

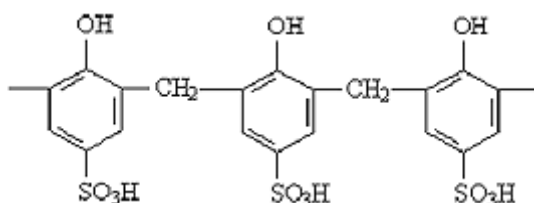
Ионообменная хроматография.

История открытия. Первооткрывателем хроматографии был русский ученый, ботаник и физикохимик **Михаил Семенович Цвет**. Исследуя пигменты растений, Цвет пропустил раствор смеси очень мало различающихся по цвету пигментов через трубку, заполненную адсорбентом – порошкообразным карбонатом кальция, и промыл затем адсорбент чистым растворителем. Отдельные компоненты смеси при этом разделились и образовали цветные полосы. Согласно современной терминологии Цвет открыл проявительный вариант хроматографии (проявительную жидкостно-адсорбционную хроматографию). Заметный вклад в развитие хроматографического метода внес **Г. Шваб** (Германия), явившийся основателем ионообменной хроматографии (1937 – 1940). Дальнейшее развитие она получила в работах советских ученых **Е.Н. Гапона** и **Т.Б. Гапона**, которые провели хроматографическое разделение смеси ионов в растворе (совместно с **Ф.М. Шемякиным**, 1947), а также осуществили высказанную еще Цветом идею о возможности хроматографического разделения смеси веществ на основе различия в растворимости труднорастворимых осадков (осадочная хроматография, 1948). Современный этап в развитии ионообменной хроматографии начался в 1975 г. после работы **Г. Смолла**, **Т. Стивенса** и **У. Баумана** (США), в которой они предложили новый аналитический метод, названный ионной хроматографией (вариант высокоэффективной ионообменной хроматографии с кондуктометрическим детектированием).

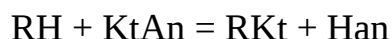
Ионообменная хроматография - это задержание молекул веществ в неподвижной фазе обусловленное их связыванием с поверхностью твердого гидрофильного материала сплошных или пористых гранул, находящихся в контакте с жидким элюентом. В этом варианте хроматографии задержание происходит в результате электростатического взаимодействия разноименно заряженных ионов. В отличие от абсорбции, ионный обмен описывается сте-

хиометрическим химическим уравнением, что важно и для ионной хроматографии. Однако в ионообменниках часто наблюдается и физическая адсорбция. Разделение в этом случае происходит благодаря разному сродству компонентов определяемой смеси к неподвижной фазе и, следовательно, разным скоростям перемещения по колонке. Ионообменная хроматография широко используется для решения многих биохимических проблем в научных исследованиях.

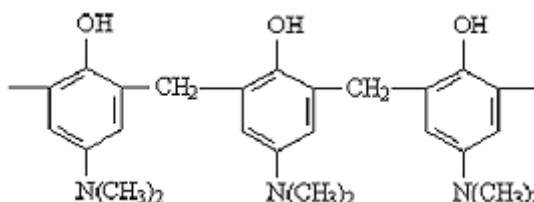
Фрагмент катионита:



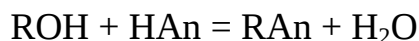
Катионный обмен:



фрагмент анионита:



Анионный обмен:



На всех наружных и внутренних поверхностях твердых гранул вдоль нитей полимеров и гелей, образующих пространственную сетку, более или менее равномерно распределены ковалентно связанные с этими поверхностями ионогенные группы. Если молекулы компонентов фракционируемой смеси тоже способны ионизироваться при растворении, причем так, что их суммар-

ный заряд имеет противоположный знак, то они связываются с неподвижными ионогенными группами силами электростатического взаимодействия, оказываясь тем самым фиксированными в неподвижной фазе. Связь эта обратима: ионы одних компонентов могут замещаться на другие или вытесняться находящимися в элюенте контрионами ионогенных групп сорбента, а также специально вводимыми для этой цели в элюент ионами. Происходит обмен ионами.

Возможность фракционирования обусловлена здесь различием в значениях их суммарных зарядов. Чем больше в данных условиях элюции суммарный заряд того или иного компонента смеси, тем сильнее его взаимодействие с ионообменником и тем медленнее он мигрирует вдоль колонки.

При ионообменной хроматографии неподвижную фазу образует твердая поверхность сорбента снаружи гранул и в их порах, точнее не сама поверхность полимерных нитей, а разбросанные по ней и связанные с ней ионогенные группы. Кулоновским взаимодействием молекул вещества с этими группами обуславливается их задержание в неподвижной фазе. В составе ионогенных групп сорбента исходно подразумевается также те или иные контрионы. В контакте с водным растворителем контрионы могут диссоциировать от ионогенных групп, оставляя заряженные, связанные с матрицей ионы, а также могут замещаться другими контрионами или более крупными ионами вещества. В исходном сухом материале сорбента(ионообменника) контрионы всегда имеются в таком количестве, чтобы нейтрализовать заряды всех ионов.

Подвижная фаза (элюент) всегда в основе своей водная. Главные ее физические параметры - pH, концентрация и природа растворенных солей. Для подавления неспецифических взаимодействий вещества с материалом матрицы в элюент могут быть внесены мочевины, детергенты.

Фракционируемые вещества всегда должны нести на себе некий электрический заряд или по крайней мере обладать способностью к ионизации. Они могут представлять собой более или менее крупные ионы, цвиттерионы, т.е.

в целом нейтральные молекулы, несущие равное число положительных и отрицательных зарядов, или амфолиты – крупные молекулы, на поверхности которых располагается несколько ионогенных групп, способных заряжаться и в зависимости от pH элюента создавать ту или иную мозаику электрических зарядов обоих знаков.

Протекание хроматографического процесса как всегда определяется в первую очередь значениями коэффициентов равновесного распределения (K) между неподвижной и подвижной фазами для каждого из компонентов хроматографической смеси веществ. Распределение вещества между фазами зависит от силы электростатического взаимодействия ионов или заряженных групп в молекуле вещества с заряженными группами ионообменника. Это взаимодействие определяется как природой самого вещества, так и свойствами жидкой среды, в которой оно происходит, в частности pH.

Хроматографический процесс.

Ионные взаимодействия вещества и сорбента.

По всему объему гранулы сорбента равномерно распределены неподвижно закрепленные ионогенные группы. В сильном ионообменнике все ионогенные группы ионизированы и несут электрический заряд, а в слабом – ионизирована только вполне определенная (зависящая от pH) часть этих групп. Но даже и в сильном обменнике в каждый данный момент времени далеко не все ионизированные группы доступны для электрического взаимодействия с ионами и молекулами вещества. В растворе подвижной фазы внутри гранул находятся контрионы, «блокирующие» электрические заряды этих групп. Это – протоны, гидроксилы или другие исходные контрионы самого ионообменника. К ним присоединяются ионы буфера и соли, которую обычно именно для этой цели вносят в элюент. При сближении под действием взаимного притяжения контриона и иона образуется ионная пара. Вне ее электрическое поле исчезает, поскольку происходит наложение полей двух единичных за-

рядов противоположного знака. Таков смысл термина «блокирование» заряда ионогенной группой.

Каждый единичный акт блокирования длится недолго – под тепловыми ударами молекул воды легкие контрионы отходят, обнажая заряды неподвижных ионов обменника. Но на их место вскоре становятся другие контрионы.

Чем выше концентрация соли (или буфера) в элюенте, тем меньше времени каждый из зарядов ионообменника будет оставаться открытым одновременно. Теперь дополняем картину медленно диффундирующими внутрь гранул молекулами хроматографируемых веществ. Интересующие нас биологические молекулы являются цвиттерионами (аминокислоты) или амфолитами (белки, НК). Цвиттерионы несут два заряда – положительный и отрицательный. В изоэлектрической точке на долю каждой молекулы цвиттериона в среднем приходится по одному положительному (аминогруппа) и одному отрицательному (карбоксил) заряду. Это в среднем. На самом деле, кроме нейтральных цвиттерионов, несущих оба заряда, в любой момент времени при $pH = pI$ в растворе будет находиться еще и статистически одинаковое число положительно и отрицательно заряженных ионов, у которых одна из двух ионогенных групп в этот момент окажется неионизированной. При $pH > pI$ в совокупности всех молекул число отрицательных зарядов превысит число положительных, однако в растворе окажется еще очень много молекул, несущих заряды обоих знаков или даже положительно заряженных. Соотношение количеств разноименно заряженных ионов изменится в пользу молекул, несущих отрицательный заряд, и тем сильнее, чем выше значение pH . Аналогичные рассуждения можно привести для случая $pH < pI$.

В принципе точно такая же ситуация имеет место и в случае амфолитов, например белков. Разница лишь в том, что вместо двух зарядов противоположного знака суммарный электрический заряд макромолекулы определяется совокупностью множества положительных зарядов и множества отрицательных. Во-первых, как и при $pH = pI$, так и при любых других значениях pH в

огромной популяции молекул амфолитов имеется, как в целом нейтральные, так и суммарно положительно и отрицательно заряженные молекулы, а, во-вторых, каков бы ни был суммарный электрический заряд молекулы амфолита, на ее поверхности почти наверняка найдутся заряженные группы обоих знаков.

Из всего сказанного следует, что для возникновения электростатической связи между молекулой вещества и ионообменником должно иметь место совпадения трех следующих событий. В ходе своей тепловой диффузии внутри гранулы обменника молекула амфолита должна подойти к нити полимера или стенке поры так, чтобы разноименно заряженные ионы на поверхностях сорбента и молекулы оказались сближенными до расстояния, на котором эффективно действует кулоновская сила притяжения разноименных зарядов. В этот момент оба сблизившихся иона должны оказаться незаблокированными контрионами. Хотя вероятность такого совпадения кажется и небольшой, но число столкновений с поверхностью обменника, которые испытывает каждая молекула вещества за единицу времени, настолько велико, что за разумный промежуток времени практически для каждой молекулы вещества благоприятная ситуация реализуется хотя бы однажды, и молекула оказывается связанной с матрицей обменника. Ее поступательное движение прекратится, хотя под тепловыми ударами молекул воды она будет поворачиваться около точки своей фиксации.

«Оторвать» биологическую макромолекулу от матрицы после этого будет нелегко, во-первых, из-за того, что большая масса обуславливает инерционность ее поведения, во-вторых, из-за того, что разнонаправленные импульсы ударов о поверхность макромолекулы многих молекул воды будут уравновешивать друг друга. Тем не менее неизбежно наступит момент, когда равнодействующая этих импульсов окажется достаточно большой для того, чтобы удалить молекулу на такое расстояние, где кулоновское притяжение между двумя ранее сближенными ионами перестанет играть существенную роль, и молекула оторвется от матрицы. Если концентрация соответствующих конт-

рионов в окрестности ионов мала и оба иона в течение некоторого времени будут сохранять свои свободные заряды, то есть шанс, что недалеко отошедшая в сторону молекула вещества за счет броуновского движения вновь сблизится с ионами матрицы.

Если же концентрация контрионов велика и они немедленно блокируют хотя бы один из ранее взаимодействующих ионов, то молекула вещества окончательно оторвется от данной точки матрицы и возобновит свое диффузионное движение до тех пор, пока совпадение благоприятных условий не фиксирует ее в новой точке внутри гранулы обменника и не будет унесена током элюента.

Выбор условий динамической ионообменной хроматографии.

Выбор ионообменника.

Выбор типа ионообменника целесообразно начать с его пористости. Для низкомолекулярных соединений (аминокислот, нуклеотидов, олигонуклеотидов) удобно использовать ионообменные смолы на основе полистирола. Для более крупных полипептидов и полинуклеотидов с молекулярной массой менее 10 000 можно использовать ионообменные сефадексы типов А-25 и С-25. Фракционирование и очистку особо крупных молекулярных агрегатов и вирусов с молекулярной массой более $4 \cdot 10^6$ приходится вести на поверхности гранулы, для чего можно использовать ионообменные сефадексы типов А-25 и С-25 или даже смолы.

Следующий этап – выбор между сильным и слабым ионообменником. Для низкомолекулярных ионов и цвиттерионов предпочтение, как правило, следует отдать сильным ионообменным мелкопористым смолам высокой емкости. Для биополимеров, с их склонностью образовывать многоточечные связи с обменником, предпочтение следует отдать слабому ионообменнику.

Чем крупнее молекула белка, т.е. чем больше вероятность ее многоточечного связывания, тем меньше должна быть емкость выбираемого обменника.

Ионообменники на основе целлюлозы и агарозы имеют меньшую емкость, чем ионообменные сефадексы. Для разделения молекул используются следующие матриксы: диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза) - заряжена положительно; карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза) и фосфоцеллюлоза - заряжены отрицательно.

Еще один фактор, который надо иметь ввиду при выборе обменника, это - опасность неспецифической сорбции вещества на материале матрицы. Например, если молекулы вещества заметно гидрофобны, то от использования крупнопористой полистирольной смолы, следует отказаться в пользу мелкопористой или обменника на основе целлюлозы. Агарозные ионообменники также имеют определенную склонность к гидрофобным взаимодействиям с веществом.

Выбор типа элюции.

Для разделения близким по своим хроматографическим свойствам веществ используют изократическую элюцию – раствором неизменного состава. Это вариант элюции дает наилучшее разрешение пиков.

Элюцию ступенчатым или непрерывным градиентом осуществляют чаще всего за счет изменения концентрации соли в буфере неизменного состава. Изменение pH буфера используют, как правило, для ступенчатого градиента с целью нейтрализации, а иногда и изменения знака заряда компонентов фракционируемой смеси или нейтрализации самого обменника. Условия посадки препарата на колонку при градиентной элюции обычно бывают таковы, что он концентрируется в верхней части колонки.

Выбор pH буфера для элюции.

Для низкомолекулярных ионов и цвиттерионов этот выбор не очень строг – достаточно обеспечить нужный заряд вещества. Элюцию с сильных анионо-

обменников кислых по своей природе веществ (нуклеотидов) удобно производить с помощью HCl. Ион Cl⁻ вытесняет с сорбента кислотный остаток, а ион H⁺ его нейтрализует.

Если элюент должен состояться на основе буфера, то, помимо соответствия диапазона буферной емкости нужному значению pH, необходимо обдумать выбор химической природы буфера в связи с возможностью его взаимодействия с обменником. В состав любого буфера входит обеспечивающий само явление буферности не полностью диссоциированный остаток слабой кислоты или слабого основания. Если такой остаток сорбируется на обменнике, то буферное равновесие нарушается и изменяется pH. Во избежание этого хроматографию на анионообменниках предпочтительно вести в таких буферах, у которых буферный компонент является катионом, т.е. трисовым, пиридиновым и имидазольным, а для катионообменников следует использовать такие буферы, как ацетатный, фосфатный, бикарбонатный и др., где буферным компонентом служит анион кислотного остатка.

Выбор концентрации соли.

Соль в составе элюента в момент посадки препарата на обменник может быть необходима для растворимости биополимера или сохранения его нативности, однако чаще всего ее вводят изначально для предотвращения слишком прочной сорбции исходного препарата. Обычно для обменников на основе целлюлозы исходная солевая концентрация должна быть около 0,01M, для ионообменных сефадексов – на порядок выше.

Для целей хроматографической очистки белок желательно сорбировать на колонку в присутствии наибольшей концентрации соли, которая еще не мешает его практически полной сорбции, а элюировать - наименьшей концентрацией соли, обеспечивающей наиболее полную очистку от примесей, часть которых плохо сорбируется изначально, а часть не снимается с колонки в ходе элюции.

Примеры применения ионообменной хроматографии

Высокоэффективная ионообменная хроматография (колонки, упакованные сорбентом с размером зерен 5-10 мкм, давление для прокачивания элюента до 10^7 Па) смесей нуклеотидов, нуклеозидов, пуриновых и пиримидиновых оснований и их метаболитов в биологических жидкостях (плазма крови, моча, лимфа и др.) используется для диагностики заболеваний. Белки и нуклеиновые кислоты разделяют с помощью ионообменной хроматографии на гидрофильных высокопроницаемых ионитах на основе целлюлозы, декстранов, синтетических полимеров, широкопористых силикагелей. Гидрофильность матрицы ионита уменьшает неспецифическое взаимодействие биополимера с сорбентом. В препаративных масштабах ионообменная хроматография используется для выделения индивидуальных РЗЭ, алкалоидов, антибиотиков, ферментов, для переработки продуктов ядерных превращений. Для современной ионной хроматографии используются смолы с постоянным размером частиц в пределах 5-50 мкм. Ионообменники представляют собой либо органические смолы с частицами сферической формы, либо пористый силикагель, с которым химически связана ионообменная фаза.

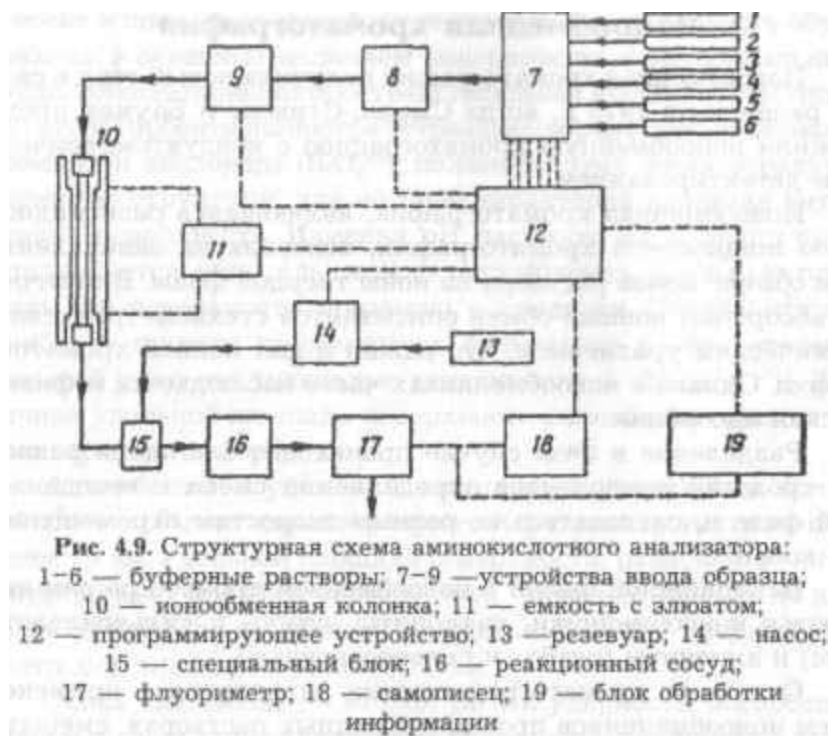
Колонки имеют длину 250-1000 мм и внутренний диаметр 5-2 мм. Для уменьшения размывания пиков в современных системах применяют соединительные трубки малого диаметра (0,3 мм). В высокоэффективной хроматографии объём пробы невелик (10-100 мкл). Это позволяет получить гораздо более узкие пики и улучшить качество разделения.

Наиболее важным аспектом современной ионообменной хроматографии является применение систем автоматического детектирования, обеспечивающих непрерывную запись сигнала самописцем. В настоящее время датчиками для ионообменной хроматографии являются спектрофотометрические, электрохимические детекторы и детекторы электропроводности.

Разделение смесей аминокислот.

Для практических целей ионообменную хроматографию наиболее широко используют для анализа аминокислот. Особенно широкую популярность ионообменная хроматография аминокислот получила с появлением аминокислотных анализаторов, позволяющих автоматически разделять смеси аминокислот. При **разделении аминокислот** методом ионообменной хроматографии в качестве *неподвижной фазы* используются гранулы синтетического полимера, несущие сульфогруппы ($-\text{SO}_3^-$). Эти группы ионизированы во всем диапазоне pH и несут отрицательный заряд. Для подготовки к работе ионообменник помещают в колонку и промывают Na^+ -содержащим буферным раствором с pH 2. При этом сульфогруппа связывает ионы натрия. Если теперь нанести на колонку раствор аминокислот, то положительно заряженные аминокислоты вытеснят ионы натрия и будут сорбированы на ионите. Поскольку аминокислоты не несут заряда в изоэлектрической точке, их элюируют с колонки буфером с более высоким значением pH. Строго говоря, аминокислоты элюируются при величинах pH, значительно ниже изоэлектрических точек, поскольку за связывание с ионообменником конкурируют Na^+ -ионы буферного раствора.

Автоматический аминокислотный анализатор позволяет проводить анализ смеси аминокислот белковых гидролизатов. Структурная схема аминокислотного анализатора представлена на рис. 1.



Подача буферных растворов (1-6) на ионообменную колонку (10) осуществляется с помощью соленоидных клапанов и насоса через автоматическое устройство ввода образца (7-9). Колонку заполняют специальной ионообменной смолой, которая должна обладать высокой разрешающей способностью и устойчивостью к давлению.

Нингидрин (или флуорескамин, или офталевый диальдегид) подается специальным насосом (14) из резервуара (13) и смешивается с элюатом (11), вытекающим из колонки, в специальном блоке (15). Затем полученная смесь подается в реакционный сосуд (16) для получения производных с последующим детектированием с помощью фотометра или флуориметра (17) по поглощению или флуорисценции и регистрацией на самописце (18). Контроль над процессами осуществляется с помощью программирующего устройства (12). В блоке обработки информации (19) происходит анализ полученных результатов, а также сравнение интенсивности сигналов отдельных аминокислот со стандартной смесью и определение абсолютного количества каждой аминокислоты в исследуемом гидролизате. Идентификацию каждой аминокислоты в исследуемом гидролизате.

кислоты проводят по соответствующему времени удерживания. После анализа автоматически осуществляется регенерация сорбента в колонке.

В настоящее время разработано несколько способов получения окрашенных, или флуоресцирующих производных аминокислот.

Аминокислоты в элюате после ионообменной колонки детектируют по интенсивности окрашенных в фиолетовый цвет производных, которые получают после взаимодействия аминок групп с нингидрином. В первую очередь в реакцию с нингидрином вступают первичные аминок группы с образованием интенсивно окрашенных продуктов реакции, которые детектируют при 570 нм. Вторичный аминпролин образует продукт реакции с меньшей интенсивностью окраски, его детектируют при 440 нм. Одновременную регистрацию при двух длинах волн осуществляют с помощью двухканального самописца. Так как интенсивность окрашивания зависит от строения аминокислоты, необходимо проводить калибровку прибора с использованием стандартной смеси. В зависимости от типа прибора и вида определяемых аминокислот продолжительность анализа составляет от 45 мин. до 2 ч.

Выделение иммуноглобулинов.

Гранулами набухшего в каком-либо растворителе геля с пористой структурой наполняют колонки, настилают сверху на столб геля осажденную фракцию иммуноглобулинов с разными молекулярными массами и пропускают их через гель. В основе метода ионообменной хроматографии лежит применение носителей, состоящих из нерастворимой основы (гели декстрана, агарозы, полиакриламида) с фиксированными на ней функциональными группами (сульфометильными, сульфэтильными, сульфопропильными, карбоксиметильными или карбоксиэтильными и др. катионов). При пропускании через ионообменник с положительно заряженными, функциональными группами (катионообменник) смеси глобулинов, имеющих отрицательный заряд, последние свяжутся с ними. Связавшиеся глобулины отличаются между со-

бой изоэлектрическими точками, и их можно затем в определенной последовательности элюировать из ионообменника.

Применение в очистных сооружениях

Ионообменные смолы нерастворимы. Тонкий порошок такой смолы в хроматографической колонне поглощает ионы тяжелых металлов из раствора, замещая их на кислоту или щелочь. Так, например, готовят воду для питания паровых котлов на больших тепловых электростанциях. Вода очищается от ила и песка и поступает в колонну, наполненную катионитовой смолой. В ней полностью поглощаются соли кальция и магния, делающие воду "жесткой", вместо них появляются ионы водорода - образуется кислота. Подкисленная вода проходит колонну, в которой анионы образовавшихся кислот нейтрализуются, и получается чистая вода. Ионообменные смолы превращают даже соленую морскую воду в пресную, пригодную для питья, и извлекают ценные металлы из промышленных сточных вод.

Разделение редкоземельных металлов

На ионообменной колонне смогли разделить смесь изотопов редкоземельных элементов. Радиоактивность каждой капли раствора, вытекающего из колонны, измерялась отдельно. Оказалось, что чем выше порядковый номер элемента, тем быстрее он выходит из колонны при хроматографическом разделении. И чередование элементов удивительным образом точно соответствует их взаимному положению в периодической системе элементов: америций (№ 95), кюрий (№ 96), берклий (№ 97) и калифорний (№ 98).

