

Занятие 4

Методы разделения и идентификации ВМС. Хроматографические методы анализа. Радиальная хроматография аминокислот.

Основные методы очистки ВМС, используемые в медицине:

- диализ;
- электродиализ;
- ультрафильтрация;
- компенсационный диализ.

Диализ – самый важный из них. Сущность метода: два сосуда разделённых полупроницаемой мембраной (коллодий, целлофан, пергамент, полисилоксан, полихлорвинил, полиэтилен). В одном сосуде - очищаемый коллоидный раствор, в другом – чистый растворитель. За счет диффузии все ионы из коллоидного раствора, способные пройти через отверстия мембраны, будут переходить в растворитель, а более крупные коллоидные частицы останутся в растворе. Достоинство метода: простота и дешевизна. Недостаток: время диализа - несколько суток. Скорость можно увеличить за счёт температуры, но очень незначительно.

Но скорость можно увеличить за счёт направленного движения ионов в электрическом поле. Диализатор оборудован дополнительной камерой с электродами (постоянное напряжение). Время **электродиализа** составит несколько часов или даже минут. Этот метод широко применяется в биохимии, фармации, медицине, при очистке воды и производстве продуктов питания.

Часто используют и еще одну разновидность диализа – **компенсационный**. Сущность метода компенсационного диализа (вивидиализ) состоит в том, что дисперсная система омывается не чистым растворителем, а растворами с различной концентрацией определенного вещества (или веществ). Например: определение сахара в сыворотке крови.

Сыворотку крови омывают изотоническим раствором сахара. Концентрация сахара во внешнем растворе не будет изменяться, если она равна концентрации сахара в крови. На вивидиализе основана работа искусственной почки (гемодиализ). Искусственную почку используют для освобождения крови от продуктов обмена, коррекции электролитно-водного и кислотно-щелочного балансов при острой и хронической почечной недостаточности, а также для выведения диализирующихся токсических веществ при отравлениях и избытка воды при отёках.

Одной из самых перспективных областей применения диализа является пролонгация действия лекарственных препаратов. Срок действия контролируемого выделения находится в интервале от 2-х дней до нескольких лет, обеспечивая равномерное поступление препарата. Обычный способ применения лекарств – инъекции или в виде таблеток – резко увеличивает их концентрацию в организме, что может вызвать нежелательные побочные эффекты. Так, лекарства, содержащие гормоны, при традиционном “импульсном” вводе могут вызвать эндокринные нарушения. Поэтому применяют лекарства, покрытые мембранным слоем. Через короткое время после приема скорость поступления лекарства в организм становится постоянной и может быть задана толщиной мембраны.

Ультрафильтрация - это баромембранный процесс, заключающийся в том, что жидкость не фильтруется самопроизвольно, а под давлением «продавливается» через полупроницаемую перегородку. Этот метод называют иногда сухим диализом, в том смысле, что с другой стороны мембраны нет растворителя. Размер отверстий (пор) ультрафильтрационных мембран лежит в пределах от 5 нм до 0,05–0,1 мкм. В качестве материала для изготовления ультрафильтрационных мембран в основном используются полимерные вещества – ацетат целлюлозы, полисульфон, полиамид, полиимид и т.д. Большинство мембран состоят из тонкого селективного слоя толщиной несколько десятков мк и пористой подложки, которая обеспечивает механическую прочность. Большинство современных

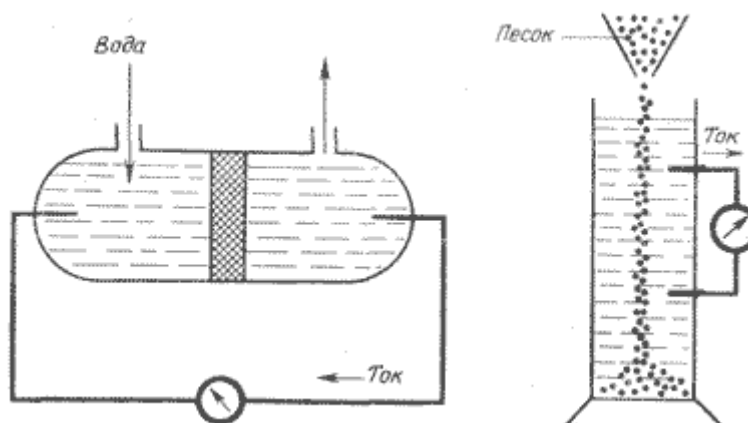
полимерных мембран устойчивы к воздействию микроорганизмов и химических соединений в широком диапазоне pH, обладают высокой селективностью и производительностью, допускают кратковременное воздействие сильных окислителей: свободного хлора, озона. Для производства ультрафильтрационных мембран также используют неорганические (керамические и металлокерамические) материалы на основе окислов Al_2O_3 , TiO_2 , ZnO . Керамические мембраны характеризуются долговечностью, высокой физической, химической и бактериальной стойкостью, что позволяет им работать в самых жестких условиях. В промышленности ультрафильтрацией чистят сточные воды, отделяют продукты микробиологического синтеза, концентрируют биологически активные вещества. В последнее время ультрафильтрацию применяют для очистки крови от токсинов и выведения избытка жидкости из организма.

Электрокинетические явления в коллоидных системах – это группа свойств, которые отражают связь, существующую между движением частиц дисперсной системы относительно друг друга и электрическими свойствами границы раздела этих фаз. Различают четыре вида электрокинетических явлений: электроосмос, электрофорез, потенциал течения и потенциал оседания (седиментации).

Электроосмос – это перемещение жидкой фазы относительно неподвижной твердой фазы под действием электрического тока (1808 г, МГУ, Рейсс). При пропускании постоянного тока через U-образную трубку, заполненную кварцевым песком и водой, в колене с отрицательным электродом (катодом) вода поднималась выше, а в другом опускалась. Т.е. жидкая фаза двигалась под действием электрического тока.

Электрофорез – перемещение твердой фазы относительно неподвижной жидкой фазы под действием электрического тока. При пропускании постоянного тока (100В) через прибор, состоящий из двух наполненных водой стеклянных трубок, погруженных в мокрую глину, Рейссе обнаружил, что частицы глины, отрываются от поверхности глины и

двигаются вверх (против силы тяжести!) к положительному полюсу (аноду). Т.е. твердая фаза двигалась под действием электрического поля.



Открытый профессором Рейссом электрофорез, а также другие электрокинетические явления послужили основой для создания методов изучения двойного электрического слоя на поверхности коллоидных частиц изучения строения коллоидных частиц вообще. **Согласно современным представлениям, на поверхности любого тела** в результате протекания ОВР, процессов диссоциации, избирательной ионной адсорбции и т.д. **образуется двойной электрический слой (ДЭС) – два слоя противоположно заряженных ионов, расположенных в пространстве непосредственной близости друг от друга.** ДЭС состоит из двух частей: внутренней - плотной и внешней - диффузной. Плотный слой составляют потенциалопределяющие ионы, прочно связанные с твердой поверхностью и часть противоионов, притянутая благодаря электростатическому притяжению и силам специфической адсорбции. Эта внутренняя часть ДЭС называется адсорбционным слоем. Сумма зарядов потенциалопределяющих ионов и противоионов в адсорбционном слое не равна нулю, противоионов обычно меньше. Некоторое количество противоионов, недостающее для компенсации зарядов потенциалопределяющих ионов, располагается во внешнем, диффузном слое. Диффузный слой образован противоионами, которые притянулись к поверхности из раствора, благодаря электростатическому взаимодействию, но с поверхностью связаны очень слабо. При движении раствора происходит разрыв между адсорбционным

слоем (прочно закрепленным на поверхности) и диффузным слоем (ионами находящимися в слое раствора). У нас появляется направленное движение заряженных частиц – электрический ток. И наоборот, в электрическом поле гранулы (твердая фаза) двигаются в одну сторону, а противоионы диффузного слоя (жидкая фаза) – в другую, т.е. происходит движение фаз коллоидных систем.

Например: Если к раствору иодида калия (т.е. он в избытке) добавлять по каплям раствор нитрата серебра, то осадок иодида серебра не выпадает; в растворе мало ионов серебра, нужных для роста кристалла. И соединяться маленькие кристаллы тоже не будут, потому что на них есть одинаковый заряд. Т.е. начавшийся процесс кристаллизации не приводит к образованию осадка, если в растворе есть электролит-стабилизатор. Образуется коллоидный раствор иодида серебра с частицами, строение которых принято выражать особыми «мицелярными» формулами:

$\{[AgI]_m nI(n-x)K^+\}^{x-} xK^+$, где $[AgI]_m$ – ядро, т.е. маленький кристалл малорастворимого иодида серебра; $nI(n-x)K^+$ – адсорбционный слой, состоящий из потенциалопределяющих ионов иода, которые избирательно адсорбировались на кристалле (они находились в растворе в избытке) и некоторого количества противоионов калия, прочно связанных с ионами иода; xK^+ – подвижный диффузионный слой ионов калия; $\{[AgI]_m nI(n-x)K^+\}^{x-}$ – гранула коллоидной частицы, которая будет самостоятельно двигаться в электрическом поле. Заряд гранулы определяет величину и заряд (дзета)-потенциала (электрокинетического потенциала) на поверхности коллоидной частицы.

В биосистемах ДЭС может возникать тоже за счет избирательной адсорбции или ионизации поверхностных функциональных групп. Адсорбция происходит в основном на полисахаридах, липидах, холестерине, а на белках ДЭС возникает обычно вследствие диссоциации карбоксильной и аминогруппы. Известно, что аминокислоты в зависимости от pH среды

существуют в растворах в виде нейтральных би-ионов, катионной либо анионной формы белка.

Дзета - потенциал уменьшается по мере увеличения числа противоионов в адсорбционном слое и может стать равен нулю, если общий заряд противоионов станет равен заряду потенциалопределяющих ионов (изоэлектрическое состояние). Это может произойти при повышении концентрации противоионов в растворе. **Чем больше дзета-потенциал, тем более устойчивой является КС**, т.к. наличие заряда препятствует слипанию частиц.

Величину дзета- потенциала нельзя измерить, его можно рассчитать по уравнению Гельмгольца- Смолуховского:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta l U}{\epsilon E}$$

,где η - вязкость среды, ϵ - диэлектрическая проницаемость среды, l - расстояние между электродами, U – скорость электрофореза, E - разность потенциалов.

В ряде случаев в уравнение Гельмгольца — Смолуховского дополнительно вводят коэффициент k , учитывающий сложную форму

$$v = \frac{k E_{\text{вн}} \zeta \epsilon \epsilon^0}{\eta}$$

границы раздела фаз:

Для частиц шарообразной формы $k = 2/3 = 0,66$; для цилиндрических частиц, расположенных и движущихся перпендикулярно силовым линиям поля, $k = 1/2$; для цилиндрических частиц, расположенных и движущихся параллельно силовым линиям поля, $k = 1$.

Для иллюстрации этого положения повторим вывод уравнения Гельмгольца — Смолуховского в случае *электрофореза* для положительно заряженных сферических частиц радиусом a .

Для сферических частиц сила трения описывается законом Стокса:

$$F_{\text{тр}} = 6\pi\eta v.$$

Действующая на частицу электрическая сила зависит от приложенной разности потенциалов $E_{\text{вн}}$ и заряда частицы.

Тогда электрофоретическую скорость шарообразных частиц можно вычислить следующим образом:

$$v = \frac{E_{\text{вн}} \zeta \epsilon \epsilon^0 4 \pi r}{6 \pi r \eta} = \frac{2 E_{\text{вн}} \zeta \epsilon \epsilon^0}{3 \eta}.$$

При единичной напряженности электрического поля $= 1$ В/м скорость движения называют *электрофоретической* (*электроосмотической*) *подвижностью*:

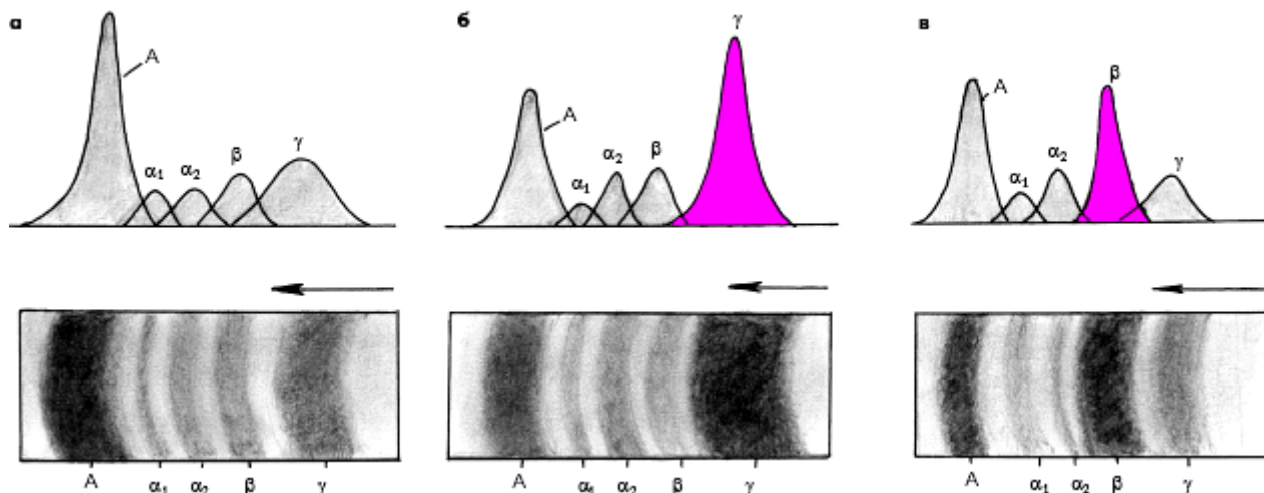
$$v_0 = \frac{v}{E_{\text{вн}}} = \frac{k \zeta \epsilon \epsilon^0}{\eta}.$$

Электрофоретическая подвижность — важная характеристика, применяемая при исследовании аминокислот, белков, красителей, других компонентов жидкостей в экологии, биохимии, медицине и многих производствах, например в пищевой и фармакологической промышленности.

Применение электрокинетических явлений. Через семьдесят лет, после того как Рейсс открыл электрокинетические явления (еще в 19 веке), электроосмос был применен на практике для сушки торфа, а затем и для сушки древесины. С 60-х годов 20 века электроосмос используют для сушки и укрепления грунтов при постройке зданий, для борьбы с оползнями при строительстве плотин, для понижения уровня грунтовых вод, для ремонта железнодорожного полотна и осушки зданий.

В земной коре через грунты и горные породы текут подземные воды, а им сопутствуют так называемые потенциалы течения, которыми пользуются геофизики для поиска полезных ископаемых, картографии подземных вод и отыскания путей просачивания воды через плотины. Потенциалы течения возникают при транспортировке жидкого топлива, при заполнении резервуаров, цистерн, нефтеналивных судов, бензобаков самолетов. Когда по трубам течет топливо, на концах трубопроводов возникают достаточно

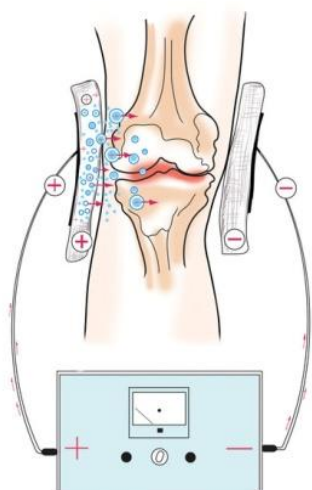
высокие разности потенциалов, из-за которых на нефтеналивных судах случались грандиозные пожары. Есть еще потенциалы оседания (это тоже течение, т.е. движение) капелек воды в облаках - причина грозových разрядов в атмосфере.



Широко пользуются электрохимическими методами медицина. Когда кровь течет через капилляры кровеносной системы, возникают потенциалы течения, являющиеся одним из источников биопотенциалов. Установлено, к примеру, что один из пиков электрокардиограммы обусловлен возникновением потенциалов течения крови в коронарных сосудах сердца. Эти потенциалы измеряют в кардиологических клиниках и лабораториях.

Электрофорез используют как метод определения и разделения белков в растворе путем пропускания через этот раствор электрического тока. Скорость движения коллоидных частиц в электрическом поле зависит от их заряда и массы, поэтому они постепенно разделяются, отходя к различным полюсам электрода. С помощью электрофореза можно получать лекарственные препараты и БАВ.

Электрофорез можно использовать и для анализа состава коллоидных систем. Электрофорез, как и хроматографию, можно выполнять на бумаге. Электрофореграммы белков плазмы крови для всех здоровых людей почти одинаковы. При патологии они приобретают характерный, причем специфический для каждого заболевания вид. Электрофорез широко используется для исследований химического состава тканей организма.



Например, для анализа различных белков и липопротеинов в сыворотке крови, анализа состава белков в моче и т.д.

Электрофорез очень часто используют для **терапевтических целей**. Например: для введения лекарственных препаратов через кожу (лекарства представляют из себя коллоидные растворы); ускорение миграции лейкоцитов к очагу воспаления (при воспалениях происходит разрушение клеточных структур с образованием продуктов кислотного характера, в этом случае поверхность тканей приобретает положительный заряд); или ускорения движения эритроцитов к страдающим от гипоксии тканям (потенциал эритроцитов человека величина стабильная и равна $-16,3\text{мВ}$).

Большее распространение в клинике терапевтической стоматологии получил электрофорез как один из методов обезболивания. С этой целью применяются 5 - 10%-ные растворы новокаина, дикаина, тримекаина, никотиновой кислоты.

Хроматографические методы анализа. Хроматография

1. Хроматография (от греч. chroma, chromatós - цвет, краска), физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя фазами - неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную. Хроматографический анализ является критерием однородности вещества: если каким-либо хроматографическим способом анализируемое вещество не разделилось, то его считают однородным (без примесей).

Принципиальным отличием хроматографических методов от других физико-химических методов анализа является возможность разделения близких по свойствам веществ. После разделения компоненты анализируемой смеси можно идентифицировать (установить природу) и

количественно определять (массу, концентрацию) любыми химическими, физическими и физико-химическими методами.

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.

Хроматография широко применяется в лабораториях и в промышленности для качественного и количественного анализа многокомпонентных систем, контроля производства, особенно в связи с автоматизацией многих процессов, а также для препаративного (в т. ч. промышленного) выделения индивидуальных веществ (например, благородных металлов), разделения редких и рассеянных элементов.

В некоторых случаях для идентификации веществ используется хроматография в сочетании с другими физико-химическими и физическими методами, например с масс-спектрометрией, ИК-, УФ-спектроскопией и др. Для расшифровки хроматограмм и выбора условий опыта применяют ЭВМ.

Основные достоинства хроматографического анализа:

- экспрессность; высокая эффективность; возможность автоматизации и получение объективной информации;
- сочетание с другими физико-химическими методами;
- широкий интервал концентраций соединений;
- возможность изучения физико-химических свойств соединений;
- осуществление проведения качественного и количественного анализа;
- применение для контроля и автоматического регулирования технологических процессов.

В зависимости от природы взаимодействия, обуславливающего распределение компонентов между элюентом и неподвижной фазой, различают следующие основные виды хроматографии - *адсорбционную*,

распределительную, ионообменную, эксклюзионную (молекулярно-ситовую) и осадочную.

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 макропористый 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).

Газовая хроматография применяется для газов разделения, определения примесей вредных веществ в воздухе, воде, почве, промышленных продуктах; определения состава продуктов основного органического и нефтехимического синтеза, выхлопных газов, лекарственных препаратов, а также в криминалистике и т.д.

Жидкостная хроматография используется для анализа, разделения и очистки синтетических полимеров, лекарственных препаратов, детергентов, белков, гормонов и др. биологически важных соединений. Использование высокочувствительных детекторов позволяет работать с очень малыми количествами веществ (10^{-11} - 10^{-9} г), что исключительно важно в биологических исследованиях.

В зависимости от агрегатного состояния неподвижной фазы газовая хроматография ГХ (GC) бывает газо-адсорбционной (неподвижная фаза - твёрдый адсорбент) и газожидкостной (неподвижная фаза - жидкость), а жидкостная хроматография - жидкостно-адсорбционной (или твёрдо-жидкостной) и жидкостно-жидкостной.

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.

Принципы и классификация

Хроматографический метод основан на распределении вещества между двумя несмешивающимися фазами, одна из фаз подвижна — ПФ, а другая неподвижна — НФ. Метод можно представить как процесс многократного повторения фактов сорбции и десорбции вещества при движении его в потоке ПФ вдоль неподвижного сорбента — НФ, это наблюдается при прохождении потока газов, паров, жидкостей через колонку, содержащую зернённый слой сорбента.

Подвижной фазой является смесь, она может быть жидким раствором или газовой смесью, неподвижной фазой является сорбент твёрдый с большой поверхностью, сорбент может быть жидким, нанесённый тонкой плёнкой на поверхность твёрдого носителя.

Хроматографические методы анализа получили широкое распространение благодаря своей универсальности, экспрессивности и высокой чувствительности. Применяется широко в различных областях промышленности, науки и техники, в экологии, медицине, биологии, криминалистке и т.д.

Классификация хроматографических методов анализа

I. По агрегативному состоянию подвижной фазы:

А) Газовая хроматография — подвижная жидкость – газ.

Б) Жидкостная хроматография — подвижная фаза — жидкость.

II. По механизму разделения смеси:

а) Адсорбционная хроматография основана на различной адсорбционной способности веществ на данной адсорбенте.

- б) Ионно-обменная хроматография основана на способности веществ обмениваться ионами друг с другом.
- в) Осадочная хроматография основана на различной растворимости осадков.
- г) Распределительная хроматография основана на различном распределении веществ (с разными коэффициентами распределения).

Определение аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге

Хроматографические методы применяют для сорбционно-динамического разделения смесей аминокислот, белков, углеводов, липидов и их метаболитов. Существует множество видов хроматографии, каждый из которых имеет свои биохимические основы.

Достаточно точным и доступным является метод распределительной хроматографии (модификация адсорбционной хроматографии). В данной работе в качестве адсорбента используется специальная фильтровальная бумага.

Принцип

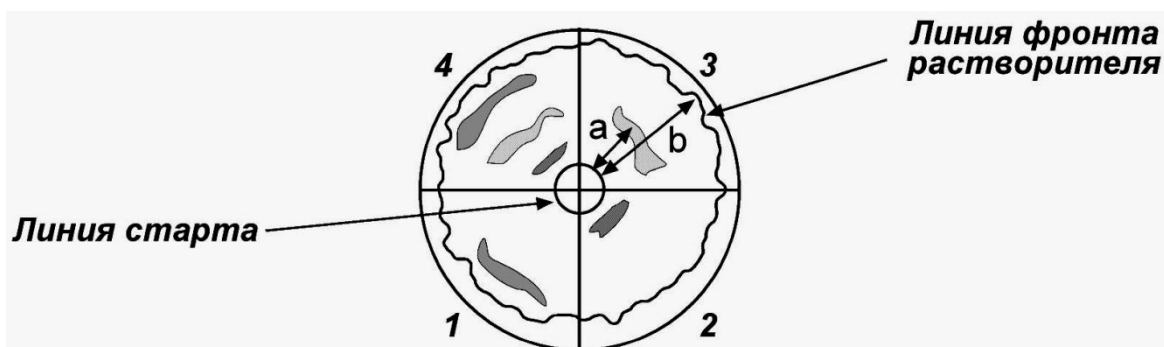
В основе распределительной хроматографии лежит различная растворимость аминокислот в полярных и неполярных растворителях. При использовании двух жидкостей, одна из которых полярна, а другая неполярна, гидрофобные аминокислоты будут переходить в неполярную жидкость, гидрофильные аминокислоты – в полярную. Если какая-либо из этих жидкостей движется, то вместе с ней будут передвигаться соответствующие аминокислоты.

При хроматографии на бумаге вода (полярная жидкость) находится между целлюлозных волокон и является неподвижной полярной фазой. В качестве подвижной неполярной фазы используется органический растворитель бутанол.

При проведении анализа более гидрофобная аминокислота, лучше растворяющаяся в подвижном неполярном растворителе, движется с большей скоростью от линии старта, чем гидрофильная аминокислота, которая

переходит в неподвижный водный слой. В результате этого отдельные аминокислоты по окончании хроматографического разделения оказываются на разном расстоянии от линии старта.

Радиальную хроматографию проводят на бумаге в чашке Петри. Растворитель перемещается от центра к периферии и захватывает аминокислоты, которые распределяются концентрическими кругами и обнаруживаются после высушивания бумаги и проведения нингидриновой реакции.



Рассчитывают коэффициент распределения R_f для каждой аминокислоты:

$$R_f = \frac{a}{b}, \text{ где}$$

a – расстояние, пройденное от линии старта аминокислотой (мм), b – расстояние, пройденное фронтом растворителя (мм).

Идентифицируют аминокислоты, находящиеся в исследуемом растворе (сектор 4), путем сравнения их положения (коэффициент R_f) с положением соответствующих аминокислот, используемых в качестве "свидетелей" (сектора 1, 2, 3).