



УДК 541.183; 543.544.5.068.7

Применение молекулярно-статистических расчётов термодинамических характеристик адсорбции пептидов для предсказания их характеристик удерживания на углеродном сорбенте Гиперкарб в варианте ОФ ВЭЖХ

Милюшкин А.Л., Буряк А.К.

ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фrumкина РАН, Москва

Поступила в редакцию 12.05.2015 г.

Молекулярно-статистическим методом определены термодинамические характеристики адсорбции пептидов на поверхности графитированной термической сажи и проведено их сравнение с величинами удерживания, определёнными экспериментально методом жидкостной хроматографии на углеродном сорбенте Гиперкарб.

Ключевые слова: пептиды, Гиперкарб, высокоэффективная жидкостная хроматография, молекулярно-статистический метод.

The use of molecular-statistical calculations of thermodynamic characteristics of adsorption of peptides for prediction of their retention properties on carbon sorbent Hypercarb in a variant of RP HPLC

Milyushkin A.L., Buryak A.K.

A.N.Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

The purpose of this work is to study the influence of physico-chemical properties of peptides on their adsorption on the porous graphitic carbon Hypercarb. The molecular statistical method of identify thermodynamic characteristics for prediction of retention properties of the peptides obtained from experimental data is considered. The molecular statistical calculations of the thermodynamic characteristics of adsorption of peptides on the surface graphitized thermal carbon black was carried out. Retention characteristics of peptides on the porous graphitic carbon Hypercarb is determined in a variant of reversed-phase high-performance liquid chromatography. It shown that satisfactory correlation between experimental and calculated values for peptides with similar structure is observed. It shown that the characteristics of retention of peptides can be predicted on the basis of their thermodynamic characteristics of adsorption on the graphitized thermal carbon black calculated by molecular statistical method.

Keywords: peptides, Hypercarb, HPLC, molecular-statistical method

Введение

Хроматографическое разделение аминокислот, пептидов и белков методом ВЭЖХ с использованием пористого графитированного углерода Гиперкарб широко

используется в настоящее время благодаря уникальным свойствам этого сорбента. Материал представляет собой пористые сферические углеродные частицы, состоящие из плоских слоев гексагонально выстроенных атомов углерода. Гиперкарб обладает отличными от силикагельных и полимерных фаз характеристиками удерживания и селективности [1], что затрудняет идентификацию, основанную на известных закономерностях удерживания.

Важным методом оценки хроматографического поведения веществ является молекулярно-статистический расчёт термодинамических характеристик адсорбции (ТХА). Метод позволяет определять константы равновесия, теплоты и энтропии адсорбции для молекул разных классов на поверхности модельного сорбента – графитированной термической сажи (ГТС) в широком интервале температур [2, 3]. Выбор ГТС в качестве модельного сорбента обоснован такими преимуществами, как химическая и геометрическая однородность поверхности. Физико-химическое состояние поверхности ГТС и пористого графитированного углерода Гиперкарб в значительной степени идентичны [4], поэтому рассчитанные ТХА могут быть использованы для прогнозирования закономерностей удерживания при проведении хроматографирования на углеродном сорбенте Гиперкарб.

Данная работа посвящена оценке возможности применения молекулярно-статистического расчёта для предсказания характеристик удерживания пептидов на сорбенте Гиперкарб.

В качестве объекта исследования выбраны пептиды, применяемые или имеющие перспективы применения в медицинских целях, в частности, для лечения желудочно-кишечного тракта [5], проявляющие анксиолитическую активность [6], а также модельные соединения, используемые для исследования влияния их физико-химических характеристик на хроматографическое поведение [7].

Эксперимент

Эксперименты проводились на жидкостном хроматографе Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, США) с градиентным насосом Quaternary Pump 1200, диодно-матричным детектором и программным обеспечением для обработки хроматографических данных ChemStationRus версия А. 10.02 (Agilent Technologies, США). Хроматографическое разделение проводилось на колонке Hypercarb 100x2.1 мм, 5 мкм, 250 Å (ThermoScientific, США). Использовался линейный градиент от 5 до 100% ацетонитрила с трифторуксусной кислотой с содержанием 0.001% длительностью 10 мин. Скорость подвижной фазы 0.5 мл/мин. В работе исследовались следующие пептиды: Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂, Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, Boc-Val-Val-Val-Val-CH₃, Boc-Val-Val-Val-CH₃, Boc-Val-Val-CH₃, Boc-Val-Ala-Ala-CH₃, Boc-Val-Ala-CH₃, Boc-Ala-Ala-Ala-CH₃, Boc-Ala-Ala-CH₃, где Boc – трет-бутилоксикарбонил. Детектирование проводили с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн от 190 до 950 нм. Пептиды растворяли в дистиллированной воде, полученной с помощью установки для очистки воды Subboiling Apparatus for the Production of Ultra Pure Acids (BERGHOF, Германия).

Для характеристики удерживания исследованных пептидов использовали величину фактора удерживания k , который рассчитывали по формуле:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0},$$

где t_R – время удерживания исследуемого вещества, t_0 – мёртвое время. Мёртвое время определяли по времени удерживания нитрита калия. Различия в термодинамических величинах удерживания исследуемых веществ оценивали по разности их дифференциальных мольных энергий адсорбции Гиббса по формуле:

$$\delta(\Delta G) = -RT \ln \frac{k_i}{k_{st}},$$

где k_i и k_{st} – факторы удерживания исследуемого вещества и стандарта [8].

Для расчёта характеристик адсорбции проведено определение геометрии молекул и её оптимизация с использованием программ «Chem & Bio 3D 12.0» и «HyperChem 8.0».

Обсуждение результатов

Молекулярно-статистический расчет констант Генри и теплот адсорбции проводился, опираясь на полуэмпирическую молекулярно-статистическую теорию адсорбции, разработанную А.В. Киселевым и Д.П. Пошкусом [2]. Согласно этому методу проводят расчеты константы Генри (K_1) для адсорбции квазижестких молекул. Равновесное расстояние r_0 обычно оценивают, используя кристаллохимические данные или данные по взаимодействию атомов молекул адсорбата с ГТС [8]. Используемые в расчетах значения атомных поляризуемостей (α , м³) атома N в аминогруппе, атома O в карбоксильной группе и атома S в тиолах, рассчитанные на основании экспериментальных данных по молекулярной рефракции молекул первичных аминов, карбоновых кислот и тиолов, соответственно, взяты из [9]. Величины диамагнитных восприимчивостей (χ , м³) атомов N, O и S взяты из [10]. Значения величин равновесного расстояния (r_0) для пар взаимодействующих атомов N(NH₂ группа)...C(ГТС), C...C(ГТС), O(СООН группа)...C(ГТС), O(ОН группа)...C(ГТС), S(SH группа)...C(ГТС), рассчитанные в соответствии с учётом сумм ван-дер-ваальсовых радиусов атомов, получены в работах [2, 11, 12, 13]. В таблице 1 представлены данные, использованные при расчёте параметров ААП.

Таблица 1. Значения поляризуемости, диамагнитной восприимчивости и равновесных расстояний, использованных при расчёте параметров ААП исследованных молекул

Атом	$\alpha \cdot 10^{30}$, м ³	$\chi \cdot 10^{36}$, м ³	r_0 , нм
N (NH ₂ группа)	1.765	-9.25	0.370
C	0.937	-10.54	0.380
O (СООН группа)	0.726	-5.58	0.326
O (ОН группа)	0.658	-7.66	0.382
S (SH группа)	3.487	-24.91	0.370

Известные к настоящему моменту и используемые в данной работе ААП (С₆, С₈ и В), рассчитываемые, как описано в [2], приведены в таблице 2. Использование этих ААП позволяет получить удовлетворительное согласие экспериментов и расчётов в тех случаях, когда взаимное влияние атомов адсорбированной молекулы невелико.

Таблица 2. Значения параметров ААП для различных атомов.

Элемент	Параметры ААП		
	С6	С8	В
Углерод (sp^3)	-1.5750	-0.14530	8491.000
Углерод (sp^2)	-1.6853	0.15547	9085.370
Кислород	-1.7519	-0.17223	5086.273
Сера	-3.8672	-0.45069	26759.806
Азот	-1.6318	-0.26445	6194.358

Используя программу «Grafc», основанную на алгоритме расчёта, приведённого в [2], для исследованных пептидов рассчитаны термодинамические характеристики адсорбции в температурном интервале 300-400 К. Известно, что для молекул, имеющих степени свободы внутреннего вращения, ТХА определяются потенциальной энергией взаимодействия молекул с адсорбентом и потенциальной функцией внутреннего вращения.

Для исследования влияния структуры молекул на адсорбционные особенности пептидов нами проведено варьирование геометрической структуры. Рассмотрены различные геометрические структуры, начиная от линейной молекулы, в предположении, что отсутствуют взаимодействия между отдельными фрагментами молекулы, и для сложных конформаций, учитывающих эти взаимодействия. Был произведен расчёт оптимальной геометрии молекул пептидов различными методами: метод молекулярной механики (программа «Chem & Bio 3D 12.0»), метод молекулярной механики (программа «HyperChem 8.0»), неэмпирический метод (программа «HyperChem 8.0»). Также рассмотрены конформации молекул, в дальнейшем именуемые «модельные формы», со стандартными значениями геометрии, то есть с величинами длин связей и углов между атомами, основанными на их типе атомов. В данном расчёте со стандартными величинами не учитываются другие силы и взаимодействия между атомами (программы «Chem & Bio 3D 12.0» и «HyperChem 8.0»). Для молекул с модельной формой программы «Chem & Bio 3D 12.0» на рисунке 1 представлена зависимость логарифма константы Генри адсорбции пептидов от обратной температуры.

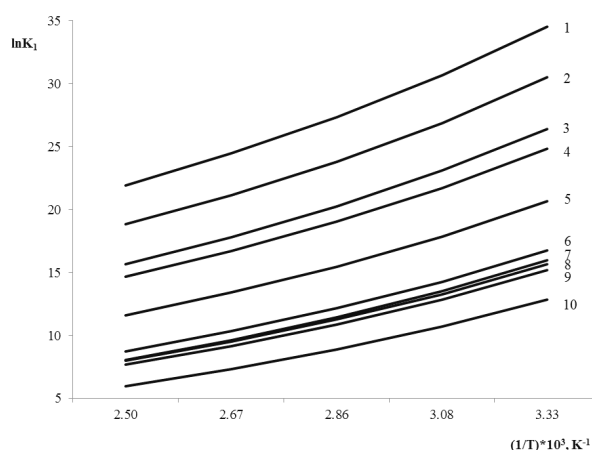


Рис. 1. Зависимость логарифма константы Генри адсорбции пептидов* от обратной температуры

Рассчитаны теплоты адсорбции и изменение энтропии при адсорбции для разных температур. Различия в интервале 300-400 К для теплоты адсорбции были не

более 2.0 кДж/моль и для изменения энтропии не более 8.2 Дж/(моль*К) в случае Boc-Ala-Ala-CH₃. Можно утверждать, что изменение температуры не оказывает значительного влияния на адсорбцию молекул, но может влиять на изменение их конформации, поэтому в таблице 3 представлены значения при температуре 300 К.

Таблица 3. Рассчитанные значения ТХА для исследованных молекул при температуре 300 К

Соединение	Q, кДж/моль	-ΔS, Дж/(моль*К)
1. Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	129	66
2. Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg	120	69
3. Trp-Leu-Asp-Phe-NH ₂	110	70
4. Boc-Val-Val-Val-CH ₃	104	65
5. Boc-Val-Val-Val-Val-CH ₃	94	64
6. Boc-Val-Val-CH ₃	84	63
7. Boc-Val-Ala-CH ₃	82	65
8. Boc-Val-Ala-Ala-CH ₃	79	58
9. Boc-Ala-Ala-Ala-CH ₃	78	59
10. Boc-Ala-Ala-CH ₃	72	58

Для сравнения с расчётными данными методом ВЭЖХ в обращённо-фазовом варианте проведено исследование удерживания пептидов на углеродном сорбенте Гиперкарб. В работе [14] предполагается, что удерживание на пористом графитированном углероде определяется сочетанием двух факторов: дисперсионными и электростатическими взаимодействиями между сорбатом – подвижной фазой и сорбатом – поверхностью сорбента, обусловленными, в частности, индуцированными зарядом взаимодействиями полярного вещества с поляризуемой поверхностью сорбента. Таким образом, энергия взаимодействия сорбата с сорбентом зависит от размера его молекулы при контакте с поверхностью пористого графитированного углерода и также от типа и расположения функциональных групп по отношению к поверхности сорбента. Предполагается, что плоские молекулы подходят к поверхности пористого графитированного углерода на наименьшие расстояния, сильнее взаимодействуют и дольше удерживаются, тогда как у неплоских молекул уменьшается взаимодействие с поверхностью сорбента и уменьшается удерживание из-за большего расстояния их фрагментов от поверхности. Считается, что поляризуемость поверхности Гиперкарба играет важную роль в механизме удерживания полярных соединений [15]. Одна из особенностей Гиперкарба состоит в том, что на этом сорбенте сильно удерживаются полярные соединения. По этой причине пористый графитированный углерод можно применять для разделения низкомолекулярных полярных соединений, которые не удерживаются на силикагелевых колонках C18 без дериватизации [16].

На рисунке 2 приведены хроматограммы всех 10 пептидов в градиентном режиме (начальная концентрация ацетонитрила – 5%) при длине волны 210 нм. В качестве добавки к подвижной фазе использовали ТФУ в концентрации 0.001%.

На основании хроматограмм по времени удерживания веществ рассчитаны коэффициенты удерживания. Для изучения механизмов сорбции на основании значений коэффициентов удерживания оценены разности дифференциальных молярных энергий Гиббса при T=298 К. В качестве стандарта принято не удерживаемое соединение KNO₂. Результаты представлены в таблице 4. Здесь же приведены значения молярной массы M, дипольного момента D, энергии гидратации

ΔH_{hydr} и фактора липофильности LogP, рассчитанные с помощью программ «Chem & Bio 3D 12.0» и «HyperChem 8.0». Результаты, приведенные в таблице 4, графически представлены на рисунках 3 и 4.

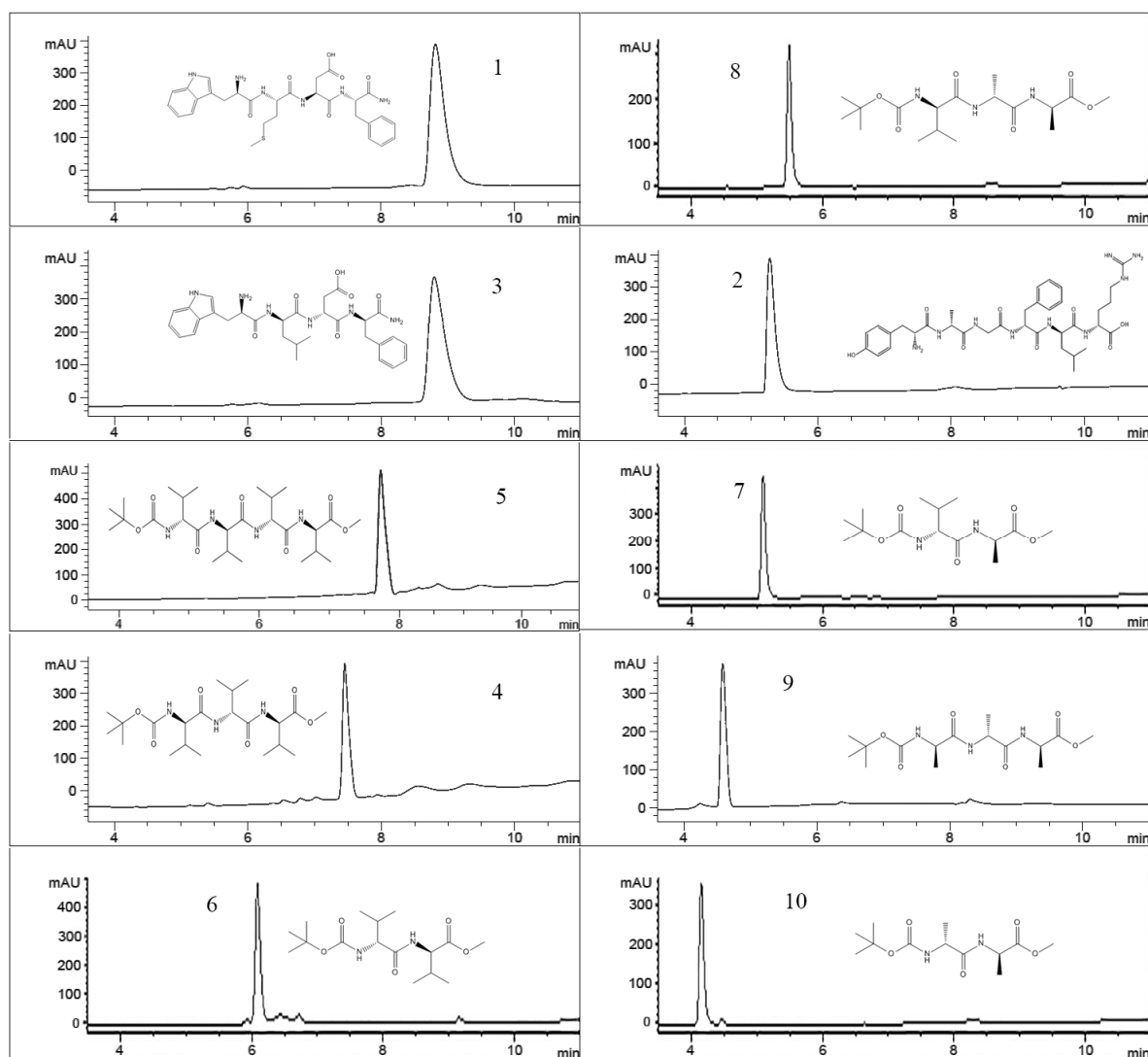


Рис. 2. Хроматограммы исследованных пептидов* при градиентном элюировании, начиная с 5% ацетонитрила, с 0.001% ТФУ

На рисунках 3 и 4 выпадающие точки не учтены в уравнениях зависимостей. Как видно из таблицы и графика, простые зависимости, которые могут быть использованы для молекул в газовой фазе, в случае крупных молекул в жидкости не приводят к удовлетворительным результатам и ограниченно применимы, так как существенное влияние вносит взаимодействие с компонентами подвижной фазы.

В варианте адсорбционной жидкостной хроматографии наибольшее влияние на процесс распределения вещества между растворителем и сорбентом оказывает геометрическая структура молекулы и ее взаимодействие с растворителем. При взаимодействии с растворителем большую роль играет возможность образования водородных и донорно-акцепторных связей. Известные теории, предсказывающие величины адсорбции для варианта адсорбционной хроматографии и сорбентов типа C18, предполагают аддитивные схемы взаимодействия адсорбата и сорбента, учитывающие целый ряд поправочных коэффициентов, связанных с положением

аминокислотного остатка в цепи (равномерностью распределения (кластеризация) относительно гидрофобных аминокислот вдоль пептидной цепи), концевыми группами, длиной пептида, его изоэлектрической точкой и склонностью к образованию альфа-спиралей [17]. Все эти теории разработаны для силикагелей с привитыми углеводородными группами.

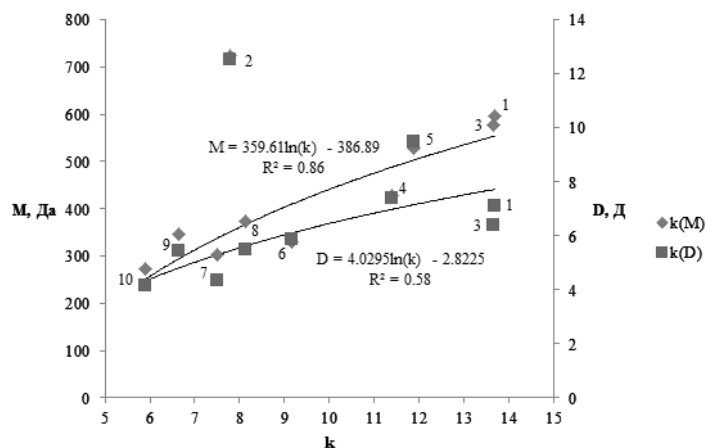


Рис. 3. Зависимость фактора удерживания k пептидов на колонке с сорбентом Гиперкарб от физико-химических характеристик пептидов: молярной массы (M , Да) и дипольного момента (D , Д)

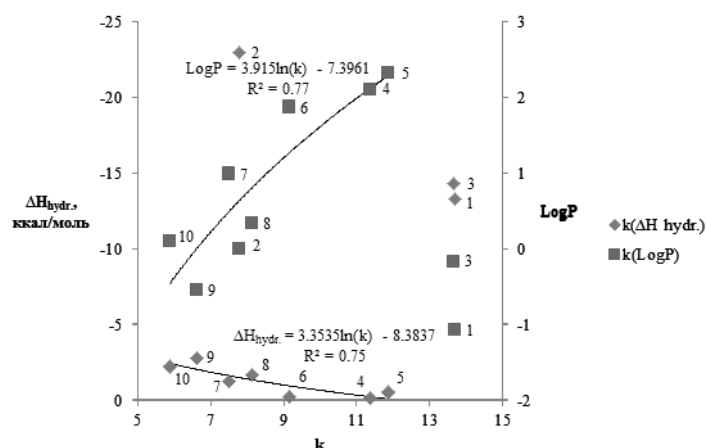


Рис. 4. Зависимость фактора удерживания k пептидов на колонке с сорбентом Гиперкарб от физико-химических характеристик пептидов: энергии гидратации ($\Delta H_{hydr.}$, ккал/моль) и фактора липофильности ($LogP$).

Представляет интерес сопоставить экспериментальные результаты, полученные методом ОФ ВЭЖХ, и рассчитанные молекулярно-статистическим методом термодинамические характеристики адсорбции для исследованных пептидов на ГТС. Лучшая корреляция показана на основе модельной геометрии молекул программы «Chem & Bio 3D 12.0». Данная корреляционная зависимость изображена на рис. 5.

Пептид Тур-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg находится вне удовлетворительной зависимости. Данный пептид, имея в составе аминокислотный остаток аргинина (Arg), содержащий гуанидиновую группу, является сильным основанием, способен образовывать множественные водородные связи, что существенно повышает

растворимость и, соответственно, снижает адсорбцию, вследствие чего он выпадает из следующей зависимости.

Таблица 4. Характеристики удерживания пептидов на поверхности сорбента Гиперкарб в сопоставлении с их физико-химическими характеристиками: молярной массой (M, Да), дипольным моментом (D, Д), энергией гидратации ($\Delta H_{\text{hydr.}}$, ккал/моль) и фактором липофильности (LogP). В качестве стандарта выбрана молекула KNO_2 .

Сорбат*	k (эксп.)	$\delta(\Delta G)$, кДж/моль	M, Да	D, Д	$\Delta H_{\text{hydr.}}$, ккал/моль	LogP
1	13.7	-7.8	596	7.1	-13.3	-1.1
2	7.8	-6.4	725	12.5	-23.0	0
3	13.6	-7.7	578	6.4	-14.3	-0.2
4	11.4	-7.3	429	7.4	-0.1	2.1
5	11.9	-7.4	528	9.5	-0.5	2.3
6	9.2	-6.7	330	5.9	-0.2	1.9
7	7.5	-6.3	302	4.3	-1.2	1.0
8	8.1	-6.5	373	5.5	-1.7	0.3
9	6.6	-5.9	345	5.5	-2.8	-0.6
10	5.9	-5.7	274	4.2	-2.2	0.1

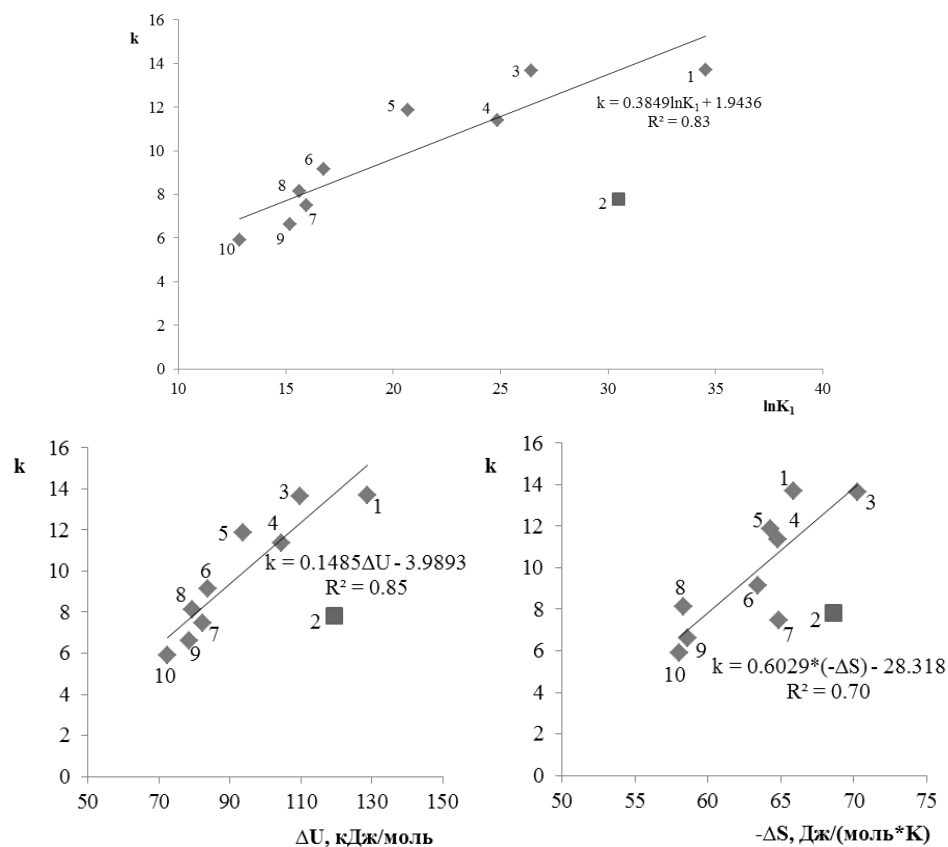


Рис. 5. Корреляционная зависимость экспериментально полученного фактора удерживания от рассчитанных константы Генри, теплоты адсорбции и энтропии.

Геометрия молекул* – модельная форма (программа «Chem & Bio 3D 12.0»).

* 1. Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, 2. Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, 3. Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂, 4. Boc-Val-Val-Val-CH₃, 5. Boc-Val-Val-Val-Val-CH₃, 6. Boc-Val-Val-CH₃, 7. Boc-Val-Ala-CH₃, 8. Boc-Val-Ala-Ala-CH₃, 9. Boc-Ala-Ala-Ala-CH₃, 10. Boc-Ala-Ala-CH₃.

Таблица 5. Величины достоверности аппроксимации зависимостей $k(\ln K_1)$ и $k(\Delta U)$ в сопоставлении с методом оптимизации геометрии молекул пептидов

Метод оптимизации	Уравнение прямой	Величина достоверности аппроксимации R^2	
		$k(\ln K_1)$	$k(\Delta U)$
Модельная форма (Chem & Bio 3D 12.0)	$k = 0.3849 \ln K_1 + 1.9436$ $k = 0.1485 \Delta U - 3.9893$	0.83	0.85
Молекулярная механика (Chem & Bio 3D 12.0)	$k = 0.3111 \ln K_1 + 3.7316$ $k = 0.1123 \Delta U - 0.3346$	0.66	0.62
Модельная форма (HyperChem 8.0)	$k = 0.1965 \ln K_1 + 5.3356$ $k = 0.0768 \Delta U + 2.2075$	0.11	0.11
Молекулярная механика (HyperChem 8.0)	$k = 0.3412 \ln K_1 + 1.8992$ $k = 0.1285 \Delta U - 2.9465$	0.62	0.57
Неэмпирический метод (HyperChem 8.0)	$k = 0.4899 \ln K_1 - 0.205$ $k = 0.1726 \Delta U - 6.1752$	0.38	0.36

Используемый молекулярно-статистический расчёт не основан на атомно-атомном приближении и не учитывает образования водородных связей, поэтому отклонение пептидов, содержащих функциональные группы, от линейных зависимостей вполне объяснимо.

Как видно из рисунка наблюдается удовлетворительная корреляция между экспериментальными и расчётными значениями для пептидов с близкой структурой.

Заключение

Молекулярно-статистическим методом, основанным на полуэмпирической молекулярно-статистической теории адсорбции, рассчитаны термодинамические характеристики адсорбции для ряда пептидов на графитированной термической саже. Экспериментально, методом обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, определены характеристики удерживания на углеродном сорбенте Гиперкарб. Показано, что геометрическая структура молекул вносит существенный вклад в термодинамические характеристики адсорбции. Сопоставлены величины удерживания с физико-химическими характеристиками пептидов. Выявлено, что корреляция экспериментальных и расчётных значений наблюдается для пептидов с близкой структурой. Показано, что характеристики удерживания пептидов на углеродном сорбенте Гиперкарб, определённые экспериментальным хроматографическим методом, могут быть предсказаны на основе термодинамических характеристик адсорбции этих веществ на графитированной термической саже, рассчитанных молекулярно-статистическим методом, для различных групп пептидов.

Список литературы

1. Csiktusnadi-Kiss G.A., Sagi G., Tegyei Z. // *Chemia-Analytica*. 1999. Vol. 44 (5). pp. 795-804.
2. Авгуль Н.Н., Киселев А.В., Пошкус Д.П. Адсорбция газов и паров на однородных поверхностях. М.: Химия. 1975. 384 с.
3. Buryak A.K. // *Russ Chem Rev*. 2002. Vol. 71(8). pp. 695-706.

4. Anderson David J. // *Anal. Chem.* 1995. Vol. 67 (12). pp. 475-486.
5. Титов М.И., Виноградов В.А., Беспалова Ж.А. // *Бюл. ВКНЦ АМН РАМН.* 1985. № 2. С. 72-76.
6. Proskuryakova T.V., Bepalova Zh.D., Pal'keeva M.E. et al. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2005. Vol. 31. No 2. pp. 119-127.
7. Dacheng Guo, Colin T. Mant, Ashok K. Taneja et al. // *Journal of Chromatography A.* 1986. Vol. 359. pp. 499-518.
8. Буряк А.К., Гарькин В.П., Редькин Н.А., Сердюк Т.М., Ульянов А.В. Молекулярно-статистические расчеты термодинамических характеристик адсорбции изомеров: учебное пособие. – Самара: «Универс групп». 2008. – 142 с.
9. Иоффе Б.В. Рефрактометрические методы химии. Л.: Химия. 1974. С. 400.
10. Краткий справочник физико-химических величин / Под ред. Равделя А.А., Пономаревой А.М. С.-П.: Специальная литература. 1999. 232с.
11. Яшкин С.Н., Григорьева О.Б., Буряк А.К. // *Изв. АН. Сер. хим.* 2001. № 6. С. 938-943.
12. Zefirov Yu.V., Zorkii P.M. // *Russ Chem Rev.* 1995. Vol. 64(5). pp. 415-428.
13. Kiselev A.V., Poshkus D.P., Grumadas A.J. // *J.G.S. Faraday Trans. 1.* 1979. Vol. 75. No 6. pp. 1281-1287.
14. Ross P. and Knox J.H. // *In Advances in Chromatography.* Vol. 37. Marcel Dekker, Inc., New York. 1997. pp. 120.
15. Echols K.R., Gale R.W., Feltz K. et al. // *J. of Chromatography A.* 1998. Vol. 811 (1-2). pp. 135-144.
16. Chaimbault P., Petritis K., Elfakir C, Dreux M. // *Journal of Chromatography A.* 2000. Vol. 870. Issues 1-2. pp. 245-254.
17. Krokhin O.V., Ying S., Craig R., Spicer V., Ens W., Standing K. G., Beavis R.C., Wilkins J.A. New sequence-specific correction factors for prediction of peptide retention in RP-HPLC: application to protein identification by off-line HPLC-MALDI-MS 52th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville. 2004. – PZ 503.

References

1. Csiktusnadi-Kiss G.A., Sagi G., Tegyei Z., *Chemia-Analytica*, 1999, Vol. 44 (5), pp. 795-804.
2. Avgul' N.N., Kiselev A.V., Poshkus D.P. Adsorbtsiya gazov i parov na odnorodnykh poverkhnostyakh (Adsorption of gases and vapors on homogeneous surfaces), М., Khimiya, 1975, pp. 384.
3. Buryak A.K., *Russ Chem Rev*, 2002, Vol. 71(8), pp. 695-706.
4. Anderson David J., *Anal. Chem.*, 1995, Vol. 67 (12), pp. 475-486.
5. Titov M.I., Vinogradov V.A., Bepalova Zh.A., *Byul. VKNTs AMN RAMN*, 1985, No 2, pp. 72-76.
6. Proskuryakova T.V., Bepalova Zh.D., Pal'keeva M.E. et al., *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, Vol. 31, No 2, pp. 119-127.
7. Dacheng Guo, Colin T. Mant, Ashok K. Taneja et al., *Journal of Chromatography A*, 1986, Vol. 359, pp. 499-518.
8. Buryak A.K., Gar'kin V.P., Red'kin N.A., Serdyuk T.M., Ul'yanov A.V. Molekulyarno-statisticheskie raschety termodinamicheskikh kharakteristik adsorbtsii izomerov: uchebnoe posobie (Molecular and statistical calculations of thermodynamic characteristics of adsorption of isomers: study book), Samara, Univers grupp, 2008, pp. 142.
9. IoFFE B.V. Refraktometricheskie metody khimii (refractometric methods of chemistry), L., Khimiya, 1974, P. 400.
10. Kratkii spravochnik fiziko-khimicheskikh velichin (Short reference book of physical and chemical values), Pod red. Ravdelya A.A., Ponomarevoi A.M. S.-P., Spetsial'naya literatura, 1999, pp. 232.
11. Yashkin S.N., Grigor'eva O.B., Buryak A.K., *Izv. AN. Ser. khim.*, 2001, No 6, pp. 938-943.
12. Zefirov Yu.V., Zorkii P.M., *Russ Chem Rev*, 1995, Vol. 64(5), pp. 415-428.
13. Kiselev A.V., Poshkus D.P., Grumadas A.J., *J.G.S. Faraday Trans. 1*, 1979, Vol. 75, No 6, pp 1281-1287.
14. Ross P. and Knox J.H., *In Advances in Chromatography*, Vol. 37, Marcel Dekker, Inc., New York. 1997. pp. 120.
15. Echols K.R., Gale R.W., Feltz K., et al., *J. of Chromatography A*, 1998, Vol. 811 (1-2), pp. 135-144.

16. Chaimbault P., Petritis K., Elfakir C, Dreux M., *Journal of Chromatography A*, 2000, Vol. 870, Issues 1-2, pp. 245-254.

17. Krokhin O.V., Ying S., Craig R., Spicer V., Ens W., Standing K. G., Beavis R.C., Wilkins J.A. New sequence-specific correction

factors for prediction of peptide retention in RP-HPLC: application to protein identification by off-line HPLC-MALDI-MS 52th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville. 2004. – PZ 503.

Милюшкин Алексей Леонидович – инженер-исследователь, Учреждение Российской Академии Наук Институт физической химии и электрохимии имени А.Н.Фrumкина РАН, Москва

Буряк Алексей Константинович – д.х.н., заведующий лабораторией физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии, Учреждение Российской Академии Наук Институт физической химии и электрохимии имени А.Н.Фrumкина РАН, Москва

Milyushkin Aleksey L. - Research engineer, A.N.Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Buryak Aleksey K. - Doctor of chemical science, Head of laboratory of physical-chemical basis of chromatography and chromate-mass-spectrometry, A.N.Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow