxil védőcsoportok nagy hidrofobicitásuk miatt fordított fázisú oszloponokon növelik a retenciós időt. Az aromás csoportok egyúttal kedvező kromoforok is (250-280 nm).

Monoaminodikarbonsavaknál az α -észterek gyakran szennyezettek ω -észterrel és viszont. RP-HPLC-vel az *N*-benzil-oxi-karbonil-glutaminsav α -benzilészterben a megfelelő γ -észter kvantitatíve meghatározható, s ez természetesen vonatkozik az α -észter szennyeződésekre is [548]. C₁₈-as analitikai oszlopon, MeOH-acetát puffer (pH 4) 1:1 eluensben, 254 nm-nél detektálva 3 perces (!) retenciós idő különbség van az α - és γ -izomer között (27. ábra).

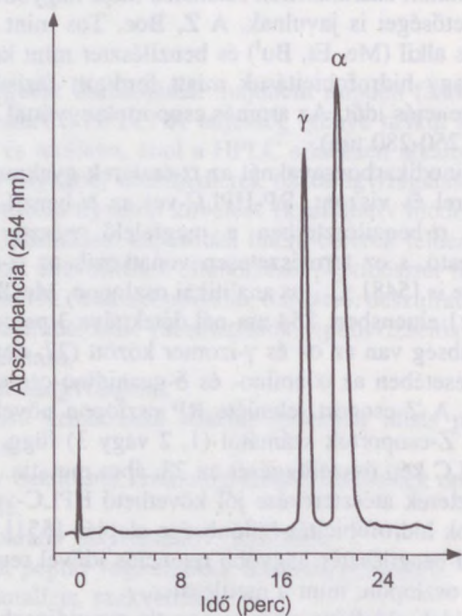
Arginin esetében az α -amino- és δ -guanidino-csoportot gyakran Z-vel védik. A Z-csoport jelenléte RP oszloponon növeli a retenciós időt, mely a Z-csoportok számától (1, 2 vagy 3) függ. A TLC adatok és a HPLC kép összefüggését az 28. ábra mutatja.

Peptidészterek átészterezése jól követhető HPLC-vel az észtere-sítő alkoholok hidrofobicitás-különbsége alapján [551] (29. ábra). A védett peptid-benzilészter nagyobb retenciós idővel rendelkezik fordított fázisú oszloponon, mint a metilészter.

Orn-peptidek oldallánc aminocsoportja guanidinezhető, így Arg-peptidekhez jutunk. A guanidinezési reakció Aquapore-RP oszloponon jól követhető. Enyhe CH₃CN-TFA gradienssel az Orn és Arg peptidek jól elválaszthatók egymástól [552], ezáltal a különböző guanidinező reagensek értékelésére lehetőség nyílik.

N-alkoxi-karbonil aminosavak, vegyes anhidridek és szimmetrikus anhidridek HPLC profiljának elemzéseit BENOITON végezte el és megállapította a racemizáció mértékét is [553]. Az általuk kidolgozott RP-HPLC rendszerben összehasonlította a különböző kloroformátokat is racemizáció, kapcsolási hatékonyság és uretánképződési mellékreakció szempontjából [554, 555]. Mivel az RP-HPLC vizes rendszerei nem megfelelőek aktivált aminosavszármazékok

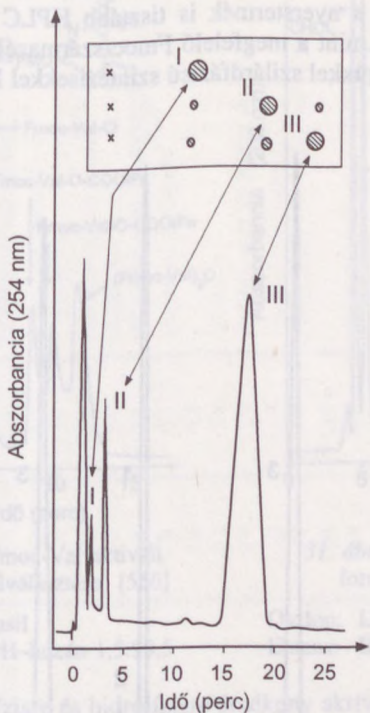
vizsgálatához, normál fázisú HPLC rendszert dolgoztak ki 2,4-diszubsztituált-5(4H)oxazonok, szimmetrikus és vegyes anhidridek és más aktivált formák szeparálására *N*-acil és *N*-alkoxikarbonil aminosavak esetén (Lichrosorb CN vagy μ Porasil oszlop 1,5-5% *tert*-butanol tartalmzó hexán eluenssel) [556] (30-31. ábra). Ugyanabban a rendszerben oldották meg Fmoc-aminosavkloridok, vegyes anhidridek és észterek egymás melletti analízisét is [557].



27. ábra. N^Z -védett glutaminsav és benzilészter elválasztása [414]

Oszlop: ODS-Hypersil-6 (125 x 4 mm)
 Eluens: MeOH-0,01 M Na-acetát (pH 4,0)
 50:50 (v/v)
 Sebesség: 1,1 ml/perc

Az α -MSH és ACTH fragmensek észterei jól megkülönböztethetők a szabad savaktól, mivel az észter \rightarrow COOH átalakulás hidrofobicitás, s így retenciós idő csökkenéssel jár (26. táblázat).



28. ábra. Z-védett Arg-származékok vizsgálata [414]

VRK: szilikagél 60 (Merck)

futtató: n-BuOH-AcOH-H₂O 4:1:1 (v/v)

HPLC: oszlop: ODS-Hypersil-6 (125 x 4 mm)

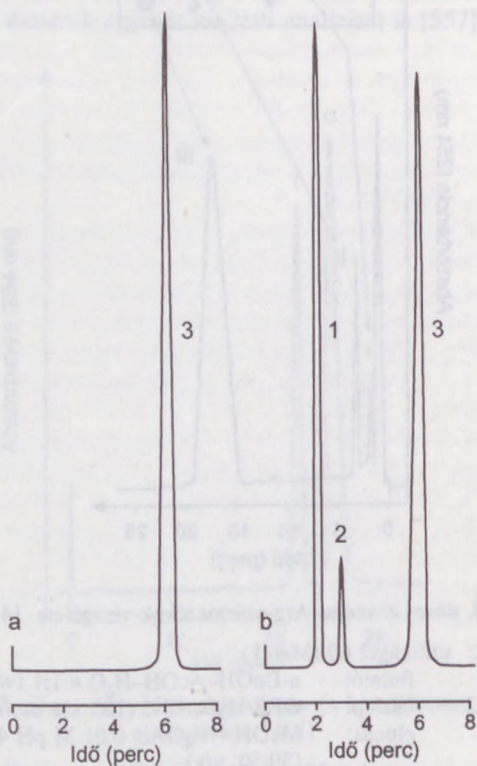
eluens: MeOH-NH₄OAc, 0,01 M pH 4
(50:50, v/v)

sebesség: 1,1 ml/perc

Minta: I. Z-Arg(OH) II. Z-Arg(Z)OH III. Z-Arg(Z)₂OH

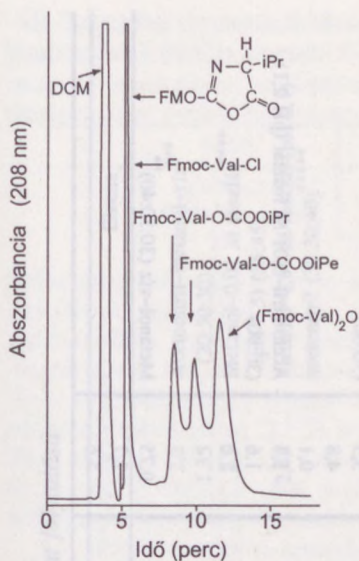
Fmoc-aminosavaknál a 9-fluorenil-metil-kloroformáttal aminosavból történő előállítás során aminosavkondenzációs mellékreakciókból származó, vékonyrétegen nem látható dipeptid szennyezéseket (1-3%) C₁₈ oszlopon MeOH-H₂O-0,1% TFA eluens rendszerrel ki lehet mutatni [562]. Fmoc-nál valamivel stabilabb Mpc (2-[4-(metil-

szulfonil)-fenil-szulfonil]-etoxi-karboxil)-csoportot tartalmazó aminosavak esetén már a nyerstelem is tisztább HPLC képet mutat (detektálás 215 nm), mint a megfelelő Fmoc-származékok [563], ez vonatkozik a segítségükkel szilárdfázisú szintézisekkel készült peptidre is.



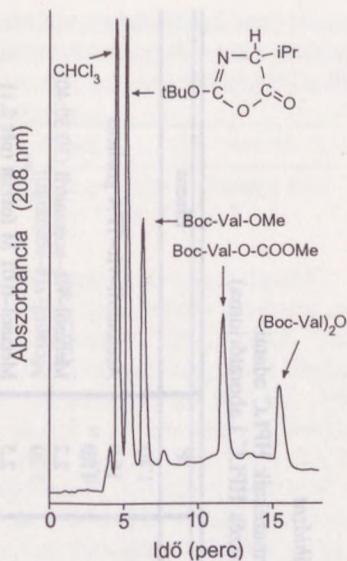
29. ábra. Boc-Ile-Gly-OBzl átészteressítése [551]
(metanol, Ca-acetát, 3 óra, 38 °C)

- Komponensek:
- 1 - benzil-alkohol
 - 2 - átészteressített peptid
 - 3 - Boc-Ile-Gly-OBzl



30. ábra. Fmoc-Val aktivált formáinak elválasztása [556]

Oszlop: μ Porasil
 Eluens: Bu¹OH-hexán 1,5:98,5



31. ábra. Boc-Val aktivált formáinak analízise

Oszlop: LiChrosorb-CN
 Eluens: Bu¹OH-hexán 1,5 : 98,5

Aminolízisre és hidrolízisre érzékeny aktív észterekromatográfiája RP-HPLC-vel jól megoldható, ha semleges vagy enyhén savas eluenseket használunk: NACHTMANN [564, 565] Z-Glu-*p*-nitro-fenil-észtereket pH 7,0-nél, laboratóriumunk Z-Lys-*p*-nitro-fenil-észtereket pH 4,0-nél mért sikeresen [548], ráadásul a *p*-nitro-fenil-észter-csoport igen hasznos kromofórnak bizonyult a detektálásnál.

Sok esetben elsősorban Pro és Gly végű peptideknél észterhidrolízissel jutnak az aktiválható peptidhez: α -MSH-, ACTH-, enkefalin- és MIF-származékok adatai jól mutatják (26. táblázat), hogy a védett peptidsavak a megfelelő alkil-észterek előtt eluálódnak, mivel polárosabbak, mint a megfelelő metil-észterek (vagy amidok) [547-550].

26. táblázat

Neuropeptidok és származékaik HPLC adatai
(ELITE Szerves Kémiai Tanszék HPLC Laboratóriuma)

Peptid	t_R	k'	Eluens
<i>α-MSH származékok*</i>			
α -MSH	19,8	15,0	Acetonitril-víz-TFA gradiens
α -MSH-Met(O) ⁴	15,6	11,0	
Z-11-T-NH ₂	3,1	2,2	Metanol-víz-acetonitril (30:30:40)
Boc			
H-1-4-OH	3,4	2,5	Metanol-0,01 M foszfát (pH 2,1)
H-1-4-OMe	4,3	3,5	(30:60)
Ac-1-4-OMe	5,9	4,8	
H-11-13-NH ₂	1,8	0,1	
H-5-7-OH	2,7	1,3	Acetonitril-0,01 M foszfát (pH 2,1)
H-8-10-OH	3,9	1,6	(30:90)
H-1-4-OH	5,0	2,0	
MIF			
Pro-Leu-Gly-NH ₂	1,4	0,75	Metanol-víz (30:30:40)**
Z-Pro-Leu-Gly-NH ₂	3,0	2,7	
Z-Pro-Leu-Gly-OMe	5,3	5,6	

26. táblázat folytatása

Peptid	t_R	k'	Eluens
<i>Enkephalinok</i>			
Z-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OMe	3,2	2,2	Acetonitril-metanol-víz (20:50:30)***
Z-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH	2,35	1,35	Metanol-0,01 M foszfát (pH 7,5) (55:45)****
Met ⁵ -enkaphalin-Arg ⁶ -Phe ⁷	7,2	3,5	Metanol-0,01 M foszfát (pH 2,1)- acetonitril (30:30:40)*****
Z-enkephalin-Lys ⁶ -Lys ⁷ -Gly ⁸ -Gln ⁹ -OBu ^t	3,9	2,85	
Boc Boc			
<i>ACTH</i>			
Boc-11-14-OMe	3,30	2,30	Metanol-víz-acetonitril** (30:30:40)
(Z)			
Boc-11-14-OH	1,90	0,90	
(Z)			
Boc-15-19-OH	2,80	1,80	
Z Z Tos Tos			

* Oszlop: ODS-Hypersil-6, 125 x 4 mm

** Sebesség: 1,1 ml/perc

*** Sebesség: 1,4 ml/perc

**** Sebesség: 1,1 ml/perc, oszlop: 250 x 4 mm

***** Sebesség: 1,5 ml/perc

A peptidszintézisben intermediereként szereplő hidrazidok RP-oszlopon nagyobb retenciót mutatnak, mint az előállításokhoz használt alkilészterek:

Oszlop	Eluens	Peptid	k'
ODS-Hypersil	MeOH-H ₂ O-CH ₃ CN 50:10:40 (v/v)	Z-Phe-Leu-OMe	1,6
		Z-Phe-Leu-NHNH ₂	2,4

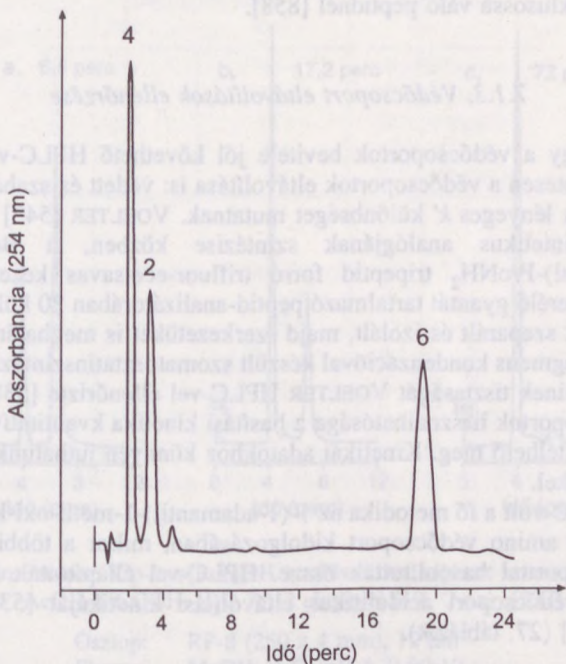
Mivel a peptidszintézis lépései nem 100 %-osak, a termékek tisztaságának vizsgálatánál az összes intermedierre figyelemmel kell lenni. Az RP-HPLC teremtett lehetőséget arra, hogy a főtermékhez hasonló szennyezéseket kvantitatíve értékelni lehessen. NACHTMANN [564, 565] az oxitocinszintézis valamennyi intermedierjének elválasztását megoldotta, és a kidolgozott HPLC módszereket használta fel a lépések optimalizálására, hogy a lehető legnagyobb hozamot érjék el. Védett oxitocin fém Na/cseppfolyós NH₃-val történő redukcióját kombinált HPLC elektrokémiai módszer segítségével optimalták meg a kutatók; a nagyobb oxitocinhozam érdekében [566].

7.1.2. Kapcsolások nyomkövetése

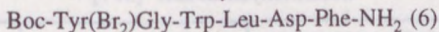
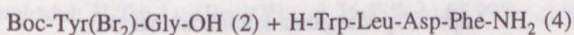
Peptidkapcsolások ellenőrzésében döntő tényező, hogy a teljesen védett kapcsolási termékek nagyobb retenciós időt mutatnak, mint a kiindulási N és C terminális védett fragmensek. A 32. ábra gasztrinszarmazék fragmenseinek kapcsolásán mutatja be, hogy az elúciós sorrend: kiindulási dipeptid Boc-Tyr(Br₂)Gly-OH és tetrapeptid H-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂ és végül a termék hexapeptid: Boc-Tyr(Br₂)-Gly-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂ [550].

A kapcsolásokban szereplő intermedierek, aktivált származékok közül BENOITON [553-556] a vegyes anhidrides kapcsolás HPLC követését oldotta meg; az aktívészterek kromatográfiájáról már említést tettünk [548, 564], a diciklohexilkarbodiimidés módszer HPLC képét pedig egy lengyel kutatócsoport elemezte [567]. Kvantitatív HPLC segítségével a kapcsolási reakciók kinetikája már könnyen megállapítható.

Szegmens kapcsolások kitűnően követhetők HPLC-vel. Humán β -endorfin (1-27) analógoknál CHENG és YAMASHIRO [568], a szegmens és lépésenkénti szilárdfázisú szintézis reakció elegeit tudta megbízhatóan analizálni és összehasonlítani.



32. ábra. Peptidkapcsolás analízise [550]



Oszlop: ODS-Hypersil-6 (125 x 4mm)

Eluens: MeOH-0,01 M foszfát puffer (pH 2) 3:6:4 (v/v)

Sebesség: 1,3 ml/perc

Diszulfidhidat tartalmazó peptideknél a tiol/diszulfid reakciókeverékek jól analizálhatók RP-HPLC-vel. Intermolekuláris diszulfidhidak kialakulásakor a peptid méretének megváltozásával egyértelműen változik (nö) a retenciós idő (pl. glutation-oxidált glutation).

Intramolekuláris cisztinhidak kialakulásakor (pl. oxitocin, vazopresszin) a még nem oxidált ditiol peptidek kapacitási faktora nagyobb, jelezvén, hogy a lineáris peptid hidrofób oldalláncai erősebb kölcsönhatásba kerülnek a hidrofób állófázissal, mint a diszulfidhíd révén ciklusossá váló peptidnél [858].

7.1.3. Védőcsoport eltávolítások ellenőrzése

Ahogy a védőcsoportok bevitele jól követhető HPLC-vel, úgy természetesen a védőcsoportok eltávolítása is: védett és szabad származékok lényeges k' különbséget mutatnak. VOELTER [543] a TRH egy szintetikus analógjának szintézise közben, a Boc-Phe-Glu(OBzl)-ProNH₂ tripeptid forró trifluor-ecetsavas kezelésével, kationcserélő gyantát tartalmazó peptid-analizátorában 20 különböző terméket szeparált és izolált, majd szerkezetüket is meghatározta.

A fragmens kondenzációval készült szomatosztatinszintézis intermedierjeinek tisztaságát VOELTER HPLC-vel ellenőrizte [538, 544]. Védőcsoportok használhatósága a hasítási kinetika kvantitatív adatai alapján ítéltető meg. Kinetikai adatokhoz könnyen juthatunk HPLC mérésekkel.

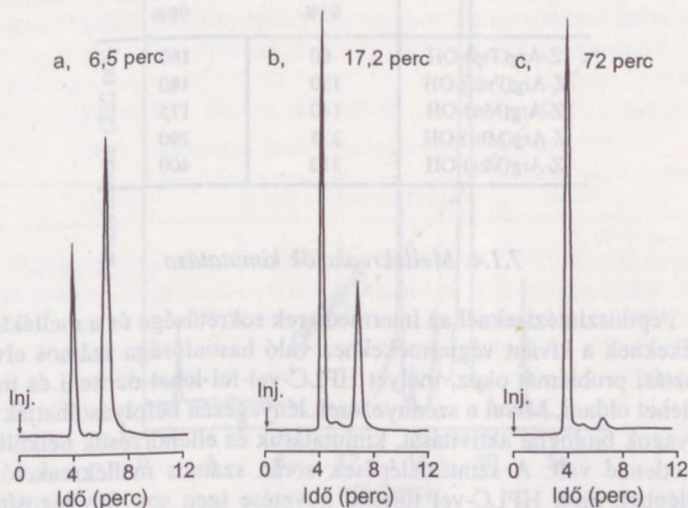
HPLC volt a fő metodika az 1-(1-adamantil)-1-metil-oxi-karbonil (Adpoc) amino védőcsoport kidolgozásában, mikor a többi amino védőcsoporttal hasonlították össze. HPLC-vel állapították meg az Adpoc-védőcsoport acidolitikus eltávolítási kinetikáját [538, 544, 569-571] (27. táblázat).

27. táblázat

Adpoc-Trp vizsgálata különböző hasítási körülmények között [537]

Acidolitikus oldószer	Hasítás (perc)		k_1 (perc ⁻¹)
	50%	99,9%	
3% TFA-CH ₂ Cl ₂ , 25 °C	0,18	1,78	3,87
3% TFA-CH ₂ Cl ₂ , 0 °C	1,1	11,7	0,63
H ₂ O-AcOH-HCOOH (83%) 2:7:1 (v/v/v), 0 °C	10,8	10,7	6,42x10 ⁻²
H ₂ O-AcOH-HCOOH (83%) 2:7:1 (v/v/v), 25 °C	355	354	1,95x10 ⁻²
AcOH	34	338	2,00x10 ⁻²

Adpoc-Trp-Lys(Boc)OH dipeptid esetén optimálással meg tudták oldani, hogy N^ε-Boc Lys védőcsoport mellől szelektíve eltávolítsák az α-amino védőcsoportot [537-544] (33. ábra).



33. ábra. Adpoc-Trp-Lys(Boc)OH hasítási kinetikájának kromatogramja AcOH-HCOOH-H₂O 7:1:2 eleggyel (40 °C-on) [537]

Oszlop: RP-8 (250 x 4 mm), 10 μm

Eluens: MeOH-H₂O (pH 5,2) 90:10

Sebesség: 2,5 ml/perc

Felszabadult H-Trp-Lys(Boc)OH: a) 36,48% b) 65,99% c) 98,63%

Új arginin guanidino védőcsoport kifejlesztése során kétféle RP-HPLC technikát is alkalmaztak: a védett származékok jó UV-elnyelést mutatnak, míg a szabad guanidino-csoport fluoreszcens színezéket képez a 9,10-fenantrénkinonnal, így a védőcsoport eltávolítása több módon is követhető: közvetlenül és oszlop előtti származékképzés segítségével (28. táblázat). A jelzett védőcsoport szelektív eltávolítását is HPLC segítségével optimálták [536].

28. táblázat

Arg guanidino védőcsoportok hasításának összehasonlítása [536]
(reakció mértéke 95%, ill. 99%)

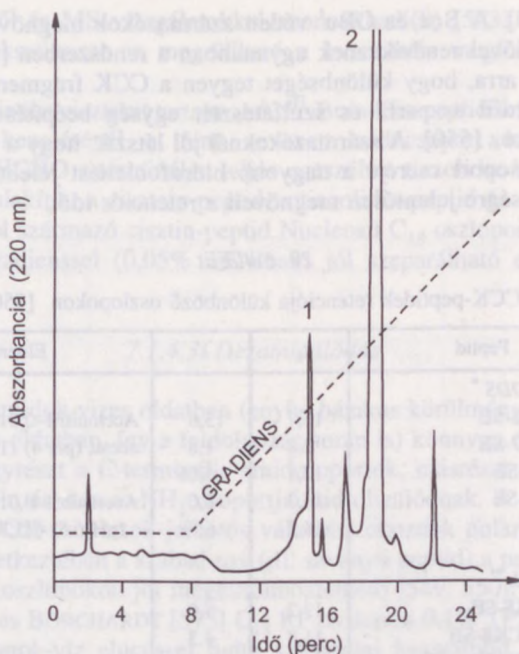
Védőcsoport	Reakcióidő (perc)	
	95%	99%
Z-Arg(Tip)-OH	60	180
Z-Arg(Pmc)-OH	130	180
Z-Arg(Mtr)-OH	140	175
Z-Arg(Mbs)-OH	225	290
Z-Arg(Mts)-OH	310	400

7.1.4. Mellékreakciók kimutatása

Péptidszintéziseknél az intermedierek sokrétűsége és a melléktermékeknek a kívánt végtermékekhez való hasonlósága számos elválasztási problémát okoz, melyet HPLC-vel fel lehet deríteni és meg is lehet oldani. Mivel a szennyezések lényegesen befolyásolhatják az anyagok biológiai aktivitását, kimutatásuk és ellenőrzésük nélkülözhetetlenné vált. A szintézislépések során számos mellékreakció is felléphet, ezek HPLC-vel történő követése igen sok felvilágosítást ad a peptidvegyésznek.

7.1.4.1. Oxidáció: $Met \rightarrow Met(O)$

Peptidek metionin része könnyen oxidálódik a preparatív eljárások során, elsősorban metionin-szulfoxidá. α -MSH esetén a Met^4 helyzetben történő oxidációval keletkező szennyeződés jól szeparálható az anyavegyülettől (34. ábra) [550]. Az elválasztási hatékonyságot gradiens elúcióval lehet növelni. RP oszlopon a szulfoxidszármazék alacsonyabb retenciós idővel rendelkezik, mint a tiszta hormon, mert valamivel nagyobb a polaritása. VOSKAM Nucleosil C_{18} oszlopon [572] calcitoninban és motilinben Met-szulfoxidot tartalmazó szennyező peptidet mutatott ki.



34. ábra. Szintetikus α -MSH tisztaságvizsgálata [550]

Oszlop: ODS-Hypersil-6, 125 x 4 mm

Eluens: A: $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}-\text{TFA}$ 20:80:0,1

B: $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}-\text{TFA}$ 60:40:0,1

Gradiens: 1% B/perc

Sebesség: 1,4 ml/perc

Komponensek: 1. $\text{Met}(\text{O})^4\alpha$ -MSH 2. α -MSH

7.1.4.2. Deszulfatálás: $\text{Tyr}(\text{SO}_3\text{H}) \rightarrow \text{Tyr}$

A kolecisztokinin peptidek szintézise két fő problémát hordoz magában: a Met-oxidációt (az előbb már említettük) és a tirozin rész szulfatálását, ill. deszulfatálását. A CCK peptidek HPLC adatait a 29. táblázat tartalmazza. Az eredmények szerint a CCK-oktapeptidek a következő sorrendben eluálódnak: oxidált, szulfatált és szulfátmentes vegyület, egyezésben hidrofobicitás sorrendjükkel

[549, 550]. A Boc és OBU¹ védett származékok megnövekedett retenciós idővel rendelkeznek ugyanabban a rendszerben [549], mely alkalmas arra, hogy különbséget tegyen a CCK fragmensek között is: a hidrofil aszpartil és szulfátészter egység beépítése gyorsabb elúciót okoz [550]. A származékoknál jól látszik, hogy a C-terminális amidcsoport cseréje a nagyobb hidrofobicitást jelentő feniletilamid egységre jelentősen megnöveli a retenciós időt.

29. táblázat

CCK-peptidek retenciója különböző oszlopokon [550]

Peptid	t_R	k'	Eluens
<i>Hypersil ODS</i> *			
Boc-CCK8-SE	16,7	15,6	Acetonitril-0,01 M Na-acetát (pH 4) (15:85)
Boc-CCK7-SE	2,8	1,8	
CCK8-SE	12,1	5,66	
CCK7-SE	16,2	8,0	Acetonitril-0,01 M TEAP (pH 6,5) (25:75)
CCK6	14,2	6,88	
<i>μBondapak</i> **			
CCK8-SE	13,2	5,0	Acetonitril-0,01 M NH ₄ -acetát (pH 4,2) (25:75)
Met(O)-CCK8-SE	11,8	4,3	
CCK8-SE	6,85	3,03	
CCK8	8,7	3,53	
Met(O)-CCK8-SE	6,1	2,60	
<i>Hypersil ODS</i> ***			
Boc-CCK4	6,6	5,60	Acetonitril-0,01 M foszfát (pH 7,5) (30:70)
Boc-CCK4-PEA	11,1	10,10	
Boc-Tyr(Br ₂) ¹ -Leu ⁴ -CCK ⁶	18,8	17,8	Metanol-0,01 M foszfát (pH 2,1) (30:60:40)
Boc-Tyr(Br ₂)-Gly-OH	2,8	1,8	
Leu ² -CCK ⁴	1,8	0,8	

* oszlop: 250 mm x 4 mm, sebesség: 1,1 ml/perc

** oszlop: 300 mm x 3,9 mm, sebesség: 1,3 ml/perc

*** oszlop: 125 mm x 4 mm, sebesség: 2,0 ml/perc

Arg-peptidek szilárdfázisú szintézisének Mtr vagy Pmc guanidino védőcsoport használata esetén a gyantáról történt lehasítás után szulfonált Arg egységeket találtak : CH₃CN-TFA gradienssel C₁₈-szilika oszlopon a szulfonált peptid(ek) preparatívé is jól elválasztható(k) a

célterméktől és MS vizsgálatokkal azonosítható(k) [573]. Az elválasztás izokratikusan is megoldható a kvantitatív meghatározások céljára.

N-terminális ciszteint tartalmazó N^{Π} -Bom-His-peptidek hidrogén-fluoridos kezelésénél a fent nevezett védőcsoport hasításából származó HCHO a terminálist teljes egészében tiazolidin karbonsav egységgé alakítja: a cisztein-peptid, a tiazolidin-peptid és az esetleg oxidációból származó cisztin-peptid Nucleosil C_{18} oszlopon, lineáris CH_3CN gradienssel (0,05% TFA-ban) jól szeparálható egymástól [574].

7.1.4.3. Dezamidálódás

Peptidamidok vizes oldatban (enyhe bázikus körülmények között vagy savas oldatban, így a feldolgozás során is) könnyen dezamidálódnak. Egyrészt a C-terminális amidcsoportok, másrészt a láncban szereplő Gln és Asn ω - NH_2 csoportjai hidrolizálódnak. A keletkező szabad COOH-csoportok jelentős változást okoznak polaritásban, s ennek következtében a szabad sav (ill. savanyú peptid) a peptid amidoktól RP oszlopokon jól megkülönböztethető [549, 550].

PATEL és BORCHARDT [575] C_{18} RP oszlopon 0,1% TFA jelenlétében metanol-víz eluenssel tudta szeparálni hexapeptid szinten a dezamidált termékeket az Asn-peptidektől. A HPLC módszer egyértelműen jelezte, hogy savas oldatban direkt hidrolízissel történt a dezamidálódás. Semleges és bázikus pH-nál viszont jóval több csúcs jelent meg a kromatogramokon: a ciklikus imid intermedier és az izopeptid is. Ez azt bizonyítja, hogy egy másik mellékreakcióval, a transzpeptidációval is számolni kell.

7.1.4.4. Transzpeptidáció

Monoaminodikarbonsavak és izomerjeik közötti retenciós időkülönbség lehetővé teszi, hogy a transzpeptidációs mellékreakciót könnyen detektálni lehet. Glutamil peptideknél $\alpha \rightarrow \gamma$ transzpeptidáció, aszpartil peptideknél $\alpha \rightarrow \beta$ transzpeptidáció történhet, mely izomerpeptidek keletkezésére vezet. Az RP-HPLC módszer alkalmas a peptid-izopeptid megkülönböztetésére [549]. A kromatográfiai mérés a transzpeptidálási folyamat kinetikájának meghatározására is

alkalmas. α -Peptidben 0,1-0,2% izopeptid szennyezés is biztonsággal kimutatható ily módon.

Az Asp monoészterek és Asp-peptidek (Z-aszpartám, DSIP) és izomerjeinek C_{18} tölteten történő elválasztásával egy kínai kromatográfiás csoport foglalkozott [576].

30. táblázat

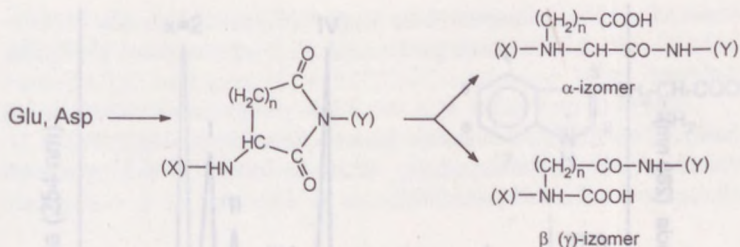
Asp és Glu α - ω származékok kromatográfiás adatai [549]

Számazék	Oszlop	Eluens	k'		R_s
			(α)	(ω)	
Z-Glu(OBzl)	ODS-Hypersil	MeOH-NaOAc (pH 4)	3,0	8,3	1,80
Z-Glu(OBzl)Lys	ODS-Hypersil	50:50	10,2	6,3	3,20
Z-Asp-Phe-NH ₂	RP-18-Knauer	MeOH-H ₂ O-AcOH 60:40:2	2,0	3,5	1,25
Boc-Glu(EDA-Z)	ODS-Hypersil	MeOH-puffer 70:30	2,3	1,4	1,76
Z-Asp(OMe)	YQG-CH-C ₁₈	MeOH-H ₂ O-AcOH 30:70:2,5	2,2	2,5	1,25
Z-Asp-Phe(OMe)	YQG-CH-C ₁₈	40:60:2,0	3,3	2,3	1,35
DSIP (Trp-Ala- Gly- Gly-Asp- Ala- Ser-Gly-Glu)	YQG-CH-C ₁₈	70:30:0,5	1,5	1,0	1,25

Szekretin és analógjainak szintézisénel BEYERMAN és VOSKAMP szemipreparatív szinten is kidolgozta a HPLC tisztítás feltételeit [577]. Azt találták, hogy elsősorban az Asp(OBzl)-Gly és Asp(OBzl)Ser kötések érzékenyek transzpeptidációra.

TÖRÖK [578] nem fehérje alkotó bázikus glutaminsav-származékot tartalmazó szintetikus, biológiailag aktív peptideknél transzpeptidációval keletkező aminoetil-glutamin, és izoglutaminszármazékot választott szét alapvonal-elválasztással, ODS-Hypersil oszlopon.

CAPASSO igazolni tudta, hogy a glutamin egység spontán dezamidálódása fiziológias körülmények között gyűrűs imiden (a glutárimiden) át vezet glutaminszármazékokhoz [579].



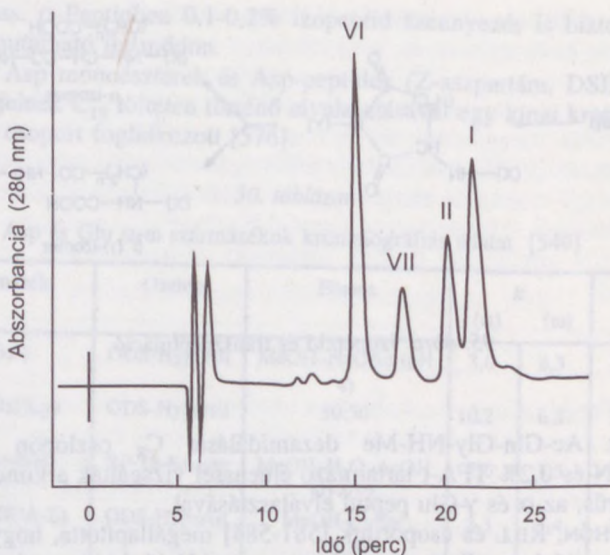
35. ábra. Izopeptid és transzpeptidáció

Az Ac-Gln-Gly-NH-Me dezamidálását C_8 oszlopon 0,2% CH_3CN és 0,2% TFA-t tartalmazó eluenssel vizsgálták a kiindulási, a gyűrűs, az α és γ -Glu peptid elválasztásával.

SCHÖN, RILL és csoportjuk [581-584] megállapította, hogy aszpartilpeptidek esetében nemcsak transzpeptidáció, hanem epimerizáció is lejátszódik. HPLC segítségével az egyes sztereoizomerek mennyiségét kvantitatíve is megállapították, beleértve az aminoszukcinil gyűrűs intermediereket is. A meghatározásokat C_{18} oszlopon (BST, 10 μm) $\text{CH}_3\text{CN-TFA-0,001 M NH}_4\text{OAc}$ (pH 4,5) 14,0-16,5 : 0,5 : 85,5-83,0 összetételű eluenssel végezték. Fmoc védőcsoport esetén a piperidinolízis révén keletkező Asp-piperidineket Lichrosorb RP-18 oszlopon $\text{CH}_3\text{CN-vizes Na}_2\text{SO}_4$ (5 mM) 7:18 elegyével (mely 0,5 mM D-kámforszulfonsavat is tartalmazott) is szét tudták választani az említett sztereoizomerekre [581-584].

VADÁSZ [580] az Asp⁶-GnRH analógok szintézise során részletesen vizsgálta a vegyületek transzpeptidációs készségét. Az analógok átalakulását RP-HPLC segítségével követte és megállapította az aminoszukcinil peptiddé alakulás sebességi állandóit. Kimutatta és azonosította valamennyi intermediert. Jelentős epimerizációt állapított meg a mellékreakciók közben az epimer származékok elválasztásával (36. ábra).

Szilárd fázison szintetizált hGH 6-13 peptidben az aszpartamid intermediert ROBSON C_{18} tölteten, nagyon enyhe (10-20%, 10-30%) CH_3CN gradiens alkalmazásával mérte ki, és megállapította, hogy az 4:1 arányú keverékké hidrolizál [585].



36. ábra. Az $[\beta\text{-Asp}^6\text{-OMe}]\text{-GnRH}(1\text{-}9)\text{-EA}$ (II) hidrolízisének (pH 7,3, 37 °C, 180 perc) HPLC analízise [580]

Oszlop: Shandon ODS Hypersil 5 μm , 250 x 4,6 mm

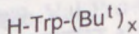
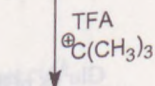
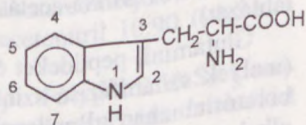
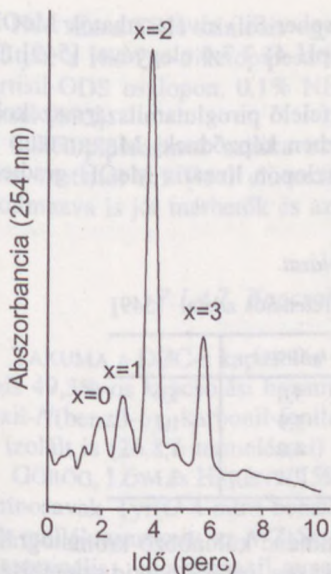
Eluens: metanol–0,25 M TEAP (pH 3,0), (47:53, v/v)

Sebesség: 0,6 ml/perc

Komponensek: I: $[\text{Asu}^6]\text{-GnRH}(1\text{-}9)\text{EA}$
 VI: $[\beta\text{-Asp}^6]\text{-GnRH}(1\text{-}9)\text{-EA}$
 VII: $[\text{Asp}^6]\text{-GnRH}(1\text{-}9)\text{-EA}$

7.1.4.5. Alkileződés

Boc és $-\text{OBu}^t$ csoportot tartalmazó peptidek védőcsoport lehasításánál a triptofán egységek *terc*-butileződést szenvedhetnek az indolgyűrűn [586-589]. A Boc-kémia alapuló szilárdfázisú szintézis lehasító lépése legtöbbször hidrogén-fluoridos acidolízis, melyben kitűnő lehetőség nyílik erre a mellékreakcióra. Trp-származékok analízisére a SAS-Hypersil töltetet találtuk alkalmasnak. Az oszlopról a Trp-származékok a szubsztituensek hidrofób karakteréből adódóan a *terc*-butil-csoportok számának megfelelő sorrendben eluálhatók (37. ábra).



- x=0 Trp
- x=1 2 - Bu^t - Trp
- x=2 2,4 - di - Bu^t - Trp
- x=3 2,5,7 tri - Bu^t - Trp

37. ábra. *tert*-Butil-triptofán-származékok analízise [48]

Oszlop: SAS-Hypersil-5 (125 x 4 mm)
 Eluens: MeOH-H₂O-AcOH 64:14:2 (v/v/v)
 Sebesség: 1,1 ml/perc

A Trp-t tartalmazó ACTH fragmensek is hasonló viselkedést mutattak [547].

ZECH és munkatársai [590] az alkilezett triptofánszármazékok analízise mellett azok RP-8 oszlopon történő szemipreparatív HPLC izolálását is megoldották gradiens elúció alkalmazásával. A származékok szerkezetmeghatározására ¹H-NMR-t és ¹³C-NMR-t alkalmaztak.

7.1.4.6. Ciklizáció, *N*-terminális gyűrűzáródás

Az *N*-terminális glutamil egységet tartalmazó peptidláncok könnyen záródnak piroglutamil-gyűrűvé. Glu(OMe)-Val-OMe előállításánál piroglutamilszármazék és szabad sav is képződik. A kom-

ponensek szilika oszlopon (Chromspher-Sil) elválaszthatók MeOH-CH₃CN-0,01 M Na-acetát puffer (pH 4) 7:7:6 elegyével [549] (31. táblázat).

Glutaminil-peptideket és a megfelelő piroglutamilszármazékokat (melyek szilárdfázisú szintézis közben képződnek) MERRIFIELD laboratóriumában μ Bondapak C₁₈ oszlopon lineáris MeOH gradienst alkalmazva választották el [591].

31. táblázat

Glu és pGlu dipeptidek retenciós adatai [549]

Peptid	t_R (perc)	k'
Z-pGlu-Val-OMe	3,6	1,0
pGlu-Val-OMe	3,9	1,1
Glu(OH)-Val-OMe	4,0	1,2
Glu(OMe)-Val-OMe	7,4	3,1

Mivel a lineáris és gyűrűs peptidlánc különböző kromatográfiás viselkedést mutat, a melléktermékek, így lineáris peptid szintézisénel a diketopiperazin-gyűrű vagy nagyobb tagszámú gyűrűs vegyület, ciklikus peptid szintézisénel a lineáris kiindulási peptid HPLC-vel könnyen meghatározható. RP oszlopon a retenciós viselkedés alakításában nem a gyűrű tagszáma a döntő tényező. (Pro-Gly) ciklopeptidek retenciós adatai azt mutatják (32. táblázat), hogy a tagszám növelése csak kis változásokat okoz a retenciós időkben [549].

32. táblázat

(Pro-Gly)_n gyűrűs peptidek retenciós adatai [549]

(Pro-Gly) _n	t_R (perc)	k'
hexa	4,2	4,2
hepta	4,4	4,5
okta	5,0	5,2
deka	4,6	4,7

Oszlop: ODS-Hypersil 125 x 4 mm
 Eluens: MeOH-H₂O 15:60 (v/v)
 Sebesség: 1,3 ml/perc
 Detektálás: UV, 215 nm

HUNTER a TRH szintézis egyik melléktermékét és *in vivo* metabolitját, a His-Pro-diketopiperazint (és diasztereomerjeit is) izolálta Partisil-ODS oszlopon, 0,1% NH₄OAC–acetonitril 10:90 (v/v) eluenssel [592].

Diketopiperazinok szilika oszlopon (pl. Polygosil 60-S) kloroform–metanol 8:1 (v/v) eluenssel, tömegspektrometriás detektálást alkalmazva is jól mérhetőek és azonosíthatók [593].

7.1.4.7. Kapcsolási mellékreakciók

TAKUMA a DCC-s kapcsolás (24 órás, Z-Phe-Val-Pro-OBu^t szintézis 49,3%-os kapcsolási hozam) HPLC vizsgálatánál *N,N'*-diciklohexil-*N*-(benzil-oxi-karbonil-fenilalanil-valil)-karbamidot azonosított és izolált is (26,8% termeléssel) [594].

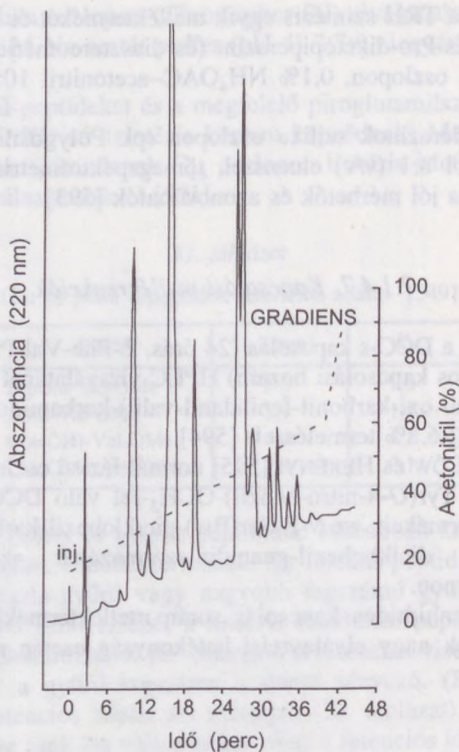
GÖRÖG, LŐW és HERÉNYI [595] normál fázisú oszlopon *N*-védett aminosavak Tyr(*O*-4-nitro-benzil)-OCH₃-rel való DCC-s kapcsolások melléktermékeit: az *N*-Z-Ser(Bu^t)-diciklohexil-karbamidot és az *N*-terminális diciklohexil-guanidin-származékát azonosította a kroma-togramon.

Vegyés anhidrides kapcsolás során melléktermékként képződő uretánok csak nagy elválasztási hatékonyság esetén mutathatók ki [596].

7.1.5. Hibás szekvenciájú peptidek kimutatása

A szilárdfázisú szintézis termékei a szintézis stratégiából és a nem 100%-os reakciólépésekből következően sokféle szennyeződést tartalmazhatnak: hibás, hiányos, blokkolt, részlegesen védett szekvenciák is előfordulhatnak közöttük.

Egy hagyományos szilárdfázisú szintézissel készült peptid minőségellenőrzése megköveteli a HPLC hatékonyságát, és a kromatogram még olyan meglepetést is tartogathat a preparatív vegyész számára, hogy a főterméket esetleg nem tudja megkülönböztetni a melléktermékektől. Természetesen nem ez az általános eset. A szemipreparatív és preparatív méretű tisztításokhoz mindenképpen szükséges a HPLC.



38. ábra. Szilárdfázisú szintézissel készült Leu-Arg-Ala-Leu-Arg-Gln-Met peptid (LM8) nyerstermék HPLC képe

Oszlop: Waters Delta-Pak C18-300 Å, 300 x 3,9 mm

Eluens: A: 0,1% TFA (H₂O)

B: 0,1% TFA (H₂O)-CH₃CN 20:80

Sebesség: 1,2 ml/perc

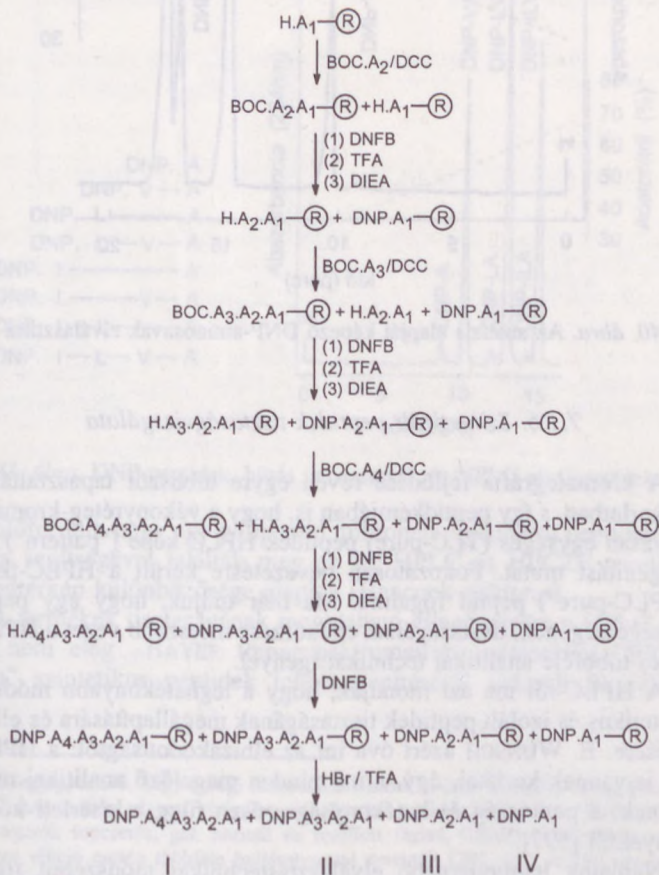
Gradiens: 15-60%, 45 perc

(készítette: Bősze Szilvia, ELTE, Peptidkémiai Kutató
Csoport 1991)

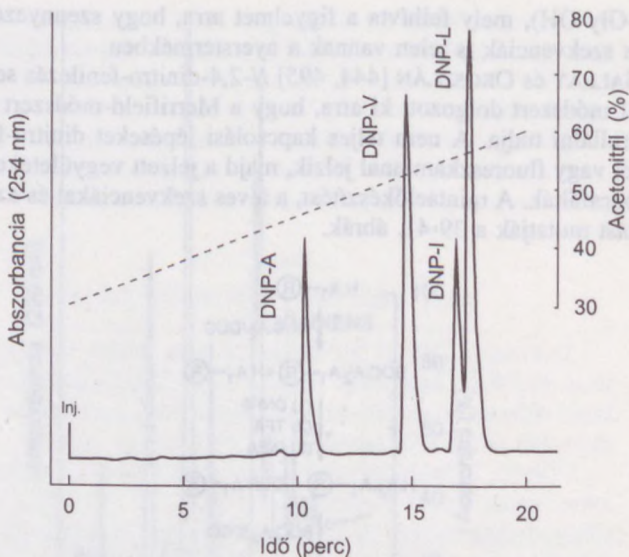
Már az először megtartott peptidszimpoziumi HPLC kerekasztal megbeszélésen (1974) bemutattak egy Merrifield módszerrel készült mioglobin oktapeptid kromatogramot (H-Val-Thr-Val-Leu-Thr-Ala-

Leu-Gly-OH), mely felhívta a figyelmet arra, hogy szennyezésként téves szekvenciák is jelen vannak a nyertermékben.

SALLAY és OROSLÁN [444, 495] *N*-2,4-dinitro-fenilezés segítségével módszert dolgozott ki arra, hogy a Merrifield-módszert végig kontrollálni tudja. A nem teljes kapcsolási lépéseket dinitro-fenilezéssel vagy fluoresztkaminnal jelzik, majd a jelzett vegyületeket kromatografálták. A mintaelőkészítést, a téves szekvenciákat és az elválasztást mutatják a 39-41. ábrák.



39. ábra. A HPLC analízisre kerülő mintakészítés lépései



40. ábra. Az analízis alapját képező DNP-aminosavak elválasztása

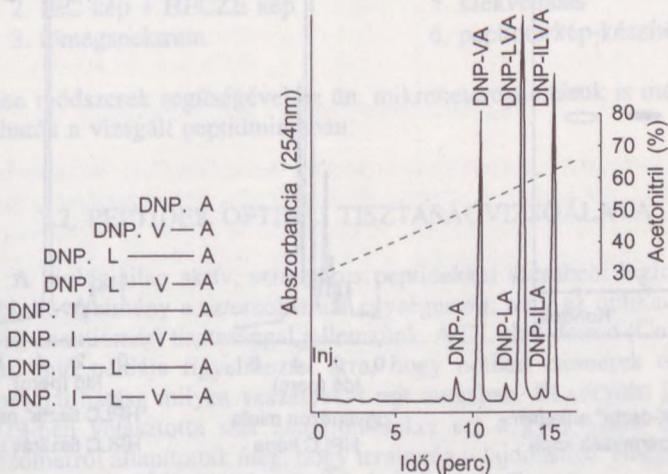
7.1.6. Szintetizált peptidok tisztaságvizsgálata

A kromatográfia fejlődése révén egyre többször tapasztalták a gyakorlatban, s így peptidkémiaiában is, hogy a vékonyréteg-kromatográfiásan egységes (TLC-pure) peptidok HPLC képe ("pattern") heterogenitást mutat. Fokozatosan bevezetésre került a HPLC-tiszta ("HPLC-pure") peptid fogalma. Ma már tudjuk, hogy egy peptid egységességének, tisztaságának ellenőrzése messzebb vezet a HPLC-nél és többféle analitikai technikát igényel.

A HPLC-ről ma azt mondják, hogy a leghatékonyabb módszer szintetikus és izolált peptidok tisztaságának megállapítására és ellenőrzésére. E. WÜNSCH azért óva int az elbizakodottságtól: a HPLC-nek is vannak korlátai, úgy, mint minden megelőző analitikai módszernek: a pontosság és hatékonyság erősen függ a kísérleti körülményektől [597].

Napjaink legmodernebb elválasztástechnikai módszereit figyelembe véve nemegyszer előfordul, hogy RP-HPLC rendszerben egy

csúcsként jelentkező anyag (HP)CZE vizsgálva nem egységes és fordítva. Az 1990-es Európai Peptidszimpoziumon már minden izolált vagy szintetizált peptid, fehérje stb. egységességét három képpel demonstrálták: HPLC, HPCZE kromatogram és tömegspektrum. Ez az előrelépés csak azt a tényt támasztja alá, hogy mindig a módszerek összessége adja a megbízható eredményt.



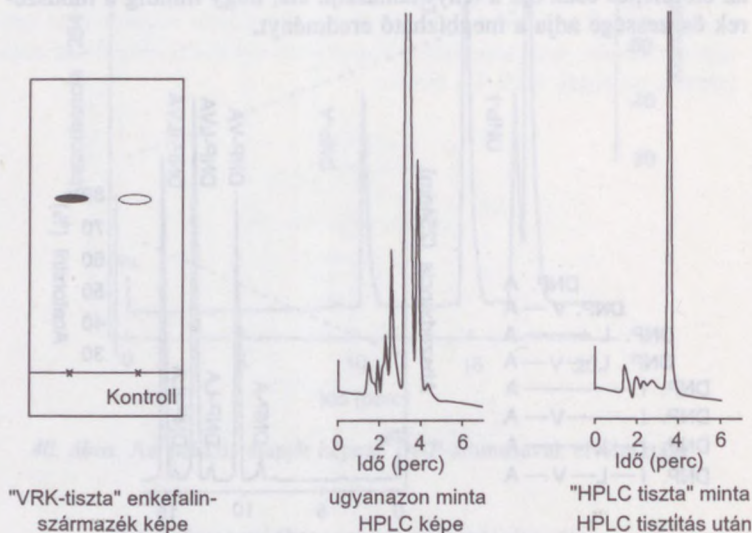
41. ábra. DNP-peptidek, hibás szekvenciák és HPLC elválasztásuk

Előfordult, hogy egy polipeptid mikroheterogenitását peptidterképezés segítségével találták meg az RP-HPLC és HPCZE triptikus peptidterkép különbözősége alapján (Hancock-módszer).

A termékek tisztaságának megbízható ellenőrzésére a HPLC ma már nem elég*. BAYER tömegspektrometriás mérésekkel "HPLC tiszta" szintetikus peptidok inhomogenitásáról számolt be [598],

* Megjegyzendő, hogy eddigi ismereteink szerint is csak többféle, és ortogonális HPLC rendszerben végzett vizsgálat után lehetett csak nyilatkozni az illető peptid tisztaságáról: ioncserés, gél, normál és fordított fázisú, többféle izokratikus vagy gradiens elúció esetén többféle hullámhosszal detektált (205, 254 és 280 nm vagy diódasoros UV-detektálással nyert többdimenziós) kromatogram segítségével. Azt mindenképpen hangsúlyozni kell, hogy a gyakorlatban legtöbbször használt RP-HPLC tisztaság egy peptid esetén szükséges, de nem elégséges feltétel.

RIVIER pedig 30-40-nél nagyobb tagszámú peptidok analízisére nem találta elégségesnek az RP-HPLC-t: kis átmérőjű IEC és HPCE-vel 30% szennyezést is talált egyébként HPLC-tiszta termékekben [599]!



42. ábra. Az enkefalin kromatogramjai

Lap: Kieselgel-60 (80x40 mm)
Futtató: BuOH-Pyr-AcOH-H₂O
(30:20:6:26)

Oszlop: ODS-Hypersil-6, 125 x 4 mm
Eluens: MeOH-H₂O-CH₃CN
(30:20:40, v/v/v)

Sebesség: 1,2 ml/perc
Detektálás: 224 nm

TREGGAR már 1972-ben demonstrálta a kritikai hozzáállás jelen tőségét: a PTH aminosavak HPLC-jével kialakított Edman-lebontás (ill. a kifejlesztett szekvenátor) a legérzékenyebb, legpontosabb és kvantitatív módszer egy szilárdfázisú szintézis [600, 601] termék egységességének, azok homogenitásának ellenőrzésére és igazolására. A legmegnyugtatóbb tesztként ezt a módszert kell a peptidvegyészek felhasználni. E módszerrel a téves szekvenciák, a nem hasított védőcsoportok és a melléktermékek is jól detektálhatók. A szintézist akkor tekinthetjük sikeresnek, ha ilyeneket nem találunk, továbbá a biológiai aktivitással sincs probléma [597, 600, 602]. A

szilárdfázisú szintézis értékelésére MATSUEDA kvantitatív szilárdfázisú Edman-lebontást dolgozott ki [603].

Ahhoz, hogy meggyőzően bizonyítani tudjuk egy szilárdfázisú szintézissel készült peptid tisztaságát, a következő módon kell dokumentálni:

- | | |
|------------------------|---------------------------|
| 1. RP-HPLC kép | 4. aminosavanalízis |
| 2. IEC kép + HPCZE kép | 5. szekvenálás |
| 3. tömegspektrum | 6. peptid térkép-készítés |

Ezen módszerek segítségével az ún. mikroheterogenitások is megtalálhatók a vizsgált peptidmintában.

7.2. PEPTIDEK OPTIKAI TISZTASÁGVIZSGÁLATA

A biológiailag aktív, szintetikus peptidekkel szembeni legfontosabb követelmény a sztereokémiai egységesség, amit az optikai (királis, enantiomer) tisztasággal jellemzünk. A DL-thalidomid (Contergan) intő példája figyelmeztet arra, hogy optikai izomerek eltérő biológiai hatása milyen veszélyeket rejt magában. BLASCHKE [604] 1979-ben választotta szét enantiomerekre ezt a gyógyszert, és az S-izomerről állapították meg, hogy teratogén tulajdonságú. Napjainkban egyre inkább tendenciális az a követelmény, hogy minden gyógyszerkészítmény királisan is egységes legyen.

Peptidek (hormonok, antibiotikumok stb.) esetében már az első lépésnél a szintézis megköveteli a kiindulási aminosavak, ill. aminosavszármazékok teljes optikai tisztaságát. A peptidszintézisben az egyik leggyakrabban előforduló mellékreakció éppen a racemizáció (epimerizáció). Nem véletlen tehát, hogy aminosavak és peptidek királis tisztaságának meghatározása a peptidkémiaiban óriási jelentőségű. Jelenleg az optikai forgatóképesség, NMR, enzimatis és GC módszereket messze felülmúlva a HPLC a leggyakrabban alkalmazott módszer erre a célra. A racemizáció (epimerizáció) diasztereoizomer (epimer) peptidek (LD, LL; DD, DL, LLL, DLL, LDL, LLD stb.) képződéséhez vezet, és ezeket a peptideket ma már a megsokkott, általános (konvencionális) HPLC körülmények között nagy hatékonysággal lehet szeparálni és kvantitatíve meghatározni.

$$\text{Szennyezés } C\% = \frac{LD}{LL + LD} \times 100$$

$$\text{Racemizáció} = 2 \times C\%$$

ahol LD és LL a diasztereomerek csúcs alatti területének mérőszámai.

7.2.1. Diasztereomer peptidek szétválasztása

LUNDANES és GREIBROKK MeOH-vizes NH_4OAc rendszerben két C_{18} RP-oszlopon drámai effektusokat talált diasztereoiszomer peptidek elválasztásában [46]. A Phenil-Sil-X oszlop gyengén szeparálja a diasztereoiszomereket, s a nitril és amino kötött fázisok sem sokkal jobbák. Az ODS oszlopoknál, pl. Leu dipeptid esetén LL-LD keveréknél 3,39 és 13,8-as k' -értéket találtak [46] (33. táblázat). Az ODS-Hypersil nagyobb feloldással rendelkezett, mint a Spherisorb ODS.

KROEFF és PIETRZYK [605] di- és tripeptid diasztereomereket szeparáltak C_8 fordított fázison etanol-vizes foszfát pufferrendszerekben. A pH-függést vizsgálva azt találták, hogy a retenció idő bármelyik izomerre az izoelektromos ponton minimális; a pH csökkenésével nő a k' , valamint az elválasztási tényező (α).

(L-Ala)₃ tripeptid esetén nemcsak a D-Ala egység változtatja meg a retenció időt, hanem a D-Ala helyzete is fontos (LLL, LDL, LLD). A hidrofobicitási sorrendet (LLL < LLD < LDL) a peptidláncon levő CH_3 -csoportok térhelyzete szabja meg, amely alternáló az LLL peptidben (34. táblázat).

ISKANDARANAI és PIETRZYK [606] porózus polisztirol-divinilbenzol kopolimer (fordított fázisú) adszorbensen (PRP-1) dolgozott ki diasztereomer elválasztásokat. Módszerük előnye, hogy az alkalmazási pH-tartomány jóval szélesebb (1,5-11) az RP-szilikákhoz képest (2-7,5). GÖRÖG, HERÉNYI és LŐW [595] a D és L-O-4-nitrobenzil-tirozin-metilészter diasztereoiszomer peptidjeit választotta szét normál fázisú HPLC-vel a kapcsolási reakcióban fellépő racemizáció meghatározása céljából.

33. táblázat

Diasztereomer peptidek retenciós adatai [46]

Dipeptid	Konfiguráció	k'		
		30% MeOH	10% MeOH	NH ₄ OAc
Ala-Ala	L,L + D,D	0,42	0,58	0,67
	L,D + D,L	0,42	0,72	1,08
Ala-Leu	L,L + D,D	0,89	1,78	
	L,D + D,L	1,44	5,28	
Ala-Val	L,L + D,D	0,61	0,83	1,17
	L,D + D,L	0,83	1,86	
Leu-Ala	L,L + D,D	0,78	1,39	4,11
	L,D + D,L	1,47	5,67	
Leu-Leu	L,L + D,D	3,39	13,00	
	L,D + D,L	13,80		
Leu-Phe	L,L + D,D	6,97		
	L,D + D,L	13,00		

34. táblázat

Diasztereomer tripeptidek retenciójának pH-függése [605]

Tripeptid	kapacitási faktor			
	pH 2,10	pH 3,32	pH 5,57	pH 7,89
L-Ala-L-Ala-L-Ala	0,68	0,62	0,09	0,26
D-Ala-D-Ala-D-Ala	0,69	0,63	0,09	0,27
L-Ala-L-Ala-D-Ala	1,59	1,14	0,22	0,59
L-Ala-D-Ala-L-Ala	3,32	2,58	0,69	1,18

Japán kutatók a Z-Ala-Val-OH + H-Val-OME és Z(OME)-Gly-Ala-OH + H-Phe-OBzl kapcsolások epimer eloszlását vizsgálták HPLC-vel [594].

RILL, SCHÖN és SZIRTES [581-584] a transzpeptidációs mellékreakciót kísérő epimerizációt tudták feltérképezni az optikai izomerek (diasztereoizomerek) HPLC-s elválasztásával.

Laboratóriumunkban a Z-Phe-Orn izopeptid sztereoizomereket (LL, DD, DL) Hypersil ODS oszlopon direkt választottuk szét MeOH-Na-acetát (pH 4,0) eluens segítségével [548].

KRUMMEN foglalta össze először a farmakológiailag jelentős peptidek HPLC-analízisét és szeparálását, nagy súlyt fektetve a diasztereomerek elválasztására [607].

LARSEN és munkatársai kidolgozták az oxitocin epimerek szeparálását [608, 609]. Az oxitocin és 7 sztereoizomerjének, nevezetesen a [1-hemi-D-cisztin]-, [2-D-tirozin]-, [4-D-glutamin]-, [5-D-aszparagin]-, [6-hemi-D-cisztin]-, [7-D-prolin]- és a [8-D-leucin]-oxitocin analógok olyan elválasztását oldották meg RP-oszlopon (35. táblázat), melyet megoszlási kromatográfiával sikertelenül kíséreltek meg [609].

35. táblázat

Oxitocin diasztereomerek HPLC vizsgálata [608]

Oxitocin diasztereomerek	10 % THF 90% 0,05 M NH ₄ OAc		18 % CH ₃ CN 82% 0,01M NH ₄ OAc	
	<i>k'</i>	α	<i>k'</i>	α
oxitocin	7,73	1,00	7,31	1,00
4-D-Gln	9,12	1,18	8,33	1,14
7-D-Pro	9,12	1,18	10,4	1,42
6-Hemi-D-Cys	9,66	1,25	9,43	1,29
5-D-Asn	11,1	1,44	9,28	1,27
1-Hemi-D-Cys	13,1	1,69	14,6	2,00
8-D-Leu	13,3	1,72	12,0	1,64
2-D-Tyr	17,7	2,29	10,7	1,46

Az elválasztást befolyásoló tényezők (puffer pH-ja, szerves oldószer fajtája, az eluens összetétele) vizsgálatával C₁₈-as oszlopon optimálni tudták a módszert. Az epimerek elúciós sorrendje az eluens szerves oldószer komponensének minőségétől lényegesen függött. Az optimált feltételek között egy oxitocin-származék, a [3-DL-(2-¹³C)leucin]-oxitocin sztereoizomerjeinek preparatív elválasztását is sikeresen megoldották [610]. Módszerüket az arginin vazopresszin peptid diasztereoiszomerek elválasztására is kiterjesztették [611].

VOELTER [543] DC-1A kationcserélő gyantán (18 μ m) 0,2 M piridin-acetáttal TRH és D-His²-TRH diasztereoiszomereket hasonlított össze. Anyaga 8% természetes hormonnal volt szennyezve, ezért mutatott biológiai aktivitást. A kromatográfiásan (és királisan) tiszta D-His²-TRH teljesen inaktívnak bizonyult. BURGUS és RIVIER RP-18

oszlopon az L-TRH-ban 0,7% D-His-TRH-t tudott meghatározni [612]. Enkefalin, LH-RH és szomatos atin analógok optikai tisztaságellenőrzését μ -Bondapak fenil, CN és C₁₈ oszlopokon [618-623] végezték.

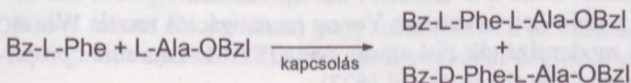
BAKKUM [L-Ala⁴] és [D-Ala⁴]-des-His-szekretiniket választott szét ecetsavtartalmú metanol vizes eluenssel [613], míg VOSKAMP epimer szekretinikkel trifluor-ecetsav-tartalmú rendszerekben dolgozott [614]. HUNTER az ODS és cyanopropil-szilika tölteteket hasonlította össze diasztereomer peptidek elválasztása szempontjából [615]. Ligandcsere kromatográfiával a L-piroglutamil-L-3,3-dimetil-prolinamid izomerjeit (LLD, LDL, LLL és DLL) választotta szét Spherisorb-CN (5 μ m) oszlopon, acetonitril-0,01 mM Cu(II)-acetát eluent (30:70, v/v) használva [592].

Az aszpartám prekursor (Z-Asp(OBzl)-Phe-OCH₃) négy sztereoizomerjét (LL, LD, DL és DD) királis oszlopon (Chiralcel OD) izopropanol-*n*-hexán (1:1) eluenssel LIN [616] szépen elválasztotta. Egy kínai csoport a különböző diasztereoizomer *N*-Z-tripeptid metilészterek RP-HPLC-jét oldott meg [617] Cosmosil 15-C₁₈ oszlopon.

Fentiek azt demonstrálják, hogy ha egy peptidláncban egy helyen megváltozik az illető aminosav konfigurációja, az RP-HPLC-ben jelentős retenciós különbséget okoz, így az epimerizáció detektálási lehetősége kiváló.

7.2.2. Racemizációs tesztek

A peptidszintézis kapcsolási módszereinek értékelésére különböző racemizációs tesztek (Anderson-, Young- 1., 2., Izumiya-, Kemp-, Kenner-, Taschner-, Bodánszky-, Halpern-Weinstein-, Berger-teszt) alkalmaznak, melyek modellpeptidek szintézisén és a keletkezett diasztereoizomer peptidek elválasztásán alapulnak. A HPLC elválasztási hatékonyságának felismerésével egyrészt a nevezett módszereket a HPLC alkalmazásával modernizálták, másrészt ezen az elven új módszereket állítottak be. Már az első peptidszimposium HPLC kerekasztalnál terítékre került ez a téma GOODMAN jóvoltából [624]:



Tökéletesített HPLC módszerükkel (60 cm hosszú Microporasil oszlop, 0,6% EtOH kloroformban) a reakcióban 0,5% alatti racemizációt is tudtak detektálni [625] (36. táblázat). Megállapították azt is, hogy szilárdfázisú szintézisben az első aminosav (Boc-Ala) gyanúra való kapcsolásánál, és a szilárdfázison történő kapcsolással gyakorlatilag nem történik racemizáció (<0,2%).

KUSUMOTO és társai [626] a Boc-L-Phe-L-Ala-OH és L-Val-OBu¹ modellkapcsolást tesztelték több módszerrel. A trifluor-ecetsavval kezelt mintákat Nucleosil 7C₁₈ oszlopon CH₃CN–0,1 M foszfát puffer eluenssel választották szét.

36. táblázat

Peptidkapcsolások racemizációs jellemzői [625]

Kapcsoló reagens	Oldószer	% Bz-D-Phe-L-Ala-OBzl ^x		
		szilárdfázis*	ekvimoláris oldat	4 x felesleg Bz-Phe oldatban
DCC	CH ₂ Cl ₂	30 ± 2	50 ± 2	5 ± 1
DCC/NHS	CH ₂ Cl ₂	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	na
DCC	DMF	40 ± 10	30 ± 2	na
DCC/NHS	DMF	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	na
MA	CH ₂ Cl ₂	1,2 ± 0,8	25 ± 5	0,0
MA	DMF	37 ± 4	24 ± 9	3
MA	THF	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,1
EEDQ	CH ₂ Cl ₂	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1
EEDQ	DMF	19 ± 5	1,0 ± 0,1	1
EEDQ	THF	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1	na
WRK	DMF	10 ± 2	0,3 ± 0,1	1 ± 0,1
Azid	EtOAc		< 0,5	

* az SPPS-ben négyszeres feleslegű Bz-Phe-OH-t és kapcsolóreagenst alkalmaztak

^x a DL izomer százalékos mennyisége a Bz-Phe-OH + Ala-OBzl kapcsolásban na nem kimutatható mennyiség

TAKUMA [594] Z-L-Phe-L-Val-OH + ProOBu¹ kapcsolás hatékonyságát és racemizációját analizálta SN 01 oszlopon 0,02 M vizes NH₄-formiát–metanol (5:95 v/v) eluens segítségével (37. táblázat). A detektálási határ a D-izomerre kb. 0,01% volt.

Az 1964-ben bevezetett Young racemizációs tesztet WODECKI és mtsai modernizálták Pirke oszlopon (DNB-L-Leu aminopropil-szilikát) etanol–hexán eluenssel [627].

BENOITON racemizációs tesztekben Z-Gly-L-X-t (X= Ala, Leu, Phe, Val, Ile) kapcsolt L-Lys(Z)-OBzl-vel, s a védőcsoport eltávolítása után nyert diasztereomer tripeptideket vizsgálta [628]. Csoportja 53 epimer N-szubsztituált di-, tri- és tetrapeptid sav és észter HPLC vizsgálata alapján (μ Bondapak-C₁₈ oszlop, acetonitril-metanol-pH 4,4 vizes puffer eluenskeverékek) az N-Z-Gly-XXX-Val-OEt (XXX= Ala, Val, Leu és Phe) sorozatot ajánlotta racemizációs tesztvizsgálatokhoz [554].

37. táblázat

Peptidkémiai kapcsolások racemizációs jellemzői [594]

Kapcsolási módszer	<i>t</i> (°C)	Idő (óra)	Hozam (%)	D-izomer (%)
DPPA-TEA	0	4	8,68	2,2
DEPC-TEA	0	4	87,6	1,4
DCC	0	24	49,3	19,3
DCC-HOBt	0	24	46,9	4,7
Ph ₃ P-2,2'-dipiridil-diszulfid	0	24	80,6	40,4
v.a.ClCO ₂ Bu-NMM	-20	4	29,9	6,8
azid (Rudinger)	0	24	61,9	2,3
"stepwise"-DPPA	0	24	82,3	0,3
"stepwise"-DEPC	0	24	79,6	0,1

A 38. táblázat néhány védett peptidre kidolgozott racemizációs teszt gyűjteményét tartalmazza.

7.2.3. Királis elválasztások

Peptidek racemizációjának vizsgálata visszavezethető az őket felépítő aminosavak vizsgálatára. A polipeptidhidrolízis után nyert enantiomer aminosavkeverék elválasztása a konvencionális HPLC körülményei között közvetlenül nem oldható meg (ez vonatkozik enantiomer peptidek elválasztására is), királis kölcsönhatás igénybevételével viszont igen.

Lehetőségek:

- királis oszlop (állófázis),
- királis eluens (mozgófázis) vagy királis adalék az eluensben,
- oszlop előtti származékképzés királis reagens segítségével.

38. táblázat

Racemizációs tesztek

HPLC rendszer	Védett peptid	Irodalom
fordított fázis	Mbe-Gly-Ala-OBzl	[629]
"	Z-Gly-Phe-Val-OMe	[630]
"	Z-Gly-XXX-Val-OEt	[554]
"	Z-Gly-Xaa-Xbb-OMe	[631]
normál fázis	Bzl-Phe-Ala-OMe(OBzl)	[625]
"	Z-Ala-Phe-Val-OMe	[632]
"	Z-Ala-Phe-Gly-Phe-Gly-OMe	[633]
"	Bz-Phe-Leu-OMe	[634]
"	Ac-Phe-Leu-OMe	[635]
"	Bzl-Val-Leu-OMe	[635]
"	Bzl-Val-Phe-Leu-OMe	[635]

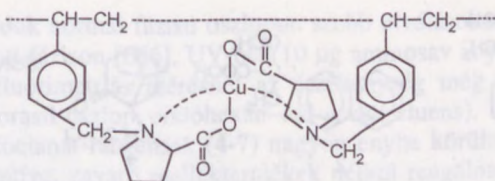
7.2.3.1. Királis oszlopok

Királis állófázisokat aminosavak, ill. származékaik [636-642] vagy fehérjék (pl. szérumalbumin, α_1 -savas-glikoprotein) szilikához kapcsolásával állítanak elő [643-647].

Racém aminosavszármazékok (amidok, karbamidok és hidantoinok) szilika alapú királis oszlopokon (Apex AP, AL, AU) CHCl_3 -hexán, izopropanol-hexán elegyekkel enantiomerekre választhatók szét [648].

D és L aminosavak szeparációját sokan megoldották különféle királis töltetek [553, 555, 557, 649-655] segítségével. Vannak töltetek, melyek optikailag aktív aminosavat (peptidet) tartalmaznak a szilikagél felületéhez kötve (4. táblázat). A módszerek közül kiemelkedik a ligandcsere kromatográfia [656], melynél vagy királis komplexképzőket alkalmaznak, vagy maga az állófázis ilyen (gyanták), vagy a normál és fordított fázisú tölteteket ilyenné alakítják [657-672].

ROGOZHIN és DAVANKOV közölt először teljes racém prolin rezolválást egy királis gyanta (klórmetilezett polisztirol L-prolinal aminálva) Cu(II) komplexén [657]:



A királis ligandot normál fázisú töltethez (szilikáwhoz) és fordított fázisúwhoz is kötötték [673, 674] és racém aminosavkeveréket szeparáltak rajtuk.

7.2.3.2. Királis eluensek [675-681]

A királis töltetek jól helyettesíthetők a hagyományos oszlopokkal, ha a mozgófáziswhoz királis komplexképző adalékot adunk pl. Cu(II)-só és egy királis szelektor formájában [682].

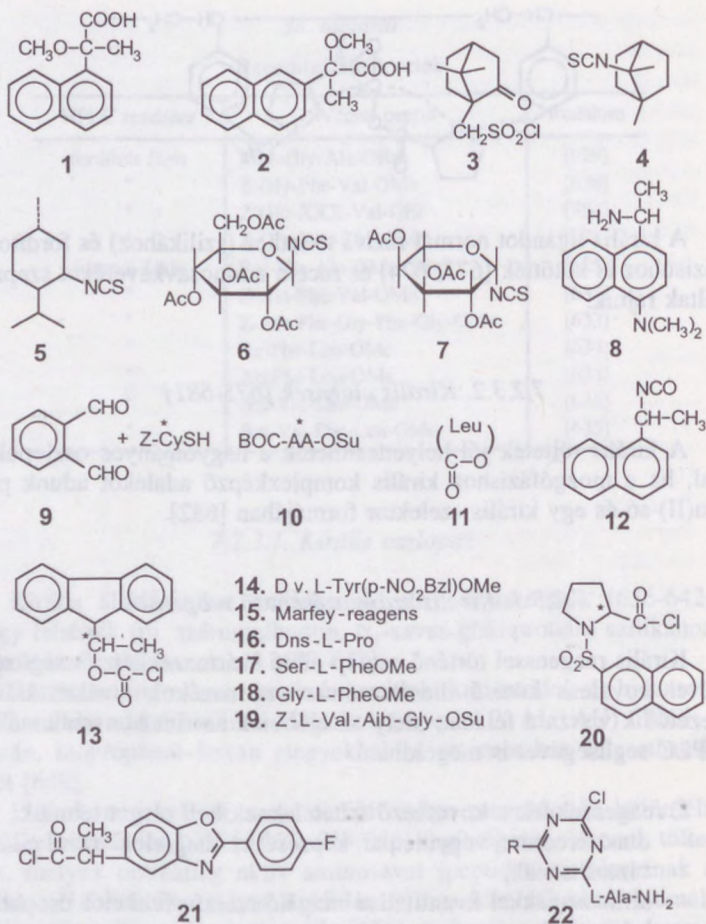
7.2.3.3. Királis származékképző reagensek

Királis reagenssel történő oszlop előtti származékképzés segítségével kovalens kötésű diasztereomer származékok elválasztására vezetődik vissza a feladat, mely az előbbiekh szerint konvencionális HPLC segítségével is megoldható.

- E reagenseknek a következő feltételeknek kell eleget tenniük:
- diasztereomer vegyülepár képzésével megfelelő rezolválást biztosítsanak,
 - aminosavakkal kvantitatíve reagáló reaktív funkciós csoporttal rendelkezzenek,
 - a detektálási érzékenység növelése érdekében egyben megfelelő kromofórt (vagy fluorofórt) is jelentsenek,
 - nagy optikai tisztasággal rendelkezzenek (99,95%).

A racém aminosav szeparálásban használatos királis reagenseket a 43. ábra tartalmazza.

FURUKAWA publikált először (1975-ben) enantiomer aminosavszármazék (*p*-nitro-benzil-észterek) elválasztásokat (+)-10-kámfor-



43. ábra. Királis származékképző reagensok

szulfonilklorid (3) reagens segítségével Micropak Si-5 és Micropak NH₂ oszlopokon [683, 684].

Aminosavakat COOH-csoportjukon is módosítottak királis származékképzéssel ((+)-1-aminoetil-4-dimetil-amino-naftalin) (8), így *N*-acetil-DL-aminosavakat tudtak szeparálni RP-18 oszlopon [685].

A Mosher-típusú naftalinszármazékokból (1, 2) képződő diaszte-

reomer amidok normál fázisú oszlopon szebb elválásokat mutatnak, mint fordított fázison [686]. UV-ben 10 µg aminosav is jól detektálható, sőt, fluorimetriás mérésnél az érzékenység még tízszer nagyobb (µ-Porasil oszlop, ciklohexán-etil-acetát eluens).

Az izotiocianát reagensek (4-7) nagyon enyhe körülmények között kvantitatíve, zavaró melléktermékek nélkül reagálnak, s a képződő tiokarbamid származékok 254 nm-nél érzékeny UV-detektálást tesznek lehetővé [685, 687-689].

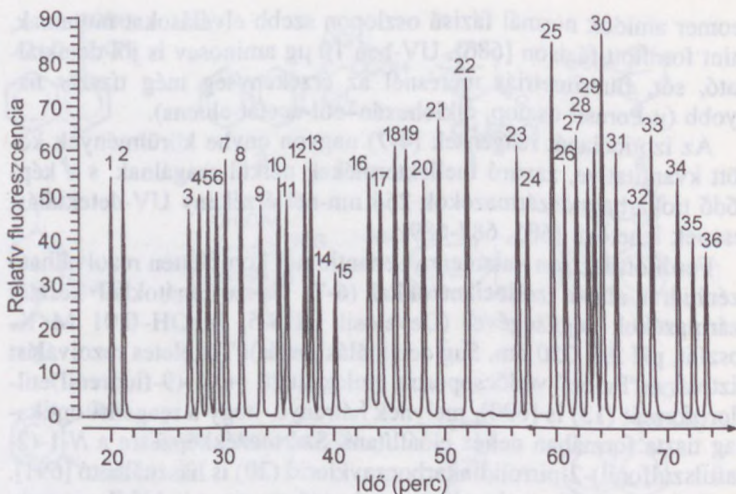
Fordított fázison valamennyi enantiomer kompletten rezolválható szénhidrát alapú izotiocianátokkal (6-7) és izocianátokkal készült származékok segítségével (Develosil ODS-5, MeOH-0,01 M K-foszfát, pH 2,8, 250 nm, 5µg detektálási határ). Tökéletes rezolválást biztosít a "Fmoc" védőcsoportra emlékeztető (+)-1-(9-fluorenil)etil-kloroformát (13) is [690], melynek hátránya, hogy a reagenst optikailag tiszta formában nehéz előállítani. Származékképzésre a *N*-1-(2-naftilszulfonil)-2-pirrolidinkarbonsavklorid (20) is használható [691].

Számos, királis aminosavat tartalmazó reagenst is kifejlesztettek. Az *o*-ftálaldehidet alkilmerkaptánok helyett *N*-védett ciszteinnel (9), tiocukrokkal vagy más optikailag aktív merkaptánokkal reagáltatva királis aminosavanalízis végezhető (44. ábra) [692-698].

Boc-aminosav-*N*-hidroxi-szukcinimidészterek (10) és az *N*-karboxi-leucin-anhidrid (11) is megfelelő reagensnek bizonyultak [699, 700]. A danszil-L-prolint ugyancsak használták már erre a célra [701]. *N*-védett aminosavak és aktív észterek optikai tisztaság ellenőrzésére GÖRÖG, HERÉNYI és LÓW [595] az L- vagy D-*O*-(4-nitrobenzil) tirozin metilésztert (14) ajánlották. A képződött diasztereomereket szilika oszlopon, *n*-hexán-izopropanol eluenssel alapvonal elválasztással szeparálták és a főtermékben 0,5 % antipódot meg tudtak határozni.

SPAHN és csoportja királis aktivált 2-aril propionsavakat: az S(+)-flunoxaprofénkloridot (21) és az S(-)-flunoxaprofénizocianátot használta származékképzésre, s a terméket fluoreszcenciásan mérték. A származékok szilikaoszlopokon *n*-hexán-CHCl₃-etanol eluensrendszerben jól elválaszthatók [702-705].

Benziloxikarbonil aminosavak királis szeparálására YAMADA és csoportja Gly-L-Phe-OMe-t (18), ill. Sar-L-Phe-OMe-t (17) használt [706, 707]. A kiindulási aminosavak optikai tisztaságának közvetlen megállapítását Z-L-Val-Aib-Gly-ONSu-val (19) oldották meg [708].



44. ábra. DL-aminosavak HPLC elválasztása [698]

Oszlop: ODS-Hypersil-5 μm , 250 x 4 mm

Eluens: A: 23 mM Na-acetát, pH 6,0

B: MeOH-CH₃CN 600/50

Gradiens: lineáris (75 perc)

Sebesség: 1 ml/perc

Származék: OPA + N-izobutiril-L-cisztein

Detektálás: fluorimetriás 230/445 nm

Komponensek:

1= L-aszparginsav

2= D-aszparginsav

3= L-glutaminsav

4= L-aszparagin

5= D-glutaminsav

6= L-szerin

7= D-aszparagin

8= D-szerin

9= L-glutamin

10= D-glutamin

11= L-treonin

12= glicin

13= D-treonin

14= L-hisztidin

15= D-hisztidin

16= L-alanin

17= L-arginin

18= D-alanin

19= D-arginin

20= L-homoarginin

21= L-tirozin

22= D-tirozin

23= L-valin

24= L-metionin

25= L-triptofán

26= D-metionin

27= D-valin

28= L-fenilalanin

29= L-izoleucin

30= D-triptofán

31= D-fenilalanin

32= D-leucin

33= D-izoleucin

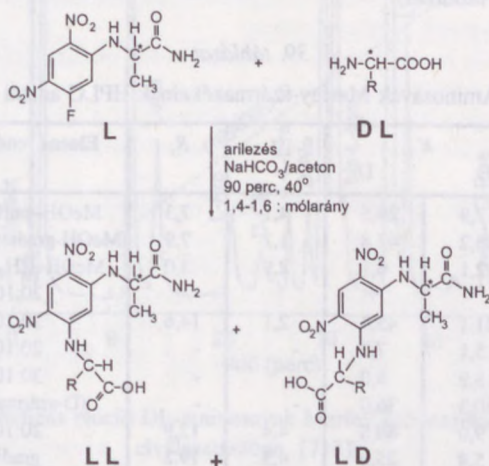
34= D-leucin

35= L-lizin

36= D-lizin

7.2.3.4. Marfey-reagens

Napjaink leghasználatosabb királis segédanyaga a Marfey-reagens [709], melynek használatával az Applied Bioscience kutatói már komplett királis aminosavanalizátort is kifejlesztettek. A Marfey-reagens 1-fluor-2,4-dinitro-fenil-5-L-alanin-amid, (a nevezéktan szerint: (*N*²-5-fluor-2,4-dinitro-fenil)-L-alanin-amid, a Sanger-reagens királissá alakított változata) az aminosavak optikai izomerjeivel diasztereomer *N*-aril származékokat ad, melyek RP-HPLC módszerrel szeparálhatók (45. ábra).



45. ábra. A Marfey-reagens reakciója aminosavakkal

A származékok nagy UV-abszorpciós együtthatóval rendelkeznek ($\epsilon_{340\text{nm}} \sim 3 \times 10^4$), így magas érzékenységgel detektálhatók. MARFEY először öt aminosavra (Ala, Asp, Glu, Met és Phe) demonstrálta a nagy retenciós idő különbségeket (és alapvonal elválasztásokat) C₁₈-as oszlopon acetonitril-gradiens rendszerben. A reagenst (3R)- és (3S)- β -leucin elválasztására is használták [710], valamint az összes fehérjealkotó aminosav és sokkomponensű aminosavkeverék analízisére is kiterjesztették [711, 712].

BRÜCKNER optimalizálta e reagenstípust, s intramolekuláris hidrogénkötések feltételezésével és modellezésével értelmezni tudta a

diasztereomerek elúciós sorrendjét és az elválasztás mechanizmusát [713, 714]. Hasonló módon királis monoklór-*s*-triazin (22) reagen-
seket is kidolgozott [715] cianurkloridból kiindulva.

Csoportunk elsők között alkalmazta és fejlesztette tovább a Marfey-módszert a peptidkémiai gyakorlatunkban előforduló racemizációs problémák megoldására [716-718]. A származékképzésre alkalmas minták különböző peptidek, fehérjék és aminosavszármazékok hidrolízisével nyerhetők. Módszerünk szerint a diasztereomer *N*-aril-származékok ODS-Hypersil oszlopon RP-HPLC feltételek között magas szeparációs tényezővel (α) és nagy feloldással (R_s) szeparálhatók (46. ábra). A rendszert alapvonal elválasztásokig optimaltunk (39. táblázat).

39. táblázat

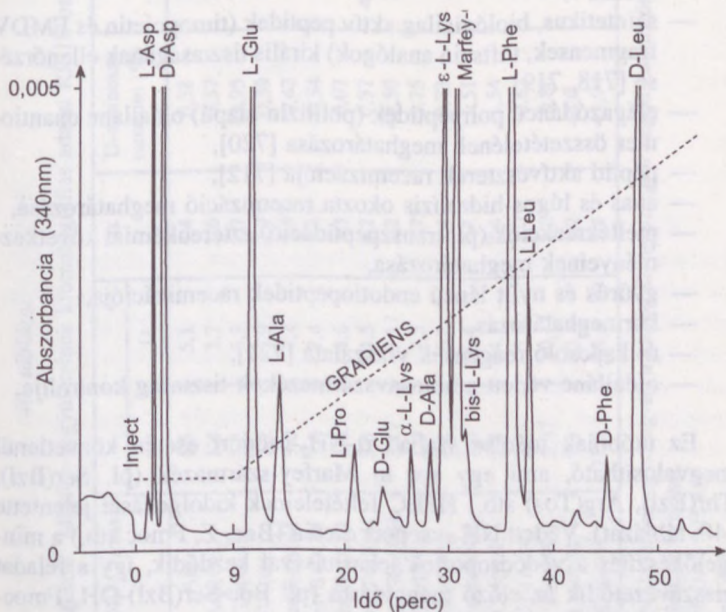
Aminosavak Marfey-származékainak HPLC adatai

Aminosav	k'		α	R_s	Eluens rendszer (v/v)	
	L	D				
Phe	7,9	29,5	4,1	7,3	MeOH-puffer (45:55)	
Phe	36,2	43,8	1,2	7,9	MeOH gradiens 80:20-ban	
Ala	2,1	6,1	2,9	3,0	MeOH-CH ₃ CN-puffer 20:10:70	
Leu	21,1	45,4	2,1	14,6	20:10:70	
Lys	α	5,1	7,2	-	-	20:10:70
	ϵ	8,9	8,0	-	-	30:10:60
bis	30,3	36,0	-	-	(D-származékokra)	
Val	9,0	40,0	4,4	12,9	20:10:70	
Thr	5,8	25,0	4,3	19,2	gradiens	
Ser	5,6	10,0	1,7	6,2	MeOH-puffer 20:80	
His	11,7	13,8	1,1	11,3	gradiens	
Met	3,0	34,5	4,3	17,6	20:10:70	
Asp	1,4	3,7	2,6	4,0	20:5:75	
Glu	1,8	4,2	2,3	3,4	20:10:70	
Gly	8,1	8,1			MeOH gradiens* 80:20	
Arg	9,8	15,4	4,5	2,7	20:10:70	

* A: 0,02 M Na-acetát puffer (pH 4)-metanol 4:1 (v/v) ; B: metanol, sebesség: 1 ml/perc, lineáris gradiens 1,5% B/perc, 9 perc után

Az L-diasztereomerek mindig a megfelelő D izomer előtt eluálódnak és az egyes aminosavpárookra 4-nél nagyobb α , ill. 19-nél na-

gyobb R_s -érték is található (!) rendszerünkben már 0,1% D-amino-sav is kimutatható, s a detektálási határ 5-8 pmol.



46. ábra. Gradiens elúció DL-aminosavak Marfey-származékainak HPLC elválasztásában [712]

Oszlop: ODS-Hypersil-6 (125 x 4 mm)

Eluens: A: MeOH-0,02M Na-acetát puffer (pH 4) 20:80 (v/v)

B: MeOH

Gradiens: lineáris (9 perctől)

A racemizáció (epimerizáció) meghatározásánál a következő lépéseket alkalmaztuk:

- hidrolízis (savas v. enzimátikus, optimált körülmények között),
- származékképzés,
- HPLC-elválasztás,
- kvantitatív kiértékelés, "háttér" racemizáció kiküszöbölése [717].

- A módszert eddig a következő területeken alkalmaztuk:
- kiindulási aminosavak optikai tisztaságának meghatározása,
 - *N* és *C*-védett aminosavszármazékok tisztaságának meghatározása
 - szintetikus, biológiailag aktív peptidek (timopietin és FMDV fragmensek, tuftszin analógok) királis tisztaságának ellenőrzése [718, 719],
 - elágazó láncú polipeptidek (polilizin-alapú) oldallánc enantiomer összetételének meghatározása [720],
 - peptid aktívészterek racemizációja [712],
 - avas és lúgos hidrolízis okozta racemizáció meghatározása,
 - mellékreakciók (pl. transzpeptidáció) sztereokémiai következményeinek meghatározása,
 - gyűrűs és nyílt láncú endotiopeptidek racemizációja,
 - kormeghatározás,
 - új kapcsoló reagensek vizsgálata [721],
 - oldallánc védett aminosavszármazékok tisztaság kontrollja.

Ez utóbbiak mérése szabad α -NH₂-csoport esetén közvetlenül megvalósítható, ami egy sor új Marfey-származék (pl. Ser(Bzl), Thr(Bzl), Arg(Tos) stb.) HPLC feltételeinck kidolgozását jelentette (40. táblázat). Védett NH₂-csoport esetén (Boc, Z, Fmoc stb.) a mintaelőkészítés a védőcsoportok lehasításával kezdődik, így a feladat visszavezetődik az előző megoldásra (pl. Boc-Ser(Bzl)-OH, Fmoc-Arg(Tos)OH vizsgálata) [722].

Peptidek esetében alkalmazott hidrolitikus előkészítési lépés maga is forrása lehet racemizációnak, mert a savas hidrolízisek körülményei között eltérő mértékben ugyan, de valamennyi aminosav racemizálódik [723-725]. A legérzékenyebb az aszparaginsav [726, 727]: a klasszikus (6 M HCl, 24 óra, 110°C) körülmények között 11,8% D-Asp tartalmat határoztunk meg mérési módszerünkkel. Nehezíti a meghatározást, hogy a racemizáció szekvenciafüggő [728].

A "hátér" racemizációt a mérési körülmények optimálásával, a korrekció pontos figyelembevételével, enzimatis hidrolízisek és a legrövidebb hidrolízis idő (2-4 perc ultrahanggenerátorban) bevezetésével [729] tudtuk kizárni [717, 730]. A racemizációt megbízhatóan 0,1%-ig, és 0,03% pontossággal tudtuk mérni.

Aminosavszármazékok* Marfey-vegyületeinek kromatográfias adatai RP-18 oszlopon

Aminosav	Származék	α -NH ₂ forma	k'		α	D-aminosav tartalom (%)	Eluens
			L	D			
Asn	Boc-Asn	Asn	1,5	5,1	3,4	0,38	20:5:75 ^a
		Asp(OH) ₂	1,4	3,7	2,6	0,37	20:5:75 ^a
Glp	Boc-Glp-OH	Glu(OH) ₂	2,2	5,9	2,7	19,95	20:5:75 ^a
	Boc-Glp-OPFP	Glu(OH) ₂	2,2	5,9	2,7	0,39	20:5:75 ^a
Ser	Boc-Ser(Bzl)OH	Ser(Bzl)OH	3,0	7,4	2,47	0,42	50:50 ^b
		Ser(Bzl)OH	3,0	7,4	2,47	0,34	50:50 ^b
Thr	Thr(Bzl)OH	Thr(Bzl)OH	3,25	6,6	2,3	0,07	50:50 ^b
Arg	Boc-Arg(Tos)OH	Arg(Tos)OH	3,5	14,5	4,2	0,37	49,5:50,5 ^b
	Fmoc-Arg(NO ₂)OH	Arg(NO ₂)OH	3,17	7,17	2,2	49,50	20:5:75 ^a
His	Boc-His(DNP)NH ₂	His(DPN)	2,0	7,5	3,75	0,75	50:50 ^b
		His(DPN)	1,8	6,2	3,4	0,73	50:50 ^b
Cys	Boc-Cys(Bzl)NH ₂	Cys(Bzl)NH ₂	7,0	16,8	2,4	1,51	50:50 ^b
		Cys(Bzl)	5,8	14,1	2,4	1,54	50:50 ^b
	Cys(Acm)	Cys(Acm)	2,71	5,80	2,07	0,83	20:5:75 ^a
		Tin-OH	5,57	10,14	1,8	0,80	20:5:75 ^a
		Leu-NH ₂	7,1	22,5	3,2	44,0	25:10:60 ^a
Leu	Boc-Leu-NH ₂	Leu-OH	21,1	45,4	2,1	43,94	20:10:70 ^a

* A vizsgált minták a REANAL Finomvegyészgyár, a Richter Gyógyszergyár Peptid Laboratóriuma és a SZOTE Orvosi Vegytani Intézet termékei.

^a MeOH-CH₃CN-0,02 M NaOAc (pH 4,0)

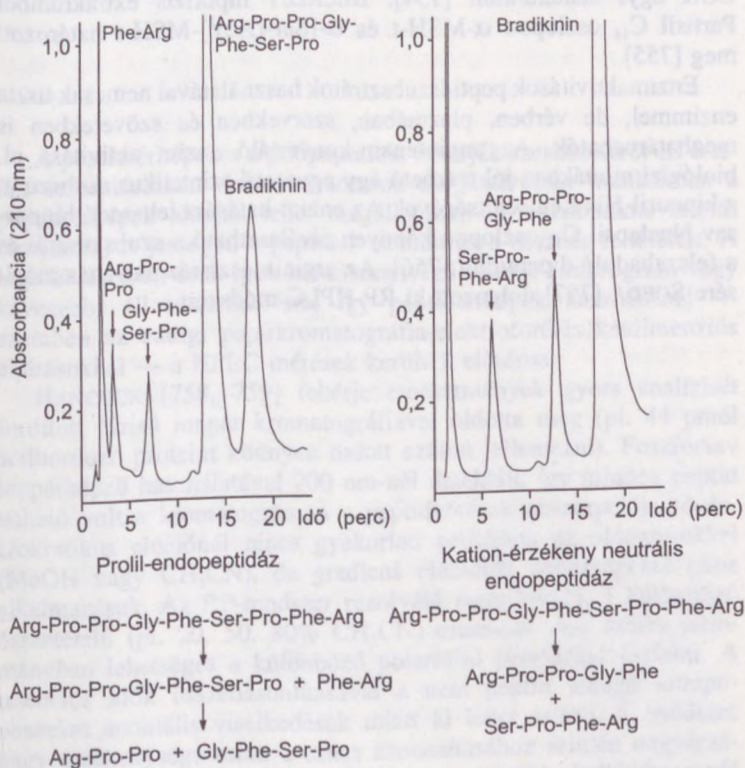
^b MeOH-0,02 M NaOAc (pH 4,0)

8. PEPTIDMETABOLIZMUS VIZSGÁLATA HPLC-VEL

A RIA (radioimmunoassay) és a biológiai értékmérések megfelelő információt adnak egy peptid inaktiválódásának, ill. felhasználásának mértékéről és helyéről. Mindezek mechanizmusának, valamint a különböző transzformációk mikéntjének feltárása megköveteli a peptidből keletkező fragmensek, ill. metabolitok szeparálását és azonosítását, melynek kitűnő segédeszköze lett a HPLC. Segítségével a peptidhormonok felezési ideje is meghatározható, de szerepe a metabolizmus felderítésében nélkülözhetetlen [731]. Az analízist a vizsgálatra kerülő minták összetettsége (vér, agy és szöveti homogenátumok, gyomornedv stb.) nehezíti. A mintaelőkészítés szerepe így döntő fontosságúvá vált. A szilárdfázisú extrakció bevezetése peptidok izolálására nagy jelentőségű volt [732, 733]. A C_{18} -szilika fordított fázisú töltet vizes oldatokból fehérjék mellől is erősen adszorbeálja a peptideket (melyek általában aromás aminosavakat is tartalmaznak). A fehérjék egyrészt méretük miatt nem juthatnak a töltetmátrixba, másrészt hidrofíl felszínükkel nem mutatnak nagy aktivitást a hidrofób szemcsék felé. A megkötött peptidek kevés elektrolitot (pl. TFA) tartalmazó vizes acetonitril, vagy metanol segítségével elújlathatók, s a nyert frakciók HPLC-vel vizsgálhatók.

BENNETT a hipofízis neuropeptidjeinek vizsgálatánál fejlesztette magas szintre ezt a módszert [731]. A biológiai minták alacsony peptidhormon-tartalma miatt a szilárdfázisú extrakció a minta koncentrációját is elősegíti. További segítséget jelent radioaktívan jelzett anyagok használata, mert így a detektálás érzékenysége nagymértékben növelhető [734]. Számos peptidhormon esetében végeztek már *in vivo* és *in vitro* metabolizmusvizsgálatokat a fenti módszertani újításokkal [735-751].

További jelentős szerep jut a HPLC-nek az enzim hasítások feltérképezésében is, hiszen a folyamatot a keletkező fragmensek nyomonkövetésével is bizonyítani lehet (1. enzim peptidterképezést is).



47. ábra. Agyi endopeptidázok hatása a bradikinin lebomlására [740]

Oszlop: ODS-SIL-X-1

Elhens: A: 15% MeOH-0,05 M KH_2PO_4 puffer (pH 2,0)

B: MeOH

Gradiens: 2 % B/perc

Sebesség: 2 ml/perc

WILK és ORLOWSKI [740] a bradikinin endopeptidázos hasítását (47. ábra) már 1979-ben felderítette. Azóta a neuropeptidek többségének, így pl. az enkefalinok, a vazopresszin, az oxitocin stb. metabolizmusát is tisztázták [303, 752, 753], valamint vizsgálták a CCK agyi átalakulásait [754]. BUCKLEY hipofízis extraktumból Partisil C₁₈ oszlopon α -MSH-t és α -[Ser-(Ac)¹]-MSH-t határozott meg [755].

Enzimaktivitások peptidszubsztrátok használatával nemcsak tiszta enzimmel, de vérben, plazmában, szervekben és szövetekben is meghatározhatók. Az angiotenzin-konvertáló enzim aktivitása pl. biológiai mintákban jól mérhető egy egyszerű szintetikus szubsztrát, a hippuril-His-Leu segítségével. Az enzim hatására lehasadó hippursav Nucleosil C₁₈ oszlopon könnyen elválasztható a szubsztráttól és a felszabaduló dipeptidtől [756]. Az arginin-észteráz aktivitás mérésére SOEDA [757] dolgozott ki RP-HPLC módszert.

9. PEPTIDTÉRKEPEK KÉSZÍTÉSE

A peptid térképezés a polipeptidek, fehérjék szerkezetéről ad értékes információkat. Aminosavsorrend meghatározási munkákban a peptid térképek alapján lehet megállapítani az enzimátikus bontás (emésztés) teljességét, a peptidek számát és a tisztítás feltételeit. A legtöbb esetben csak igen kis mennyiségű fehérje (mikrogram vagy kevesebb) áll rendelkezésre, így peptid térképek készítésénél — szemben az eddigi papírkromatográfia-elektroforézis kétdimenziós eljárásokkal — a HPLC mérések kerültek előtérbe.

HANCOCK [758, 759] fehérje emésztmények gyors analízisért fordított fázisú ionpár kromatográfiával oldotta meg (pl. 44 pmól acilhordozó proteint könnyen tudott ezúton jellemezni). Foszforsav ionpárképző használatával 200 nm-nél detektált, így minden peptid látható volt a kromatogramon a peptidkötések abszorpciója révén. Izokratikus elúciónál nincs gyakorlati probléma az oldószerekkel (MeOH vagy CH₃CN), de gradiens elúciónál nehézségeket okoz alkalmazásuk. Az RP-rendszer rezolváló ereje kiváló, 3 különböző összetételű (pl. 20, 50, 80% CH₃CN) eluenssel már széles tartományban lehetséges a különböző polaritású peptideket észlelni. A retenciók idők összehasonlításával a nem peptid jellegű komponenseket anomális viselkedésük miatt ki lehet szűrni. A módszer nagy érzékenysége miatt a csúcs azonosításához szintén nagyérzékenységű aminosavanalizátor szükséges. A több hullámhossznál történő detektálás további felvilágosítást ad a peptidek természetéről, ami a diódasoros felvételekkel még fokozható [760].

ISOBE [761] analitikai térképezéshez és preparatív elválasztáshoz fejlesztett ki HPLC rendszert sztirol-divinil-benzol típusú makróretikuláris kationcserélő gyantát (Hitachi-Gel 3013C, 6 ± 1 μm részecske méret és 35% keresztkötés) használva (eluensek: **A**: 0,4 M NH₄-metánszulfonát (pH 6,2), **B**: 0,4 M NH₄-metánszulfonát–50% CH₃CN–25% izopropanol, lineáris gradiens, 70 °C, detektálás: 210 nm). A kiváló csúcsfeloldás mechanikai és kémiai stabilitással járt

együtt. Az *S*-aminoetil Bence-Jones fehérjék triptikus bontásának analízise (nanomól-mikromól méretben) 2 órát vett igénybe. Az izolált peptidek sóatlanítás után vagy közvetlenül kerültek aminosav-analízisre és szekvenálásra.

Később kétdimenziós eljárást fejlesztettek ki egy ioncserélő és egy RP-oszlop automatizált sorba kapcsolásával, komplex peptidkeverékek (így triptikus emésztmények, agyi extraktumok) nagy feloldású analízisére [762]. A peptidterképezés RP-HPLC feltételeit többen optimálták alternatív álló és mozgófázisok alkalmazásával [763-765].

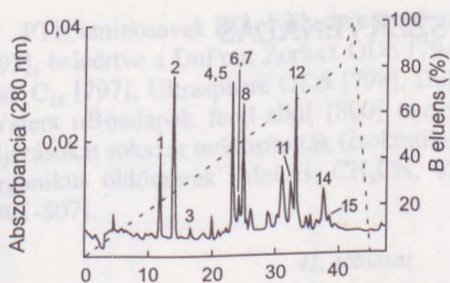
Fehérjék triptikus peptidterképeinek nagyérzékenységű (pikomól tartomány) elkészítését RUBINSTEIN fluoreszkaminos detektálást alkalmazó módszere tette lehetővé [766]. Nagyhatékonyságú, jól reprodukálható, komplex peptidkeverék elválasztására is megfelelő RP-HPLC rendszert dolgozott ki. A "marker" peptidek elúciós helyzete hónapok múlva sem változott és a visszanyerés hozama 90%-nál magasabb volt. Ők ismerték fel a módszer automatizálhatóságát és a kvantitatív mérési lehetőségeket, s a frakciógyűjtést is megoldották.

DRAY [767] összehasonlító vizsgálatai szerint a HPLC-vel izolált triptikus peptidek aminosavanalízise szebb eredményeket adott, mint a TLC-vel nyerteké (ez utóbbiak általában extra aminosavakhoz vezettek), s az izolálás hozama is nagyobb volt. HPLC-t használva a háttérszennyeződés is jelentősen csökken. (Ha az eluens NH_4 -acetát puffert tartalmaz, az aminosavanalízis természetesen magas ammóniatartalmat jelez.)

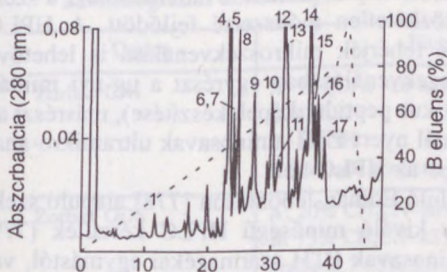
SHIVELY [768] és munkacsoportja mikroszekvenca-analízishez készítette elő a triptikus peptidterkép mintákat RP-HPLC-vel. Eluensként TFA-acetonitril rendszert (detektálás: 206 nm) vagy piridin-formiát (vagy piridin-acetát) és *n*-propanol keverékét használták oszlop utáni fluoreszkaminos származékképzéssel. Legjobb megoldásnak az alkilfenil oszlopokat találták TFA-acetonitril eluenssel.

WILSON és HUGHES [40, 769, 770] is a HPLC-t találta a legmegfelelőbbnek fehérjék, többek között a hemoglobin variánsok brómciános hasítással és tripszines bontással készült peptidterképeinek analízisére.

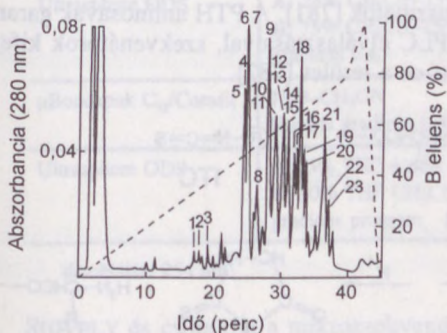
Peptidterképek készítése az RP-HPLC nagy felbontóképességét használja ki és ez a módszer ma már nélkülözhetetlen a proteinanalízisben [771-774] és szerkezetkutatásban [775].



hidrolízis kimosinnal
(pH 5,5, 37 °C), 116 óra



hidrolízis kimosinnal
(pH 3,5, 37 °C), 7 óra



hidrolízis pepszin-A-val
(pH 3,0, 37 °C, 24 óra)

48. ábra. β -A-2 Kazein proteolitikus peptidterképei [775]

Oszlop: μ Bondapak C_{18}
 Eluens: A: TFA-H₂O 1,115:1000
 B: TFA-CH₃CN-H₂O 1:600:400
 Sebesség: 2 ml/perc
 Detektálás: UV, 220 nm, 280 nm

PTH aminosavak RP-elválasztását sok tölteten megoldották [783-793], beleértve a DuPont Zorbax ODS [794-796], a Waters μ Bondapak C₁₈ [797], Ultrasphere ODS [798], DuPont Zorbax CN [799] és Waters μ Bondapak fenil-alkil [800] oszlopokat (41. táblázat). Az eljárásokat sokszor módosították (izokratikus, gradiens elválasztások, organikus oldószerek (MeOH, CH₃CN, THF stb.) használata stb.) [801-807].

41. táblázat

Kromatográfiai körülmények PTH-aminosavak HPLC-jében

Oszlop	Eluensrendszer
Zorbax CN	A: NH ₄ OAc 20 mM B: CH ₃ CN C: MeOH 5 fokozatú gradiens program, 1 ml/perc
Zorbax ODS	A: 20% CH ₃ CN–80% foszfát puffer (pH 4,5) B: 75% CH ₃ CN–25% foszfát puffer (pH 3,0) gradiens 7-95% B, 1,3 ml/perc
Ultrasphere ODS	A: 25% CH ₃ CN–75% foszfát puffer (pH 3,0) B: 75% CH ₃ CN–25% foszfát puffer (pH 3,0) gradiens u.a.
μ Bondapak C ₁₈ /Corasil	H ₂ O–CH ₃ CN lineáris gradiens 0-40%, 0,6 ml/perc
Ultrasphere ODS	A: 5% THF 4 mM NaOAc-ban (pH 5,16) B: 10% THF CH ₃ CN-ben gradiens program, 1,3 ml/perc

detektálás: 254 nm

SHIVELY és csoportja a mikroszekvenálásban érték el kimagasló eredményeket: 0,5-1,0 nmól peptid (ill. protein)-ből 30-60 lebontási ciklust végig tudnak elemezni [246-248]. Szintetikus termékek szekvenálása ma már a tisztaságvizsgálatnál elengedhetetlen követelmény. Az oldalláncvédett aminosavak PTH származékainak HPLC analízisét SCHLESINGER [781] oldotta meg. Így a szennyezések kimutatása mellett a szilárdfázisú szintézissel készült védett peptid téves szekvenciáinak felderítése is könnyebb lett.

SZEKVENCIA ANALÍZIS
(EDMAN-LEBONTÁS) →

?

← SZILÁRD FÁZISÚ
SZINTÉZIS

NH₂—(F)—(E)—(D)—(C)—(B)—(A)—COOH KORREKT AMINOSAV SORREND

NH₂—(F)—(E)—(C)—(B)—(A)—COOH HIBÁS SZEKVENCIA

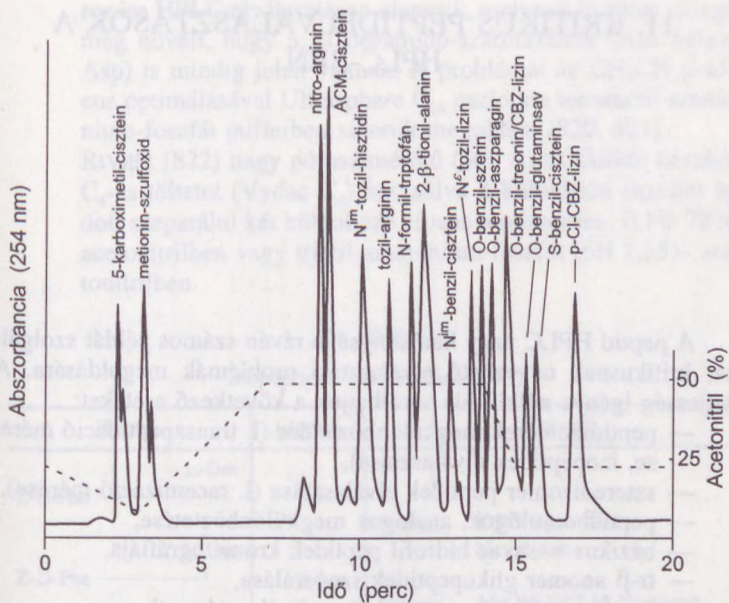
	C	C	C
	I	I	I
PITC	K	K	K
LEBONTÁS	L	L	L
	U	U	U
	S	S	S
	1	2	3
	(F)	(E)	(D)
	(F)	(E)	(C)

50. ábra. Edman-lebontás a hibás szekvenciák felderítésében

A szekvenálás jelentősége:

- izolált, új peptidek szerkezetének (aminosavsorrendjének) megállapítása,
- szekvencia összehasonlító tanulmányok,
- szilárdfázisú szintézis termékeinek kritikai értékelése,
- mikroheterogenitások felderítése.

Ami az optikai tisztaság ellenőrzést illeti, már királis Edman-reagensekkel is próbálkoztak a szekvenálás továbbfejlesztése során [811].



51. ábra. Oldalláncvédett aminosavak PTH származékainak analízise Zorbax-ODS oszlopon [781]

11. KRITIKUS PEPTIDELVÁLASZTÁSOK A HPLC-BEN

A peptid HPLC nagy hatékonysága révén számos példát szolgáltat kritikusnak nevezhető elválasztási problémák megoldására. A teljesség igénye nélkül ide sorolhatjuk a következő eseteket:

- peptidizomerek megkülönböztetése (l. transzpeptidáció mérése, izopeptidek elválasztása),
- sztereoiszomer peptidek elválasztása (l. racemizáció mérése),
- peptidhomológok, analógok megkülönböztetése,
- bázikus v. savas hidrofil peptidek kromatográfiája,
- α - β anomer glikopeptidek szeparálása,
- foszfopeptidek és izomerjeik szétválasztása stb.

A következő eseteket mutatjuk be példaként:

- Lizin izopeptid intermediereket és analógjaikat ODS-Hypersil oszlopon izokratikusan MeOH–0,01 M Na-acetát puffer (pH 4,0) eluensrendszerrel (42. táblázat) jó hatékonysággal tudtuk szétválasztani [414].

GOERTNER és PUIGSERVER [812] a Met-Lys izopeptidek szeparálását Lichrosorb C₁₈ oszlopon CH₃CN gradienssel érték el 0,1% H₃PO₄–0,1 M NaClO₄ (pH 2,2) vagy 0,005 M NaH₂PO₄ (pH 7,4) eluensben.

- Egy peptidcsalád tagjainak elválasztása (pl. α , β és γ endorfinok) szeparálása könnyen megvalósítható [813-819], a dez-Tyr¹-származékok szeparálása azonban már problémát jelentett. Ezek elválasztása Nucleosil 5C₁₈ oszlopon, NaH₂PO₄–Na₂SO₄–CH₃CN gradienssel 40°C-on megvalósítható, s a szeparáció Ultrasphere ODS-5 töltet használatával még javítható [820].
- A csak egy-két aminosavban különböző, 51 tagú inzulin polipeptidek eredetének (humán, szarvasmarha, sertés) meghatá-

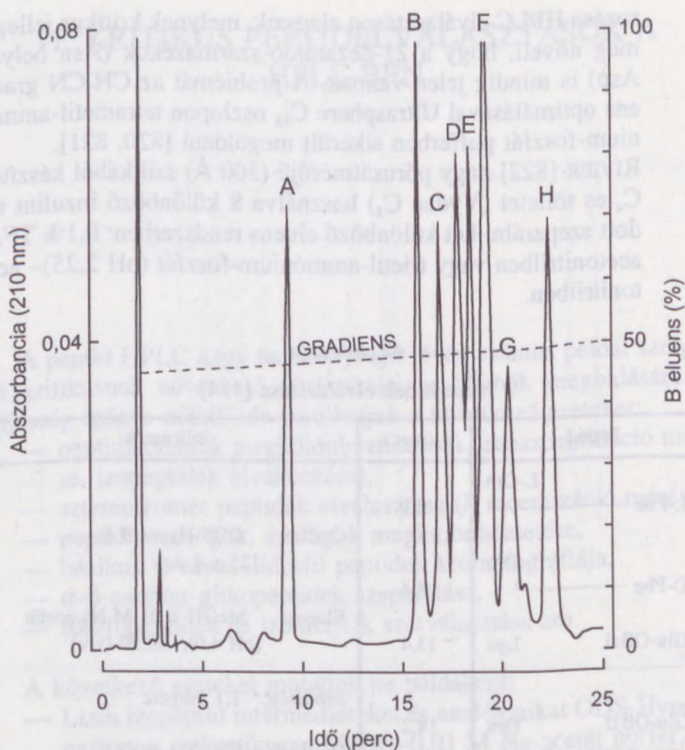
rozása HPLC elválasztáson alapszik, melynek kritikus jellegét még növeli, hogy a 21-dezamido-származékok (Asn helyett Asp) is mindig jelen vannak. A problémát az CH₃CN gradiens optimalizálásával Ultrasphere C₁₈ oszlopon tetrametil-ammónium-foszfát pufferben sikerült megoldani [820, 821].

RIVIER [822] nagy pórusátmérőjű (300 Å) szilikából készített C₄-es töltetet (Vydac C₄) használva 8 különböző inzulint tudott szeparálni két különböző eluens rendszerben: 0,1% TFA-acetonitrilben vagy trietil-ammónium-foszfát (pH 2,25)-acetonitrilben.

42. táblázat

Izopeptidek elválasztása [414]

Peptid	t _R (perc)	Jellemzők
Z-L-Phe ————— L-Orn	8,9	Oszlop: ODS-Hypersil-6 125 x 4 mm Eluens: MeOH-0,01 M Na-acetát (pH 4,0), 50:50 (v/v) Sebesség: 1,1 ml/perc Detektálás: UV, 254 nm
Z-D-Phe ————— L-Orn	8,4	
Z-Glu-OBzl ————— Lys	13,4	
Z-Glu-OBzl ————— Orn	14,2	
Z-Glu ————— Lys └ OBzl	20,2	
Met-Lys	4,5	Oszlop: Lichrosorb C ₁₈ , 7 μm 250 x 4 mm
Met ————— Lys	9,6	Eluens: CH ₃ CN gradiens 1,5%/perc 0,1% H ₃ PO ₄ -ban és *0,005 M NaH ₂ PO ₄ -ban
Ac-Met-Lys-Ala-NH ₂	14,6*	
Ac-Met ————— Lys-Ala-NH ₂	16,1*	Sebesség: 1 ml/perc Detektálás: UV, 214 nm



52. ábra. Inzulinok szeparálása [822]

Oszlop: V-1830-4, Vydac C4

Eluens: A: 0,1% TFA vízben

B: 0,1% TFA acetonitril-víz (60:40)-ben

Sebesség: 2 ml/perc

Gradiens: 45 - 50% B, 25 perc

Detektálás: UV, 210 nm

Komponensek: 5-5 µg A csirke, B marha, C birka D nyúl,
E humán, F sertés, G patkány^I,
H patkány^{II} -inzulin

— Egy módosított ACTH fragmens, a H-Met(O₂)-Glu-His-Phe-D-Lys-Phe-OH szintézise során a His-nél racemizálódott, amit a megsztetizált H(MetO₂)-Glu-D-His-Phe-D-Lys-Phe-OH összehasonlító segítségével igazolni lehetett. HPLC-vel

így 0,1% racemizáció volt megállapítható [820] (Nucleosil C₁₈-10 µm oszlop, eluensek: **A**: 0,1% H₃PO₄, **B**: 0,05 M tetrametil-ammonium-foszfát puffer (pH 2,8)–MeOH (50:50)).

— Bázikus hidrofil peptidek, pl. Arg-Arg-Ala-Ser-Val, Arg-Lys-Asp, ACTH₁₁₋₁₆ stb. esetén RP oszlopokon még tiszta vizes eluens esetében is csak nagyon gyenge retenciót lehet elérni. Ionpároképző pentán- vagy hexánszulfonát-só alkalmazásával olyan retenció-növekedés érhető el [823-826], hogy gradiens elúcióval még a peptid diasztereo izomerek is elválaszthatók lesznek.

— Savas, hidrofil peptideknél az előzőhöz hasonló kromatográfiás viselkedés miatt RP oszlopokon ionpároképző tetraalkilammonium-sók alkalmazása ajánlott [827]. Sok esetben a szilika oszlop használata is megoldást jelenthet [828], pl. nagyon hidrofil Pro, Gln, Ser tartalmú tetra és pentapeptidek trietil-amin-trifluor-acetát–H₂O–i-PrOH, NH₄OAc puffer–i-PrOH eluenssel szilika oszlopon jól kromatografálhatók.

— Az emberi neurofilamens fehérje több szerint tartalmazó alegységének szintézise során a különböző módon *O*-foszforilezett peptideket Ötvös [829] Ultrasphere ODS oszlopon 0,1% TFA–CH₃CN eluenssel, gradiens elúcióval tudta szétválogatni.

— Boc-X-Ser-NHCH₃ (X: Pro, Val) dipeptidek 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-glüko-, D-galacto- és D-manno-piranozidjainak anomer-keverékeit tudtuk RP-18 oszlopon MeOH–H₂O izokrátikus rendszerrel analizálni és szemipreparatívén tisztítani [830].

Előzetes tisztítás (µg)	10	20	30	40
Előzetes tisztítás (µg)	10	20	30	40
Tisztítás (µg)	10	20	30	40
Előzetes tisztítás (µg)	10	20	30	40
Tisztítás (µg)	10	20	30	40
Előzetes tisztítás (µg)	10	20	30	40
Tisztítás (µg)	10	20	30	40

12. CSÚCSFELHASADÁSOK A PEPTID-HPLC-BEN

Polygosil-C₁₈ oszlopon, CH₃CN–foszfát puffer 7:93 eluenssel BAJUSZ [860] véralvadásgátló Arg-tripeptid aldehidje, a pH 6,8-nál egy csúcsot mutató D-Phe-L-Pro-L-Arg-H savas mozgófázis (pH 2,2) esetén három csúcsban eluálódik. Ezek az aldehid, aldehid-hidrát és a ciklikus aldiminhidrát formák között fennálló egyensúly komponenseinek felelnek meg. Optikai tisztaságvizsgálat során a DLL és DLD konfigurációjú anyag 3-3 csúcsot mutatott (pH 2,2) [831, 832, 861].

Lassú konformációs egyensúlyok, melyek a retenciós idő nagyságrendjébe esnek, hőmérsékletfüggő csúcsszélesedést vagy csúcsfelhasadást mutatnak középmeretű peptidek RP-HPLC-jében. Pro-Pro kötést tartalmazó lineáris peptidek, valamint prolinokat tartalmazó ciklopeptidek mutatják ezt a jelenséget. 50 °C körüli hőmérsékleten egységes csúcs alacsony hőmérsékleten (0, –10 °C) teljes kettőződést mutathat, mely *cisz* és *transz* peptidkötés jelenlétével magyarázható [833]. HENDERSON biológiailag aktív Pro tartalmú peptideknél ugyanezt tapasztalta [834].

N-metil-aminosavakat tartalmazó kolecisztokinin analógok RP-HPLC képe –17 °C-on a *cisz-transz* származékok egyensúlyát bizonyítja [835].

Konformációs izomerek polipeptidek kromatografálásánál megjelenhetnek [836-838].

13. MIKRO-HPLC

A HPLC érzékenységeinek növelése és az eluensszükséglet csökkentésének igénye vezetett az oszlopátmérő csökkentéséhez. Ilyen oszlopokat PTH-aminosavak, danszil-aminosavak és peptidek analízisének, a neuropeptid vizsgálatokban már alkalmaznak is "microbore", "narrow-bore", "kapilláris" HPLC elnevezéssel.

A módszer pikomól tartományban teszi lehetővé az LC elválasztásokat és méréseket [839-845]. Használatukkal 20-100-szoros érzékenységnövekedés érhető el az analitikai HPLC-hez képest. Ezen oszlopokkal ma már nanopreparatív izolálások és tisztítások váltak lehetővé [846, 847].

A "microbore" oszlopok megjelenése jelentős változtatásokat hozott a HPLC rendszer felépítésén (pumpa, detektor, mikrogradiens rendszer stb.) [848-849]. Jelentős szerephez jutott a peptidek jellemzésében, hiszen a mikroszekvenáláshoz minták tisztítása [841, 850], valamint triptikus peptidterképek [846, 848] készítését lehet megoldani segítségével, s így 400 pmól vagy még kevesebb peptidminta elegendő lehet a teljes szerkezetmeghatározáshoz (aminosavanalízis, mikroszekvenálás, peptidterképek stb.).

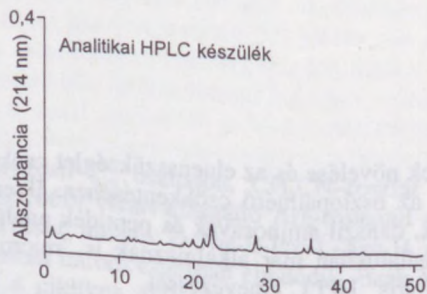
43. táblázat

HPLC oszlopok összehasonlítása

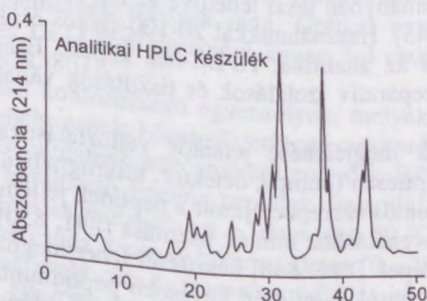
	"Kapilláris"	"Microbore"	"Narrowbore"	"Analitikai"
Oszlop belső átmérő (mm)	0,2-0,3	1,0	2,0	4,6
Sebesség (μl/perc)	1-10	50	200	1000
Érzékenység (mAV)	200	20	5	1
Kapacitás (mg)	10 ⁻³ -10 ⁻⁵	0,1	0,4	2
Csúcs térfogat (μl)	5	25	100	500
Eluens szükséglet (ml/40 óra)	2,4-24	120	480	2400

Az alacsony átfolyási sebesség egyszerűbbé teszi számos detektorral, pl. a tömegspektrométerrel való csatlakoztatását, valamint meg-

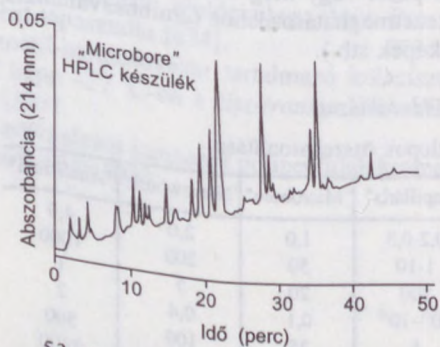
könnyíti a különböző elválasztási technikák kapcsolását a multidimenziós kromatográfiában.



Oszlop: 4,6 x 150 mm
 Sebesség: 1,0 ml/perc
 Minta: 200 pmol



Oszlop: 1,0 x 150 mm
 Sebesség: 0,05 ml/perc
 Minta: 200 pmol



Oszlop: 1,0 x 150 mm
 Sebesség: 0,05 ml/perc
 Minta: 10 pmol

53. ábra. β -Laktoglobulin triptikus peptidterképeinek összehasonlítása PLRP-S 300 töltetű oszlopokon HPLC-vel különböző készülékeken [846]

Eluens: A: 0,1% TFA, B: 0,1% TFA-acetonitril
 Gradiens: 0–50% B, 50 perc

14. IRODALOM

1. HAMILTON, P.B.: in *Advances in Chromatography*, Vol. 2, eds. GIDDINGS, J.C.—KELLER, R.A., Marcel Dekker Inc., New York, p. 3 (1966).
2. RZESZOTARSKI, W.J.—MAUGER, A.B.: *J. Chromatogr.* **86**, 246 (1973).
3. TSUJI, K.—ROBERTSON, J.H.—BACH, J.A.: *J. Chromatogr.* **99**, 597 (1974).
4. TSUJI, K.—ROBERTSON, J.H.: *J. Chromatogr.* **112**, 663 (1975).
5. STORM, D.R.—STRONINGER, J.L.: *J. Biol. Chem.* **248**, 3940 (1973).
6. PAVLI, V.—SOKOLIC, M.: *J. Liquid Chrom.* **13**, 303 (1990).
7. GIL, E.: in *Peptides 1974*, ed. WOLMAN, Y., Acad. Press, New York, p. 247 (1975).
8. NAIDER, F.—SIPZNER, R.—STEINFELD, A.S.—BECKER, J.M.: *J. Chromatogr.* **176**, 264 (1979).
9. HARA, S.—OHSAWA, A.—DOBASHI, A.: *J. Liquid Chromatogr.* **4**, 409 (1981).
10. NAIDER, F.—HUCHITAL, M.—BECKER, J.M.: *Biopolymers* **22**, 1401 (1983).
11. GÖRÖG, S.—HERÉNYI, B.—LÓW, M.: *J. Chromatogr.* **353**, 417 (1986).
12. GABRIEL, T.F.—JIMENEZ, M.H.—FELIX, A.M.—MICHALEWSKY, J.—MEIENHOFER, J.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **9**, 129 (1977).
13. *Synthese von Peptiden, Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*, ed. WÜNSCH, E., Band XV/1, XV/2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p. 494 (1974).
14. YAMASHIRO, D.: in *Partition and Partition Chromatography of Peptides and Proteins in Hormonal Proteins and Peptides*, *Techniques in Protein Chemistry*, Vol. 9, ed. LI, C.H., Academic Press, (1980).
15. YAMASHIRO, D.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **13**, 5 (1979).
16. GALPIN, I.J.—JACKSON, A.G.—KENNER, G.W.—NOBLE, P.—RAMAGE, R.: *J. Chromatogr.* **147**, 424 (1978).
17. GALPIN, I.J.—KENNER, G.W.—OHLSEN, S.R.—RAMAGE, R.: *J. Chromatogr.* **106**, 125 (1975).
18. HALÁSZ, I.—SEBASTIAN, I.: *Angew. Chem. Internat. Ed.* **8**, 453 (1969).
19. PRYDE, A.: *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 486 (1974).
20. HAKY, J.E.—RAGHANI, A.R.—DUNN, B.M.—WIESERMAN, L.F.: *Chromatographia* **32**, 49 (1991).

21. HAKY, J.E.—RAGHANI, A.—DUNN, B.M.: *J. Chromatogr.* **541**, 303 (1991).
22. AFEYAN, N.B.—GORDON, N.F.—MAZSAROFF, I.—VARADAY, L.—FULTON, S.P.—YANG, Y.B.—REGNIER, F.E.: *J. Chromatogr.* **519**, 1 (1990).
23. PRYDE, A.: *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 486 (1974).
24. ROUMELIOTIS, P.—UNGER, K.K.: *J. Chromatogr.* **149**, 211 (1978).
25. HEMETSBERGER, H.—MAASFELD, W.—RICKEN, H.: *Chromatographia* **7**, 303 (1976).
26. KIKTA, E.J.—GRUSHKA, E.: *Anal. Chem.* **48**, 1098 (1976).
27. ZHANG, R.—XIE, Z.—ZHO, R.—LI, X.—LIU, G.—AGUILAR, M.J.—HEARN, M.T.W.: *Anal. Chem.* **63**, 1861 (1991).
28. PEARSON, J.D.—LIN, N.T.—REGNIER, F.E.: *Anal. Biochem.* **124**, 217 (1982).
29. WILSON, K.J.—VAN WIERINGEN, E.—KLAUSER, F.—BRECHTOLD, M.—HUGHES, G.J.: *J. Chromatogr.* **153**, 407 (1982).
30. HEARN, M.T.W.—BISHOP, C.A.—HANCOCK, D.R.K.—HARDING, W.S.—REYNOLDS, G.D.: *J. Liquid Chromatogr.* **2**, 1 (1979).
31. UNGER, K.K.: Proceedings of the 10th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Wiesbaden, Germany, p. 13, (1990).
32. REH, E.—KAPFER, V.: *Chromatographia* **30**, 663 (1990).
33. KROEFF, E.P.—PIETRZYK, D.J.: *Anal. Chem.* **50**, 502 (1978).
34. UCHIDA, T.—OHTANI, T.—KOSAI, M.—YANAGIHARA, Y.—NOGUCHI, K.: *J. Chromatogr.* **506**, 327 (1990).
35. KNOX, J.H.—UNGER, K.K.—MUELLER, H.: *J. Liquid Chromatogr.* **6**, 1 (1983).
36. KNOX, J.H.—KAUR, B.—MILLWARD, G.R.: *J. Chromatogr.* **352**, 3 (1986).
37. HAKY, J.E.—RAGHANI, A.R.—DUNN, B.M.—WIESERMAN, L.F.: *Chromatographia* **32**, 49 (1991).
38. REGNIER, F.E.—GOODING, K.M.: *Anal. Biochem.* **103**, 1 (1980).
39. NACHTMANN, F.: *J. Chromatogr.* **176**, 391 (1979).
40. WILSON, K.J.—HONEGGER, A.—STÖTZEL, R.P.—HUGHES, G.J.: *Biochem. J.* **199**, 31 (1981).
41. BLEVINS, D.D.—BURKE, M.F.—HRUBY, V.J.: *Anal. Chem.* **52**, 420 (1980).
42. NICE, E.C.—CAPP, M.W.—COOKE, N.—O'HARE, M.J.: *J. Chromatogr.* **218**, 569 (1981).
43. MANT, C.T.—ZHOU, N.E.—HODGES, R.S.: *J. Chromatogr.* **476**, 363 (1989).
44. TANAKA, N.—KIMATA, K.—MIKAWA, Y.—HOSOYA, K.—ARAKI, T.—OHTSU, Y.—SHIOJIMA, Y.—TSUBOI, R.—TSUCHIYA, H.: *J. Chromatogr.* **535**, 13 (1990).

45. WILSON, K.J.—VAN WIERINGEN, E.—KLAUSER, S.—BERCHTOLD, M.W.—HUGHES, G.J.: *J. Chromatogr.* **237**, 407 (1982).
46. LUNDANES, E.—GREIBROKK, T.: *J. Chromatogr.* **149**, 241 (1978).
47. OFFORD, R.E.: *Nature* **211**, 591 (1966).
48. KNOX, J.H.—SZÓKÁN, GY.: *J. Chromatogr.* **171**, 439 (1979).
49. SZÓKÁN, GY.—PENKE, B.—BALÁSPIRI, L.—TÖRÖK, A.: in *Chromatography, the State of the Art*, KALÁSZ, H.—ETTRE, L.S., eds., Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 257 (1984).
50. WILSON, K.J.—VAN WIERINGEN, E.—KLAUSCR, F.—BERCHTOLD, M.—HUGHES, G.J.: *J. Chromatogr.* **153**, 407 (1982).
51. BÖHLEN, P.—KLEEMAN, G.: *J. Chromatogr.* **205**, 65 (1981).
52. RUBINSTEIN, M.: *Anal. Biochem.* **98**, 1 (1979).
53. RIVIER, J.E.: *J. Liquid Chromatogr.* **1**, 343 (1978).
54. HANSEN, J.J.—GRIEBROKK, T.—CURRIE, B.L.—JOHANSSON, K.N.G.—FOLKERS, K.: *J. Chromatogr.* **135**, 155 (1977).
55. HENDERSON, L.E.—SOWDER, R.—OROSZLÁN, S.: in *Chemical Synthesis and Sequencing of Peptides and Proteins*, ed. LIU, C., Elsevier/North-Holland, Amsterdam, p. 252 (1981).
56. KITKA JR., E.J.—GRUSHKA, E.: *J. Chromatogr.* **135**, 367 (1977).
57. GRUSHKA, E.—SCOTT, R.P.W.: *Anal. Chem.* **45**, 1626 (1973).
58. FONG, G.W.K.—GRUSHKA, E.: *J. Chromatogr.* **142**, 299 (1977).
59. FONG, G.W.K.—GRUSHKA, E.: *Anal. Chem.* **50**, 1154 (1978).
60. SZÓKÁN, GY.: nem közölt adatok.
61. MOLNÁR, I.—HORVÁTH, CS.: *J. Chromatogr.* **142**, 623 (1977).
62. BLONDELLE, S.E.—BÜTTNER, K.—HOUGHTEN, R.A.: *J. Chromatogr.* **625**, 199 (1992).
63. REKKER, R.F.: *The Hydrophobic Fragmental Constant*, Elsevier, New York (1977).
64. O'HARE, M.J.—NICE, E.C.: *J. Chromatogr.* **171**, 209 (1979).
65. MEEK, J.L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1632 (1980).
66. MEEK, J.L.—ROSETTI, Z.L.: *J. Chromatogr.* **211**, 15 (1981).
67. BULL, H.—BREESE, K.: *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 665 (1974).
68. LEO, A.—HANSCH, C.—ELKINS, D.: *Chem. Rev.* **71**, 525 (1971).
69. PLISKA, V.—SCHMIDT, M.—FAUCHÉRE, J.L.: *J. Chromatogr.* **216**, 79 (1981).
70. BIGELOW, C.C.—CHANNON, M.: *Handbook of Biochem. Mol. Biol.* **1**, 209 (1976).
71. DI CESARE, J.L.: *Chrom. Newsletter* **9**, 16 (1981).
72. WEHR, T.C.: *Varian Instr. Appl.* **14**, 18 (1980).
73. BROWNE, C.A.—BENNETT, H.P.J.—SOLOMON, S.: *Anal. Biochem.* **124**, 201 (1982).
74. SASAGAWA, T.—OKNYAMA, T.—TELLER, D.C.: *J. Chromatogr.* **240**, 329 (1982).

75. SNIDER, R.H.—MOORE, C.F.—NYLEN, E.S.—BECKER, K.L.: *Biochromatography* **3**, 100 (1988).
76. GUO, D.—MANT, C.T.—TANEJA, A.K.—PARKER, J.M.R.—HODGES, R.S.: *J. Chromatogr.* **359**, 499 (1986).
77. GUO, D.—MANT, C.T.—TANEJA, A.K.—HODGES, R.S.: *J. Chromatogr.* **359**, 519 (1986).
78. SAKAMOTO, Y.—KAWAKAMI, N.—SASAGAWA, T.: *J. Chromatogr.* **442**, 69 (1988).
79. SASAGAWA, T.—SAKAMOTO, Y.—HIROSE, T.—YOSHIDA, T.—KOBAYASHI, Y.—SATO, Y.—KOIZUMI, K.: *J. Chromatogr.* **485**, 533 (1989).
80. JINNO, K.—TANIGAWA, E.: *Chromatographia* **25**, 613 (1988).
81. MANT, C.T.—BURKE, T.W.L.—ZHOU, N.E.—PARKER, J.M.R.—HODGES, R.S.: *J. Chromatogr.* **485**, 365 (1989).
82. JINNO, K.—BAN, Y.: *Chromatographia* **30**, 1 (1990).
83. GLAJCH, J.L.—KIRKLAND, J.J.—SNYDER, L.R.: *J. Chromatogr.* **238**, 269 (1982).
84. GLAJCH, J.L.—KIRKLAND, J.J.: *Anal. Chem.* **55**, 319 A (1983).
85. HEARN, M.T.W.—GREGO, B.: *J. Chromatogr.* **255**, 125 (1983).
86. MOLNÁR, I.—SCHOENESHOEFER, M.: in *High-performance Liquid Chromatography in Peptide and Protein Chemistry*, Eds. LOTTSPEICH, F.—HENSCHEN, A.—HUPE, K.P., Walter de Gruyter, Berlin, p. 97 (1981).
87. SNYDER, L.R.: in *High-performance Liquid Chromatography*, ed. HORVATH, CS., Vol. 1., Academic Press, New York, p. 207 (1980).
88. SCHOENMAKERS, P.J.—BILLIET, H.A.H.—DE GALAN, J.: *J. Chromatogr.* **218**, 261 (1981).
89. SCHOENMAKERS, P.J.—BARTHA, Á.—BILLIET, H.A.H.: *J. Chromatogr.* **550**, 425 (1991).
90. RUBINSTEIN, M.—CHEN-KIANG, S.—STEIN, S.—UDENFRIEND, S.: *Anal. Biochem.* **95**, 117 (1979).
91. HEARN, M.T.W.—GREGO, B.: *J. Chromatogr.* **203**, 349 (1981).
92. HEARN, M.T.W.—GREGO, B.: *J. Chromatogr.* **218**, 497 (1981).
93. WILSON, K.J.—HONEGGER, A.—HUGHES, G.J.: *Biochem. J.* **199**, 43 (1981).
94. HORVÁTH, CS.—MELANDER, W.—MOLNÁR, I.: *J. Chromatogr.* **125**, 129 (1976).
95. BIJ, K.E.—HORVÁTH, CS.—MELANDER, W.R.—NAHUM, A.: *J. Chromatogr.* **203**, 68 (1981).
96. ZHOU, N.—MANT, C.T.—HODGES, R.S.: *Peptide Research* **3**, 8 (1990).
97. BAYER, E.—PAULUS, A.: *J. Chromatogr.* **400**, 1 (1987).
98. FREISER, H.H.—NOWLAN, M.P.—GOODING, D.L.: *J. Liquid Chromatogr.* **12**, 827 (1989).
99. DOLAN, J.W.: *LC/GC Magazine* **4**, 222 (1986).

100. NAHUM, A.—HORVÁTH, CS.: *J. Chromatogr.* **203**, 53 (1981).
101. BIJ, K.E.—HORVÁTH, CS.—MELANDER, W.R.—NAHUM, A.: *J. Chromatogr.* **203**, 65 (1981).
102. SADEK, P.C.—CARR, P.W.—BOWERS, L.W.: *J. Liquid Chromatogr.* **8**, 2369 (1985).
103. WEBER, S.G.—TRAMPOSCH, W.G.: *Anal. Chem.* **55**, 1171 (1983).
104. COX, G.B.—STOUT, R.W.: *J. Chromatogr.* **384**, 315 (1987).
105. NAWROCKY, J.: *J. Chromatogr.* **407**, 171 (1987).
106. ENGELHARDT, H.—APPELT, G.—SCHWEINHEIM, E.: *J. Chromatogr.* **499**, 165 (1990).
107. GÖRÖG, S.—HERÉNYI, B.—NYÉKI, O.—SCHÓN, I.—KISFALUDY, L.: *J. Chromatogr.* **452**, 317 (1988).
108. HERÉNYI, B.—GÖRÖG, S.—NYÉKI, O.—SCHÓN, I.—KISFALUDY, L.: *Chromatographia* **29**, 395 (1990).
109. HANCOCK, W.S.—BISHOP, C.A.—PRESTIDGE, R.L.—HARDING, D.R.K.—HEARN, M.T.W.: *J. Chromatogr.* **153**, 391 (1978).
110. HANCOCK, W.S.—BISHOP, C.A.—PRESTIDGE, R.L.—HARING, D.R.K.—HEARN, M.T.W.: *Science* **200**, 1168 (1978).
111. HANCOCK, W.S.—BISHOP, C.A.—HEARN, M.T.W.: *Chem. N.Z.* **43**, 18 (1979).
112. HANCOCK, W.S.—BISHOP, C.A.—MEYER, L.J.—HARDING, D.R.K.—HEARN, M.T.W.: *J. Chromatogr.* **161**, 291 (1978).
113. WILSON, K.J.—HONEGGER, A.—HUGHES, G.J.: *Biochem. J.* **199**, 43 (1981).
114. SZEPESI, G.—GAZDAG, M.: *J. Chromatogr.* **218**, 597 (1982).
115. GAZDAG, M.—SZEPESI, G.: *J. Chromatogr.* **218**, 603 (1981).
116. HATEFI, Y.—HANSTEIN, W.G.: *Biochemistry* **62**, 1129 (1969).
117. STÜBER, K.—BEYRENTHER, K.: in *High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry*, eds. LOTTSPEICH, F.—HENSCHEN, A.—HUPE, K.P., Walter de Gruyter, Berlin, p. 205 (1981).
118. RIVIER, J.E.: *J. Liquid Chromatogr.* **1**, 343 (1978).
119. VIVILLE, R.—SCARSO, A.—DURIEUX, J.P.—LOFFET, A.: *J. Chromatogr.* **262**, 411 (1983).
120. BENNETT, H.P.J.—BROWNE, C.A.—GOLTZMAN, D.—SOLOMON, S.: in *Proceedings of the 6th American Peptide Symposium*, eds. GROSS, E.—MEIENHOFER, J., Pierce Chem. Co., Rockford, Illinois, USA, p. 121 (1980).
121. DUNLOP, C.E.—GENTLEMAN, S.—LOWNEY, L.I.: *J. Chromatogr.* **160**, 191 (1978).
122. BENNETT, H.P.J.—HUDSON, A.M.—MCMARTIN, C.—PURDON, G.E.: *Biochem. J.* **168**, 9 (1977).
123. BENNETT, H.P.J.—HUDSON, A.M.—KELLY, L.—MCMARTIN, C.—PURDON, G.E.: *Biochem. J.* **175**, 1139 (1978).

124. GAY, D.D.—LAHTI, R.A.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **18**, 107 (1981).
125. SCHAAPER, V.M.M.—VOSKAMP, D.—OLIEMAN, C.: *J. Chromatogr.* **195**, 181 (1980).
126. BENNETT, H.P.J.—BROWNE, C.A.—SOLOMON, S.: *J. Liquid Chromatogr.* **3**, 1353 (1980).
127. HARDING, D.R.K.—BISHOP, C.A.—TARTTELIN, M.F.—HANCOCK, W.S.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **18**, 214 (1981).
128. HANCOCK, W.S.—BISHOP, C.A.—BATTERSBY, J.E.—HARDING, D.R.K.—HEARN, M.T.W.: *J. Chromatogr.* **168**, 377 (1979).
129. BENNETT, H.P.J.—BROWNE, C.A.—SOLOMON, S.: *J. Liquid Chromatogr.* **3**, 1353 (1980).
130. ACHARYA, A.S.—DI DONATO, A.—MANJULA, B.N.—FISCHETTI, V.A.—MANNING, J.M.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **22**, 78 (1983).
131. SPINDEL, E.—WURTMAN, R.J.: *J. Chromatogr.* **175**, 198 (1979).
132. RAGNARSSON, U.—FRANSSON, B.—ZETTERQUIST, Ö.: in *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, HANCOCK, W.S. (ed.) CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, Vol. II. p. 75 (1984).
133. FRANSSON, B.—RAGNARSSON, U.—ZETTERQUIST, Ö.: *J. Chromatogr.* **240**, 165 (1982).
134. FRANSSON, B.—RAGNARSSON, U.—ZETTERQUIST, Ö.: *Anal. Biochem.* **126**, 174 (1982).
135. FRANSSON, B.—RAGNARSSON, U.: in *Peptides*, eds. BLÁHA, K.—MALON, P., Walter de Gruyter and Co., Berlin, p. 415 (1983).
136. SZÓKÁN, GY.: nem közölt adatok (1987).
137. HANCOCK, W.S.—BISHOP, C.A.—MEYER, I.J.—HARDING, D.R.K.—HEARN, M.T.W.: *J. Chromatogr.* **161**, 291 (1978).
138. IMOTO, T.—YAMADA, H.: *Mol. Cell. Biochem.* **51**, 111 (1983).
139. SZÓKÁN, GY.—KNOX, J.H.: nem közölt adatok (1978).
140. SCHÖNESHÖFER, M.—FENNER, A.: *J. Chromatogr.* **224**, 472 (1981).
141. HEARN, M.T.W.—GREGO, B.—HANCOCK, W.S.: *J. Chromatogr.* **185**, 429 (1979).
142. RIVIER, J.E.: *J. Liquid Chromatogr.* **1**, 343 (1978).
143. MAHONEY, W.C.—HERMODSON, M.A.: *J. Biol. Chem.* **255**, 11199 (1980).
144. HEARN, M.T.W.—GREGO, B.: *J. Chromatogr.* **218**, 497 (1981).
145. SCHOENMAKERS, P.J.—BARTHA, Á.—BILLIET, H.A.H.: *J. Chromatogr.* **550**, 425 (1991).
146. NICE, E.C.—CAPP, M.W.—COOKE, N.—O'HARE, M.J.: *J. Chromatogr.* **218**, 569 (1981).
147. HEARN, M.T.W.: in *High Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives*, Vol.3. HORVÁTH, CS., ed., Acad. Press, New York, p. 87 (1983).

148. WEHR, C.T.—CORREIA, L.—ABBOTT, S.R.: *J. Chromatogr. Sci.* **20**, 114 (1982).
149. LEWIS, R.V.—STEIN, S.—UDENFRIEND, S.: *Int. J. Pept. Prot. Res.* **13**, 493 (1979).
150. NICE, E.C.—CAPP, M.W.—COOKE, N.—O'HARE, M.J.: *J. Chromatogr.* **218**, 569 (1981).
151. KAMP, R.M.—YAO, Z.J.—WITTMANN-LIEBOLD, B.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **365**, 141 (1983).
152. KAMP, R.M.—YAO, Z.J.—BOSSERHOFF, A.—WITTMANN-LIEBOLD, B.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**, 1777 (1983).
153. RIVIER, J.—RIVIER, C.—SPIESS, J.—VALE, W.: *Anal. Biochem.* **127**, 258 (1982).
154. KAMP, R.M.—BOSSERHOFF, A.—KAMP, D.—WITTMANN-LIEBOLD, B.: *J. Chromatogr.* **317**, 181 (1984).
155. DIZDAROGLU, M.—KRUTZSCH, H.C.—SINNIE, M.G.: *J. Chromatogr.* **237**, 417 (1982).
156. DIZDAROGLU, M.—KRUTZSCH, H.C.—SINNIE, M.G.: *Anal. Biochem.* **123**, 190 (1982).
157. DIZDAROGLU, M.—SINNIE, M.G.—RINOUX, F.—ST PIERRE, S.: *J. Chromatogr.* **245**, 158 (1982).
158. WELINDER, B.S.—LINDE, S.: in *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides, Proteins* (ed.) HANCOCK, W.S., CRC Press Inc., Boca Paton, Florida, Vol. II. p. 357 (1984).
159. RICHEY, F.: *Int. Lab.* **13**, 50 (1983).
160. SLUTERMAN, L.A.AE.—ELGERSMA, O.: *J. Chromatogr.* **150**, 17 (1978).
161. SLUTERMAN, L.A.AE.—WIJDENES, J.: *J. Chromatogr.* **150**, 31 (1978).
162. LAABECK, D.H.—ROBINSON, H.K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 248 (1975).
163. PORATH, J.—FLODIN, P.: *Nature (London)* **183**, 1657 (1959).
164. KATO, Y.—KOMIYA, K.—SASAKI, H.—HASHIMOTO, T.: *J. Chromatogr.* **190**, 297 (1980).
165. KATO, Y.—KOMIYA, K.—SAWADA, Y.—SASAKI, H.—HASHIMOTO, T.: *J. Chromatogr.* **190**, 305 (1980).
166. WEHR, C.T.—CUNICO, R.L.—OTT, G.S.—SHORE, V.G.: *Anal. Biochem.* **125**, 386 (1982).
167. ROKUSHIKA, S.—OKKAWA, T.—HATANO, H.: *J. Chromatogr.* **176**, 456 (1979).
168. RICHTER, W.O.—JACOB, B.—SCHWANDT, P.: *Anal. Biochem.* **133**, 288 (1983).
169. SHIOYA, Y.—YOSHIDA, H.—NAKAJIMA, T.: *J. Chromatogr.* **240**, 341 (1982).
170. RIVIER, J.E.: *J. Chromatogr.* **202**, 211 (1980).
171. LAZURE, C.—DENNIS, M.—ROCHEMENT, J.—SEIDAH, N.G.—CHRETIEN, M.: *Anal. Biochem.* **125**, 406 (1982).

172. SWERGOLD, G.D.—RUBIN, C.S.: *Anal. Biochem.* **131**, 295 (1983).
173. HEFTI, F.: *Anal. Biochem.* **121**, 378 (1982).
174. MONTELARO, R.C.—WEST, M.—ISSEL, C.J.: *Anal. Biochem.* **114**, 398 (1981).
175. SCHNEIDER, H.J.—DREXLER, R.—FELDMAIER, G.—LINZEN, B.—LOTTSPPEICH, F.—HENSCHEN, A.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**, 1357 (1983).
176. KOPACIEWICZ, W.—REGNIER, F.E.: *Anal. Biochem.* **126**, 8 (1982).
177. HANSEN, J.J.—GREIBROKK, T.—CURRIE, B.L.—JOHANSON, K.N.G.—FOLKERS, K.: *J. Chromatogr.* **135**, 155 (1977).
178. RUTSCHMANN, M.—KNEHN, L.—DAHLMANN, B.—REINAUER, H.: *Anal. Biochem.* **124**, 134 (1982).
179. JENIK, R.A.—PORTER, J.W.: *Anal. Biochem.* **111**, 184 (1981).
180. ROUMELIOTIS, P.—UNGER, K.K.: *J. Chromatogr.* **185**, 445 (1979).
181. GALPIN, I.J.—KENNER, G.W.—OHLSEN, R.S.—RAMAGE, R.: *J. Chromatogr.* **106**, 125 (1975).
182. GALPIN, I.J.—JACKSON, A.G.—KENNER, G.W.—NOBLE, P.—RAMAGE, R.: *J. Chromatogr.* **147**, 424 (1978).
183. DEIGIN, V.J.—ULYASHIN, V.U.—IVANOV, V.T.—NEFEDOV, P.P.—ZHMAKINA, T.P.—BELENKIJ, B.G.: *Bioorg. Khim.* **9**, 616 (1983).
184. RICHTER, W.O.—JACOB, B.—SCHWANDT, P.: *Anal. Biochem.* **133**, 288 (1983).
185. KIRKLAND, J.J.—GLAJCH, J.L.—FARLEE, R.D.: *Anal. Chem.* **61**, 1 (1989).
186. GLAJCH, J.L.—KIRKLAND, J.J.: *LC/GC Magazine* **8**, 2 (1990).
187. ALPERT, A.J.—ANDREWS, P.C.: *J. Chromatogr.* **443**, 85 (1988).
188. ALPERT, A.J.: *J. Chromatogr.* **499**, 177 (1990).
189. TISELIUS, A.: *Arkiv Kem. Mineral. Geol.* **B14**, 22 (1940).
190. CRAMER, S.M.—HORVÁTH, CS.: *Prep. Chromatogr.* **1**, 29 (1988).
191. SUBRAMANIAN, G.—PHILLIPS, M.W.—CRAMER, S.M.: *J. Chromatogr.* **394**, 305 (1987).
192. PHILLIPS, M.W.—SUBRAMANIAN, G.—CRAMER, S.M.: *J. Chromatogr.* **454**, 1 (1988).
193. LEE, A.L.—LIAO, A.W.—HORVÁTH, CS.: *J. Chromatogr.* **443**, 31 (1988).
194. KALÁSZ, H.—HORVÁTH, CS.: *J. Chromatogr.* **239**, 423 (1982).
195. HORVÁTH, CS.—NAHUM, A.—FRENZ, J.H.: *J. Chromatogr.* **218**, 365 (1981).
196. KALÁSZ, H.—HORVÁTH, CS.: *J. Chromatogr.* **215**, 295 (1981).
197. LIAO, A.W.—EL RASSI, Z.—LE MASTER, D.M.—HORVÁTH, CS.: *Chromatographia* **24**, 881 (1987).
198. VIGH, GY.—VARGA-PUCHONY, Z.—SZEPESI, G.—GAZDAG, M.: *J. Chromatogr.* **386**, 353 (1987).
199. HODGES, R.S.—BURKE, T.W.L.—MANT, C.T.: *J. Chromatogr.* **548**, 267 (1991).

200. FELLEGVÁRI, I.: Kandidátusi értekezés, Budapest, 1991.
201. CARDINALI, F.—ZIGGIOTTI, A.—VISCOMI, G.C.: *J. Chromatogr.* **499**, 37 (1990).
202. LARSSON, P.O.—GLAD, M.—HANSSON, L.—MANSSON, M.O.—OHLSON, S.—MOSBACH, K.: in *Advances in chromatography*, eds. GIDDINGS, J.C.—GRUSHKA, E.—CAZES, J.—BROWN, P.R., Vol. **21**, Marcel Dekker Inc., New York, p. 41 (1983).
203. OHLSON, S.—HANSSON, L.—LARSSON, P.O.—MOSBACH, K.: *FEBS Lett.* **93**, 5 (1978).
204. GLAD, M.—OHLSON, S.—HANSSON, L.—MANSSON, M.O.—MOSBACH, K.: *J. Chromatogr.* **200**, 254 (1980).
205. LAVE, C.R.—GLAD, M.—LARSSON, P.O.—OHLSON, S.—SMALL, D.A.P.—ATKINSON, T.—MOSBACH, K.: *J. Chromatogr.* **215**, 303 (1981).
206. SPORTSMAN, J.R.—WILSON, G.S.: *Anal. Chem.* **52**, 2013 (1980).
207. LARSSON, P.O.—MOSBACH, K.: *Biochem. Soc. Trans.* **9**, 285 (1981).
208. SMALL, D.A.P.—ATKINSON, T.—LOWE, C.R.: *J. Chromatogr.* **216**, 175 (1981).
209. NILSSON, K.—MOSBACH, K.: *Biochem Biophys. Res. Commun.* **102**, 449 (1981).
210. REGNIER, F.E.—FAUSNAUGH, J.: *J. Liquid Chrom.* **1**, 402 (1983).
211. CHANG, S.H.—GOODING, K.M.—REGNIER, F.E.: *J. Chromatogr.* **120**, 321 (1976).
212. REGNIER, F.E.—GOODING, K.M.: *Anal. Biochem.* **103**, 1 (1980).
213. OHTA, T.—INONE, T.—FUKUMOTO, Y.—TAKITANI, S.: *Chromatographia* **30**, 410 (1990).
214. SPORTSMAN, J.R.—WILSON, G.S.: *Anal. Chem.* **52**, 2013 (1980).
215. BURGUS, R.—RIVIER, J.: in *Peptides 1986*, ed. LOFFET, A., Editions de l'Univ. Bruxelles, Belgium, p. 85 (1987).
216. CHELENOV, M.A.—TITOVA, E.V.—KUDRYASHOV, L.I.: *Bioorg. Khim.* **8**, 914 (1982).
217. RIVIER, J.—MCCLINTOCK, R.—GALYEAN, R.—ANDERSON, H.: *J. Chromatogr.* **288**, 303 (1984).
218. BURKE, T.W.L.—MANT, C.T.—HODGES, R.S.: *J. Liquid Chromatogr.* **11**, 1229 (1988).
219. TÓTH, G.K.—PENKE, B.—ZARÁNDI, M.—KOVÁCS, K.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **26**, 630 (1985).
220. BISHOP, C.A.—HARDING, D.R.K.—MEYER, L.J.—HANCOCK, W.S.—HEARN, M.T.W.: *J. Chromatogr.* **192**, 222 (1980).
221. BISHOP, C.A.—MEYER, L.J.—HARDING, D.R.—HANCOCK, W.S.—HEARN, M.T.W.: *J. Liquid Chromatogr.* **4**, 661 (1981).
222. YOUNG, P.—WHENT, T.—GRANT, J.—KEARNEY, T.: *LC-GC* **9**, 726 (1991).
223. MAJORS, R.: *LC, Liquid Chromatogr. HPLC Mag.* **3**, 862 (1985).

224. SITRIN, R.—DE PHILLIPS, P.—DINGERDISSEN, J.—ERHARD, K.—FILAN, J.: *LC-GC* **4**, 530 (1986).
225. SNYDER, L.R.—KIRKLAND, J.J.: *Introduction to modern liquid chromatography*, 2nd edition, John Wiley and Sons, Inc., NY. (1979).
226. VERZELE, M.—DEWAELE, C.: *LC Liquid Chromatogr. HPLC Mag.* **3**, 22 (1985).
227. BENNETT, H.P.J.—BROWNE, C.A.—SOLOMON, S.: *J. Liquid Chromatogr.* **3**, 1353 (1980).
228. HEARN, M.T.W.—GREGO, B.: *J. Chromatogr.* **266**, 75 (1983).
229. L'ITALIEN, J.J.: *J. Chromatogr.* **359**, 213 (1986).
230. STADALIUS, M.A.—QUARTY, M.A.—SNYDER, L.R.: *J. Chromatogr.* **327**, 93 (1985).
231. STONE, K.L.—WILLIAMS, K.: *J. Chromatogr.* **359**, 203 (1986).
232. YOUNG, P.M.—WHEAT, T.E.: *J. Chromatogr.* **512**, 273 (1990).
233. HUANG, J.X.—GUIOCHON, G.: *J. Chromatogr.* **492**, 431 (1989).
234. COCHIA, P.J.—VAN EYK, J.—TANEJA, A.—HODGES, R.S.: *J. Chromatogr.* **266**, 651 (1983).
235. KATO, Y.—NAKATANI, S.—KITAMURA, T.—ONAKA, A.—HASHIMOTO, T.: *J. Chromatogr.* **513**, 384 (1990).
236. YOUNG, P.M.—WHEAT, T.E.: *Peptide Res.* **3**, 287 (1990).
237. REGNIER, F.E.—MAZSAROFF, I.: *Biotech. Progr.* **3**, 22 (1987).
238. MAZSAROFF, I.—REGNIER, F.E.: *J. Liquid Chromatogr.* **9**, 2563 (1986).
239. GABRIEL, T.F.—MICHALEWSKY, J.—MEIENHOFER, J.: *J. Chromatogr.* **129**, 287 (1976).
240. GABRIEL, T.F.—JIMENEZ, M.H.—FELIX, A.M.—MICHALEWSKY, J.—MEIENHOFER, J.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **9**, 129 (1977).
241. KULLMANN, W.: *J. Liquid Chromatogr.* **2**, 1017 (1979).
242. RIVIER, J.—MCLINTOCK, R.: in *The Use of HPLC in Receptor Biochemistry*, ed. KERLAVAGE, A.R., Alan R. Liss, Inc. USA, p. 77 (1989).
243. ASZALOS, A.—AQUILAR, A.: *J. Chromatogr.* **290**, 83 (1984).
244. MISONO, K.S.—GRAMMER, R.T.—FUKUMI, H.—INAGAMI, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 444 (1984).
245. RIVIER, J.—SPIESS, J.—VALE, W.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **80**, 4851 (1983).
246. SPIESS, J.—RIVIER, J.—VALE, W.: *Nature* **303**, 532 (1983).
247. RIVIER, J.—RIVIER, C.—SPIESS, J.—VALE, W.: *Anal. Biochem.* **127**, 258 (1982).
248. OLIVERA, B.—GRAY, W.P.—ZEIKUS, R.—MCINTOSH, J.M.—VARGA, J.—RIVIER, J.—DE SANTOS, V.—GRUZ, L.J.: *Science* **230**, 1338 (1985).
249. SCARBOROUGH, R.M.—JANNIESON, G.C.—KALISH, F.—KRAMER, S.J.—MCENROC, G.A.—MILLER, C.A.—SCHOOLEY, D.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 5575 (1984).

250. REEVE, J.R., JR.—WALSH, J.H.—TOMPkins, R.K.—HAWKE, D.—SHIVELY, J.E.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **123**, 404 (1984).
251. DOCKRAY, G.J.—REEVE, J.E., JR.—SHIVELY, J.—GAYTON, R.J.—BARNARD, C.S.: *Nature* **305**, 328 (1983).
252. SHARIFI, B.G.—BASCORN, C.C.—KHURANA, V.K.—JOHNSON, T.C.: *J. Chromatogr.* **324**, 173 (1985).
253. HOEGER, C.—GALYEAN, R.—BONBLIK, J.—MCCLINTOCK, R.—RIVIER, J.: *Biochromatography* **2**, 134 (1987).
254. GABRIEL, T.S.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **30**, 40 (1987).
255. DONOVAN, J.W.: *Ultraviolet Absorption in Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, Part A*, ed. LEACH, S.J., Acad. Press, New York, (1969).
256. GEORGE, S.A.—MAUTE, A.: *Chromatographia* **15**, 419 (1982).
257. FELL, A.F.—CLARK, B.: *European Chromatogr. News* **1**, 16 (1987).
258. FELL, A.F.—SCOTT, H.P.: *J. Chromatogr.* **273**, 3 (1983).
259. POPPE, H.: *Chromatographia* **24**, 25 (1987).
260. FELL, A.F.—CASTLEDINE, J.B.—SELLBERG, R.—MODIN, B.—WEINBERGER, R.: *J. Chromatogr.* **535**, 33 (1990).
261. RAO, P.S.—WEINSTEIN, G.S.—WILSON, D.W.—RUJIKARN, N.—TYRAS, D.H.: *J. Chromatogr.* **536**, 137 (1991).
262. FELL, A.F.—CLARK, B.J.—SCOTT, H.P.: *J. Chromatogr.* **297**, 203 (1984).
263. NYBERG, F.—PERNOW, C.—MOBRG, U.—ERIKSON, R.B.: *J. Chromatogr.* **359**, 541 (1987).
264. KIRK, E.M.—CLARK, B.J.—FELL, A.F.: *Chromatographia* **24**, 766 (1987).
265. MEYS, M.—COHEN, S.A.: *LC/GC Magazine* **9**, 422 (1991).
266. GREGO, B.—NICE, C.—SIMPSON, R.J.: *J. Chromatogr.* **352**, 359 (1986).
267. SCHLABACH, T.D.—WEHR, T.C.: *Anal. Biochem.* **127**, 22 (1982).
268. CREASER, E.H.—HUGHES, G.J.: *J. Chromatogr.* **144**, 69 (1977).
269. JOYS, T.M.—KIM, H.: *Anal. Biochem.* **94**, 371 (1979).
270. FREI, R.W.—MICHEL, L.—SANTI, W.: *J. Chromatogr.* **126**, 665 (1976).
271. FREI, R.W.—MICHEL, L.—SANTI, W.: *J. Chromatogr.* **142**, 261 (1977).
272. FREI, R.W.: *Research Developm.* **42** (1977).
273. MENDEZ, E.—GAVILANES, J.G.: *Anal. Biochem.* **72**, 473 (1976).
274. TAYLOR, S.—TAPPEL, A.L.: *Anal. Biochem.* **56**, 150 (1973).
275. WILSON, K.J.—HONEGGER, A.—HUGHES, G.J.: *Biochem. J.* **199**, 43 (1981).
276. VAN DEN BELD, C.M.B.—LINGEMAN, H.: *Pract. Spectrosc.* **12**, 237 (1991).
277. FLEET, B.—LITTLE, C.J.: *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 747 (1974).
278. DOW, L.—MAZZER, J.—KRULL, I.S.: *Biochromatography* **5**, 74 (1990).
279. ALLISON, L.A.—SHOWP, R.E.: *Anal. Chem.* **55**, 8 (1983).

280. OKA, K.—KIJOMA, K.—TOGARI, A.—NAGOTSU, T.—KISIS, B.: *J. Chromatogr.* **308**, 43 (1984).
281. SPATOLA, A.F.—BENOVITZ, D.E.: *J. Chromatogr.* **327**, 165 (1985).
282. YOSHIURA, M.—IRIYAMA, K.—IWAMOTO, T.: *J. Liquid Chromatogr.* **9**, 2955 (1986).
283. MURAI, S.—SALTO, H.—MASUDA, Y.—ITO, T.: *J. Neurochem.* **50**, 473 (1988).
284. BRETZ, J.T.—BROWN, P.R.: *J. Chromatogr. Sci.* **26**, 310 (1986).
285. HALBERT, M.K.—BALDWIN, R.P.: *J. Chromatogr.* **345**, 43 (1985).
286. COX, J.A.—GRAY, T.J.: *Electroanalysis* **2**, 107 (1990).
287. COX, J.A.—GRAY, T.J.: *Anal. Chem.* **61**, 2462 (1989).
288. MEEK, J.L.: *J. Chromatogr.* **266**, 401 (1983).
289. JOSEPH, M.H.—DAVIES, P.J.: *J. Chromatogr.* **277**, 125 (1983).
290. MAHACHI, J.J.—CARLSON, R.M.—POE, D.P.: *J. Chromatogr.* **298**, 279 (1984).
291. MEFFORD, I.—ADAMS, R.N.: *Life Sci.* **23**, 1167 (1978).
292. MARSDEN, C.A.—BRAZELL, M.P.—BENNETT, G.W.: *Neurosci. Lett.* **7**, 5929 (1981).
293. BENNETT, G.W.—BRAZELL, M.P.—MARSDEN, C.A.: *Life Sci.* **29**, 1001 (1981).
294. SAUTER, A.—FRICK, W.: *Anal. Biochem.* **133**, 307 (1983).
295. WHITE, M.W.: *J. Chromatogr.* **262**, 420 (1983).
296. HOLMAN, R.B.—SNAPE, B.M.: *J. Chromatogr.* **262**, 415 (1983).
297. KIM, C.—CHENG, R.—GEORGE, S.R.: *J. Chromatogr.* **494**, 67 (1989).
298. BENNETT, G.W.—BRAZELL, M.P.—MARSDEN, C.A.: *Life Sci.* **29**, 1001 (1981).
299. DAWSON, R., JR.—STEVES, J.P.—LORDEN, J.F.—OPARIL, S.: *Peptides* **6**, 1173 (1985).
300. FLEMING, L.H.—REYNOLDS, N.C.: *J. Liquid Chromatogr.* **7**, 793 (1984).
301. MEEK, J.L.—BOHAN, T.B.: *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **18**, 141 (1978).
302. MOUSA, J.L.: *J. Chromatogr.* **266**, 401 (1983).
303. MOUSA, S.—COURI, D.: *J. Chromatogr.* **267**, 191 (1983).
304. AUSTIN, D.S.—POLTA, J.A.—POLTA, T.Z.—TANG, A.P.C.—KABELKA, T.D.—JOHNSON, D.C.: *J. Electroanal. Chem.* **168**, 227 (1968).
305. WELCH, L.E.—LA COURSE, W.R.—MEAD, D.A., JR.—JOHNSON, D.C.—HU, T.: *Anal. Chem.* **61**, 555 (1989).
306. JOHNSON, D.C.—LA COURSE, W.R.: *Anal. Chem.* **62**, 589A (1990).
307. KAFIL, J.B.—HUBER, C.O.: *Anal. Chim. Acta* **1175**, 275 (1985).
308. KOK, W.TH.—HANEKAMP, H.B.—BOS, P.—FREI, R.W.: *Anal. Chim. Acta* **142**, 31 (1982).
309. KOK, W.TH.—BRINKMAN, U.A.TH.—FREI, R.W.: *J. Chromatogr.* **256**, 17 (1983).

310. STULIK, K.—PACAKOVA, V.—WEINGART, M.: *J. Chromatogr.* **367**, 311 (1986).
311. STULIK, K.—PACAKOVA, V.—LE, K.—HENNISSEN, B.: *Talanta* **35**, 455 (1988).
312. WANG, H.—PACAKOVA, V.—STULIK, K.: *J. Chromatogr.* **509**, 245 (1990).
313. PRABHU, S.V.—BALDWIN, R.P.: *Anal. Chem.* **61**, 852 (1989).
314. PRABHU, S.V.—BALDWIN, R.P.: *Anal. Chem.* **61**, 2258 (1989).
315. LUO, P.—PRABHU, S.V.—BALDWIN, R.P.: *Anal. Chem.* **62**, 752 (1990).
316. LUO, P.—ZHANG, F.—BALDWIN, R.P.: *Anal. Chim. Acta* **244**, 169 (1991).
317. LUO, P.—ZHANG, F.—BALDWIN, R.P.: *Anal. Chem.* **63**, 1702 (1991).
318. TSAI, H.—WEBER, S.G.: *J. Chromatogr.* **515**, 451 (1990).
319. GAMES, D.E.: in *Advances in Chromatography*, eds. GIDDINGS, J.C.—GRUSHKA, E.—CANES, J.—BROWN, P.R., Marcel Dekker, Inc., New York, Vol. 21, p. 1 (1983).
320. BURLINGAME, A.L.—MILLINGTON, D.S.—NORWOOD, D.L.—RUSSEL, D.H.: *Anal. Chem.* **62**, 268R (1990).
321. PUTNEY, S.C.—ROYAL, N.G.—DE BEGVAR, H.N.—HERLIKY, W.C.—BIEMANN, K.—SCHIMMEL, P.: *Science* **213**, 1497 (1981).
322. DESIDERIO, D.M.: in *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, ed. HANCOCK, W.S., Vol. I. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 197 (1984).
323. DESIDERIO, D.M.—STEIN, J.L.—CUNNINGHAM, M.D.—SABBATINI, J.Z.: *J. Chromatogr.* **195**, 369 (1980).
324. DESIDERIO, D.M.—YAMADA, S.—TANZER, F.S.—HORTON, J.—TRIMBLE, J.: *J. Chromatogr.* **217**, 437 (1981).
325. YAMADA, S.—DESIDERIO, D.M.: *Anal. Biochem.* **127**, 213 (1982).
326. MAY, H.E.—TANZER, F.S.—FRIDLAND, G.—WAKELYN, C.—DESIDERIO, D.M.: *J. Liquid Chromatogr.* **5**, 2135 (1982).
327. DESIDERIO, D.M.—CUNNINGHAM, M.D.: *J. Liquid Chromatogr.* **4**, 721 (1981).
328. DIXON, D.J.: in *High Performance Chromatography in Protein and Peptide Chemistry*, eds. LOTTSPEICH, F.—HENSCHEN, A.—HUPE, K.P., Walter de Gruyter, Berlin, p. 127 (1981).
329. MELUCKEY, S.A.—VAN BERKEL, G.J.—GLISH, G.L.—HUANG, E.C.—HENION, J.D.: *Anal. Chem.* **63**, 375 (1991).
330. HUNT, D.F.—BONE, W.M.—SHABANOWITZ, J.—RHODES, J.—BALLARD, J.: *Anal. Chem.* **54**, 1704 (1981).
331. BIEMANN, K.: *Biomed. Environm. Mass Spectrom.* **16**, 99 (1988).
332. YOSHIDA, Y.—YOSHIDA, H.—TSUGE, S.—TAKEUCHI, T.—MOCHIZUKI, K.: *J. High Res. Chromatogr. Chrom. Commun.* **3**, 16 (1980).
333. BLAKLEY, C.R.—CARMODY, J.J.—VESTAL, M.L.: *Anal. Chem.* **52**, 1636 (1980).

334. BLAKLEY, C.R.—CARMODY, J.J.—VESTAL, M.L.: *Chin. Chem.* **26**, 1467 (1980).
335. BLAKLEY, C.R.—CARMODY, J.J.—VESTAL, M.L.: *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 5931 (1980).
336. PILOSOFF, D.—KIM, H.Y.—DYCKES, D.F.—VESTAL, M.L.: *Anal. Chem.* **56**, 1236 (1984).
337. BALDWIN, M.A.—MCLAFFERTY, F.W.: *Org. Mass. Spectrom.* **7**, 1111 (1973).
338. DAWKINS, B.G.—ARPINO, P.J.—MCLAFFERTY, F.W.: *Biomed. Mass Spectrom.* **5**, 1 (1978).
339. GAMES, D.E.—ECKERS, C.—GOWER, J.L.—HIRTER, P.—KNIGHT, M.E.—LEWIS, E.—RAO, K.R.N.—WEARASINGHE, N.C.: in *Current Developments in Clinical Applications of HPLC, GC and MS*, eds. LAWSON, A.M.—LIM, C.K.—RICHMOND, W., Acad. Press, New York, p. 97 (1980).
340. GAMES, D.E.—ECKERS, C.—HIRTER, P.—LEWIS, E.—RAO, K.R.N.: *27th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Seattle, p. 627 (1979).
341. GAMES, D.E.—GAWER, J.L.—LEE, M.G.—LEWIS, I.A.S.—PUGH, M.E.—ROSSITER, M.: in *Blood Drugs and Other Analytical Challenges*, ed. REID, E., Ellis Harwood, Chichester, p. 185 (1978).
342. GAMES, D.E.—HIRTER, P.—KUHNZ, W.—LEWIS, E.—WEERASINGHE, N.C.A.—WESTWOOD, S.A.: *J. Chromatogr.* **203**, 131 (1981).
343. NAU, H.: *Angew. Chem. Intern. Ed.* **15**, 75 (1976).
344. MORRIS, H.R.—DELL, A.: in *Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis* ed. PERHAM, R.N., Acad. Press, New York, p. 147 (1975).
345. VESTLING, M.M.—MURPHY, C.M.—FENSCLAU, C.: *Anal. Chem.* **62**, 2391 (1990).
346. ROEPSTORF, P.—MCDAWALL, M.A.—GAMES, M.P.L.—GAMES, D.E.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **48**, 197 (1983).
347. KENYON, C.N.: *Biomed. Mass Spectrom.* **10**, 535 (1983).
348. LARSEN, B.R.: *Life Sci.* **30**, 1007 (1982).
349. THIBAUT, P.—PLEASANCE, S.—LAYCOCK, M.V.—MACKAY, R.M.—BOYD, R.K.: *Intern. J. Mass Spectrom. ion Proc.* **111**, 317 (1991).
350. HEMLING, M.E.—ROBERTS, G.D.—JOHNSON, W.—CARR, S.A.—COVEY, T.R.: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **19**, 677 (1990).
351. GRIFFIN, P.R.—COFFMAN, J.A.—HOOD, I.E.—YATES, J.R.: *Intern. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **111**, 131 (1991).
352. SMITH, J.B.—MIESBAUER, L.R.—LEEDS, J.—SMITH, D.L.—LOO, J.A.—SMITH, R.D.—EDWARDS, C.G.: *Intern. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **111**, 229 (1991).
353. BRUINS, A.P.—COVEY, T.R.—HENION, J.D.: *Anal. Chem.* **59**, 2642 (1987).

354. HUANG, E.C.—WACHS, T.—CONBOY, J.J.—HENION, J.D.: *Anal. Chem.* **62**, 713A (1990).
355. FENN, J.B.—MANN, M.—MENG, C.K.—WONG, S.F.—WHITEHOUSE, C.M.: *Mass Spectrom. Rev.* **9**, 37 (1990).
356. FENN, J.B.—MANN, M.—MENG, C.K.—WONG, S.F.—WHITEHOUSE, C.M.: *Science* **246**, 64 (1989).
357. HUANG, E.C.—HENION, J.D.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1**, 158 (1990).
358. LOO, J.A.—UDSETH, H.R.—SMITH, R.D.: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **17**, 411 (1988).
359. LOO, J.A.—UDSETH, H.R.—SMITH, R.D.: *Anal. Biochem.* **176**, 404 (1989).
360. HAIL, M.—LEWIS, S.—JARDINE, I.—LIU, J.—NOVOTNY, M.: *J. Microcol. Sep.* **2**, 285 (1990).
361. MANNSCHRECK, A.—ANDERT, D.—EIGLSPERGER, A.—GIVELE, E.—BUCHNER, H.: *Chromatographia* **25**, 182 (1988).
362. REITSMAN, B.H.—YEUNG, E.S.: *J. Chromatogr.* **362**, 353 (1986).
363. REITSMAN, B.H.—YEUNG, E.S.: *Anal. Chem.* **59**, 1059 (1987).
364. MEINARD, C.—BRUMEAN, P.—PERRONNETT, J.: *J. Chromatogr.* **349**, 109 (1985).
365. KUROSU, Y.—SASAKI, T.—TAKAKUWA, T.—SAKAYANAGI, N.—HIBI, K.—SENDA, M.: *J. Chromatogr.* **515**, 407 (1990).
366. BRINGHURST, F.R.—SERGE, G.V.—LAMPMAN, G.W.—POTTS, J.T., JR.: *Biochemistry* **21**, 4252 (1982).
367. GUY, M.N.—ROBERSON, G.M.—BARNES, L.D.: *Anal. Biochem.* **112**, 272 (1981).
368. SEIDAH, N.G.—DENNIS, M.—CORVOL, P.—ROCHEMONT, J.—CHRETIEN, M.: *Anal. Biochem.* **109**, 185 (1980).
369. LAMBERT, P.W.—ROOS, B.A.: *J. Chromatogr.* **198**, 293 (1980).
370. FOURMY, D.—PRADAYROL, L.—ANTONIOTTI, H.—ESTEVE, J.P.—RIBET, A.: *J. Liquid Chromatogr.* **5**, 757 (1982).
371. SEIDAH, N.G.—CHRETIEN, M.: *Meth. Enzym.* **92**, 292 (1983).
372. BIRNBAUMER, L.—SWARTZ, T.L.—ROJAS, F.J.—GARBER, A.J.: *J. Recept. Res.* **3**, 3 (1983).
373. VON STETTEN, D.—SCHLETT, R.: *J. Chromatogr.* **218**, 591 (1981).
374. JANÁKY, T.—TÓTH, G.—PENKE, B.—KOVÁCS, K.—LÁSZLÓ, F.A.: *J. Liquid Chromatogr.* **5**, 1499 (1982).
375. JANÁKY, T.: HPLC alkalmazása az endokrin kutatásban. Kandidátusi értekezés, Szeged, 1990.
376. JANÁKY, T.—LÁSZLÓ, F.A.—TÓTH, G.K.—ZSIGÓ, J.—PENKE, B.—TÓTH, G.—MORGAT, J.L.: in *Chromatography '84*, eds. KALÁSZ, H.—ETTRE, L.S., Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 521 (1986).
377. LÁSZLÓ, F.A.—JANÁKY, T.—BALÁSPIRI, L.—MORGAT, J.L.: *J. Endocrinol.* **88**, 181 (1981).

378. JANÁKY, T.—LÁSZLÓ, F.A.—SIROKMÁN, F.—MORGAT, J.L.: *J. Endocrinol.* **93**, 295 (1982).
379. JANÁKY, T.—LACZI, F.—LÁSZLÓ, F.A.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **394**, 116 (1982).
380. JANÁKY, T.—LÁSZLÓ, F.A.—BALÁSPIRI, L.—MORGAT, J.L.: *Horm. Metab. Res.* **14**, 385 (1982).
381. ORLOWSKI, R.: in *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, ed. HANCOCK, W.S., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, Vol. I., p. 369 (1984).
382. KEMPER, B.—HABENER, J.F.—ERNST, M.D.—POTTS, J.T., JR.—RICH, A.: *Biochemistry* **15**, 14 (1976).
383. SEGRE, G.V.—NIALL, H.D.—SAUER, R.—POTTS, J.T., JR.: *Biochemistry* **16**, 2417 (1977).
384. LINK, T.P.—STORK, G.R.: *J. Biol. Chem.* **243**, 1082 (1967).
385. FRANCO-BOURLAND, R.E.—FERNSTROM, J.D.: *Endocrinol.* **109**, 1097 (1981).
386. HRUBY, V.J.—VISWANATHA, V.—YANG, Y.C.S.: *J. Label. Comp. Radiopharm.* **17**, 801 (1980).
387. BUCKLEY, D.I.—RAMACHANDRAN, J.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **17**, 514 (1981).
388. NIKOLICS, K.—KÉRI, GY.—SZÓKE, B.—HORVÁTH, A.—TELPÁN, I.: in *Hormonally Active Brain Peptides*, eds. MCKERNS, C.—PANTIC, E., Plenum Press, New York, p. 427 (1982).
389. FISHER, L.A.—FERNSTROM, J.D.: *Life Sci.* **28**, 1471 (1981).
390. MCDERMOTT, J.R.—SMITH, A.I.—BIGGINS, J.A.—AL-NOAEMI, M.C.—EDWARDSON, J.A.: *J. Chromatogr.* **222**, 371 (1981).
391. SPINDEL, E.—PITTIONE, D.—FISHER, L.—FERNSTROM, J.—WURTMAN, R.: *J. Chromatogr.* **222**, 381 (1981).
392. LOEBER, J.G.—VERHOEF, J.: in *Methods in Enzymology*, eds. LANGONE, J.J.—VAN VUNAKIS, H., Academic Press, New York, Vol. **73**, p. 261 (1981).
393. AKIL, H.—UEDA, Y.—LIN, H.L.—WATSON, S.J.: *Neuropeptides* **1**, 429 (1981).
394. MOHRING, J.—BOHLEN, P.—SHOUN, J.—MELLET, M.—SUSS, U.—SCHMIDT, M.—PILSKA, V.: *Acta Endocrinol.* **99**, 371 (1982).
395. VECSENYÉS, M.—JÓJÁRT, I.—PEPÓ, J.—LACZI, F.: *Brain Res.* **522**, 325 (1990).
396. IDEI, M.—PAJOR, A.—MENYHÁRT, J.: *J. Liquid Chrom.* **12**, 2769 (1989).
397. LAWRENCE, J.F.: *J. Chromatogr. Sci.* **17**, 147 (1979).
398. SZÓKÁN, GY.: *J. Liquid Chromatogr.* **5**, 1493 (1982).
399. SZÓKÁN, GY.—PINTÉR, GY.: in *Peptides 1982*, eds. BLAHA, K.—MALON, P., Walter de Gruyter, Berlin, p. 419 (1983).
400. WEBER, G.: *Biochem. J.* **51**, 155 (1952).

401. GRAY, W.R.—HARTLEY, B.S.: *Biochem. J.* **89**, 59 (1963).
402. HARTLEY, B.S.—MASSEY, V.: *Biochem. Biophys. Acta* **21**, 58 (1956).
403. BAYER, E.—GROM, E.—KALTENEGGER, B.—UHMANN, R.: *Anal. Chem.* **48**, 1106 (1976).
404. HSU, K.T.—CURRIE, B.L.: *J. Chromatogr.* **166**, 555 (1978).
405. WILKINSON, J.M.: *J. Chromatogr. Sci.* **16**, 547 (1978).
406. TAPUHI, Y.—SCHMIDT, D.E.—LINDNER, W.—KARGER, B.L.: *Anal. Biochem.* **115**, 123 (1981).
407. KANEDA, N.—SATO, M.—YAGI, K.: *Anal. Biochem.* **127**, 345 (1982).
408. DE JANG, C.—HUNGHEES, G.J.—VAN WIERINGEN, E.—WILSON, K.J.: *J. Chromatogr.* **241**, 345 (1982).
409. GREGO, B.—HEARN, M.T.V.: *J. Chromatogr.* **255**, 67 (1983).
410. WEINER, S.—TISCHLER, A.: *J. Chromatogr.* **213**, 501 (1981).
411. TAPUHI, Y.—MILLER, N.—KURGER, B.L.: *J. Chromatogr.* **205**, 325 (1981).
412. BONGIOVANNI, R.—GLASS, A.R.—BAHM, T.M.: in *Biological-Biomedical Applications of Liquid Chromatography Vol. 3*, ed. HAWK, G.L., Marcel Dekker New York, p. 211 (1981).
413. SCHMIDT, G.J.—OLSON, D.C.—SLAVIN, W.: *J. Liquid Chromatogr.* **2**, 1031 (1979).
414. SZÓKÁN, GY.—KELEMEN, G.—TÖRÖK, A.: *J. Chromatogr.* **366**, 285 (1986).
415. SZÓKÁN, GY.—GYENES, M.—TYIHÁK, E.—SZENDE, B.: in *Peptides 1982*, eds. BLAHA, K.—MALON, P., Walter de Gruyter, Berlin, p. 203, (1983).
416. PARRIS, N.—GALLELI, D.: *J. Liquid Chromatogr.* **7**, 917 (1984).
417. HUDECZ, F.—SZÓKÁN, GY.: in *Chromatography, the State of Art*, eds. KALÁSZ, H.—ÉTTRE, L. Akadémiai Kiadó, L.S., Budapest, p. 273 (1983).
418. MALTSEV, V.G.—KOROLYAVA, E.M.—BELENKI, B.G.—VINEGRODAVA, R.G.—GANITSKY, M.B.: *Bioorg. Khim.* **9**, 186 (1983).
419. UDENFRIEND, S.—STEIN, S.—BÖHLEN, P.—DOIRMAN, W.—LAIMGRUBER, W.—WEIGELE, M.: *Science* **178**, 871 (1972).
420. WEIGELE, M.—DE BERNARDO, S.L.—TENGI, J.P.—LEIMGRUBER, W.: *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 5927 (1972).
421. MCHUGH, W.—SANDMANN, R.A.—HANEY, W.G.—SOOD, S.P.—WITTNER, D.P.: *J. Chromatogr.* **124**, 376 (1976).
422. TOOME, V.—MANHART, K.: *Anal. Lett.* **8**, 441 (1975).
423. DE BERNARDO, S.—WEIGELE, M.—TOOME, V.—MANHART, K.—LEIMGRUBER, W.—BÖHLEN, P.—STEIN, S.—UDENFRIEND, S.: *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 390 (1974).
424. MENDEZ, E.—GAVILANES, J.G.: *Anal. Biochem.* **72**, 473 (1976).
425. STEIN, S.—BÖHLEN, P.—STONE, J.—DAIRMAN, W.—UDENFRIEND, S.: *Arch. Biochem. Biophys.* **155**, 203 (1973).

426. BOHLEN, P.—STEIN, S.—STONE, J.—UDENFRIEND, S.: *Anal. Biochem.* **67**, 438 (1975).
427. FREI, R.W.—LAURECE, J.F.: *J. Chromatogr.* **83**, 321 (1973).
428. FREI, R.W.—MICHEL, L.—SANTI, W.: *J. Chromatogr.* **126**, 665 (1976).
429. KRUMMEN, K.—FREI, R.W.: *J. Chromatogr.* **132**, 27 (1977).
430. GRUBER, K.—STEIN, S.—BRINK, L.—RADHAKISHNAN, A.—UDENFRIEND, S.: *Proc. Nat. Anal. Sci. USA* **73**, 1314 (1976).
431. UDENFRIEND, S.—STEIN, S.: in *Peptides 1977, Proceedings of the 5th American Peptide Symposium*, eds. GOODMAN, M.—MEIENHOFER, J., John Wiley and Sons, Inc. New York, p. 14 (1978).
432. LIVE, D.H.: in *Peptides*, eds. GOODMAN, M.—MEIENHOFER, J., Academic Press, New York, p. 41 (1977).
433. UDENFRIEND, S.—KILPATRICK, D.L.—KOJIMA, K.: in *Methods in Biogenic Amine Research*, ed. PARVEZ, S., Elsevier Sci. Publ., p. 1 (1983).
434. BOPANA, V.K.—MILLER-STEIN, C.—POLITOWSKI, G.R.—RHODES, J.F.: *J. Chromatogr.* **548**, 319 (1991).
435. NARAYANAN, T.K.—GREENBAUM, L.M.: *J. Chromatogr.* **306**, 109 (1984).
436. NARAYANAN, T.K.—GREENBAUM, L.M.: *J. Chromatogr.* **306**, 109 (1984).
437. STEIN, S.—MOSEKERA, J.: in *Methods in Enzymology*, ed. PESTKA, S., Academic Press, New York, Vol. **79**, p. 7 (1981).
438. WU, K.M.—SLOAN, J.W.—MARTIN, W.R.: *J. Chromatogr.* **202**, 500 (1980).
439. YANG, H.S.—STUDEBAKER, J.F.—PARRAVANO, C.: in *Biological-Biomedical Applications of Liquid Chromatography*, ed. HAWK, G.L., Marcel Dekker Inc. New York, p. 247 (1979).
440. KOHR, W.J.—KECK, R.—HARKINS, R.N.: *Anal. Biochem.* **172**, 348, (1982).
441. FELIX, A.M.—JIMENEZ, M.H.: *Anal. Biochem.* **52**, 377 (1973).
442. TOMETSKO, A.M.—VOGELSTEIN, E.: *Anal. Biochem.* **64**, 438 (1975).
443. FELIX, A.M.—JIMENEZ, M.H.—VERGONA, R.—COHEN, M.R.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **7**, 11 (1975).
444. SALLAY, S.I.—OROSZLÁN, S.: in *Biological/Biomedical Applications of Liquid Chromatography*, ed. HAWK, G.L., Marcel Dekker Inc., New York, p. 199 (1979).
445. KUCERA, P.—UMAGOT, H.: *J. Chromatogr.* **255**, 563 (1983).
446. SCHLABACH, T.D.: *J. Chromatogr.* **266**, 427 (1983).
447. BOPANA, V.K.—MILLER-STEIN, C.—POLITOWSKI, J.F.—RHODES, G.H.: *J. Chromatogr.* **548**, 319 (1991).
448. WEIGELE, M.—DE BERNARDO, S.—LEIMGRUBER, W.—CLEELAND, R.—GRUNBERG, E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 899 (1973).

449. WIDEMAN, J.—BRINK, L.—STEIN, S.: in *Peptides, 1977*, Proceedings of the 5th American Peptide Symposium, eds. GOODMAN, M.—MEIENHOFER, J., Wiley and Sons Inc. New York, p. 24 (1977).
450. RUBINSTEIN, M.—WIDEMAN, J.—STEIN, S.: in *Peptides 1977*, Proceedings of the 5th American Peptide Symposium, eds. GOODMAN, M.—MEIENHOFER, J., Wiley and Sons Inc., New York, p. 41 (1977).
451. ROTH, M.: *Anal. Chem.* **43**, 880 (1971).
452. SIMMONS, S.S.—JOHNSON, D.F.: *Anal. Biochem.* **82**, 250 (1977).
453. SIMMONS, S.S.—JOHNSON, D.F.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **11**, 374 (1977).
454. SIMMONS, S.S.—JOHNSON, D.F.: *J. Org. Chem.* **43**, 2886 (1978).
455. ROTH, M.—HANYAI, A.: *J. Chromatogr.* **83**, 353 (1973).
456. BENSON, J.R.—HARE, P.E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 619, (1975).
457. LINDROTH, P.—MOPPER, K.: *Anal. Chem.* **51**, 1667 (1979).
458. MAY, M.E.—BROWN, L.L.: *Anal. Biochem.* **181**, 136 (1989).
459. HODGIN, J.C.: *J. Liquid Chromatogr.* **2**, 1047 (1979).
460. LARSEN, B.R.—WEST, F.G.: *J. Chromatogr. Sci.* **19**, 259 (1981).
461. SCHMIDT, G.J.—OLSON, D.C.—SLAVIN, W.: *J. Liquid Chromatogr.* **2**, 1031 (1971).
462. GARNDER, W.S.—MILLER, W.H.: *Anal. Biochem.* **101**, 61 (1980).
463. TURNELL, D.C.—COOPER, J.D.H.: *Clin. Chem.* **28**, 3 (1982).
464. TURNELL, D.C.—COOPER, J.D.H.: *J. Antom. Chem.* **5**, 36 (1983).
465. BOHLEN, P.—MELLET, M.: *Anal. Biochem.* **94**, 313 (1979).
466. ISHIDA, Y.—FUJITA, T.—ASAI, K.: *J. Chromatogr.* **204**, 143 (1981).
467. JONES, B.N.—PAABO, S.—STEIN, S.: *J. Liquid Chromatogr.* **4**, 565 (1981).
468. JOSEPH, M.H.—DAVIES, P.: *J. Chromatogr.* **277**, 125 (1983).
469. PINTÉR, GY.—KOVÁCS, A.L.: in *Chromatography '84*, eds. KALÁSZ, H.—ETTRE, L.S., Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 475 (1986).
470. AOKI, K.—KUROIWA, Y.: *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 2684 (1978).
471. BARKHOLT, J.—JENSEN, A.L.: *Anal. Biochem.* **177**, 318 (1989).
472. IWAI, K.: *Yakugaku Zasshi* **103**, 1225 (1983).
473. JOYS, T.M.—KIM, H.: *Anal. Biochem.* **94**, 371 (1979).
474. CREASER, E.H.—HUGHES, G.J.: *J. Chromatogr.* **144**, 69 (1977).
475. LARSEN, B.R.: *Life Sci.* **30**, 1007 (1982).
476. MONTIGNY, P.DE—STOBAUGH, J.F.—GIVENS, R.S.—CARLSON, R.G.—SRIMIVASACHAR, K.—STERNSON, L.A.—HIGUCHI, T.: *Anal. Chem.* **59**, 1096 (1987).
477. MATUSZEWSKI, B.K.—GIVENS, R.S.—SRINIVASACHAR, K.—CARLSON, R.G.—HIGUCHI, T.: *Anal. Chem.* **59**, 1102 (1987).
478. CARLSON, R.G.—SRIMIVASACHAR, K.—GIVENS, R.S.—MATUSZEWSKI, B.K.: *J. Org. Chem.* **51**, 3978 (1986).

479. MIFUNE, M.—KREHBIEL, D.K.—STOBAUGH, J.F.—RILEY, C.M.: *J. Chromatogr.* **496**, 55 (1989).
480. DE MONTIGNY, P.—RILEY, C.M.—STERNSON, L.A.—STOBAUGH, J.F.: *J. Pharmaceut. and Biomed. Anal.* **8**, 419 (1990).
481. BEALE, S.C.—SAVAGE, J.C.—WIESLER, D.—WIETSTOCK, S.—NOVOTNY, M.: *Anal. Chem.* **60**, 1765 (1988).
482. HSIEH, Y.Z.—BEALE, S.C.—WIESLER, D.—NOVOTNY, M.: *J. Microcolumn Sep.* **2**, 96 (1989).
483. BEALE, S.C.—HSIEH, Y.Z.—SAVAGE, J.C.—WIESLER, D.—NOVOTNY, M.: *Talanta* **36**, 322 (1981).
484. BEALE, S.C.—HSIEH, Y.Z.—WIEDER, D.—NOVOTNY, M.: *J. Chromatogr.* **499**, 570 (1990).
485. LIU, J.—HSIEH, Y.Z.—WIESLER, D.—NOVOTNY, M.: *Anal. Chem.* **63**, 408 (1991).
486. CARPINO, L.A.—HAN, G.Y.: *J. Org. Chem.* **37**, 3404 (1982).
487. MOYE, H.A.—BONING, A.J., JR.: *Anal. Letters* **12**, (B1) 25 (1979).
488. EINARSSON, S.—JOSEFSSON, B.—LAGERKVIST, L.: *J. Chromatogr.* **282**, 609 (1983).
489. GUSTAVSSON, B.—BETNÉR, J.: *J. Chromatogr.* **507**, 67 (1990).
490. FÜRST, L. POLLACK, P.—GRASER, T.A.—GODEL, H.—STEHLE, P.: *J. Chromatogr.* **499**, 557 (1991).
491. BÜTIKHOFER, V.—FUCHS, D.—BOSSET, J.O.—GMÜR, W.: *Chromatographia* **31**, 441 (1991).
492. ZERVAS, L.—BOROVAS, D.—GAZIS, E.: *J. Chem. Soc.* **85**, 3660 (1963).
493. SCOFFONE, E.—FONTANA, A.—ROCCHI, R.: *Biochemistry* **7**, 971 (1968).
494. SANGER, F.: *Biochem. J.* **39**, 507 (1945).
495. SALLAY, S.I.—OROSZLÁN, S.: in *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins*, ed. HANCOCK, W.S., CRC Pres, Inc., Boca Raton, Florida, Vol. II. p. 99 (1984).
496. PETERSON, W.R.—WARTHESEN, J.J.: *J. Food Sci.* **44**, 994 (1979).
497. PETERSON, W.R.—WARTHESEN, J.J.: in *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins*, ed. HANCOCK, W.S., CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. I. p. 331 (1984).
498. BACHMANN, E.W.—FREI, J.—MUEHLEMANN, M.: *Chromatographia* **12**, 345 (1979).
499. SATAKE, K.—OKUYAMA, T.—OHASHI, M.—SHINODA, T.: *J. Biochem.(Tokyo)* **47**, 654 (1960).
500. CANDILL, W.L.—WIGHTMAN, R.M.: *Anal. Chim. Acta* **141**, 269 (1982).
501. GHOSH, P.B.—WHITEHOUSE, M.W.: *Biochem. J.* **108**, 155 (1968).
502. BIRKETT, D.J.—PRICE, N.C.—RODDA, G.K.—SALMON, A.G.: *FEBS Lett.* **6**, 346 (1970).
503. IWAI, K.—WATONABE, Y.: *Anal. Chim. Acta* **130**, 377 (1981).

504. TOYOOKA, T.—WATANABE, Y.—IWAI, K.: *Anal. Chim. Acta* **149**, 305 (1983).
505. IWAI, K.—WATANABE, Y.—TOYOOKA, T.: *Chromatographia* **16**, 214 (1982).
506. HEINRIKSON, R.L.—MEREDITH, S.C.: *Anal. Biochem.* **136**, 65 (1984).
507. MAUGH, T.H.: *Science* **225**, 42 (1984).
508. BIDLINGMEYER, B.A.—COHEN, S.A.—TARVIN, T.L.: *J. Chromatogr.* **336**, 93 (1984).
509. CALULL, M.—FABREGAS, J.—MORCÓ, R.M.—BANNULL, F.: *Chromatographia* **31**, 272 (1991).
510. SCHOLZE, H.: *J. Chromatogr.* **350**, 453 (1985).
511. YANG, C.Y.—SEPULVEDA, F.I.: *J. Chromatogr.* **346**, 413 (1985).
512. SHOJI, S.—ICHIKAWA, M.—YAMAOKA, T.—FUNAKOSHI, T.—KUBOTA, Y.: *J. Chromatogr.* **354**, 463 (1986).
513. DAVEY, J.F.—ERSSER, R.S.: *J. Chromatogr.* **528**, 9 (1990).
514. FÜRST, D.—POLLACK, L.—GRASER, T.A.—GODEL, H.—STEHLE, P.: *J. Chromatogr.* **499**, 557 (1990).
515. HEINRIKSON, R.L.—MEREDITH, S.C.: *Anal. Biochem.* **136**, 65 (1984).
516. NEIDLE, A.—BANAY-SCHWARTZ, M.—SACKS, S.—DUNLOP, D.S.: *Anal. Biochem.* **180**, 291 (1989).
517. CHANG, J.Y.—BRAUER, D.—WITTMANN-LEIBOLD, B.: *FEBS Lett.* **93**, 205 (1978).
518. CHANG, J.Y.: *Biochem. Biophys. Acta* **578**, 188 (1979).
519. CHANG, J.Y.—LEHMANN, A.—WITTMANN-LEIBOLD, B.: *Anal. Biochem.* **102**, 380 (1980).
520. CHANG, J.Y.: *Biochem. J.* **199**, 537 (1981).
521. CHANG, J.Y.: *Biochem. J.* **199**, 557 (1981).
522. LIN, J.K.—CHANG, J.Y.: *Anal. Chem.* **47**, 1634 (1975).
523. LIN, J.K.—CHEN, C.A.—WANG, C.H.: *Proc. Natl. Sci. Council, ROC* **3**, 158 (1979).
524. LIN, J.K.—WANG, C.H.: *Clin. Chem.* **26**, 579 (1980).
525. LIN, J.K.—LAI, C.C.: *Anal. Chem.* **52**, 630 (1980).
526. CHANG, J.Y.—KNECHT, R.—BRAUN, D.G.: *Biochem. J.* **199**, 547 (1981).
527. MAEDA, H.—ISHIDA, N.—KAWAUCHI, H.—TUZIMURA, K.: *J. Biochem.* **65**, 777 (1969).
528. MURAMOTO, K.—KAWAUCHI, H.—YAMAMOTO, Y.—TUZIMURA, K.: *Agr. Biol. Chem.* **40**, 815 (1976).
529. HORN, M.J.—HARGRAVE, P.A.—WANG, J.K.: *J. Chromatogr.* **180**, 111 (1979).
530. IVANOV, C.P.—MANCHEVA, I.N.: *Anal. Biochem.* **53**, 420 (1973).
531. MANCHEVA, I.N.—NILSOLOV, R.N.—PFLETSCHINGER, J.: *J. Chromatogr.* **213**, 99 (1981).

532. KAI, M.—MIYAZAKI, T.—YAMAGUCHI, M.—OHKURA, Y.: *J. Chromatogr.* **268**, 417 (1983).
533. KAI, M.—MIURA, T.—ISHIDA, J.—OHKURE, Y.: *J. Chromatogr.* **345**, 259 (1985).
534. KAI, M.—MIYAZAKI, T.—SAKAMOTO, Y.—OHKURA, Y.: *J. Chromatogr.* **322**, 473 (1985).
535. LIU, D.—MCADOO, D.J.: *J. Liquid Chromatogr.* **13**, 2049 (1990).
536. VOELTER, W.—GRÜBLER, G.—GUTJAHR, F.—ECHNER, H.: *Chromatographia* **30**, 719 (1990).
537. VOELTER, W.: in *High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry*, eds. LOTTSPREICH, F.—HENSCHEN, A.—HUPE, K.P., Walter de Gruyter and Co. Berlin, p. 35 (1981).
538. KALBACHER, H.—VOELTER, W.: in *Structure and Activity of Natural Peptides*, eds. VOELTER, W.—WEITZEL, G., Walter de Gruyter and Co., Berlin, p. 383 (1981).
539. VOELTER, W.—ZECH, K.: *J. Chromatogr.* **112**, 643 (1975).
540. VOELTER, W.: *Pure Appl. Chem.* **48**, 105 (1976).
541. TIKHOMIROV, M.M.—KHORLIN, A.Y.—VOELTER, W.—BAUER, H.: *J. Chromatogr.* **167**, 197 (1978).
542. BAUER, H.—VOELTER, W.—TIKHOMIROV, M.M.: in *Structure and Activity of Natural Peptides*, eds. VOELTER, W.—WEITZEL, G., Walter de Gruyter and Co., Berlin, p. 255 (1981).
543. VOELTER, W.—BAUER, H.—FUCHS, S.—PIETRZIK, E.: *J. Chromatogr.* **153**, 433 (1978).
544. VOELTER, W.: in *Polypeptide Hormones*, eds. BEERS, R.F.—BASSETT, E.C., Raven Press, New York, p. 135 (1980).
545. VOELTER, W.—MÜLLER, J.: *Liebigs Ann. Chem.* **248**, (1983).
546. VOELTER, W.: in *High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry*, eds. HENSCHEN, A.—HUPE, K.P.—LOTTSPREICH, F.—VOELTER, W., Verlag Chemie (VHC), Weinheim, p. 217. (1985).
547. KNOX, J.H.—SZÓKÁN, GY.: *J. Chromatogr.* **171**, 439 (1979).
548. SZÓKÁN, GY.—KELEMEN, G.—TÖRÖK, A.: *J. Chromatogr.* **366**, 283 (1986).
549. SZÓKÁN, GY.—TÖRÖK, A.—PENKE, B.: *J. Chromatogr.* **387**, 267 (1987).
550. SZÓKÁN, GY.—PENKE, B.—BALÁSPIRI, L.—TÖRÖK, A.: in *Chromatography, the State of the Art*; eds. KALÁSZ, H.—ETTRE, L.S., Akadémiai Kiadó, p. 257 (1984).
551. MIRANDA, M.T.M.—THEOBALDO, F.C.—TOMINAGA, M.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **37**, 451 (1991).
552. TIAN, Z.—ROESKE, R.W.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **37**, 245 (1991).
553. BENOITON, N.L.—LEE, Y.—CHEN, F.M.F.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **31**, 443 (1988).

554. BENOITON, N.L.—LEE, Y.—LIBEREK, B.—STEINAUER, R.—CHEN, F.M.F.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **31**, 581 (1988).
555. CHEN, F.M.F.—BENOITON, N.L.: *Can. J. Chem.* **65**, 619 (1987).
556. CHEN, F.M.F.—BENOITON, N.L.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **36**, 476 (1990).
557. CHEN, F.M.F.—BENOITON, N.L.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **38**, 97 (1991).
558. GRIGORJEVA, V.D.—SHATZ, V.D.—BRIOKALNE, L.A.—CHIPENS, G.I.: *Bioorg. Khim.* **9**, 869 (1983).
559. GRIGORJEVA, V.D.—SHATZ, V.D.—BRIOKALNE, L.A.—CHIPENS, G.I.: *Bioorg. Khim.* **9**, 869 (1983).
560. GRIGORJEVA, V.D.—BRIOKALNE, L.A.—SHATZ, V.D.: *Bioorg. Khim.* **11**, 447 (1985).
561. GRIGORJEVA, V.D.—SHATZ, V.D.: *Bioorg. Khim.* **15**, 1157 (1989).
562. TESSIER, M.—ALBERICIO, S.—PEDROSO, E.—GRANDAS, A.—ERITJA, R.—GIRALT, E.—GRANIER, C.—VAN RIETSCHOTEN, J.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **22**, 125 (1983).
563. SCHIELEN, W.J.G.—ADAMS, H.P.H.M.—NIEUWENHUIZEN, W.—TESSER, G.I.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **37**, 341 (1991).
564. NACHTMANN, F.: *J. Chromatogr.* **176**, 391 (1979).
565. NACHTMANN, F.: in *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, ed. HANCOCK, W.S., CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. II. p. 131 (1984).
566. PÉTER, A.—LUKÁCS, F.—BURGER, K.—SCHÓN, I.—LÓW, M.—KISFALUDY, L.: *J. Chromatogr.* **507**, 59 (1990).
567. SLEBIODA, M.—KOŁODZIEJCZYK, A.M.: *Analyst* **111**, 91 (1986).
568. CHENG, H.C.—YAMASHIRO, D.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **38**, 70 (1991).
569. KALBACHER, H.—VOELTER, W.: *Angew. Chem.* **90**, 998 (1978).
570. RAMPOLD, G.—LUNDANES, E.—FOLKERS, K.—VOELTER, W.—KALBACHER, H.—BLIZNAKOV, E.: *Z. Naturforsch.* **35b**, 1476 (1980).
571. KALBACHER, H.—VOELTER, W.: *Chem. Commun.* 1265 (1980).
572. VOSKAMP, D.—ELIEMAN, C.—BEYERMAN, H.C.: *Recueil, J.R. Netherlands Chem. Soc.* **99**, 105 (1980).
573. BECK-SCIKINGER, A.G.—SCHNORRENBURG, G.—METZGER, J.—JUNG, G.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **38**, 25 (1991).
574. GESQUIRE, J.C.—DIESIS, E.—TARTAR, A.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1402 (1990).
575. PATEL, K.—BORCHARDT, R.T.: *Pharmaceut. Res.* **7**, 787 (1990).
576. JIN, H.L.—LIN, Y.—LI, C.X.—YIEH, Y.H.—CHI, A.H.—LU, Y.J.—ZHAO, C.—JIN, H.Z.—HSING, C.Y.: *Chromatographia* **17**, 205 (1983).
577. BAKHUM, J.T.M.—BEYERMAN, H.C.—HOOGERHOUT, P.—OLIEMAN, C.—VOSKAMP, D.: *Recueil Trav. Chim. Pays-Bas* **96**, 301 (1977).

578. TÖRÖK, A.—KOVÁCS, K.—SZÓKÁN, GY.: in *Chromatography '85*, eds. KALÁSZ, H.—ETTRE, L.S., Akadémiai Kiadó, Budapest, p.117 (1986).
579. CAPASSO, S.—MAZZARELLA, L.—SICA, F.—ZAGARI, A.: *J. Chem. Soc. Commun.* 1667 (1991).
580. VADÁSZ, ZS.—SEPRÓDI, J.—ÉRCHEGYI, J.—TEPLÁN, I.—SCHÓN, I.: *J. Chromatogr.* **477**, 377 (1989).
581. SCHÓN, I.—RILL, A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **54**, 3360 (1989).
582. SCHÓN, I.—COLOMBO, R.—CSEHI, A.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 505 (1983).
583. SCHÓN, I.—RILL, A.: *Acta Chim. Hung.* **124**, 191 (1987).
584. SCHÓN, I.—SZIRTES, T.—RILL, A.—BALOGH, G.—VADÁSZ, ZS.—SEPRÓDI, J.—TEPLÁN, I.—CHINO, N.—KUMOGAYE, K.Y.—SAKAKIBARA, S.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 3213 (1991).
585. ROBSON, V.M.J.—RAE, I.D.—NG, F.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **37**, 423 (1990).
586. WÜNSCH, E.—JAEGER, E.—DEFFNER, M.—SCHARF, R.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 1716 (1972).
587. JAEGER, E.—THAMM, P.—SCHMIDT, I.—KNOF, S.—MORODER, L.—WÜNSCH, E.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 155 (1978).
588. LÓW, M.—KISFALUDY, L.—JAEGER, E.—THAMM, P.—KNOF, S.—WÜNSCH, E.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 1637 (1978).
589. JAEGER, E.—THAMM, P.—KNOF, S.—WÜNSCH, E.—LÓW, M.—KISFALUDY, L.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 1617 (1978).
590. ZECH, K.—HEINZEL, W.—VOELTER, W.—HUPE, K.P.: in *High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry*, eds. LOTTSPEICH, F.—HENSCHEN, A.—HUPE, K.P., Walter de Gruyter, Berlin, p. 143 (1981).
591. DIMARCHI, R.D.—TAM, J.P.—KENT, S.B.H.—MERRIFIELD, R.T.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **19**, 88 (1982).
592. HUNTER, C.—SUGDEN, K.—LLOYD-JONES, J.G.: *J. Liquid Chromatogr.* **3**, 1335 (1980).
593. VAN DER GREEF, J.—TAS, A.C.: *J. Chromatogr.* **394**, 77 (1987).
594. TAKUMA, S.—HAMODA, Y.—SHIORI, T.: *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 3147 (1982).
595. GÖRÖG, S.—HERÉNYI, B.—LÓW, M.: *J. Chromatogr.* **353**, 417 (1986).
596. CHEN, F.M.F.—BENOITON, N.L.: *Can. J. Chem.* **65**, 619 (1987).
597. WÜNSCH, E.: in *Structure and Activity of Natural Peptides*, eds. VOELTER, W.—WEITZEL, G., Walter de Gruyter and Co., Berlin, p. 3. (1981).
598. BAYER, E.—RAPP, W.—ZHANG, L.: in *Peptides 1988, Proceedings of the 20th European Peptide Symposium*, eds. JUNG, G.—BAYER, E., Walter de Gruyter and Co., Berlin, p. 390 (1989).
599. RINIER, J.E.—MILLER, C.L.—TUCHSCHERER, G.—CRAIG, A.—HERNANDEZ, J.F.—DYKERT, J.—RASCHDORF, F.—MUTTER, M.: in

- Peptides 1990, Proceedings of the 21st European Peptide Symposium, eds. GIRALT, E.—ANDREU, D., ESCOM, Leiden, p. 326 (1991).
600. NIALL, H.D.—TREGGAR, G.W.—JACOBS, J.: in *Chemistry and Biology of Peptides*. Proceedings of the 3rd American Peptide Symposium, ed. MEIENHOFER, J., Ann Arbor Sci., Ann Arbor, Michigan, p. 695 (1972).
601. TREGGAR, G.W.: in *Peptides*, Proceedings of the 13th European Peptide Symposium, ed. WOLMAN, Y., John Wiley and Sons, New York, p. 177 (1974).
602. HUNKAPILLER, M.W.—HOOD, L.E.: *Biochemistry* **17**, 2124 (1978).
603. MATSUEDA, G.R.—HABER, E.—MARGOLIES, M.N.: *Biochemistry* **20**, 2571 (1981).
604. BLASCHKE, G.: *Angew. Chem.* **92**, 14 (1980).
605. KROEFF, E.P.—PIETRZYK, D.J.: *Anal. Chem.* **50**, 1353 (1981).
606. ISKANDARANAI, Z.—PIETRZYK, D.J.: *Anal. Chem.* **53**, 489 (1981).
607. KRUMMEN, K.: *J. Liquid Chromatogr.* **3**, 1243 (1980).
608. LARSEN, B.—WISWANATHA, V.—CHANG, S.Y.—HRUBY, V.J.: *J. Chromatogr. Sci.* **16**, 208 (1978).
609. LARSEN, B.—FOX, B.L.—BURKE, M.F.—HRUBY, V.J.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **13**, 12 (1979).
610. WISWANATHA, V.—LARSEN, B.—HRUBY, V.J.: *Tetrahedron* **35**, 1575 (1979).
611. BLEVINS, D.D.—BURKE, M.F.—HRUBY, V.J.—LARSEN, B.R.: *J. Liquid Chromatogr.* **3**, 1299 (1980).
612. BURGUS, R.—RIVIER, J.: in *Peptides 1976*, ed. LOFFET, C.A., Editions de L'Universite de Bruxelles, Belgium, p. 85 (1976).
613. BAKKUM, J.T.M.—BEYERMAN, H.C.—HOGERHUT, P.—OLIEMAN, C.—VOSKAMP, D.: *Recueil, J.R. Netherlands Chem. Soc.* **96**, 301 (1977).
614. VOSKAMP, D.—OLIEMAN, C.—BEYERMAN, H.C.: *Recueil, J.R. Netherlands Chem. Soc.* **99**, 105 (1980).
615. SUGDEN, K.—HUNTER, C.—LLOYD-JONES, J.G.: *J. Chromatogr.* **204**, 195 (1981).
616. LIN, S.L.—CHEN, S.T.—WU, S.H.—WANG, K.T.: *J. Chromatogr.* **540**, 392 (1991).
617. YAMADA, T.—KUROKAWA, S.—DEJIMA, K.—WATANABE, K.—KTOANI, M.—MIYAZAWA, T.—KUWATA, S.: *Mem. Konan Univ., Sci. Ser.* **32**, 11 (1985).
618. CURRIE, B.L.—CHANG, J.K.—COLLEY, R.: *J. Liquid Chromatogr.* **3**, 513 (1980).
619. MONSA, S.—MULLET, D.—COURI, D.: *Life Sci.* **29**, 61 (1981).
620. RIVIER, J.—SPIESS, J.—PERRIN, M.—VALE, W.: in *Biological-Medical Applications of Liquid Chromatography II.*, HAWK, G.L., Marcel Dekker, New York, p. 223 (1979).
621. RIVIER, J.E.: *J. Liquid Chromatogr.* **1**, 343 (1978).

622. SERTL, D.C.—JOHNSON, R.N.—KHO, B.T.: *J. Liquid Chromatogr.* **4**, 1134 (1981).
623. MEYERS, C.A.—COY, D.H.—HUANG, W.Y.—SCHALLY, A.V.—REDDING, T.W.: *Biochemistry* **17**, 2326 (1978).
624. GOODMAN, M.—KLEOGH, P.: in *Peptides 1974, Proceedings of the 13th European Peptide Symposium*, ed. WOLMAN, Y., Academic Press, New York, p. 247 (1974).
625. GOODMAN, M.—KEOGH, P.—ANDERSON, H.: *Bioorg. Chem.* **6**, 239 (1977).
626. KUSUMOTO, S.—MATSUKARA, M.—SHIBA, T.: *Biopolymers* **20**, 1869 (1981).
627. WODECKI, Z.J.—SLEBIODA, M.—KOŁODZIEJCZYK, A.M.: *J. Chromatogr.* **477**, 454 (1989).
628. BENOITON, N.L.—KURODA, K.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **17**, 197 (1988).
629. KISO, Y.—SATOMI, M.—MIYAZAKI, T.—HIRAIWA, H.—AKITA, T.: in *Peptide Chemistry 1980*, ed. OKAWA, H., Protein Res. Found., Osaka, Japan (1981).
630. VANDER ANWERA, C.—VAN DAMME, S.—ANTEUNIS, M.J.O.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **29**, 466 (1987).
631. MIYAZAWA, T.—OTOMATSU, T.—YAMADA, T.—KUWATA, S.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **39**, 229 (1992).
632. BERNDT, H.: *Tetrahedron Lett.* **21**, 3265 (1980).
633. MATONI, Y.—BERNDT, H.: *Tetrahedron Lett.* **22**, 37 (1980).
634. CARPINO, L.A.—RICE, N.W.—MANSOUR, E.M.E.—S. TRIOLO, A.: *J. Org. Chem.* **49**, 836 (1984).
635. SLEBIODA, M.—KOŁODZIEJCZYK, A.M.: in *Peptides, Chemistry and Biology* ed. MARSHALL, G., ESCOM Sci. Publ., Leiden, The Netherlands p. 43 (1988).
636. PIRKLE, W.H.—HYUN, M.H.: *J. Org. Chem.* **49**, 3043 (1984).
637. BERDT, H.—KRUGER, G.: *J. Chromatogr.* **348**, 275 (1985).
638. PIRKLE, W.H.—POCHAPSKY, T.C.—MAHLER, G.S.—COREY, D.G.—RENO, D.S.—ALESSI, D.: *J. Org. Chem.* **51**, 4991 (1986).
639. MACAUDIERE, P.—LIENNE, M.—TOMBUTE, A.—CAUDE, M.: in *Chiral Separations by HPLC*, ed. KRISTULAVIC, A.M., Ellis Harwood Ltd., Chichester, p. 400 (1989).
640. PIRKLE, W.H.—POCHAPSKY, T.C.: *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 352 (1986).
641. PIRKLE, W.H.—DEMING, K.C.—BURKE, J.A.: *Chirality* **3**, 183 (1991).
642. PERRIN, S.R.: *Chirality* **3**, 188 (1991).
643. ALLENMARK, S.: *LC, Liquid Chromatogr. HPLC. Mag.* **3**, 348 (1985).
644. ALLENMARK, S.: *J. Liquid Chromatogr.* **9**, 425 (1986).
645. THOMPSON, R.—ANDERSSON, S.—ALLENMARK, S.: *J. Chromatogr.* **465**, 263 (1989).
646. HERMANSSON, J.—ERIKSSON, M.: *J. Liquid Chromatogr.* **9**, 621 (1986).

647. ALLENMARK, S.—ANDERSSON, S.: *J. Chirality* **1**, 154 (1989).
648. AZIZ, E.—DAVIES, J.S.—LLEWELLYN, G.—SZAJDA, S.—WARD, R.S.—RAO, K.R.N.: *J. Chrom. Sci.* **29**, 419 (1991).
649. DAVANKOV, V.A.—SEMECHKIN, A.V.: *J. Chromatogr.* **141**, 313 (1977).
650. KYBA, E.P.—TIMKO, J.M.—KAPLAN, L.J.—DE JONG, F.—GOKEL, G.W.—CHRAM, D.J.: *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 4555 (1978).
651. SONSA, L.R.—SOGAH, G.D.Y.—HOFFMAN, D.H.—CRAM, D.J.: *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 4569 (1978).
652. DAVANKOV, V.A.—ZOLOTAREV, Y.A.—KURGANOV, A.A.: *J. Liquid Chromatogr.* **2**, 1191 (1979).
653. LINDNER, W.: *Naturwissenschaften* **67**, 354 (1980).
654. ENGELHARDT, H.—KRONIDAS, S.: *Naturwissenschaften* **67**, 353 (1980).
655. GÜBITZ, G.—JELLENZ, W.—SCHÖNLEBER, D.: *J. High Res. Chromatogr. Chrom. Commun.* **3**, 31 (1980).
656. DAVANKOV, V.A.—KURGANOV, A.A.—BOCHKOV, A.S.: in *Adv. in Chromatogr. Vol. 22*, eds. GIDDINGS, J.C.—GRUSHKA, E.—CAZES, J.—BROWN, P.R., Marcel Dekker, New York, p. 1 (1983).
657. ROGOZHIN, S.V.—DAVANKOV, V.A.: *Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.* **192**, 1288 (1970).
658. ROGOZHIN, S.V.—DAVANKOV, V.A.: *Chem. Commun.* 490 (1971).
659. KURGANOV, A.A.—ZUCHKOVA, L.Y.—DAVANKOV, V.A.: *Makromol. Chem.* **180**, 2101 (1979).
660. DAVANKOV, V.A.: in *Adv. in Chromatography Vol. 18.*, eds. GIDDINGS, J.C.—GRUSHKA, E.—BROWN, J.P.R., Marcel Dekker, New York, p. 139, 1980.
661. DAVANKOV, V.A.—BOCHKOV, A.S.—BELOV, Y.U.P.: *J. Chromatogr.* **218**, 547 (1981).
662. SUGDEN, K.—HUNTER, C.—LLOYD JONES, J.G.: *J. Chromatogr.* **192**, 228 (1980).
663. GÜBITZ, G.—JELLENZ, W.—LÖFLER, G.—SANTI, W.: *HRC and CC* **3**, 145 (1979).
664. FONCAULT, A.—CAUDO, M.—OLIVEROS, L.: *J. Chromatogr.* **185**, 345 (1979).
665. DAVANKOV, V.A.—SEMECHKIN, A.V.: *J. Chromatogr.* **141**, 313 (1977).
666. ANDEBERT, R.: *J. Liquid Chromatogr.* **2**, 1063 (1979).
667. KRULL, I.S.: in *Adv. in Chromatogr. Vol. 16*, eds. GIDDINGS, J.C.—GRUSHKA, E.—CAZES, J.—BROWN, J.P.R., Marcel Dekker, New York, p. 176 (1978).
668. GÜLITZ, G.—JELLENZ, W.—SANTI, W.: *J. Chromatogr.* **203**, 377 (1981).
669. HORA, S.—DOBASHI, A.: *J. Liquid Chromatogr.* **2**, 883 (1979).
670. HORA, S.—DOBASHI, A.: *J. Chromatogr.* **186**, 543 (1979).
671. DOBALSHI, A.—OKA, K.—HARA, S.: *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 2122 (1980).

672. DAVANKOV, V.A.—BOCHKOV, A.S.—KURGANOV, A.A.—RONMELIOTIS, P.—UNGER, K.K.: *Chromatographia* **13**, 677 (1980).
673. CANDE, M.H.—JARDY, A.P.—ROSSET, R.H.: in *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins*, ed. HANCOCK, W.S., CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. I. p. 411 (1984).
674. SUGDEN, K.: in *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins*, ed. HANCOCK, W.S., CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. I. p. 423 (1984).
675. HARE, P.E.—GIL AV, E.: *Science* **204**, 1226 (1979).
676. GILON, C.—LESHEM, R.—GRUSHKA, E.: *Anal. Chem.* **52**, 1206 (1980).
677. LINDNER, W.—LEPAGE, J.N.—DAVIES, G.—SEITZ, D.E.—KARGER, B.L.: *J. Chromatogr.* **185**, 323 (1980).
678. GIL AV, E.—TISHBEE, A.—HARE, P.E.: *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 5115 (1980).
679. WEINSTEIN, S.—ENGEL, M.H.—HARE, P.E.: *Anal. Biochem.* **121**, 370 (1982).
680. WEINSTEIN, S.: *Angew. Chem. Int. Ed. English* **21**, 218 (1982).
681. FEDERICI, F.—GIRELLI, A.M.—MESSINA, A.—NICOLETTI, I.—SIMIBALDI, M.: *Anal. Letters* **23**, 1565 (1990).
682. GIL AV, E.—WEINSTEIN, S.: in *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins*, ed. HANCOCK, W.S., CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. I. p. 429 (1984).
683. FURUKAWA, H.—SAKAHIBARA, E.—ITO, K.: *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 1625 (1975).
684. FURUKAWA, H.—MORI, Y.—TAKEUCKI, Y.—ITO, K.: *J. Chromatogr.* **136**, 428 (1977).
685. NAMBARA, T.—IKEGAWA, S.—HASEGAWA, M.—GOTO, J.: *Anal. Chim. Acta* **101**, 111 (1978).
686. GOTO, J.—HASEGAWA, M.—NAKAMURA, S.—SHIMODA, K.—NAMBARA, T.: *J. Chromatogr.* **152**, 413 (1978).
687. NIMURA, N.—OGURA, H.—KINOSHITA, T.: *J. Chromatogr.* **202**, 375 (1980).
688. NIMURA, N.—TOYAMA, A.—KINOSHITA, T.: *J. Chromatogr.* **316**, 347 (1984).
689. KINOSHITA, T.—KASAKARA, Y.—NIMURA, N.: *J. Chromatogr.* **210**, 77 (1981).
690. EINARSSON, S.—JOSEFSSON, B.—MÖLLER, P.—SANCHEZ, D.: *Anal. Chem.* **59**, 1191 (1987).
691. NISHI, H.—ISHII, K.—TAKU, K.—SHIMIZU, R.—TONMAGARI, N.: *Chromatographia* **27**, 301 (1989).
692. BUCK, R.H.—KRUMMEN, K.: *J. Chromatogr.* **315**, 279 (1984).

693. DUCHATEAU, A.—CHROMBACK, J.—KAMPHNIS, M.—BOESTEN, W.H.J.—SCHOEMAKER, H.E.—MEIJER, E.M.: *J. Chromatogr.* **471**, 263 (1989).
694. BRÜCKNER, H.—WITTNER, R.—GODEL, H.: *J. Chromatogr.* **476**, 73 (1989).
695. EINARSSON, S.—FOLESTAD, S.—JOSEFSSON, B.: *J. Liquid Chromatogr.* **10**, 1589 (1987).
696. JEGOROV, A.—TRISKA, J.—TRUKA, T.—CERNY, M.: *J. Chromatogr.* **434**, 417 (1988).
697. JEGOROV, A.—MATHA, V.—TRUKA, T.—CERNY, M.: *J. High Res. Chrom.* **13**, 718 (1990).
698. BRÜCKNER, H.—WITTNER, R.—GODEL, H.: *Chromatographia* **32**, 383 (1991).
699. MITCHELL, A.R.—KENT, S.B.H.—CHU, I.C.—MERRIFIELD, R.B.: *Anal. Chem.* **50**, 637 (1978).
700. TAKAYA, T.—KISHIDA, Y.—SAKAHIBARA, S.: *J. Chromatogr.* **215**, 279 (1981).
701. GEMOH, K.—SAWAMOTO, H.: *Anal. Chim. Acta* **243**, 251 (1991).
702. SPAHN, H.: *J. Chromatogr.* **427**, 131 (1988).
703. MARTIN, E.—QUINKE, K.—SPAHN, H.—MUTSCHLER, E.: *Chirality* **1**, 223 (1989).
704. SPAHN, H.—KRAUSS, D.—MUTSCHLER, E.: *Pharm. Res.* **5**, 107 (1988).
705. LANGGUTH, P.—SPAHN, H.—MERKLE, H.P.: *J. Chromatogr.* **528**, 55 (1990).
706. YAMADA, T.—DEJIMA, K.—SHIMAMURA, M.—MIYAZAWA, T.—KUWATA, S.: *Chem. Express* **4**, 725 (1989).
707. YAMADA, T.—SHIMAMURA, M.—MIYAZAWA, T.—KUWATA, S.: *Chem. Express* **4**, 729 (1989).
708. YAMADA, T.—NONOMURA, S.—FUJIWARA, H.—MIYAZAWA, T.—KUWATA, S.: *J. Chromatogr.* **515**, 475 (1990).
709. MARFEY, P.: *Carlsberg Res. Commun.* **49**, 591 (1984).
710. ABERHART, D.J.—COTTING, J.A.—LIU, H.J.: *Anal. Biochem.* **151**, 88 (1985).
711. KOCHBAR, S.—CHRISTEN, P.: *Anal. Biochem.* **178**, 17 (1989).
712. SZÓKÁN, GY.—MEZŐ, G.—HUDECZ, F.: *J. Chromatogr.* **444**, 115 (1988).
713. BRÜCKNER, H.—KELLER-HOEHL, C.: *Chromatographia* **30**, 621 (1990).
714. BRÜCKNER, H.—GAH, C.: *J. Chromatogr.* **555**, 81 (1991).
715. BRÜCKNER, H.—STECKER, B.: *Chromatographia* **33**, 586 (1992).
716. SZÓKÁN, GY.—MEZŐ, G.—HUDECZ, F.: in *Peptides*, eds. PENKE, B.—TÖRÖK, A., Walter de Gruyter, Berlin p. 83 (1988).

717. SZÓKÁN, GY.—MEZŐ, G.—HUDECZ, F.—MAJER, ZS.—SCHÓN, J.—NYÉKI, O.—SZIRTES, T.—DÖLLING, R.: *J. Liquid Chrom.* **12**, 2855 (1989).
718. SZÓKÁN, GY.—MEZŐ, G.—MAJER, ZS.—SCHÓN, I.—NYÉKI, O.—DÖLLING, R.: in *Peptides 1990*, eds. GIRALT, E.—ANDREU, D., ESCOM Sci. Publ. B.V., p. 339 (1991).
719. MEZŐ, G.—KAJTÁR, J.—SZÓKÁN, GY.—SÁRMAY, G.—GERGELY, J.—SZEKERKE, M.: in *Peptides 1990*, eds. GIRALT, E.—ANDREU, D., ESCOM Sci. Publ. B.V. p. 832 (1991).
720. MEZŐ, G.—HUDECZ, F.—KAJTÁR, J.—SZÓKÁN, GY.—SZEKERKE, M.: *Biopolymers* **28**, 1801 (1989).
721. SOMLAI, CS.—SZÓKÁN, GY.—BALÁSPIRI, L.: *Synthesis* (1991).
722. SZÓKÁN, GY.: még nem publikált adatok.
723. KEMP, D.S.: in *The Peptides*, Vol. I., eds. GROSS, E.—MEIENHOFER, J., Acad. Press, New York, p. 317 (1979).
724. MANNING, J.M.: *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 1449 (1979).
725. NEUBERGER, A.: *Adv. Protein Chem.* **4**, 339 (1948).
726. DUNLOP, D.S.—NEIDLE, A.: *Anal. Biochem.* **165**, 38 (1987).
727. DUNLOP, D.S.—NEIDLE, A.—MCHALE, D.—DUNLOP, D.M.—LAJTHA, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 27 (1986).
728. BENOITON, N.L.: in *The Peptides*. Vol. 5., eds. GROSS, E.—MEIENHOFER, J., Academic Press, New York, p. 217 (1983).
729. CHEN, S.T.—CHION, S.H.—CHU, Y.H.—WANG, K.T.: *Int. J. Pept. Protein Res.* **30**, 572 (1987).
730. SZÓKÁN, GY.—ALMÁS, M.: még nem publikált adatok, 1991.
731. BENNETT, H.P.J.—MCMARTIN, C.: *Pharmacol. Rev.* **30**, 247 (1979).
732. BENNETT, H.P.J.—HUDSON, A.M.—KELLY, L.—MCMARTIN, C.—PURDON, G.E.: *Biochem. J.* **175**, 1139 (1978).
733. BENNETT, H.P.J.—BROWNE, C.A.—SOLOMON, S.: *Biochemistry* **20**, 4530 (1980).
734. DUGGER, H.A.—ORNIG, B.A.: *Drug Metabolism Reviews* **10**, 247 (1979).
735. MCMARTIN, C.—PURDON, G.E.: *J. Endocrinol.* **77**, 67 (1978).
736. HUDSON, A.M.—MCMARTIN, C.: *J. Endocrinol.* **85**, 93 (1980).
737. PETERS, G.E.: *Regul. Peptides* **3**, 361 (1982).
738. BURBACH, J.P.H.—DE KLOET, E.R.—DE WEID, D.: *Brain Res.* **202**, 401 (1980).
739. HUDSON, A.M.—AMBLER, L.—BENNETT, H.P.J.—MCMARTIN, C.: *J. Endocrinol.* **81**, 129 (1979).
740. WILK, SH.—ORLOWSKI, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 1 (1979).
741. ARATAN, S.—CZERNICHOW, P.: *Comptes Rendus Series D*, **286**, 1375 (1978).
742. MORIER, E.: *Int. J. Biochem.* **10**, 769 (1979).

743. WILK, S.—BENUCK, M.—ORLOWSKI, M.—MARKS, N.: *Neurosci. Lett.* **14**, 275 (1979).
744. GUYON, A.—ROQUES, B.P.—GUYON, F.—FOUCAULT, A.—PERDRISOT, R.—SWERTS, J.P.—SCHWARTZ, J.C.: *Life Sci.* **25**, 1605 (1979).
745. MAURER, R.: *J. Biochem. Biophys. Methods* **2**, 183 (1980).
746. GUYON, F.—FOUCAULT, A.—CAUDE, M.: *J. Chromatogr.* **186**, 677 (1979).
747. WITTER, A.—SCHOLTENS, H.—VERHOEF, J.: *Neuroendocrinol.* **30**, 377 (1980).
748. DUGGER, H.A.—ORNIG, B.A.: *Drug Metabolism Reviews* **10**, 247 (1979).
749. ORLOWSKI, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 1145 (1980).
750. DESCHODT-LANCKMAN, M.: *Regul. Peptides* **2**, 15 (1981).
751. BRINGHURST, F.R.—SEGRE, G.V.—LAMPMAN, G.W.—POTTS, J.T., JR.: *Biochemistry* **21**, 4252 (1982).
752. VAN AMSTERDAM, J.G.C.—VAN BUUREN, K.J.H.—DIK, J.—WYNNE, H.J.: *J. Chromatogr.* **258**, 165 (1983).
753. BURBACH, J.P.H.: in *Neurobiology of Oxytocin. Current Topics in Neuroendocrinology*. Vol. 6., eds. GANTEN, D.—PFAFF, D., Springer Verlag, Berlin, p. 55 (1986).
754. DESCHODT, M.—BUI, N.D.—NOYER, M.—CHRISTOPHE, J.: *Regul. Peptides* **2**, 15 (1981).
755. BUCKLEY, D.I.—HOUGHTEN, R.A.—RAMACHANDRAN, J.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **17**, 508 (1981).
756. HORINCKI, M.—FUJIMURA, K.I.: *J. Chromatogr.* **233**, 123 (1982).
757. SOEDA, S.—ABE, K.—NAGAMATON, A.: *J. Liquid Chromatogr.* **4**, 713 (1981).
758. HANCOCK, W.S.—BISHOP, C.A.—PRESTIDGE, R.L.—HEARN, M.T.W.: *Anal. Biochem.* **89**, 203 (1978).
759. BISHOP, C.A.—HANCOCK, W.S.—BRENNAN, S.O.—CARRELL, R.W.—HEARN, M.T.W.: *J. Liquid Chrom.* **4**, 599 (1981).
760. HUBER, J.F.K.: Oral presentation on the 3rd International Conference on Biochemical Separations, Sopron, Hungary, 1991.
761. ISOBE, T.—TAKAYASHU, T.—TAKAI, N.—OKUYAMA, T.: *Anal. Biochem.* **122**, 417 (1982).
762. MATSUOKA, K.—TAOKA, M.—ISOBE, T.—OKUYAMA, T.—KATO, Y.: *J. Chromatogr.* **515**, 313 (1990).
763. DONG, M.W.—TRAN, V.D.: *J. Chromatogr.* **499**, 125 (1990).
764. YOUNG, P.M.—WHEAT, T.W.: *J. Chromatogr.* **512**, 273 (1990).
765. TAKAHASHI, N.—ISOBE, T.—KASAI, H.—SETA, K.—OKUYAMA, T.: *Anal. Biochem.* **115**, 181 (1981).
766. RUBINSTEIN, M.—CHEU-KIANG, S.—STEIN, S.—UDENFRIEND, S.: *Anal. Biochem.* **95**, 117 (1979).

767. ORAY, B.—JAHAMI, M.—GRACY, R.W.: *Anal. Biochem.* **125**, 131 (1982).
768. YUAN, P.M.—PANDE, H.—CLARK, B.R.—SHIVELY, J.E.: *Anal. Biochem.* **120**, 280 (1982).
769. WILSON, K.J.—HUGHES, G.J.: *Chimia* **35**, 327 (1981).
770. WILSON, K.J.—HONEGGER, A.—HUGHES, G.J.: *Biochem. J.* **199**, 43 (1981).
771. FULLMER, C.S.—WASSERMAN, R.H.: in *Methods in Protein Sequence Analysis Humana*, ed. ELZINGA, M., Press Clifton, New Jersey, p. 489 (1982).
772. ANDERSON, K.J.—MOLE, J.E.: *Anal. Biochem.* **123**, 413 (1982).
773. KRATZIN, H.—YANG, C.Y.—KRUSCHE, J.V.—HILSCHMANN, N.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **361**, 1591 (1980).
774. CHLOUPEK, R.C.—HARRIS, R.J.—LEONARD, C.K.—KECK, R.G.—KEYT, B.A.—SPELLMAN, M.W.—JONES, A.J.S.—HANCOCK, W.S.: *J. Chromatogr.* **463**, 375 (1989).
775. GUILLON, H.—MIRANDA, G.—PELISSIER, J.P.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **37**, 494 (1991).
776. HAWKE, D.—YUAN, P.M.—SHIVELY, J.E.: *Anal. Biochem.* **120**, 302 (1981).
777. HUNKAPILLER, M.W.—HOOD, L.E.: *Science* **207**, 523 (1980).
778. EDMAN, P.: *Acta Chem. Scand.* **4**, 283 (1950).
779. HUNKAPILLER, M.W.—HOOD, L.E.: *Biochemistry* **17**, 2124 (1978).
780. HUNKAPILLER, M.W.—HOOD, L.E.: *Science* **207**, 523 (1980).
781. SIMMONS, J.—SCHLESINGER, D.H.: *Anal. Biochem.* **104**, 254 (1980).
782. SCHLESINGER, D.H.: in *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, ed. HANCOCK, W.S., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, Vol. I. p. 367 (1984).
783. ELION, J.—DOWNING, M.—MANN, K.: *J. Chromatogr.* **155**, 436 (1978).
784. ZEEUWS, R.—STORSBERG, A.D.: *FEBS Lett.* **85**, 68 (1978).
785. MOSER, P.W.—RICKLI, E.E.: *J. Chromatogr.* **176**, 451 (1979).
786. ANNAN, W.D.: *J. Chromatogr.* **173**, 194 (1971).
787. ROSE, S.M.—SCHWARTZ, B.D.: *Anal. Biochem.* **107**, 206 (1980).
788. HARRIS, J.U.—ROBINSON, D.—JOHNSON, A.J.: *Anal. Biochem.* **105**, 239 (1989).
789. GREIBROKK, T.—JENSEN, E.—OSTVOLD, G.: *J. Liquid Chromatogr.* **3**, 1277 (1980).
790. FOHLMAN, J.—RASK, L.—PETERSON, P.A.: *Anal. Biochem.* **106**, 22 (1980).
791. DIMARI, S.J.—ROBINSON, J.P.—HASH, J.H.: *J. Chromatogr.* **213**, 91 (1981).
792. HANG, W.—LANGER, K.: *Chromatographia* **7**, 659 (1974).
793. SPATZ, R.—ROGGENDORF, E.: *Z. Anal. Chem.* **299**, 267 (1979).

794. ZIMMERMAN, C.L.—APELLA, E.—PISANO, J.J.: *Anal. Biochem.* **77**, 569 (1977).
795. ZIMMERMAN, C.L.—APELLA, E.—PISANO, J.J.: *Anal. Biochem.* **75**, 77 (1976).
796. BLEDSOE, M.—PISANO, J.J.: in *The Synthesis and Sequence of Peptides and Proteins*, eds. LINZ, D.—SCHFCKER, A., Elsevier, Amsterdam, p. 38 (1981).
797. MARGOLIES, M.N.—BRANER, A.: *J. Chromatogr.* **148**, 429 (1978).
798. SAMOCK, E.: *Anal. Biochem.* **104**, 464 (1980).
799. JOHNSON, N.D.—HUNKAPILLER, M.W.—HOOD, L.E.: *Anal. Biochem.* **100**, 335 (1979).
800. HENDERSON, L.E.—COPELAND, T.D.—OROSZLÁN, S.: *Anal. Biochem.* **102**, 1 (1980).
801. FRANK, G.—STRUBERT, W.: *Chromatographia* **6**, 522 (1973).
802. GRAFFEO, A.P.—HANG, A.—KARGER, B.L.: *Anal. Lett.* **6**, 505 (1973).
803. MATTHEWS, E.W.—BYFIELD, P.G.H.—MAC INTRYRE, I.: *J. Chromatogr.* **110**, 369 (1975).
804. BOLLET, C.—CAUDE, M.: *J. Chromatogr.* **121**, 323 (1976).
805. DE VRIES, J.X.—FRANK, R.—BIRR, C.: *FEBS Lett.* **55**, 65 (1975).
806. ABRAHAMSSON, M.—GRONINGSSON, K.—CASTENSSON, S.: *J. Chromatogr.* **154**, 313 (1978).
807. BHOWN, A.S.—MOLE, J.E.—WISSINGER, A.—BENNETT, J.C.: *J. Chromatogr.* **148**, 532 (1978).
808. YUAN, P.M.—PANDE, H.—CLARK, B.R.—SHIVELY, J.G.: *Anal. Biochem.* **120**, 289 (1982).
809. HAWKE, D.—YUAN, P.M.—SHIVELY, J.E.: *Anal. Biochem.* **120**, 302 (1982).
810. SHIVELY, J.E.—HAWKE, D.—JONES, B.N.: *Anal. Biochem.* **120**, 312 (1982).
811. DAVIES, J.S.—MOHAMMED, A.K.—HAKEEM, E.: in *Peptides 1982, Proceedings of the 17th European Peptide Symposium*, eds. BLAHA, K.—MALON, P., Walter de Gruyter, Berlin, p. 431 (1983).
812. GAERTNER, H.—PUIGSERVER, A.: *J. Chromatogr.* **350**, 279 (1985).
813. LOEBER, J.G.—VERHOEF, J.—BURBACH, J.P.H.—WITTER, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**, 1288 (1979).
814. LEWIS, R.V.—SKIN, S.—UDENFRIEND, S.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **13**, 493 (1979).
815. MORRIS, H.R.—ETIENNE, A.T.—DELL, A.—ALBUQUERQUE, R.: *J. Neurochem.* **34**, 574 (1980).
816. GAY, D.D.—LAHTI, R.A.: *Int. J. Peptide Prot. Res.* **18**, 107 (1981).
817. SCHOEMAKER, H.—DAVIS, T.P.—PEDIGO, N.W.—CHEN, A.—BERENS, E.S.—RAGAN, P.—LING, N.C.—YAMAMURA, H.J.: *Eur. J. Pharmacol.* **81**, 459 (1982).
818. YAMASHIRO, D.—LI, C.H.: *J. Chromatogr.* **215**, 255 (1981).

819. LEWIS, R.V.—STEIN, S.—UDENFRIEND, S.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **13**, 493 (1979).
820. JANSSEN, P.S.L.—VAN NISPEN, J.W.—HAMELINCK, R.L.A.E.—MELGERS, P.A.T.A.—GOVERDE, B.S.: *J. Chromatogr. Sci.* **22**, 234 (1984).
821. WELINDER, B.S.—SÖRENSEN, H.H.—HANSEN, B.: *J. Chromatogr.* **361**, 357 (1986).
822. RIVIER, J.—MCCLINTOCK, R.: *J. Chromatogr.* **268**, 112 (1983).
823. FRANSSON, B.—RAGNARSSON, V.—ZETTERQUIST, Ö.: *J. Chromatogr.* **240**, 165 (1982).
824. FRANSSON, B.—RAGNARSSON, V.: in *Peptides 1982*, eds. BLAHA, K.—MALON, P., Walter de Gruyter, Berlin, p. 415 (1983).
825. RAGNARSSON, V.—FRANSSON, B.—ZETTERQUIST, Ö.: in *Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins*, ed. HANCOCK, W.S., CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. II. p. 75 (1984).
826. NYASSE, B.—FRANSSON, B.—RAGNARSSON, V.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **36**, 316 (1990).
827. CALDERAN, A.—RUZZA, P.—MARIN, O.—SECCHIERI, M.—BORIN, G.—MARCHIORI, F.: *J. Chromatogr.* **548**, 329 (1991).
828. SZÓKÁN, GY.—BOTYÁNSZKI, J.—SÜLI-VARGHA, H.: még nem publikált adatok.
829. ÖTVÖS, L., JR.—TANGOREN, I.A.—WROBLEWSKI, K.—HOLLÓSI, M.—LEE, V.M.Y.: *J. Chromatogr.* **512**, 265 (1990).
830. SZÓKÁN, GY.—PERCZEL, A.—ALMÁS, M.—HOLLÓSI, M.: *Proceedings of the 11th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides*, Washington, p. 804 (1991).
831. TOMORI, É.—HORVÁTH, GY.—SÁNDOR, P.—KOLTAI, E.: *Chromatographia* **27**, 228 (1989).
832. TOMORI, É.—SZÉLL, E.—BARABÁS, É.: *Chromatographia* **19**, 437 (1984).
833. GESQUIERE, J.C.—DIESIS, E.—CUNG, M.T.—TARTAR, A.: *J. Chromatogr.* **478**, 121 (1989).
834. HENDERSON, D.E.—MELLO, J.A.: *J. Chromatogr.* **499**, 79 (1990).
835. LEBL, M.—FANG, S.—HRUBY, V.J.: *J. Chromatogr.* **586**, 145 (1991).
836. BENEDEK, K.—DONG, S.—KARGER, B.L.: *J. Chromatogr.* **317**, 227 (1984).
837. COHEN, S.A.—BENEDEK, K.P.—DONG, S.—TAPUHI, Y.—KARGER, B.L.: *Anal. Chem.* **56**, 217 (1984).
838. COHEN, K.A.—SCHELLENBERG, K.—BENEDEK, K.—KARGER, B.L.—GREGO, B.—HEARN, M.T.W.: *Anal. Biochem.* **140**, 223 (1984).
839. SCHWARTZ, H.—BROWNLEE, R.G.: *Am. Lab.* **16**, 43 (1984).
840. SCHWARTZ, H.—BERRY, V.V.: *LC* **3**, 110 (1985).
841. GREGO, B.—VAN DRIEL, I.R.—STEARNE, P.A.—GODING, J.W.—NICE, E.C.—SIMPSON, R.J.: *Eur. J. Biochem.* **148**, 485 (1985).

842. WILSON, K.J.—HONG, A.L.—BRASSEUR, M.M.—YUAN, P.M.: *Biochromatography* **1**, 106 (1986).
843. NICE, E.C.—GREGO, B.—SIMPSON, R.J.: *Biochem. Int.* **11**, 187 (1985).
844. NICE, E.C.—LLOYD, C.J.—BURGESS, A.W.: *J. Chromatogr.* **296**, 143 (1984).
845. WILSON, K.J.—HONG, A.L.—BRASSEUR, M.M.—YUAN, P.M.: *Biochromatography* **1**, 106 (1986).
846. NUGENT, K.D.—NUGENT, P.W.: *Biochromatography* **5**, 142 (1990).
847. SIMPSON, R.J.—MORITZ, R.L.—BEGG, G.S.—RUBIRA, M.R.—NICE, E.C.: *Anal. Biochem.* **177**, 221 (1989).
848. CHERVET, J.P.—MEIJVOGEL, C.J.—URSEM, M.—SALZMANN, J.P.: *LC-GC Intl.* **4**, 32 (1986).
849. SCHWARTZ, H.—BERRY, V.V.: *LC-GC* **3**, 110 (1985).
850. NICE, E.C.—GREGO, B.—SIMPSON, R.J.: *Biochem. Intl.* **11**, 187 (1985).
851. KRSTULOVIC, A.M.—BROWN, P.R.: *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, New York (1982).
852. LEBL, M.: in *CRC Handbook of HPLC for Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins*. ed. HANCOCK, W.S., Vol. II., CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 173 (1984).
853. SZEPESEY, L.—HORVÁTH, Cs.: *Chromatographia* **26**, 13 (1988).
854. HANSON, M.—UNGER, K.K.—SCHMID, J.—ALBERT, K.—BAYER, E.: *Anal. Chem.* **65**, 2249 (1993).
855. ANDREWS, P.C.: *Peptide Research* **1**, 93 (1988).
856. SEREDA, T.J.—MANT, C.T.—QUINN, A.M.—HODGES, R.S.: *J. Chromatogr.* **646**, 17 (1993).
857. HANCOCK, W.S.—HARDING, D.R.K.: in *CRC Handbook of HPLC for Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins*. ed. HANCOCK, W.S., Vol. I., CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 189 (1984).
858. YEO, P.L.—RABENSTEIN, D.L.: *Anal. Chem.* **65**, 3061 (1993).
859. FELDHOFF, R.: in *Techniques in Protein Chemistry II.*, ed. VILLAFRANCA, J.J., Acad. Press, Inc., New York, p. 55, (1991).
860. BAJUSZ, S.—SZÉLL, E.—BAGDY, D.—BARABÁS, É.—HORVÁTH, GY.—DIÓSZEGI, M.—FITTLER, ZS.—SZABÓ, G.—JUHÁSZ, A.—TOMORI, É.—SZILÁGYI, G.: *J. Med. Chem.* **33**, 1729 (1990).
861. TOMORI, É.: *Chromatographia* **36**, 105 (1993).

Alapvető könyvek, kézikönyvek peptidek HPLC-jéhez:

1. HANCOCK, W.S.: CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vols. I, II. CRC Press, Boca Raton, FL, 1984.
2. BLACKBURN, S.: CRC Handbook of Chromatography Peptides Vol. I, II. CRC Pres Inc., Boca Raton, FL, 1986.
3. HODGES, R.S.—MANT, C.T.: High-Performance Liquid Chromatography of peptides and proteins: separation, analysis and conformation. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1991.
4. HANCOCK, W.S.—SPARROW, J.T.: HPLC Analysis of Biological Compounds. Chrom. Sci. Series Vol. 26., Marcel Dekker Inc., 1984.
5. KRSTULOVIC, A.M.—BROWN, P.R.: Reserved Phase High Performance Liquid Chromatography – Theory, Practice and Biomedical Applications, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1982.
6. GIDDINGS, J.C.—GRUSHKA, E.—CAZES, J.—BRAWN, P.R. eds.: Advances in Chromatography. Vol. 18, 19, 20, Marcel Dekker, New York.
7. HORVÁTH, CS. ed.: High Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives. Vol. 1, 2, 3. Marcel Dekker, New York.
8. LOTTSPEICH, F.—HENSCHEN, A.—HUPE, K.P. eds.: High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry, Walter de Gruyter, Berlin, 1981.
9. HEARN, M.T.W.—REGNIER, F.E.—WEHR, C.T. eds.: High Performance in Liquid Chromatography of Proteins and Peptides, Acad. Press, New York, 1983.
10. HEARN, M.T.W.—HANCOCK, W.S. et al.: HPLC of Peptides and Proteins, I-CXII. J. Chromatogr. (1976-1991).
11. GOODING, K.M.—REGNIER, F.E.: HPLC of Biological Macromolecules: Methods and Applications, Marcel Dekker, New York (1990).
12. HENSCHEN, A.—HUPE, K.P.—LOTTSPEICH, F.—VOELTER, W.: High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry, VCH GmbH, Weinheim (FRG), 1985.

Ára: 504,- Ft 12% áfával

A KÉMIA ÚJABB EREDMÉNYEI

79. KÖTET

SZERKESZTI
CSÁKVÁRI BÉLA

Szókán Gyula és Janáky Tamás : Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) a peptidkémiai c. monográfiája a könyvsorozatban megjelent peptidkémiai tárgyú munkák spektrumát szélesíti. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia nagyszámú és egyre bővülő területek, modellek körében nyert alkalmazást. A peptidkémiai kutatások hazai színvonala és várható további fejlődése, azok interdiszciplinális jellege (kémia, biológia, orvostudományok, agrárkutatás) indokolja a speciális témaválasztást, mely széles körű olvasótábor érdeklődésére számíthat.

ISBN 963 05 6927 2



9 789630 569279

A kért információ újabb eredményei

