

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра фундаментальной медицины и биологии

Отчётная работа

По результатам выполнения индивидуальных заданий

профильной учебной практики

«Профильная учебная практика по биохимии»

на тему:

«Хроматографические методы анализа белков: ион-обменная хроматография,
гель-фильтрация, аффинная хроматография. Использование в
биомедицинских исследованиях».

С.И.
Степанов. И.И.
24.07.2019

Выполнили: студентки

3 курса 302 группы

МБФ «Биология»

Лебедева Ж.И., Смирнова А.О.

Проверил: доцент кафедры

фундаментальной медицины и биологии

Морковин Е.И.

Волгоград 2019

Содержание

История метода.....	2
Классификация хроматографических методов.....	3
Абсорбционная хроматография.....	6
Жидкостная хроматография.....	8
Ионообменная хроматография.....	13
Гель-фильтрация.....	15
Аффинная хроматография.....	16
Использование в биомедицинских исследованиях.....	17
Литература.....	20

История метода.

Хроматографический метод анализа был впервые применён русским учёным-ботаником Михаилом Семеновичем Цветом в 1900 году. Он использовал колонку, заполненную карбонатом кальция для разделения пигментов растительного происхождения. Первое сообщение о разработке метода хроматографии было сделано Цветом 30 декабря 1901 года на XI Съезде естествоиспытателей и врачей в С.-Петербурге. Первая печатная работа по хроматографии была опубликована в 1903 году, в журнале Труды Варшавского общества естествоиспытателей. Впервые термин хроматография появился в двух печатных работах Цвета в 1906 году, опубликованных в немецком журнале *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. В 1907 году Цвет демонстрирует Немецкому Ботаническому обществу образец хроматографа — прибора для осуществления процесса хроматографии. В 1910-1930 годы метод был незаслуженно забыт и практически не развивался. В 1952 году Дж. Мартину и Р. Синджу была присуждена Нобелевская премия по химии за создание метода распределительной хроматографии.

Актуальность нашей работы в том, что хроматография является одним из наиболее широко применяемых методов анализа, за счёт ряда преимуществ перед другими методами:

1. Разделение носит динамический характер, причем акты сорбции-десорбции разделяемых компонентов повторяются многократно. Этим обусловлена значительно большая эффективность хроматографического разделения по сравнению со статическими методами сорбции и экстракции.
2. При разделении используют различные типы взаимодействия сорбатов и неподвижной фазы: от чисто физических до хемосорбционных. Это обуславливает возможность селективного разделения широкого круга веществ.
3. На разделяемые вещества можно накладывать различные дополнительные поля (гравитационное, электрическое, магнитное и др.), которые, изменяя условия разделения, расширяют возможности хроматографии.
4. Хроматография – гибридный метод, сочетающий одновременное разделение и определения нескольких компонентов.

5. Хроматография позволяет решать как аналитические задачи (разделение, идентификация, определение), так и препаративные (очистка, выделение, концентрирование). Решение этих задач можно сочетать, выполняя их в режиме “on line”.

Целью нашей работы является сбор и анализ информации по хроматографическим методам анализа белков, в частности ион-обменной хроматографии, гель-фильтрации, аффинной хроматографии и использованию этих методов в биомедицинских исследованиях.

Хроматография – это метод разделения и определения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами – подвижной и неподвижной. Неподвижной (стационарной) фазой служит твердое пористое вещество (часто его называют сорбентом) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу, иногда под давлением. Компоненты анализируемой смеси (сорбаты) вместе с подвижной фазой передвигаются вдоль стационарной фазы. Ее обычно помещают в стеклянную или металлическую трубку, называемую колонкой. В зависимости от силы взаимодействия с поверхностью сорбента (за счет адсорбции или по какому-либо другому механизму) компоненты будут перемещаться вдоль колонки с разной скоростью. Одни компоненты останутся в верхнем слое сорбента, другие, в меньшей степени взаимодействующие с сорбентом, окажутся в нижней части колонки, а некоторые и вовсе покинут колонку вместе с подвижной фазой (такие компоненты называются неудерживаемыми, а время их удерживания определяет “мертвое время” колонки). Таким образом происходит быстрое разделение сложных смесей компонентов.

Классификация видов хроматографии

Существуют различные способы классификации хроматографических методов.

- По физической природе неподвижной и подвижной фаз.

Жидкостная хроматография (если подвижная фаза жидкая).

Жидкостную хроматографию, в свою очередь, можно разделить в зависимости от агрегатного состояния неподвижной фазы на *твёрдо-жидкофазную (ТЖХ)* —

неподвижная фаза твёрдая и жидко-жидкофазную хроматографию (ЖЖХ) — неподвижная фаза жидкая. ЖЖХ часто называют распределительной хроматографией.

Газовая хроматография (если подвижная фаза газообразная).

Газовую хроматографию в зависимости от агрегатного состояния неподвижной фазы делят на *газоадсорбционную* (ГТХ, ГАХ) и *газожидкостную* (ГЖХ) или *газораспределительную*.

- В зависимости от способа перемещения сорбатов вдоль слоя сорбента.

Проявительный (элюентный) — при его использовании пробу исследуемой смеси вводят порцией в начальной точке (на входе в колонку) в разделительную насадку (сорбент). Под действием потока подвижной фазы зона пробы перемещается вдоль колонки, причём скорости перемещения отдельных компонентов пробы обратно пропорциональны величинам соответствующих им констант распределения.

Фронтальный — при этом разделяемая смесь непрерывно поступает на слой сорбента в начальной точке и, таким образом, фактически играет роль подвижной фазы.

Вытеснительный — методика проведения разделения вытеснительным методом аналогична методике проведения разделения проявительным методом, но без использования несорбирующегося элюента (подвижной фазы). Перемещение хроматографических зон достигается путём вытеснения компонентов разделяемой смеси веществом, которое сорбирует сильнее любого из этих компонентов. Каждый компонент этой пробы вытесняет компоненты, которые взаимодействуют с неподвижной фазой менее сильно, чем он сам.

Электрохроматография — хроматографический процесс, при котором движение заряженных частиц осуществляется под действием приложенного электрического поля. Скорость движения частиц определяется их массой и зарядом.

Для аналитических целей наиболее широко используется элюентный (проявительный) метод хроматографирования.

- В зависимости от природы процесса, обуславливающего распределение сорбатов между подвижной и неподвижной фазами.

Адсорбционная хроматография — разделение за счёт адсорбции основано на различии адсорбируемости компонентов смеси на данном адсорбенте.

Распределительная хроматография — разделение основано на различии в растворимости сорбатов в подвижной и неподвижной фазах или на различии в стабильности образующихся комплексов.

Ионообменная хроматография — разделение основано на различии констант ионообменного равновесия.

Осадочная хроматография — разделение основано на различной растворимости осадков в подвижной фазе.

Аффинная хроматография — основана на биоспецифическом взаимодействии компонентов с аффинным лигандом;

Эксклюзионная хроматография — разделение основано на различии и проницаемости молекул разделяемых веществ в неподвижную фазу. Компоненты элюируются в порядке уменьшения их молекулярной массы.

- В зависимости от механизма сорбции.

Хроматография подразделяется на *молекулярную, ситовую, хемосорбционную и ионообменную*. В молекулярной хроматографии природой сил взаимодействия между неподвижной фазой (сорбентом) и компонентами разделяемой смеси являются межмолекулярные силы типа сил Ван-дер-Ваальса.

К *хемосорбционной* хроматографии относят осадочную, комплексообразовательную (или лигандообменную), окислительно-восстановительную. Причиной сорбции в хемосорбционной хроматографии являются соответствующие химические реакции.

- По технике выполнения (характеру процесса).

Разделяют хроматографию на:

колоночную (неподвижная фаза находится в колонке);

плоскостную (планарную) — бумажную и тонкослойную (неподвижная фаза — лист бумаги или тонкий слой сорбента на стеклянной или металлической пластинке);

капиллярную (разделение происходит в плёнке жидкости или слое сорбента, размещённом на внутренней стенке трубки);

хроматографию в полях (электрических, магнитных, центробежных и других сил).

• В зависимости от цели проведения хроматографического процесса.

Различают *аналитическую, неаналитическую, препаративную и промышленную хроматографию*. Аналитическая хроматография предназначена для определения качественного и количественного состава исследуемой смеси.

Адсорбционная хроматография основана на различии сорбируемости разделяемых веществ адсорбентом (твёрдое тело с развитой поверхностью); **распределительная хроматография** - на разной растворимости компонентов смеси в неподвижной фазе (высококипящая жидкость, нанесённая на твёрдый макropористый носитель) и элюенте; **ионообменная хроматография** - на различии констант ионообменного равновесия между неподвижной фазой (ионитом) и компонентами разделяемой смеси; **эксклюзионная (молекулярно-ситовая) хроматография** - на разной проницаемости молекул компонентов в неподвижную фазу (высокопористый неионогенный гель). **Осадочная хроматография** основана на различной способности разделяемых компонентов выпадать в осадок на твёрдой неподвижной фазе.

В соответствии с агрегатным состоянием элюента различают:

- газовую хроматографию ГХ (GC)

- жидкостную хроматографию ВЭЖХ (HPLC).

Распределительная хроматография: на бумаге, в тонком слое, газожидкостная и ионообменная

Распределительная хроматография осуществляется на колонках (газожидкостная и колоночная хроматография) либо на специальной хроматографической бумаге (распределительная хроматография на бумаге).

Хроматографическая бумага обладает свойством задерживать воду между волокнами. Эту воду можно рассматривать как один из растворителей (неподвижная фаза). Если бумагу поместить в слой неводного растворителя, то под воздействием капиллярных сил неводный растворитель (подвижная фаза) будет перемещаться и молекулы анализируемого вещества, предварительно нанесенного на хроматографическую бумагу, будут распределяться между фазами в соответствии с их коэффициентом распределения R_f . Каждое вещество характеризуется своей величиной R_f .

В идеальном случае R_f определяется только природой вещества, параметрами бумаги и свойствами растворителей и не зависит от концентрации вещества и присутствия других компонентов.

По технике выполнения различают следующие виды хроматографии на бумаге: одномерную, двухмерную и круговую.

Первые два вида могут быть получены в восходящем и нисходящем потоке растворителей. Однако двумерная хроматография открывает более широкие возможности в разделении сложных смесей, чем одномерная.

К хроматографической бумаге и растворителям предъявляются определенные требования: бумага должна быть однородной по плотности, химически чистой и инертной по отношению к разделяемым компонентам и подвижному растворителю; объемные соотношения растворителей приведены в таблице 2.

При использовании *тонкослойной хроматографии* (ТСХ) сорбент распределяют тонким слоем (0,25-5,00 мм) на стеклянные или металлические пластинки. Пробу в виде пятна наносят при помощи микропипетки на расстоянии примерно 2,5 см от нижнего края пластинки. Разделение проводят в стеклянной камере, на дно которой налит растворитель слоем 2 см. Пластинку оставляют в камере на определенное время для уравнивания в закрытом состоянии.

Газовая хроматография — физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов анализируемой смеси между двумя несмешивающимися и движущимися относительно друг друга фазами, где в качестве подвижной фазы выступает газ (газ-носитель), а в качестве неподвижной

фазы - твердый сорбент или жидкость, нанесенная на инертный твердый носитель или внутренние стенки колонки.

В зависимости от типа используемой неподвижной фазы газовую хроматографию подразделяют на газоадсорбционную (в зарубежной научной литературе ее принято обозначать как газотвердофазная) и газожидкостную хроматографию. В первом случае неподвижной фазой является твердый носитель (силикагель, уголь, оксид алюминия), во втором — жидкость, нанесенная на поверхность инертного носителя.

Газо-жидкостная хроматография — разделение газовой смеси вследствие различной растворимости компонентов пробы в жидкости или различной стабильности образующихся комплексов. Неподвижной фазой служит жидкость, нанесенная на инертный носитель, подвижной — газ.

Разделение основано на различиях в летучести и растворимости (или адсорбируемости) компонентов разделяемой смеси.

Этот метод можно использовать для анализа газообразных, жидких и твердых веществ с молекулярной массой меньше 400, которые должны удовлетворять определенным требованиям, главные из которых — летучесть, термостабильность, инертность, лёгкость получения. Этим требованиям в полной мере удовлетворяют, как правило, органические вещества, поэтому газовую хроматографию широко используют как серийный метод анализа органических соединений.

Жидкостная хроматография, вид хроматографии, в которой подвижной фазой (элюентом) служит жидкость. Неподвижной фазой м. б. твердый сорбент, твердый носитель с нанесенной на его поверхность жидкостью или гель. Различают колоночную жидкостную хроматографию, в которой через колонку, заполненную неподвижной фазой, пропускают порцию разделяемой смеси в-в в потоке элюента (под давлением или под действием силы тяжести), и тонкослойную жидкостную хроматографию (см. Тонкослойная хроматография), в которой элюент перемещается под действием капиллярных сил по плоскому слою сорбента, нанесенного на стеклянную пластинку или металлич. фольгу, вдоль пористой полимерной пленки, по поверхности цилиндрич. кварцевой или

керамич. палочки, по полоске хроматографич. бумаги (см. Хроматография на бумаге). Разработан также метод тонкослойной жидкостной хроматографии под давлением (элюент прокачивают через слой сорбента, зажатого между пластинами). Жидкостная хроматография применяется как аналитическая и препаративная (см. Хроматография препаративная). В высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) используют колонки диаметром до 5 мм, плотно упакованные сорбентом с частицами малого размера (3-10 мкм); давление для прокачивания элюента до $3 \cdot 10^7$ Па (ее называют также хроматографией высокого давления). Варианты ВЭЖХ - микроколоночная хроматография на наполненных колонках малого диаметра и капиллярная хроматография на полых и наполненных сорбентом капиллярных колонках. К жидкостной хроматографии обычно относят также гидродинамич. хроматографию, где неподвижная фаза отсутствует. В этом случае используют тот факт, что скорость потока элюента максимальна в центре полого капилляра и минимальна у его стенок, а разделяемые компоненты распределяются между движущимися с разной скоростью слоями элюента в соответствии со своими размерами или под влиянием наложенного в поперечном направлении внеш. силового поля (центробежного, электрического, магнитного).

Основные виды

По механизму удерживания разделяемых в-в неподвижной фазой жидкостная хроматография делится на осадочную хроматографию, адсорбционную, распределительную, ионообменную хроматографию (в т. ч. ионную хроматографию), ион-парную, лигандообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию (ситовую) и аффинную хроматографию (биоспецифическую). Осадочная жидкостная хроматография основана на разл. р-рности осадков, образующихся при взаимодействии компонентов анализируемой смеси с реагентом-осадителем. Преимущества метода в том, что получающиеся вдоль сорбента зоны имеют резкие границы, содержат осадки только одного в-ва и часто разделены зонами

чистого сорбента. Метод пока не нашел широкого распространения. Адсорбционная жидкостная хроматография в зависимости от относит. полярности сорбента и элюента подразделяется на нормально-фазную и обращенно-фазную. В первом случае адсорбция в-в происходит на полярном сорбенте [напр., силикагеле, содержащем гидроксильные (силанольные) группы] из неполярного элюента благодаря донорно-акцепторному взаимодей. или образованию водородных связей. Во втором - на поверхности гидрофобизир. сорбента из полярного элюента благодаря дисперсионному (гидрофобному) взаимодей. разделяемых молекул с пов-стью (образование водородной связи возможно в подвижной фазе с молекулами элюента, к-рый, как правило, содержит воду). В распределительной жидкостной хроматографии разделение основано на распределении в-в между двумя жидкими фазами: неподвижной, нанесенной на пов-сть носителя, и подвижной элюентом. В зависимости от полярности жидких фаз возможны нормально-фазный и обращенно-фазный варианты. В первом случае на пов-сть или в поры пористого носителя наносится полярная жидкость, не смешивающаяся с неполярным элюентом, во втором - используется неполярная неподвижная фаза и полярный элюент. К распределительной жидкостной хроматографии относится и экстракционная жидкостная хроматография, в к-рой неподвижной фазой служит орг. экстрагент, нанесенный на твердый носитель, а подвижной - водный р-р разделяемых соединений. В качестве экстрагентов используют диалкилфосфорные и алкилсульфоновые к-ты, фенолы (кислотные экстрагенты), триалкилфосфаты, фосфиноксиды и др. (нейтральные экстрагенты), амины, четвертичные аммониевые основания, а также серосодержащие фосфорорг. соед., хелатообразующие реагенты и др. Применяется для разделения и концентрирования неорг. соед., напр., ионовщелочных металлов, актиноидов, РЗЭ и др. близких по св-вам элементов, в процессах переработки отработанного ядерного горючего. В ионообменной жидкостной хроматографии разделение основано на разл. способности разделяемых ионов к р-ции ионного обмена с фиксир. ионами сорбента,

образующимися в результате диссоциации ионогенных групп последнего. В зависимости от знака заряда фиксир. ионов различают катиониты (закреплен анион) и аниониты (закреплен катион) (см. Иониты). Разделение ионов регулируют подбором оптимальных значений pH элюента и его ионной силы. Вариант ионообменной жидкостной хроматографии - ионная хроматография, в которой разделенные анионы (катионы) детектируют в виде к-т (соответственно оснований) высокочувствительным кондуктометрическим детектором, а высокоэффективные колонки наполнены поверхностно-активным ионитом с небольшой емкостью. Ион-парную жидкостную хроматографию можно рассматривать как комбинацию адсорбционной и ионообменной; в качестве неподвижной фазы используют гидрофобизированный адсорбент, а подвижной - водно-органический элюент с добавлением поверхностно-активных ионогенных соединений (ион-парных реагентов), например, додецилсульфата Na или триметилцетиламмоний бромид. Разделение основано на удерживании ион-парного реагента на гидрофобной поверхности адсорбента с образованием ионита, который и проводит разделение ионогенных соединений. Возможно также образование ионных пар разделяемых ионов с ион-парным реагентом, которые затем удерживаются на гидрофобизированной поверхности адсорбента. Лигандообменная жидкостная хроматография основана на различной способности разделяемых соединений образовывать комплексы с катионами переходных металлов - Cu(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Co(II) и др. - и фиксированными группами (лигандами) неподвижной фазы. Часть координационной сферы ионов металла занята молекулами воды или другими слабыми лигандами, которые могут вытесняться молекулами разделяемых соединений. Наиболее эффективна для разделения оптических изомеров. Аффинная жидкостная хроматография основана на образовании прочной связи со специфическими группами неподвижной фазы (лигандами, аффинантами). Взаимодействие лигандов с разделяемыми веществами основано на биологической функции последних. Так, при разделении ферментов лигандами служат их субстраты, ингибиторы или коферменты, токсинов - рецепторы, белков - антитела

ла и т. д. Особенно эффективна в биотехнологии и биомедицине для выделения ферментов, белков, гормонов. В эксклюзионной (ситовой, гель-проникающей, гель-фильтрационной) жидкостной хроматографии разделение основано на различиях в размерах молекул; молекулы малых размеров проникают в сравнительно тонкие поры сорбента и задерживаются в них, крупные молекулы либо не проникают в поры, либо проникают лишь в широкие поры и проходят колонку с незначит. удерживанием. Пов-сть сорбента и состав элюента подбирают так, чтобы исключить или уменьшить энергию адсорбц. взаимодействия (однако иногда при разделении олигомеров удобнее использовать адсорбц. механизм). Применяют для разделения олигомеров и полимеров (в т. ч. биологических).

Различают колоночную и плоскостную хроматографию. В колоночной сорбентом заполняют специальные трубки - колонки, а подвижная фаза движется внутри колонки благодаря перепаду давления. Разновидность колоночной хроматографии - капиллярная, когда тонкий слой сорбента наносится на внутренние стенки капиллярной трубки. Плоскостная хроматография подразделяется на тонкослойную и бумажную. В тонкослойной хроматографии тонкий слой гранулированного сорбента или пористая плёнка наносится на стеклянную или металлическую пластинки; в случае бумажной хроматографии используют специальную хроматографическую бумагу. Тонкослойная (ТСХ) и бумажная хроматография используются для анализа жиров, углеводов, белков и др. природных веществ и неорганических соединений.

Ряд видов хроматографии осуществляется с помощью приборов, называемых **хроматографами**, в большинстве из которых реализуется проявительный вариант хроматографии. Хроматографы используют для анализа и для препаративного (в т. ч. промышленного) разделения смесей веществ. При анализе разделённые в хроматографической колонке вещества вместе с элюентом попадают в установленное на выходе из колонки специальное устройство – детектор, регистрирующее их концентрации во времени.

Полученную в результате этого выходную кривую называют хроматограммой. Для качественного хроматографического анализа определяют время от момента ввода пробы до выхода каждого компонента из колонки при данной температуре и при использовании определённого элюента. Для количественного анализа определяют высоты или площади хроматографических пиков с учётом коэффициентов чувствительности используемого детектирующего устройства к анализируемым веществам.

Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография – метод разделения и анализа веществ, основанный на эквивалентном обмене ионов анализируемой смеси и ионообменника (ионита). Происходит обмен ионами между фазами гетерогенной системы. Неподвижной фазой являются иониты; подвижной, как правило, вода, т.к. этот элюент обладает хорошими растворяющими и ионизирующими свойствами. Соотношение концентраций обменивающихся ионов в растворе и в фазе сорбента (ионита) определяется ионообменным равновесием.

Иониты – полимеры природного и синтетического, органического и минерального происхождения, содержащие ионогенные группы. Иониты имеют разветвленную матричную структуру, в состав которой входят фиксированные ионы. В зависимости от заряда иона матрица имеет положительный или отрицательный заряд, который компенсируется подвижными противоионами.

Наличие в матрице фиксированных ионов (гидрофильных групп) определяет основное физическое свойство ионитов – способность матрицы к набуханию. При этом смола превращается в полиэлектролит, объем ионообменника увеличивается в несколько раз.

В соответствии со свойствами и природой иониты классифицируются на следующие группы.

Катиониты – в состав матрицы входят фиксированные ионогенные группы кислотного характера: $-\text{SO}_3^-$; $-\text{PO}_3^{2-}$; $-\text{COO}^-$ и другие; противоионы – H^+ ; Na^+ ; K^+ и другие. Например, катионит КУ-2 – это сульфированный сополимер стирола и дивинилбензола RSO_3H в Н-форме, где R – матрица полимера.

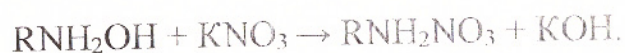
На катионите протекают гетерогенные реакции катионного обмена:



Элюат (раствор, выходящий из колонки) – раствор кислоты.

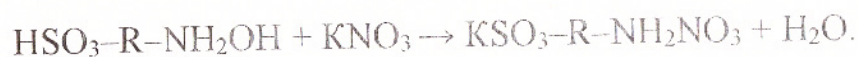
Аниониты – в составе матрицы находятся фиксированные аммонийные основания: $-\text{NH}_3^+$; $=\text{NH}_2^+$; $\equiv\text{NH}^+$ и другие; противоионы – OH^- ; Cl^- и другие. Например, анионит АН-1 имеет формулу RNH_2OH в OH -форме.

На анионите протекают реакции обмена анионами:



Элюат – раствор щелочи.

Амфолиты – содержат одновременно группы кислотного и основного характера. На этих смолах протекают реакции обмена катионами и анионами:



Элюатом является элюент (вода).

Перед анализом ионит переводят в активную (рабочую) форму: катионит в H -форму, анионит в OH -форму. Для этого через колонку пропускают раствор кислоты или щелочи соответственно. После каждого анализа ионообменную смолу регенерируют, восстанавливая ее активную форму. Для регенерации ионообменников проводят обратную ионообменную реакцию, пропуская через катионит раствор кислоты, через анионит – раствор щелочи. Таким образом, ионообменные смолы служат много циклов.

После ионообменной реакции элюат анализируют титриметрическими, электрохимическими, спектральными и другими методами.

Способность ионитов к ионному обмену количественно определяется обменной емкостью. *Полная динамическая обменная емкость* – количество моль-эквивалентов иона, поглощаемого 1 г сухого ионита (весовая емкость, моль-экв/г) или 1 cm^3 набухшей смолы (объемная емкость, моль-экв/ cm^3).

Применение в анализе ионообменников позволяет проводить разделение и селективное определение ионов в смеси. Хроматографическое разделение ионов основано на их различной сорбционной способности по отношению к иониту. Экспериментально установлены ряды сродства ионов к ионообменникам. Для

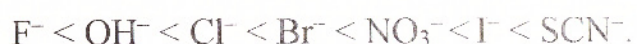
ионов с различными зарядами сорбционная способность возрастает с повышением заряда:



Ионы с одинаковым зарядом на сильнокислотных катионитах сорбируются в определенной последовательности:



Ряды селективности установлены и для анионообменников:



Для достижения селективности разделения ионов выбирают подходящую подвижную фазу и условия анализа (рН, концентрация, ионная сила и состав раствора).

В анализе пищевых продуктов метод ионообменной хроматографии применяется для решения следующих задач:

концентрирование металлов с последующим анализом элюата полярографическим, фотоколориметрическим, комплексонометрическим или другими методами; эта операция заменяет трудоемкую стадию минерализации пробы;

концентрирование и определение органических кислот и солей хроматографическими методами;

определение суммарного содержания катионов или анионов;

деминерализация (деионизация) пищевых продуктов, при которой удаляются электролиты;

хроматографическое разделение отдельных ионов и соединений, основанное на их различном сродстве к ионитам.

Гель-фильтрация

Гель-фильтрация или эксклюзионная хроматография (ситовая, гель-проникающая, *гель-фильтрационная хроматография*) — разновидность хроматографии, в ходе которой молекулы веществ разделяются по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы

(бóльшей молекулярной массы), способные проникать в минимальное число пор стационарной фазы. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры. В отличие от адсорбционной хроматографии, при гель-фильтрации стационарная фаза остаётся химически инертной и с разделяемыми веществами не взаимодействует.

Принцип

В колонку вносят раствор образца, объём которого является лимитирующим для качества хроматографии. Для аналитических разделений он не должен превышать 0,1 % от CV (общего объёма колонки), а для препаративной очистки он должен быть не выше 8-10 % от CV. Колонка упакована порошком, частицы или гранулы которого имеют поры определённого диаметра. Высокомолекулярные вещества, не входящие в поры, проходят между гранулами, поэтому их объём удержания равен объёму колонки за вычетом объёма стационарной фазы (так называемый, *свободный объём*). Они элюируются первыми. Молекулы средних размеров помещаются в поры сорбента, но не полностью. Поэтому их объём удержания несколько выше свободного объёма. Они элюируются вторыми. Самые мелкие молекулы свободно входят в поры вместе с молекулами растворителя. Поэтому их объём удержания в колонке намного выше свободного и приближается к общему объёму колонки (то есть 100 % CV). Они элюируются последними.

Аффинная хроматография

Аффинная хроматография - это метод очистки и разделения белков, основанный на их избирательном взаимодействии с лигандом, ковалентно связанным с инертным носителем (иммобилизованный лиганд). В качестве лигандов используют соединения, взаимодействия которых с разделяемыми веществами основано на биологической функции последних. Так, при разделении ферментов лигандами служат их субстраты, ингибиторы или коферменты. Главная особенность, которая обуславливает высокую эффективность аффинной хроматографии, состоит в том, что разделение основано на различии не физико-химических признаков молекулы (заряда, формы и размера), а специфических

функциональных свойств, отличающих данный фермент от множества других биополимеров.

Схематически процесс разделения веществ с помощью аффинной хроматографии можно представить следующим образом. Колонку заполняют носителем, прочно связанным с каким-нибудь биологически активным веществом (лигандом). Пропускают через колонку анализируемую смесь веществ, к одному из которых лиганд обладает биологическим сродством. Лиганд из всей смеси веществ выбирает «свое» вещество и образует с ним биоспецифический комплекс. В результате этого вещество останется в колонке связанным с лигандом, а все остальные компоненты смеси пройдут через колонку, не задерживаясь. После этого можно изменить буферный раствор, подобрав условия, при которых комплекс лиганда с избранным им веществом распадается и чистое вещество вымывается этим буферным раствором из колонки.

В настоящее время метод аффинной хроматографии применяется для выделения и очистки многих природных белковых молекул (антител, антигенов, ингибиторов, ферментов, гормонов, клеточных рецепторов), специфических пептидов, гликопротеидов и гликолипидов, полисахаридов, моносахаридов, нуклеиновых кислот и нуклеотидов, липидов, субклеточных частиц и многих видов клеток.

Основные аспекты применения хроматографии в медицине и биологии.

Благодаря развитию жидкостной тонкослойной и колоночной хроматографии стало возможным определение свободных аминокислот и нуклеотидов в биообъектах; исследователи получили инструмент для анализа состава белков и нуклеиновых кислот, а клиницисты – “аминокислотную” и “нуклеотидную” диагностику патологических состояний; стало возможным определение различного рода лекарственных препаратов и их метаболитов в крови и тканях органов больных экспериментальных животных, следовательно, фармакологи имеют возможность изучать фармакокинетику, а клиницисты – контролировать эффективность лечения. При достаточно стандартизированных условиях можно получить хроматограммы с информацией, необходимой для диагностирования, не добываясь полного

разделения смесей. Такие хроматограммы названы обзорными, а метод их использования для диагностики заболеваний человека, разработанный в лаборатории хроматографии 2-го медицинского института, – «методом обзорных хроматограмм». Так, по «обзорным» хроматограммам можно диагностировать рак, гастрит или устанавливать отсутствие патологии.

В практике клинической медицины большое распространение имеет лечение различных патологий с применением сорбентов, используемых в хроматографии. Так разработаны методы лечения больных посредством удаления из биологических жидкостей токсических метаболитов эндогенной и экзогенной природы с помощью различного рода сорбентов (сорбция токсичных агентов из крови – гемосорбция; из плазмы – плазмсорбция; из ликворы – ликворсорбция). Также разработаны принципы, аппаратура, сорбенты, техника для реализации этих методик, получены положительные результаты при лечении больных с острыми отравлениями лекарственными препаратами и химическими ядами, больных с поражениями печени в стадии прекомы и комы. Основой этого метода является жидкостноадсорбционная хроматография, где неподвижная фаза – адсорбент, подвижная – плазма, лимфа, ликвор, а разделяемая смесь вся масса веществ и токсические метаболиты соответствующей биологической жидкости. Техника лечения заключается в том, что соответствующий сосуд (артерия, вена, лимфатический поток и т.д.) подключается к колонке, заполненной специальным адсорбентом (различные типы активированных углей, ионообменные смолы и т.д.); биологическая жидкость подвергается перфузии – пропусканию через систему, находящуюся вне организма, затем очищенные жидкости направляются в организм. После проведения перфузии твердая фаза содержит вещество, ответственное за возникновение той или иной патологии, и в тех случаях, когда этиология заболевания неизвестна, а улучшение состояния больного на лицо, можно сделать вывод о причине заболевания. Смыть с колонки, определить качественно и количественно это вещество – трудная, но выполнимая задача. Таким образом, гемосорбция – конкретный случай весьма успешного и

результативного применения методов жидкостной хроматографии в клинической медицине.

Проанализировав найденную информацию по хроматографии можно сделать вывод о том, что хроматография является одним из наиболее эффективных методов, используемых в современной биомедицине.

Литература:

1. «Хроматография» Винарский В. А., 2004г.
2. «Автоматический хроматографический анализ» Гуревич А. Л., Русинов Л. А., Сягаев Н. А., 2001г.
3. «Высокоэффективные хроматографические процессы» Руденко Б. А. Руденко Г. И., 2003г.
4. Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В., "Хроматографические методы анализа" Методическое пособие для специального курса, Москва, 2007
5. Орлов В.И. Аратсков А.А., "Жидкостная хроматография".