

Наиболее часто хроматографическое разделение пептидных фрагментов, полученных в результате гидролиза осуществляется на колонках, заполненных сорбентами на основе гидрофобных силикагелей с привитыми группами C18, C8, C4 или иными сорбентами, с размером частиц от 3 нм до 10 мкм или 1,7-2,5 мкм (при использовании ультраэффективной жидкостной хроматографии) и размером пор от 130 до 300 Å.

Подвижная фаза. Подвижную фазу выбирают исходя из свойств испытуемого образца, типа сорбента колонки и метода детектирования. Наиболее часто в качестве подвижной фазы используются вода и ацетонитрил в качестве органического модификатора с добавлением 0,1 % кислоты трифторуксусной. При необходимости, для повышения растворимости компонентов смеси, могут прибавляться 1-пропанол, 2-пропанол или другие модификаторы. Прибавление спиртов не должно приводить к чрезмерному повышению вязкости компонентов.

Подвижная фаза, содержащая фосфатный буфер, может быть использована в случаях, когда необходимо увеличить разделяющую способность системы, поскольку изменение pH в интервале от 3,0 до 5,0 улучшает разделение пептидов, содержащих кислотные остатки (например, глутаминовая и аспарагиновая кислоты). Натрия или калия фосфаты, ацетат аммония, фосфорная кислота при значении pH между 2 и 7 (или выше при использовании полимерного наполнителя) используются с ацетонитрильным градиентом.

Растворители.

В качестве растворителей используются различные буферные растворы.

Способ элюирования.

В большинстве случаев применяется градиентное элюирование, поскольку позволяет достичь эффективного и быстрого разделения пептидных фрагментов, представляющих собой сложные смеси различного состава обладающих различными свойствами