

Министерство образования и науки Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова

Г. А. Урванцева, Е. Л. Грачева

Методы анализа живых систем

Учебное пособие

*Рекомендовано
Научно-методическим советом университета
для студентов, обучающихся по направлению
Прикладная информатика в химии*

Ярославль
ЯрГУ
2013

УДК 543.21(075.8)

ББК Е072я73

У69

*Рекомендовано
Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2013 года*

Рецензенты:

Щапов А. Н., кандидат химических наук,
доцент кафедры химии фармацевтического факультета
Ярославской государственной медицинской академии;
кафедра органической и неорганической химии
Ярославского государственного педагогического университета
им. К. Д. Ушинского

Урванцева, Г. А. Методы анализа живых систем :
У69 учебное пособие / Г. А. Урванцева, Е. Л. Грачева ; Яросл. гос.
ун-т им. П. Г. Демидова. – Ярославль : ЯрГУ, 2013. – 104 с.

ISBN 978-5-8397-0942-3

Учебное пособие написано в соответствии с содержанием Государственных образовательных стандартов, программой практикума (раздел «Биохимические методы анализа»); программой дисциплины «Химические основы и методы анализа живых систем»; программой дисциплины «Биотехнология и организация аналитического контроля»; программой «Физико-химические и биологические методы анализа». Изложены методы центрифугирования, электрофореза, хроматографии, ПЦР и других методов анализа живых систем. Рассмотрены их теоретические основы, достоинства и недостатки, перспективы развития и другие особенности и характеристики.

Предназначено для студентов, обучающихся по направлению 230700.62 Прикладная информатика в химии (дисциплина «Химические основы и методы анализа живых систем», цикл Б2), очной формы обучения.

УДК 543.21(075.8)

ББК Е072я73

ISBN 978-5-8397-0942-3

© ЯрГУ, 2013

Основные обозначения

- А – абсорбция вещества (оптическая плотность)
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ОЭП – относительная электрофоретическая подвижность
- ВЭКХ – высокоэффективная колоночная хроматография
- ПАУ – полиароматические углеводороды
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- АМХП – автоматизированное многократное хроматографическое проявление
- R_f – коэффициент скорости движения
- K_d – коэффициент распределения
- ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ПЦР – полимеразная цепная реакция

Введение

Настоящее учебное пособие посвящено описанию современных методов анализа и исследования живых систем. Живые системы имеют ряд существенных особенностей:

1. Во-первых, как правило, исходный материал – биомасса, из которой предстоит выделить интересующее исследователя вещество, – состоит из многих сотен или даже тысяч различных соединений. Многие компоненты этих смесей, выполняя разнообразные биологические функции, построены довольно однотипно;

2. Во-вторых, работа с биологическими объектами заключается в необходимости манипулировать с очень маленькими количествами вещества. Поэтому используемые для их детекции методы должны быть высокочувствительными. Основными методами детекции компонентов живых систем являются спектрофотометрические методы, основанные на измерении поглощения видимого или ультрафиолетового света, а также люминесцентные методы, основанные на измерении флуоресценции, био- и хемилюминесценции;

3. В-третьих, многие компоненты живых систем обладают низкой устойчивостью и при умеренных температурах и незначительных изменениях pH способны к денатурации. Кроме того, в клетках часто находятся ферменты, способные разрушать те или иные вещества.

Все эти особенности следует учитывать при выборе метода исследования компонентов живых систем, тем более что в настоящее время с этой целью по-прежнему широко используются и традиционные физико-химические методы анализа, например абсорбционная спектроскопия. Биохимическими методами анализа живых систем многие исследователи считают центрифугирование, электрофорез и хроматографические методы анализа, о которых подробно пойдет речь в настоящем пособии. Однако в последние годы широкое развитие получили новые молекулярные методы анализа, такие как ПЦР. На этот метод также будет обращено внимание студентов в данном пособии. Кроме того, в настоящее время распространено совместное использование двух или более методов анализа, например хромато-масс-

спектрометрия. Общей тенденцией развития современных методов анализа живых систем является математизация анализа, создание сети банков аналитических данных, разработка систем машинной идентификации природных соединений, выпуск аналитической аппаратуры со встроенной ЭВМ. Важно уметь выбрать метод, наиболее подходящий в данных обстоятельствах, дающий наибольшую информацию.

Перед началом выполнения лабораторной работы необходимо ознакомиться с соответствующей теоретической частью, приведенной в данном пособии в каждом разделе, а также в рекомендуемой литературе. При подготовке к сдаче выполненной работы следует ответить на контрольные вопросы, представить полученные результаты и сформулировать выводы.

1. Центрифугирование

1.1. Общие принципы центрифугирования

Центрифугирование – разделение веществ в поле центробежной силы.

Центрифугирование применяется для разделения мелкодисперсных многокомпонентных смесей, а также для фракционирования клеточных органелл и определения молекулярного веса высокомолекулярных органических соединений, например белков, нуклеиновых кислот (седиментационный анализ).

Разделение веществ с помощью центрифугирования основано на том, что в центробежном поле частицы, имеющие различные размеры, форму и плотность, осаждаются (седиментируют) с разной скоростью.

Величина центробежной силы определяется скоростью вращения ротора и расстоянием от оси вращения. Для сравнения условий центрифугирования на разных центрифугах принято указывать относительное центробежное ускорение (фактор разделения), выраженное в g ($g = 9,8 \text{ м}\cdot\text{с}^{-2}$). Для примерных расчетов фактора разделения обычно пользуются номограммами или таблицами, которые прилагаются к каждому ротору.

В зависимости от задач, стоящих перед исследователем, центрифугирование можно условно разделить на препаративное и аналитическое (седиментационный анализ). Препаративное центрифугирование заключается в выделении биологического материала для последующих биохимических исследований.

С помощью препаративного центрифугирования выделяют большое количество клеточных частиц для изучения их морфологии, структуры и биологической активности. Метод применяется также для выделения таких биологических макромолекул, как ДНК и белки из предварительно очищенных препаратов. Аналитическое центрифугирование применяется главным образом для изучения чистых или практически чистых препаратов макромолекул или частиц, например, рибосом. В данном случае используется небольшое количество материала, а седиментация исследуемых частиц непрерывно регистрируется с помощью специальных оптических систем.

Метод позволяет получать данные о чистоте, молекулярном весе и структуре материала. В практикумах для студентов препаративное центрифугирование применяется гораздо чаще, чем аналитическое, поэтому мы остановимся на нем более подробно, хотя в основе обоих методов лежат общие принципы (см. рис. 1.1).

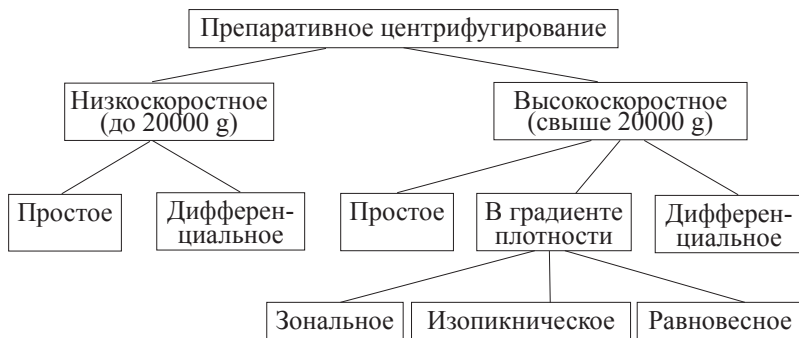


Рис. 1.1. Классификация методов препаративного центрифугирования

1.2. Разделение клеточных органелл дифференциальным центрифугированием

Для дифференциального центрифугирования используются различные типы роторов, в зависимости от объемов и требуемого фактора разделения. Описанными методами можно выделять клеточные органеллы из гомогенатов тканей. Основные компоненты клетки осаждаются в следующей последовательности: сначала целые клетки и их фрагменты, затем ядра, хлоропласты, митохондрии, лизосомы (или другие микротельца), микросомы (фрагменты гладкой и шероховатой эндоплазматической сети) и, наконец, рибосомы.

Центрифугирование. Исследуемую взвесь или коллоидный раствор наливают в пробирку, которую после уравнивания с точностью до 1 мг и удаления пузырьков воздуха (при использовании герметичных роторов углового типа) помещают в установленный на валу привода центрифуги ротор и центрифугируют при первом выбранном факторе разделения, что необходимо для осаждения самых тяжелых частиц.

Получить чистый препарат за одно центрифугирование практически невозможно. Первый образовавшийся осадок содержит, кроме самых тяжелых частиц, некоторое количество других компонентов разделяемой смеси. После седиментации его ресуспендируют в среде, состав которой определен задачами работы, и снова центрифугируют при тех же условиях.

Эту процедуру проводят для получения чистых осадков несколько раз. Полученные супернатанты (надосадочные жидкости) объединяют для дальнейшего разделения. Объединенный супернатант центрифугируют при втором факторе разделения для осаждения более мелких частиц. Далее, также ступенчато повышают фактор разделения до тех пор, пока не получат осадок последнего компонента изучаемой смеси. После этого супернатант, проверенный на полноту осаждения, можно отбросить, в случае необходимости, исследовать, исходя из задач эксперимента. Ступени относительного центробежного ускорения в большинстве случаев подбирают экспериментально применительно к среде гомогенизации и объекту исследования. Большая дискретность ступеней фактора разделения обеспечивает получение более чистых препаратов. Однако достигнуть высокой чистоты практически не удастся из-за относительно близких размеров частиц. Для улучшения очистки используют центрифугирование в градиентах плотности сахарозы, декстрана и других веществ.

Таблица 1.1

Применение дифференциального центрифугирования для разделения клеточных органелл

<i>Компонент</i>	<i>Условия центрифугирования</i>	
	<i>Фактор разделения, g</i>	<i>Время, мин.</i>
Клеточные стенки	500-750	10
Ядра	500-1000	10-20
Митохондрии	9000-18000	10-20
Общие микросомы	80000-100000	30-90

1.3. Разделение фракций в градиентах плотности

Существуют два вида градиентов плотности веществ: непрерывный и ступенчатый. Градиент должен охватывать диапазон плотностей изучаемого материала и несколько перекрывать его. Ступенчатые градиенты можно разделить на простые (2–3 слоя растворов разной плотности) и сложные (более 3 слоев). Чем больше слоев, тем ближе ступенчатый градиент приближается к непрерывному. Широкое распространение ступенчатые градиенты получили из-за простоты их приготовления, а также возможности получения больших количеств исследуемой фракции. Наносят их пипеткой или шприцем, наслаивая раствор с меньшей плотностью на раствор с большей плотностью.

Формирование непрерывных градиентов осуществляется автоматически с помощью специальных установок.

1.4. Способы центрифугирования в градиентах плотности

Скоростное зональное центрифугирование (s-зональное) применяют для разделения частиц по размеру. Его проводят с использованием линейного градиента плотности. Изучаемую смесь наносят на поверхность градиента и центрифугируют при максимально возможном для данного типа ротора фактора разделения 20–30 мин до получения дискретных зон или полос исследуемых фракций. Наличие градиента препятствует конвекционному смешиванию этих зон. Если разделение не достигнуто, то увеличивают время центрифугирования или фактор разделения (применяя другой ротор). Если все частицы осели на дно, то увеличивают плотность градиента или уменьшают фактор разделения.

Изопикническое центрифугирование, в основе которого лежит разделение частиц в зависимости от их плавучей плотности. Плавучая плотность вещества определяется соотношением формы, размеров и удельной плотности разделяемых веществ, а также плотностью жидкого компонента, т. е. можно подобрать среду центрифугирования и фактор разделения так, что центробежная сила будет уравновешена силой диффузии на выделяемый компонент смеси не будет осаждаться на дно пробирки.

Такое равновесное состояние называется *изопикнической точкой*. Плавающая плотность компонента в изопикнической точке совпадает с плотностью раствора.

Равновесная плавающая плотность отличается от истинной плотности исследуемых частиц и зависит от способности раствора градиента проникать внутрь везикулы. Биологические мембраны проницаемы для небольших молекул сахарозы, и равновесная плотность пузырьков в сахарозном градиенте определяется главным образом самим объектом и связанной с ним водой. В градиенте декстрана и других высокомолекулярных веществ, не проникающих внутрь везикул, плавающая плотность частиц существенно ниже, чем в сахарозе. Достижение изопикнической точки – длительный процесс.

Существуют два вида изопикнического центрифугирования: без градиента плотности и с градиентом. В первом случае сначала удаляют тяжелые частицы, затем осаждают исследуемую фракцию. Осадок ресуспендируют в среде, плотность которой совпадает с плавающей плотностью фракции, и центрифугируют до тех пор, пока исследуемые частицы не осядут на дно, а частицы с меньшей плотностью не всплывут.

Зонально-изопикническое центрифугирование – наиболее распространенный способ изопикнического центрифугирования. В этом случае образец наносят на поверхность линейного или ступенчатого градиента концентрации сахарозы или другого специально подобранного вещества, охватывающего все плавающие плотности компонентов исследуемой смеси, и центрифугируют до тех пор, пока каждый компонент не окажется в своей изопикнической точке. Этот метод требует более длительного центрифугирования (более часа), но позволяет с высокой степенью разрешения разделить несколько компонентов по их плавающим плотностям.

Флотация – разновидность изопикнического центрифугирования, основанная на всплывании исследуемого компонента. При проведении разделения этим методом образец ресуспендируют в растворе с большей плотностью, помещают его на дно пробирки, затем наслаивают раствор с меньшей плотностью, причем изопикническая точка должна располагаться в средней части

пробирки. Центрифугирование проводят до тех пор, пока изучаемый компонент не всплывет в зону равновесной плотности.

Правила техники безопасности

Работы, связанные с эксплуатацией центрифуг, относятся к работам с повышенной опасностью. Работающий на центрифуге должен придерживаться последовательности операций при работе на оборудовании согласно инструкции используемого оборудования.

При работе с центрифугой запрещается:

1. Работать без заземления.
2. Работать с открытой крышкой ротора и центрифуги.
3. Работать со стеклянными пробирками при частоте вращения свыше 4000 об/мин.
4. При неполной загрузке ротора необходимо размещать только предварительно уравновешенные на технических весах пробирки в гнездах, расположенных напротив друг друга.

Практическая работа 1

Осаждение ядер из гомогената печени

Оборудование и реактивы. Настольная лабораторная центрифуга Sigma 2-6 для центрифугирования в емкостях малого и среднего объема.

Технические характеристики центрифуги:

- предварительная установка скорости до 4000 об/мин;
- возможность работы на низкой скорости от 100 об/мин;
- надежная блокировка крышки с двух сторон для большей безопасности;
- низкий уровень шума;
- быстрое ускорение и торможение ротора;
- звуковой сигнал, переключаемый;
- автоматическое открытие крышки, переключаемое;
- стальной корпус для максимальной безопасности и устойчивости;
- таймер 10 сек – 11 часов 59 минут;
- «быстрый запуск» и «быстрое торможение»;
- «плавный запуск» и «плавное торможение»;
- отключение при дисбалансе;

- напряжение сети – 230 В, 50 Гц.

Системы управления и контроль работы центрифуги выведены на специальную панель управления и дисплей.

Гомогенизатор; химический стакан емкостью 200 мл, воронка, марля; 0,25 М сахарозы; 10 мМ трис (HCl); 0,2 мМ ЭДТА.

Материалы: печень животных.

Выполнение работы

I. Приготовление гомогената

1. Приготовить 150 мл среды выделения следующего состава:
0,25 М сахарозы
10 мМ трис(HCl)
0,2 мМ ЭДТА
2. Отмытую и охлажденную на льду навеску (~ 10 – 15 г) печени, порезав на кусочки, поместить в металлический стакан гомогенизатора.
3. Залить содержимое стакана 80 г среды выделения.
4. Закрепить металлический стакан на гомогенизаторе (на стакане имеется резьба).
5. Включить гомогенизатор в сеть и гомогенизировать 2 мин.
6. Перелить гомогенат в химический стакан, отфильтровав жидкость через несколько слоев марли.

II. Осаждение ядер

1. Включить центрифугу нажатием на выключатель питания с правой стороны центрифуги. В результате этого загорится дисплей центрифуги.
2. Для открытия крышки нажать на клавишу открытия крышки.
3. Для активирования автоматического открытия крышки после центрифугирования при открытой крышке центрифуги нажать на клавишу открытия крышки три раза, причем во время третьего нажатия удерживать клавишу примерно 2 сек.
3. Подготовленный для центрифугирования гомогенат разлить в специальные стеклянные пробирки центрифуги (по 12,5 мл), уравновесить попарно на технических весах и расставить в роторе центрифуги напротив друг друга (при этом заполнить противоположные держатели одинаковым количеством пробирок одинакового веса для того, чтобы не нарушить равно-

весие. Если используются не все ячейки держателя, загрузка пробирок должна быть симметричной).

4. Закрывать ротор крышкой, нажав с левой и правой сторон на крышку, и убедиться, что оба замка крышки заблокированы. Горящий индикатор на клавише старта свидетельствует о том, что центрифуга готова к работе.

5. Для установления времени центрифугирования поворачивать левую вращающуюся ручку управления до тех пор, пока не появится режим установки «set» в нижней левой области дисплея. Затем поворачивать правую вращающуюся ручку управления до тех пор, пока на дисплее не отобразится требуемая длительность центрифугирования – «15 мин». Нажать на правую вращающуюся ручку для того, чтобы подтвердить сделанную установку.

6. Для установки скорости центрифугирования поворачивать левую ручку управления до тех пор, пока на дисплее перед параметром «speed» (скорость) не появится «set». Поворачивать правую вращающуюся ручку управления до тех пор, пока на дисплее не отобразится требуемое значение 2000 об/мин (это значение загорится на дисплее). Нажать на правую вращающуюся ручку управления для того, чтобы подтвердить сделанную установку.

7. Нажать на клавишу старта, чтобы инициировать центрифугирование. Через некоторое время привод центрифуги автоматически выведет ротор на заранее заданную частоту вращения (контроль осуществляется по индикаторам частоты вращения на дисплее).

8. По прошествии времени центрифугирования центрифуга автоматически остановится.

9. После полной остановки ротора, когда крышка ротора автоматически откроется, извлечь пробирки.

10. Слить надосадочную жидкость, а осадок залить средой суспендирования и аккуратно перемешать (в осадке будут ядра и некоторое количество крупных фрагментов клеток).

11. После окончания работы отключить выключатель источника питания.

Контрольные вопросы

1. Проанализируйте классификацию методов препаративного центрифугирования. К какому виду относится центрифугирование, проведенное в работе?

2. Воспроизведите схему получения чистого препарата методом дифференциального центрифугирования на примере клеточных ядер.

3. Сравните условия дифференциального центрифугирования для ядер и микросом. Объясните различия.

4. Дайте общую характеристику разделения фракций в градиенте плотности. В чем преимущество использования данного вида центрифугирования?

Литература

1. Центрифугирование: Медицинские лабораторные технологии / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 2002. – Т. 1. – С. 282, 283.

2. Самбурский, А. И. Лабораторные центрифуги: Классификации и рекомендации по использованию / А. И. Самбурский // Медтехника и медизделия. – 2008. – № 3 (46). – С. 28–32.

2. Электрофорез

2.1. Общие принципы электрофореза

Электрофорезом называют движение заряженных коллоидных частиц в постоянном электрическом поле к противоположно заряженному электроду.

Биологические макромолекулы находятся в растворе в виде частиц, которые по своим размерам соответствуют коллоидным частицам. Кроме того, белки и нуклеиновые кислоты содержат ионизирующиеся группы, вследствие чего в растворе они могут существовать в заряженной форме, в виде катионов или анионов. Молекулы с близкими по величине зарядами, но различающиеся молекулярными массами, отличаются друг от друга отношением заряда к массе. На указанных различиях основано разделение ионов при их движении в растворе под действием электрического поля. В этом и состоит принцип электрофореза.

Суммарный электрический заряд белковой молекулы зависит от pH среды и соотношения радикалов аминокислот, обладающих кислотными и основными свойствами. Кислотные свойства радикалов аминокислот обусловлены карбоксильными и сульфгидрильными группами, а также фенольными гидроксилами. Основные свойства возникают за счет наличия в радикалах аминокислот амино-, имино- и гуанидиновых групп. Следовательно, белки, являясь амфотерными электролитами, могут диссоциировать как кислоты или как основания. Преобладание одного из этих процессов зависит от аминокислотного состава данного белка, а также от окружения, в котором находятся его молекулы, главным образом от pH среды. В кислой среде основные группы радикалов аминокислот протонированы, тогда как диссоциация кислотных групп подавлена, поэтому белки оказываются заряженными положительно. В щелочной среде, наоборот, основные группы не имеют заряда, а кислотные легко диссоциируют, вследствие чего в молекуле белка образуется избыток отрицательно заряженных групп и белок в целом имеет суммарный отрицательный заряд.

Скорость движения молекул в электрическом поле (электрофоретическая подвижность) возрастает с увеличением суммарного

электрического заряда. Так как величина заряда зависит от рН раствора, то подвижность белковых молекул тем выше, чем больше рН раствора отличается от изоэлектрической точки самого белка.

На электрофоретическую подвижность белковых молекул влияют следующие факторы.

1. Форма и величина белковой молекулы

Молекулы одного размера, но разной формы, например фибриллярные и глобулярные белки, обладают различной подвижностью в электрическом поле. Это обусловлено различиями в силе трения и электростатическом взаимодействии с окружающей средой. Чем крупнее молекула, тем меньше ее подвижность, так как при этом возрастает сила трения и электростатического взаимодействия крупных молекул по сравнению с молекулами меньших размеров. Кроме того, молекулы с близкими по величине зарядами, но различающимися молекулярными массами отличаются друг от друга отношением заряда к массе. Это также способствует разделению ионов при движении их в растворе под действием электрического поля.

2. Электрическое поле

Как известно, по закону Ома сила тока I (в амперах, А), напряжение V (в вольтах, В) и сопротивление R (в омах, Ом) связаны следующим соотношением: $I = V/R$. На разделение ионов в электрическом поле влияют все три фактора.

Сила тока. Поскольку ток в растворе между электролитами обусловлен исключительно переносом ионов буфера и образца, скорость их перемещения прямо пропорциональна силе тока. Длина пути, пройденного ионами, пропорциональна времени пропускания тока. Следовательно, для максимальной воспроизводимости результатов сила тока в процессе электрофореза не должна меняться.

Напряжение. Электрофоретическая подвижность белковых молекул пропорциональна падению напряжения в поддерживающей (опорной) среде или градиенту потенциалов (приложенное напряжение, деленное на длину слоя носителя). Используются как низкие (100–600 В), так и высокие (600–1000 В) напряжения. Высокие напряжения применяют в основном для разделения низкомолекулярных веществ.

Сопротивление. Подвижность молекул белка обратно пропорциональна сопротивлению, которое, в свою очередь, зависит от типа и размеров носителя и ионной силы буфера. Сопротивление возрастает с увеличением слоя носителя и уменьшается при увеличении его ширины, а также с возрастанием концентрации буферных ионов. В ходе электрофореза выделяется тепло, сопротивление при этом уменьшается. Таким образом, при постоянном напряжении такое нагревание приводит к увеличению силы тока и испарению растворителя. Для обеспечения максимальной воспроизводимости результатов применяют стабилизированные источники питания, которые автоматически поддерживают на постоянном уровне либо силу тока, либо напряжение, несмотря на неизбежные изменения сопротивления. Испарение сводят до минимума, накрывая прибор для электрофореза крышкой и проводя разделение веществ при температуре + 40⁰С.

3. Характер буфера и его ионная сила

Буфер создает и стабилизирует рН носителя, а также самым различным образом влияет на скорость движения разделяемых веществ. В качестве буферных растворов для электрофоретического разделения белковых молекул используют практически все буферные системы, применяемые для экстракции белков. Так, например, широко применяют трис-глициновый, трис-цитратный буферы и др. Они обеспечивают широкий выбор диапазонов рН, ионной силы и подвижности катионов и анионов буферной системы, что обуславливает разделение белков без изменения их растворимости, химических свойств и биологической активности.

По мере увеличения ионной силы буфера скорость движения образца уменьшается. При высокой ионной силе буфера суммарный ток, обусловленный переносом ионов буфера и образца, увеличивается и, следовательно, возрастает количество выделяемого тепла. При низкой ионной силе ток, обусловленный переносом ионов буфера, уменьшается, а доля, приходящаяся на ток за счет ионов образца, возрастает. При этом подвижность образца увеличивается. В буфере с низкой ионной силой общая сила тока и выделение тепла уменьшаются, но диффузия возрастает, вследствие чего разрешающая способность меньше, чем при высокой

ионной силе. Таким образом, при выборе ионной силы приходится идти на компромисс. Применяющиеся обычно буферы имеют ионные силы в интервале концентраций от 0,005 до 0,10 моль/л.

4. Природа носителя

Чаще всего в качестве носителей используют относительно инертные вещества, но их состав все же оказывает влияние на подвижность разделяемых веществ, поэтому выбор носителя зависит от природы образца.

Существует два основных типа электрофоретических систем: 1) электрофорез с подвижной границей (метод подвижной границы) без каких-либо опорных сред; 2) зональный (в основном с использованием опорных сред).

В системах первого типа электрическое поле прикладывается к исходно резкой границе между раствором макромолекул и буфером. Скорость миграции заряженных частиц определяется путем наблюдения за перемещением этой границы. Если раствор содержит гетерогенную смесь ионизированных макромолекул, то можно увидеть множество движущихся частиц. В такой системе индивидуальные компоненты нельзя разделить на отдельные зоны, так как наслоенный сверху буферный раствор имеет более низкую плотность по сравнению с находящимся под ним раствором молекул. Если бы и удалось достигнуть разделения зон, то все равно произошло бы их перемешивание, так как плотность раствора внутри этих зон была бы выше, чем между ними. Электрофорез по методу подвижной границы нашел применение преимущественно при исследовании белков, в частности свойств отдельных белков, анализе белковых смесей, оценке гетерогенности препаратов различных белков, изучении взаимодействий между белками и низкомолекулярными веществами, а также белков между собой. В настоящее время метод подвижной границы редко применяют в повседневной лабораторной практике ввиду доступности более удобных методик, не требующих такой сложной и дорогостоящей аппаратуры, как данный метод.

В случае зонального электрофореза смешивание разделенных зон предотвращено. В основном это достигается путем применения опорных, поддерживающих сред, таких как фильтровальная или хроматографическая бумага, пленки из ацетата целлюлозы

или различные гели (например, крахмальный, агаровый, полиакриламидный). Все перечисленные вещества образуют капиллярную структуру. Выбор опорной среды определяется конкретными условиями анализа. При использовании зонального электрофореза общая особенность состоит в том, что разделяемые вещества движутся в виде отчетливых зон, которые легко обнаружить соответствующим аналитическим методом.

Оборудование, необходимое для зонального электрофореза, состоит из двух частей: источника питания и собственно электрофоретического блока. Источник питания генерирует стабилизированный постоянный ток и имеет системы контроля напряжения и силы тока на выходе. Для работы с низким напряжением применяют источники питания с выходным напряжением до 600 В и силой тока до 150 мА. В электрофоретический блок входят электроды (угольные или платиновые), буферные камеры, опора для носителя и прозрачная изолирующая крышка.

Итак, преимущество зонального электрофореза в сравнении с методом подвижной границы заключается в следующем:

- 1) приборы для зонального электрофореза имеют простое устройство;
- 2) необходимое количество исследуемого материала весьма мало;
- 3) разделяемые вещества движутся в виде отчетливых зон, которые можно фиксировать в поддерживающей среде и выявлять с помощью специфического окрашивания;
- 4) разделение белковых фракций происходит довольно быстро;
- 5) зональный электрофорез применяется как в аналитических, так и в препаративных целях.

2.2. Электрофорез на бумаге и ацетате целлюлозы

Этот метод стал широко применяться для разделения смесей макромолекул с 1950 г. Он фактически открыл путь для обширных аналитических исследований во многих отраслях биологии. К настоящему времени значение его снизилось в связи с использованием других сред, более подходящих для зонального электрофореза.

Электрофорез на бумаге – самый простой из электрофоретических методов. Носителем служит, как правило, специальная хро-

матографическая бумага, которая не требует никакой подготовки: ее просто нужно разрезать на куски требуемого размера. В зависимости от типа прибора и условий опыта электрофорез на бумаге длится от 4 до 16 часов. После электрофореза белки фиксируют высушиванием, а затем красят красителями, специфичными для белков. Окрашенные полосы белковых фракций можно хранить или, разрезав на участки, элюировать для фотометрического определения каждой фракции. При электрофорезе на бумаге белков сыворотки крови удается получить до 5 фракций.

Бумага не является абсолютно инертным носителем и может адсорбировать некоторые вещества (это нежелательное ее свойство удастся устранить при использовании ацетата целлюлозы). Кроме того, при электрофорезе на бумаге вследствие особенностей ее химического состава в той или иной степени проявляется электроэндоосмос (то есть возникновение заряда между молекулами буферного раствора и поверхностью носителя), что резко снижает разрешающую способность метода.

Электроэндоосмос менее заметен в носителе из ацетата целлюлозы, к тому же ацетат целлюлозы менее гидрофилен, чем бумага, поэтому он удерживает меньшее количество буферного раствора. Пленки из ацетата целлюлозы в качестве поддерживающей среды для электрофореза были предложены в 1957 г. и с тех пор нашли широкое применение. Они несколько дороже хроматографической бумаги. Во многих случаях это препятствует их применению вместо бумаги при электрофорезе. Данный метод целесообразно применять для разделения малых количеств веществ. К тому же электрофорез на ацетате целлюлозы обладает более высокой разрешающей способностью по сравнению с электрофорезом на бумаге.

В 1960-е гг. была предложена модифицированная поддерживающая среда – желатинизированный ацетат целлюлозы, получивший название целлогеля.

2.3. Электрофорез в гелях

В этом методе в качестве опорной среды используют крахмальный, агаровый, полиакриламидный гели.

Характерной особенностью данной разновидности зонального электрофореза является высокая разрешающая способность. Дело в том, что гели являются не только поддерживающей средой, они функционируют как молекулярные сита. Принцип действия молекулярного сита состоит в том, что крупные молекулы двигаются через него тем медленнее, чем меньше размер пор в геле. Гель-электрофорез особенно ценен для разделения смесей веществ, имеющих одинаковые заряды, но слегка различающихся по массе.

Электрофорез в крахмальном геле был первым электрофоретическим методом, в котором для улучшения разделения веществ была использована среда, обладающая свойствами молекулярного сита. Этот метод был предложен в 1955 г. Крахмал – это нерастворимый в воде полисахарид. В нативном состоянии он связывает некоторое количество воды и набухает, но не способен превратиться в жидкость при повышении температуры. Путем частичного кислотного гидролиза крахмал может быть превращен в форму, представляющую собой жидкий золь при температуре выше 70оС и твердый гидрогель при комнатной температуре. Для электрофореза вполне подходит картофельный крахмал. Размер пор в геле определяется концентрацией крахмала и степенью его гидролиза. Наибольшее применение крахмальные гели нашли при разделении сложных смесей структурных и физиологически активных белков. Так, при разделении белков сыворотки крови удается получить 20–30 полос.

Агар, используемый в качестве носителя при электрофорезе, выделяют из клеточных мембран различных водорослей. Чистота и химический состав отдельных препаратов значительно различаются в зависимости от источника получения и способа очистки. Точная структура агара неизвестна. Вероятно, он содержит, по крайней мере, два полисахарида, а именно агарозу и агаропектин. Агар растворяется в водных растворах при нагревании на кипящей водяной бане, при 38оС он застывает. Агаровый гель механически прочен. После высушивания он превращается в прозрачную пленку, которую удобно фотометрировать оптическими методами и легко хранить. Кроме того, агар является и нетоксичным материалом. Агар и особенно агароза широко используются в биохимии в качестве

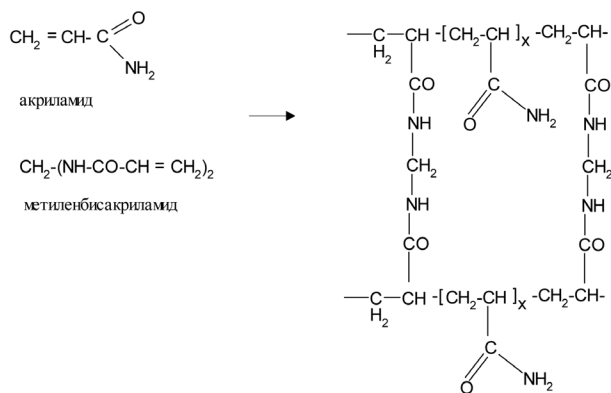
поддерживающей среды при электрофорезе, в основном для исследования макромолекул. Агаровый гель содержит большое количество воды (концентрация агарозы и агаропектина в геле всего 1 %), вследствие чего ионы в процессе электрофореза движутся очень быстро. Благодаря этому свойству агар очень удобен для разделения и обнаружения антигенов методом иммуноэлектрофореза.

Общими недостатками рассмотренных вариантов гель-электрофореза являются наличие электроэндоосмоса (хотя и меньше, чем на бумаге) и нестандартность материалов, используемых для приготовления гелей.

Самым перспективным из перечисленных выше гелей является полиакриламидный гель (ПААГ). Полиакриламидные гели введены в биологическую практику в 1959 г. Раймондом. Они лишены недостатков, характерных для крахмального и агарового гелей.

Электрофорез в ПААГе в настоящее время является самым эффективным из существующих методов и широко используется в различных областях биологии. Этот метод обладает большей разрешающей способностью по сравнению с методами, где используются другие гели. Полиакриламидный гель прозрачен, обладает значительной механической прочностью, однороден по составу, химически инертен. Размер пор у ПААГа можно варьировать в широких пределах, его можно применять с самыми различными буферами, удобно использовать для количественного определения разделяемых веществ.

Полиакриламидный гель получают непосредственно перед работой полимеризацией акриламида и метиленбисакриламида.



При этом возникает полимер сетчатой структуры, в котором линейные участки из акриламида «сшиваются» поперечными мостиками из метиленбисакриламида. Чем больше концентрация метиленбисакриламида, тем более плотной получается сетчатая структура геля. Полимеризацию проводят в присутствии тетраметилэтилендиамина (ТЕМЭДа) в качестве инициатора и персульфата аммония или калия как катализатора. Изменяя соотношение мономеров, можно регулировать величину ячеек получаемого полимера трехмерной структуры. Концентрация мономера от 2 до 30 % дает возможность получать гели пористостью от 40 до 0,1 нм. Полиакриламидный гель дает возможность исследовать растворы разной концентрации и в небольших объемах (до 0,001 мл), использовать охлаждение и проводить разделение очень быстро – в течение 60–70 минут.

При разделении макромолекул на полиакриламидном геле адсорбция и электроосмос малы. Полиакриламидный гель не поглощает ультрафиолетовый свет при 270 нм, и, следовательно, местоположение белков после разделения можно определить по поглощению при этой длине волны. И наконец, после разделения молекул их можно окрашивать и определять количество вещества с помощью денситометра – прибора, измеряющего оптическую плотность.

Вариантов проведения электрофореза в полиакриламидном геле много (вертикальный и горизонтальный, в трубках и на пластинах). Чаще других используют метод вертикального электрофореза. В нем сочетаются две системы полиакриламидных гелей: крупнопористая (верхний гель) и мелкопористая (нижний гель). В верхнем геле происходит отделение клеточного материала и уплотнение белков. В нижнем геле происходит разделение белков.

2.4. Диск-электрофорез

Электрофорез в ПААГе часто называют диск-электрофорезом. Это название происходит от двух английских слов – discontinuity, обозначающего в данном случае неоднородность электрофоретической среды, и discoid – дискообразный. Дело в том, что по случайному совпадению при стандартных условиях проведения опыта разделенные зоны имеют форму дисков.

Для диск-электрофореза характерны скачкообразные изменения рН, концентрации геля и градиента напряжения. Как известно, нижняя часть трубки заполнена разделяющим гелем с порами, которые действуют как молекулярное сито по отношению к разделяемым молекулам. Над разделяющим гелем имеется концентрирующий гель, имеющий крупные поры и поэтому не обладающий свойствами молекулярного сита. Выше располагается исследуемый раствор белка. Смысл диск-электрофореза состоит в создании очень узкой стартовой зоны, которая обеспечивает высокую разрешающую способность. Как это достигается?

Дело в том, что в состав как электродного буфера, так и буфера концентрирующего геля входит слабое аминное основание – трис, но в электродный буфер к трису прибавлена слабая кислота глицин (трис-глициновый буфер, рН = 8,3), а концентрирующий гель содержит соляную кислоту, что дает буферную систему трис-НСl, рН = 6,7.

Итак, в верхнем геле глицинатные ионы движутся медленно. Ионы хлора, наоборот, продвигаются очень быстро и стремятся догнать ведущие глицинатные. Промежуточные по подвижности анионы белков будут располагаться между первыми и вторыми ионами. В итоге происходит концентрирование белковых анионов: образуется чрезвычайно узкая белковая полоса, которая подходит к разделяющему гелю вслед за ионами хлора.

2.5. Применение метода диск-электрофореза

Метод электрофореза в полиакриламидном геле широко используется в различных отраслях биологических, экологических, химических и медицинских исследований. Приведем лишь некоторые примеры его применения:

в медицине (диагностика заболеваний – изучение белков и ферментов различных органов и тканей в норме и патологии);

в серологии (разделение белков сыворотки крови для определения родов и видов и их идентификации);

в генетике (выявление мутаций путем изучения белковых спектров);

в гистологии и цитологии (анализ компонентов клеточных фрагментов и тканей);

в ботанике (исследование белков семян растений);
в микробиологии (изучение белков бактерий, вирусов и фагов, определение принадлежности микроорганизмов к определенному штамму);
в биохимии (изучение белковых спектров, множественных молекулярных форм ферментов, разделение смесей нуклеиновых кислот в различных органах и тканях организмов);
в экологии (изучение влияния абиотических и биотических факторов окружающей среды на биохимические показатели обитающих в ней организмов).

Практическая работа 2

Фракционирование белков методом электрофореза в полиакриламидном геле

Разделение белков осуществляют в слабощелочной среде (рН 8,3–8,9)

Оборудование и реактивы. Прибор для электрофореза фирмы «Реанал», источник питания «Эльф»-8, резиновая подставка для трубок на время полимеризации геля, рефрактометр, набор пипеток и микропипеток, соляная кислота: $C(HCl) = 1$ моль/л, триоксиметиламинометан (трис), ТЕМЭД, акриламид, N,N – метиленбисакриламид, персульфат аммония, сахараза (40 %-ный раствор), глицин, амидовый черный 10 В (1 %-ный раствор в смеси этанола, ледяной уксусной кислоты и воды в соотношении 10:1:30), уксусная кислота (7 %-ный раствор), рибофлавин, свежепрокипяченная дистиллированная вода.

Материалы:

- *сыворотка крови.* Цельную кровь в широких пробирках оставляют на сутки в холодильнике. Для лучшего отделения сгустка содержимое пробирок обводят вязальной спицей. Через сутки сыворотку отбирают пипеткой с резиновой грушей. Чистая сыворотка имеет соломенно-желтый цвет. Если есть в сыворотке крови примесь форменных элементов (красный оттенок), то ее центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин;

- *экстракт белков хирономид, моллюсков.* 1 г хирономид, моллюсков замораживают в морозильной камере холодильника,

а затем растирают в фарфоровой ступке с 2 мл трис-глицинового буфера (рН = 8,6). Экстракт центрифугируют в течение 10 мин при 10 000 – 12 000 об/мин. Отбирают надосадочную жидкость. Для нанесения на гель готовят раствор в 40 %-ной сахарозе.

Выполнение работы

1. Приготовление колонок полиакриламидного геля

Для приготовления нижнего и верхнего геля используют следующие исходные растворы (их можно хранить месяц в холодильнике):

- Раствор А: раствор соляной кислоты: $C(\text{HCl}) = 1$ моль/л – 48 мл; трис – 36,6 г.; ТЕМЭД – 0,23 мл; вода – до 100 мл (рН = 8.6).

- Раствор Б: раствор соляной кислоты $C(\text{HCl}) = 1$ моль/л – 48 мл; трис-5,98 г; ТЕМЭД – 0.46 мл; вода – до 100 мл (рН = 6.7).

- Раствор В: акриламид – 30 г; бисакриламид – 0,735 г; вода – до 100 мл.

- Раствор Г: акриламид -10 г; бисакриламид – 2,5 г; вода – до 100 мл.

- Раствор Д: рибофлавин – 4,0 мг; вода – до 100 мл.

- Раствор Е: сахароза – 40 г; вода – до 100 мл.

- Раствор Ж: персульфат аммония – 0,14 г; вода – до 100 мл.

Процесс полимеризации геля ведут без доступа кислорода. С этой целью нижние концы сухих обезжиренных электрофоретических трубок (диаметр 0,6 см, длина 8 см) осторожно устанавливают в лунки резиновой подставки для трубок до момента, пока гель в них не заполимеризуется. Из запасных растворов, доведенных до комнатной температуры, готовят смесь для нижнего, разделительного геля. Для этого смешивают 1 часть раствора А, 2 части раствора В, 1 часть воды и 4 части раствора Ж. Эту смесь перемешивают и заливают в электрофоретические трубки (примерно 2 мл). На смесь сразу наслаивают пипеткой по стенке колонки слой свежепрокипяченной дистиллированной воды высотой примерно 8 мм. Полимеризация нижнего геля при комнатной температуре продолжается около часа. Для ускорения процесса полимеризации трубки с гелем помещают в термостат при температуре +37°C. Полимеризация геля в термостате длится около 30 мин. Об окончании процесса полимеризации нижнего геля можно судить

по появлению четкой границы между гелем и слоем воды над ним. После окончания процесса полимеризации геля с него удаляют воду и заливают в колонку смесь для верхнего геля. Для этого смешивают 1 часть раствора Б, 2 части раствора Г, 1 часть раствора Д и 4 части раствора Е. Смесь для верхнего геля наносят высотой 0,5 см, что составляет примерно 0,2 мл. На эту смесь снова наслаивают воду и ведут полимеризацию верхнего геля на солнечном свете или под УФ-лампой. Начало полимеризации определяют по переходу флуоресцирующего желто-зеленого цвета смеси в опаловый, а конец – по резкой границе между гелем и водой. Полимеризация верхнего геля длится 10–15 мин. После удаления воды колонки готовы для нанесения исследуемого раствора.

2. Подготовка материала для электрофоретического разделения

Оптимальное количество вносимого однородного белка на одну гелевую колонку – от 10 до 100 мкг. При выполнении данной работы следует вносить 200 мкг, так как белки сыворотки крови неоднородны. Следующий этап работы – определение содержания белка в исследуемом экстракте или сыворотке крови и разведение его до нужной концентрации. Для количественного определения содержания белка в биологическом материале чаще всего используют рефрактометрический метод или один из колориметрических методов. После определения содержания белка сыворотку крови разводят 40 %-ным раствором сахарозы до концентрации 2000 мкг в мл (на одну гелевую колонку наносят по 0,1 мл раствора, содержащего 200 мкг белка). Так как в сыворотке крови содержится примерно 9 % белка, то ее разводят раствором сахарозы в 45 раз. По 0,1 мл полученного раствора сыворотки крови наносят на приготовленный гель. Затем трубки доверху заполняют трис-глициновым буфером, разбавленным в 10 раз, снимают водонепроницаемые доньшки и укрепляют колонки в приборе для электрофореза.

Для приготовления трис-глицинового буфера (рН = 8,6) берут 6 г триса и 28,8 г глицина, растворяют их в воде и доводят объем до 1 л дистиллированной водой в мерной колбе. Этот же раствор, разбавленный дистиллированной водой в 10 раз, исполь-

зуют для заправки электродных камер прибора для электрофореза. Такой разведенный буферный раствор называют электродным буфером. Его ионная сила равна 0,075.

3. Монтаж прибора для электрофореза в полиакриламидном геле

Основные части прибора представлены на рис. 2.1.

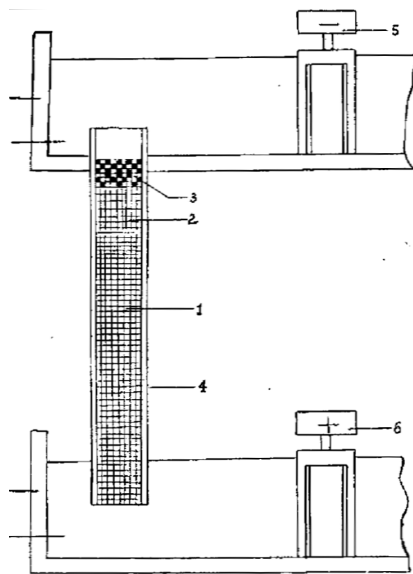


Рис. 2.1. Схема прибора для электрофореза в полиакриламидном геле: 1 – мелкопористый гель; 2 – крупнопористый гель; 3 – исследуемый раствор белка; 4 – стеклянная трубочка; 5, 6 – электроды; 7 – верхний резервуар для катодного буфера; 8, 10 – электродные буферы; 9 – нижний резервуар для анодного буфера

Угольный электрод закрепляют в центре нижнего буферного резервуара и наливают в последний охлажденный электродный трис-глициновый буфер ($\text{pH} = 8,6$). Затем стеклянные трубки с нанесенными образцами ввинчивают в отверстия, просверленные в дне верхнего резервуара. Устанавливают электрод верхнего резервуара и собранную верхнюю часть прибора присоединяют

к нижнему резервуару так, чтобы концы трубок были погружены в буферный раствор нижнего резервуара.

Удаляют воздушные пузырьки с концов трубок. Осторожно заполняют верхний резервуар трис-глициновым буфером, разбавленным в 10 раз, следя за тем, чтобы электрод был полностью погружен в раствор. В верхний резервуар добавляют 2 мл раствора бромфенолового синего, служащего индикатором окончания электрофореза.

4. Проведение электрофореза

Прибор для электрофореза подключают к источнику питания. На каждую колонку подают первые 10–15 минут силу тока 2 мА, а затем 5 мА, напряжение от 300 до 600 В, длительность электрофореза 60–70 мин, температура не выше +40С (прибор для электрофореза помещают в холодильник). Электрофорез заканчивают, когда индикаторная краска окажется на расстоянии 5–6 мм от нижнего края трубки. По окончании электрофореза прибор разбирают, трубки вынимают и извлекают из них гель. Отслаивание геля от стенок стеклянных трубок проводят тонкой металлической иглой. Хорошо использовать с этой целью мандрену от шприцевой иглы или шприц, наполненный водой. Колонку на время извлечения геля с помощью металлической иглы помещают в кристаллизатор с водой. После извлечения гелевую колонку помещают в пробирку и быстро дважды промывают дистиллированной водой. Затем ее заливают 7 %-ным раствором уксусной кислоты на 15–20 минут для фиксации зон расположения белков и отмывают дистиллированной водой (10–15 минут). Замечено, что чем лучше произошла фиксация, тем быстрее и легче отмывается гель от красителя впоследствии.

5. Обнаружение белковых фракций

Расположение фиксированных уксусной кислотой белковых фракций на колонках полиакриламидного геля определяют, окрашивая их 1 %-ным раствором амидового черного 10 В в смеси этанола, уксусной кислоты, воды (10:1:30). Для этого гелевые колонки опускают в раствор красителя на 1 мин. В результате вся колонка окрашивается в темный цвет, но только белковые фракции удерживают краситель прочно. От остальной части геля

он отмывается смесью этанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 10:1:30, заменяемой многократно.

Электрофореграмму (схему расположения белковых фракций на гелевой колонке) нужно зарисовать в тетради. Каждая белковая фракция может быть охарактеризована по интенсивности окраски и по относительной электрофоретической подвижности (ОЭП). ОЭП белковых фракций рассчитывают, деля длину пути, пройденного фракцией, на длину пути, пройденного индикаторной краской. Тот и другой путь измеряют с точностью до десятых долей миллиметра, а ОЭП рассчитывают с точностью до сотых долей.

При сравнении электрофореграмм на основании статистической обработки данных разницу в 0,01 значения ОЭП у двух фракций с величинами ОЭП вдоль колонки в пределах от 0 до 0,3 считают несущественной. Аналогично этому разницу значения ОЭП 0,02 считают несущественной в пределах от 0,3 до 0,6, а разницу в 0,03 – в пределах от 0,6 до 1,0.

Гелевые колонки после окрашивания можно фотографировать или сканировать.

6. Хранение и реставрация гелей

Гелевые колонки с окрашенными белковыми фракциями хранят много месяцев в отмывающем растворе в плотно закрытых пробирках. Высохшие электрофореграммы могут быть размочены и реставрированы в этом же отмывающем растворе.

Техника безопасности при работе методом электрофореза

Необходимо соблюдать осторожность при работе с прибором для электрофореза, составной частью которого является источник питания, имеющий высокое напряжение (до 600 В). Он должен быть надежно заземлен. Кроме того, и другие части прибора находятся под напряжением, поэтому при эксплуатации прибора следует быть осторожным.

Изоляция соединительных проводов должна быть безупречной.

Необходимо помнить, что акриламид обладает определенной токсичностью, что вызывает раздражение кожи. В связи с этим при работе с акриламидом надо остерегаться его попадания на кожу.

Контрольные вопросы

1. Что такое электрофорез и какие биологические макромолекулы можно изучать с помощью метода электрофореза?
2. Чем обусловлен суммарный электрический заряд белков?
3. От чего зависит подвижность белков в электрическом поле?
4. Какие разновидности электрофореза Вы знаете? В чем преимущество методов зонального электрофореза?
5. В чем состоит отличие электрофореза в гелях от других видов электрофореза? Каковы преимущества полиакриламидного геля?
6. Применение метода электрофореза в биологических и экологических исследованиях.
7. В чем заключаются основные этапы разделения белков методом электрофореза в полиакриламидном геле?

Литература

1. Остерман, Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. / Л. А. Остерман. – М.: МЦНМО, 2002. – 248 с.
2. Казин, В. Н. Физико-химические методы исследования в экологии и биологии: учеб. пособие / В. Н. Казин, Г. А. Урванцева. – Ярославль: ЯрГУ, 2002. – 172 с.
3. Девени, Т. Аминокислоты, пептиды и белки / Т. Девени, Я. Гергей. – М.: Мир, 1976. – 364 с.
4. Маурер, Г. Диск-электрофорез / Г. Маурер. – М.: Мир, 1971. – 247 с.
5. Гаспаров, В. С. Определение белка по связыванию с красителем кумасси бриллиантовым голубым G-250 / В. С. Гаспаров, В. С. Дектярь // Биохимия. – 1994. – Т. 56, № 6. – С. 763–767.

2.6. Метод энзимэлектрофореза в полиакриламидном геле

Существует два основных способа обнаружения активности ферментов в полиакриламидном геле: инкубирование геля с субстратом после окончания электрофореза и электрофорез с субстратом, непосредственно добавленным в гель.

В первом случае гель вынимают из трубки и выявляют ферментативную активность отдельных белковых фракций непосредственно

ственно на гелевых колонках с помощью химических реакций, протекающих в специально подготовленных инкубационных средах. Инкубационные среды специфичны для каждого фермента, так как содержат его субстрат и буфер с оптимальным для фермента рН. При последующем добавлении красителя в местах локализации фермента обнаруживают окрашенные зоны вследствие образования продукта химической реакции.

При втором способе субстрат вводят при приготовлении поликриламидного геля вместо воды. После окончания электрофореза гель инкубируют в соответствующем буфере, а затем добавляют раствор красителя. При этом происходит цветная реакция с самим субстратом в геле, а зоны ферментативной активности не окрашены.

Практическая работа 3 *Обнаружение α -амилазы*

в тканях животного происхождения *методом электрофореза в полиакриламидном геле*

Ферменты амилазного комплекса ускоряют гидролиз полисахаридов (крахмала, гликогена) с образованием разнообразных промежуточных и конечных продуктов.

Как известно, крахмал существует в двух формах: в виде амилозы и амилопектина. Амилоза состоит из длинных неразветвленных цепей, в которых все Д-глюкозные остатки соединены α -1,4 связями. Цепи эти полидисперсны. Их молекулярная масса варьирует от нескольких тысяч до 500 000. В воде амилоза не дает истинного раствора, но образует гидратированные мицеллы, которые при добавлении йода окрашиваются в синий цвет. Цепи амилопектина сильно разветвлены. Остов молекулы амилопектина имеет α -1,4 гликозидные связи, а в точках ветвления α -1,6 связи. Амилопектин образует коллоидные растворы, которые при добавлении йода окрашиваются в красно-фиолетовый цвет. Молекулярная масса амилопектина может достигать 1 млн.

Основные компоненты крахмала гидролизуются ферментативным путем разными способами. Амилоза может быть гидролизована при участии α - и β -амилаз. α -амилаза или 1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, ускоряет гидролиз α -1,4 связей без какого-

либо определенного порядка, в результате чего сначала возникают олигосахариды, которые также подвержены действию α -амилазы, если они содержат три и более остатков Д-глюкозы. В конечном счете получается смесь α -мальтозы и Д-глюкозы. α -амилаза найдена у всех растений и животных.

Фермент β -амилаза (или α -1,4-глюканмальтогидролаза) ускоряет реакцию гидролиза амилозы по 1,4 связям, последовательно отщепляя остатки β -мальтозы с нередуцирующего конца. β -амилаза характерна только для высших растений.

В природе найдена также γ -амилаза, или α -1,4-глюканглюкогидролаза, ускоряющая гидролиз 1,4-связей в крахмале так, что последовательно отщепляются остатки глюкозы, начиная с нередуцирующего конца.

Амилопектин также гидролизуется при участии α , β , γ -амилаз, но так как все эти амилазы не способны расщеплять α -1,6-связи в точках ветвления амилопектина, то конечным продуктом при действии амилаз на амилопектин является крупная, сильно разветвленная «сердцевина» полисахарида, называемая остаточным декстрином. α -1,4-связи в нем гидролизуются при участии особых ферментов (α -1,6-глюкозидаз).

В исследуемых препаратах в основном содержится α -амилаза. Выявление ферментативной активности амилазы проводят, используя реакцию взаимодействия крахмала и продуктов его гидролиза с йодом.

Оборудование и реактивы. Приборы и реактивы для определения общего белка, приборы и реактивы для проведения электрофореза в ПААГе, трис-глициновый буфер, разбавленный в 5 раз, 1 %-ный раствор растворимого крахмала, ацетатный буфер (рН = 5,6), раствор йода, тканевые экстракты, термостат на 37°C.

Выполнение работы

Колонки полиакриламидного геля готовят в соответствии с прописью, приведенной ранее в работе 1, только вместо 1 части воды при приготовлении нижнего геля берут 1 часть раствора крахмала. В исследуемом образце определяют содержание белка и разбавляют его 40 %-ным раствором сахарозы до содержания белка 4 000–6 000 мкг/мл. На каждую колонку полиакриламидного геля наносят по 0,1 мл белкового экстракта, содержащего

400–600 мкг белка, и проводят электрофоретическое разделение по методу, описанному ниже. По завершении электрофореза гелевую колонку извлекают из трубки и инкубируют в ацетатном буфере (рН = 5,6) при 37°C в течение часа, затем буферный раствор сливают, гель промывают водой и заливают раствором йода.

ВНИМАНИЕ! *Перед употреблением раствор йода разбавляют в 6 раз.*

Окрашивание проводят в течение 1–3 минут. Далее раствор йода сливают и гелевые колонки заливают водой. Гелевая колонка окрашивается в синий цвет, а в отдельных зонах, где разрушен крахмал, введенный в состав геля, имеются неокрашенные участки. Эти участки показывают наличие α -амилазы.

Схему расположения форм α -амилазы на гелевой колонке нарисовать в тетради, посчитать ОЭП фракций.

Контрольные вопросы

1. В чем состоит метод энзимэлектрофореза? Каковы способы обнаружения ферментов методом энзимэлектрофореза?
2. Каков принцип действия амилаз?
3. Каков принцип выявления α -амилазы методом энзимэлектрофореза в полиакриламидном геле?

Литература

1. Остерман, Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерман. – М.: МЦНМО, 2002. – 248 с.
2. Казин, В. Н. Физико-химические методы исследования в экологии и биологии: учеб. пособие / В. Н. Казин, Г. А. Урванцева. – Ярославль: ЯрГУ, 2002. – 172 с.

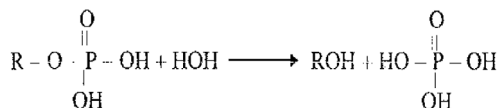
Практическая работа 4

Обнаружение кислой фосфатазы методом электрофореза в полиакриламидном геле

Оборудование и реактивы. Приборы и реактивы для определения концентрации белка в пробах; приборы и реактивы для проведения электрофореза в ПААГе; трис-глициновый буфер, разбавленный в 5 раз; ацетатный буфер: С(ацетатного буфера) =

0,2 моль/л (рН = 4,8); I-нафтилфосфат; прочный синий Б; тканевые экстракты; термостат на 37°C.

Кислая фосфатаза принадлежит к классу гидролаз. Фосфатазы расщепляют эфирную связь между фосфатом и остатком спирта (R):



Данный фермент имеет огромное значение в общем метаболизме клетки. Кислая фосфатаза принимает участие как в деструктивных процессах, так и в реакциях анаболизма, являясь ключевым ферментом благодаря широкой субстратной специфичности и многообразию изоформ, которыми представлен энзим в клетках большинства организмов.

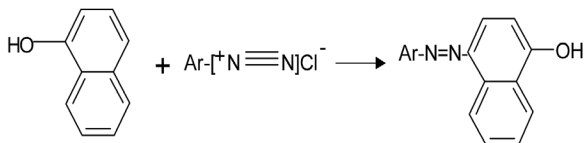
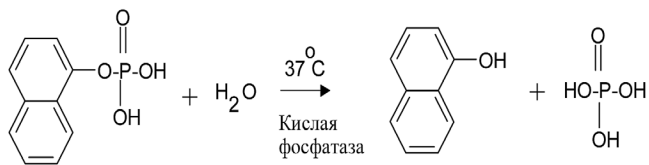
Все это вызывает давний и заслуженный интерес как теоретического, так и прикладного характера к изучению кислой фосфатазы.

Кислая фосфатаза (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты (3.1.3.2)).

Колонки полиакриламидного геля готовят в соответствии с приведенной ранее прописью. В исследуемом образце определяют содержание белка по методу Лоури и разбавляют его 40 %-ным раствором сахарозы до содержания белка 4000–6000 мкг/мл. На каждую колонку полиакриламидного геля наносят по 0,1 белкового экстракта и проводят электрофоретическое разделение белков.

Для обнаружения кислой фосфатазы гелевую колонку с электрофоретически фракционированными белками помещают сначала в инкубационную смесь, состоящую из 9 мл ацетатного буфера: С(ацетатного буфера) = 0,2 моль/л (рН = 4,8) и 3 мг I-нафтилфосфата на 10 минут (выдерживают в термостате при 37°C). Затем в смесь добавляют 1 мл раствора прочного синего Б (2 мг в 1 мл воды) и выдерживают в термостате еще 20 минут. Зоны локализации кислой фосфатазы окрашиваются в малиново-красный цвет.

Окраска развивается в результате взаимодействия между 1-нафтолом, образующимся при гидролизе субстрата (1-нафтилфосфата) в присутствии кислой фосфатазы, и солью диазония (прочным синим Б) с образованием нерастворимого азосоединения.



Схему расположения белковых фракций, обладающих эстеразной активностью, зарисовать в тетради. Подсчитать ОЭП полученных фракций.

Контрольные вопросы

1. К какому классу и подклассу ферментов относится кислая фосфатаза?
2. Каковы принципы выявления кислой фосфатазы методом электрофореза в полиакриламидном геле?

Литература

1. Ленинджер, А. Основы биохимии: в 3 т. / А. Ленинджер; пер. с англ. – М.: Мир, 2009.
2. Коницев, А. С. Ферменты как биохимические маркеры загрязнения воды / А. Коницев и др. // Приложение к Вестнику МГОУ. Серия «Естественные науки». – М.: Изд-во МГОУ, 2005. – С. 151–153.
3. Цветков, И. Л. Оценка качества сточных и природных вод с помощью биохимического показателя – активности кислой фосфатазы пресноводных моллюсков / И. Л. Цветков и др. // Водные ресурсы. – 2006. – Т. 33, № 1. – С. 62–70.
4. Цветков, И. Л. Кислая фосфатаза гидробионтов как фермент-индикатор биохимической адаптации к воздействию токсических веществ / И. Л. Цветков и др. // Изв. АН. Сер. Биология. – 1997. – № 5. С. 539–545.

3. Хроматографические методы анализа

3.1. Общие принципы хроматографии

История развития хроматографических методов, определения и теоретические основы

Хроматографический метод разделения и анализа веществ был открыт в 1903 г. русским ботаником М. С. Цветом при пропускании сложной смеси растительных пигментов (петролейно-эфирной вытяжки из листьев растений) через трубку (колонку) с карбонатом кальция. В колонке образовался ряд окрашенных зон, что и дало название методу. Слово «хроматография» состоит из двух корней греческого происхождения, означающих «цвет» и «писать». М. С. Цвет назвал метод хроматографией, то есть цветописью, указывая на возможность разделения и бесцветных веществ.

В 1938 г. появился вариант тонкослойной хроматографии. Он был предложен отечественными учеными Н. А. Измайловым и М. С. Шрайбер. Однако широкие возможности этого метода были открыты позднее благодаря работам Ю. Кирхнера и Э. Шталя.

Началом современной хроматографии принято считать 1941 г., когда американские ученые Л. Мартин и Р. Синдж, ставшие впоследствии лауреатами Нобелевской премии, разработали метод распределительной хроматографии и дали его теоретическое обоснование. Эти же авторы указали на возможность осуществления газожидкостной хроматографии. Следствием этих работ стало огромное количество исследований, направленных на развитие метода газовой хроматографии. Метод газовой хроматографии – первый из хроматографических методов, получивший инструментальное обеспечение. Середина 70-х гг. XX в. ознаменована рождением высокоэффективной колоночной хроматографии (ВЭКХ). В это время появились первые жидкостные хроматографы. Среди разнообразных методов анализа хроматография отличается самой высокой степенью информативности благодаря одновременной реализации функций разделения, идентификации и определения. В настоящее время хроматография – один из самых распространенных и универсальных методов в исследовательской работе, нашедший применение в биологии,

экологии, химии, медицине, на производстве. Эффективность метода повышается при сочетании с другими методами анализа, автоматизацией и компьютеризацией процессов разделения, обнаружения и количественного определения.

Хроматографией называют физико-химический метод, основанный на различии скорости переноса растворенных веществ в системе двух фаз, одна из которых подвижна.

Отличительной чертой хроматографического метода является разделение смеси веществ на основе распределения между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых **неподвижная**, а другая – **подвижная**, непрерывно протекающая через неподвижную фазу. В роли подвижной фазы чаще всего выступает газ или жидкость, а в качестве неподвижной фазы – жидкость или твердое вещество. Разделение может происходить за счет установления:

а) адсорбционного равновесия между неподвижной твердой и подвижной жидкой фазами (адсорбционная хроматография);

б) равновесного распределения между неподвижной жидкой и подвижной газовой фазами (газо-жидкостная хроматография);

в) равновесного распределения между неподвижной жидкой и подвижной жидкой фазами (хроматография на бумаге);

г) ионообменного равновесия между ионообменной смолой (неподвижная фаза) и электролитом (подвижная фаза) (ионообменная хроматография);

д) равновесия между жидкой фазой на внутренней и внешней поверхностях пористой структуры или «молекулярного сита» (эксклюзионная или проникающая хроматография);

е) равновесного связывания макромолекулы с малой молекулой, по отношению к которой она проявляет высокую биологическую специфичность, а следовательно, и сродство (аффинная хроматография).

Во всех случаях разделение компонентов происходит вследствие разности в коэффициентах распределения между подвижной и неподвижной фазами. Закон распределения описывает динамическое равновесие, в котором молекулы непрерывно обмениваются между фазами. Равновесное распределение анализируемого вещества между несмешивающимися фазами характеризуется коэффициентом распределения K .

Коэффициент распределения определяется как отношение концентраций анализируемого вещества в подвижной и неподвижной фазе. Его можно выразить, написав вместо концентраций среднее время пребывания молекул каждого из компонентов в неподвижной и подвижной фазах.

3.2. Классификация хроматографических методов

Многообразие вариантов хроматографического метода вызвало необходимость их систематизации. Предложено несколько классификаций хроматографических систем. Наиболее распространенной является систематизация их по четырем признакам.

1. В зависимости от агрегатного состояния фаз. Сюда отнесены два варианта хроматографии – газовая (газо-адсорбционная и газожидкостная) и жидкостная (жидкостно-жидкостная и жидкостно-адсорбционная).

Газовая хроматография. Подвижной фазой является газ (или пар). В газо-адсорбционной (точнее, газо-твердой) хроматографии неподвижной фазой является твердый адсорбент, а в газожидкостной – жидкость, нанесенная на твердый носитель.

Жидкостная хроматография. Подвижной фазой служит жидкость. В жидкостно-адсорбционной хроматографии неподвижной фазой является твердый адсорбент, в жидкостно-жидкостной хроматографии – жидкость, удерживаемая твердым носителем, в ионообменной – сорбент-ионит.

2. В зависимости от механизма, лежащего в основе равновесного распределения. Включает адсорбционную, распределительную (хроматография на бумаге), ионообменную, проникающую и аффинную хроматографии. Для каждой из них характерны свои особенности.

Адсорбционная хроматография. Разделение основано на различиях в адсорбируемости компонентов смеси на данном адсорбенте.

Распределительная хроматография. Разделение основано на различии в растворимости веществ в подвижной и неподвижной фазах.

Ионообменная хроматография. Разделение зависит от констант равновесия между ионообменной смолой (неподвижной фазой) и электролитом (подвижной фазой).

Проникающая хроматография (эксклюзионная, гель-хроматография). Деление веществ обусловлено тем, что молекулы разделяемой смеси отличаются по размеру и, следовательно, обладают разной способностью проникать в поры геля (неподвижную фазу).

Аффинная хроматография. Основана на уникальном свойстве макромолекул – их биологической специфичности. Широко используется для очистки высокомолекулярных биологических соединений.

3. В зависимости от формы проведения процесса. Различают колоночную и плоскостную (тонкослойную и бумажную) хроматографии.

Колоночная хроматография отличается тем, что процесс проводится в хроматографических колонках – трубках, которые наполнены адсорбентом или носителем, содержащим подвижную фазу.

Плоскостная (планарная) хроматография осуществляется в плоском слое сорбента (неподвижной фазе). Она различается на бумажную и тонкослойную хроматографию. В первой в качестве сорбента используется специальная бумага, во второй процессы разделения происходят в тонких слоях сорбента, нанесенного на инертную твердую подложку или в пленках пористого полимерного материала.

4. В зависимости от цели проведения хроматографического процесса различают аналитическую, неаналитическую, препаративную и промышленную хроматографии.

Аналитическая хроматография предназначена для определения качественного и количественного состава исследуемых смесей.

Неаналитическая хроматография – метод исследования физико-химических характеристик веществ при использовании хроматографической аппаратуры.

Препаративная хроматография применяется для выделения небольших количеств очень чистых компонентов в лабораторных условиях.

Промышленная хроматография применяется для выделения чистых веществ в значительных количествах.

В последнее время появились приборы, позволяющие проводить разделение соединений методами хроматографии под высоким давлением. В этом случае неподвижную фазу помещают

в узкую стальную колонку, в которую затем под давлением нагнетают подвижную жидкую фазу. Применение высокого давления позволяет использовать значительно более длинные колонки и одновременно сокращать время разделения. Метод универсален, так как может применяться в адсорбционной, распределительной, ионообменной и проникающей хроматографиях.

3.3. Применение методов хроматографии

Наибольшей разрешающей способностью отличается интенсивно разрабатываемая в последние годы высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), когда для ускорения процесса хроматографирования проводят под давлением. В зависимости от типа применяемого сорбента в данном методе применяют два варианта хроматографирования: на полярном сорбенте с использованием неполярного элюента (вариант прямой фазы) и на неполярном сорбенте с использованием полярного элюента (обращенно-фазовая ВЭЖХ). Большинство анализов при помощи ВЭЖХ проводят вторым вариантом. Этот метод хроматографии позволяет проводить микроколичественный анализ веществ в ультрамалых количествах и за короткое время с использованием высокочувствительных детекторов в микроколоночном варианте. Удобство и быстрота обработка аналитической информации, получаемой на хроматографах, обеспечивается вычислительным комплексом, укомплектованным пакетом программ широкого назначения. ВЭЖХ приходит на смену гель-проникающей хроматографии и другим хроматографическим методам. Метод широко применяется для анализа белков, производных аминокислот и других соединений.

Простота, эффективность, универсальность хроматографических методов обусловили их широкое применение в биологии, экологии, химии, физике, медицине и многих других направлениях, в лабораторных и промышленных условиях.

Хроматографические методы находят с каждым годом все большее применение в анализе и мониторинге токсикантов в окружающей среде. В литературе описано достаточно большое число методик по определению хлор-, азот- и фосфорорганических пестицидов, полихлорированных и полибромированных бифенилов, нитроароматических соединений, полиароматических углеводо-

родов (ПАУ) методом газовой хроматографии. С помощью тонкослойной хроматографии определяют пестициды и продукты их метаболизма в почвах, грязевых шламмах и почвенных водах, а также в питьевой воде и водах минеральных источников. Метод ВЭЖХ в последние годы считается одним из наиболее важных в определении следовых количеств пестицидов и полиароматических углеводородов, в анализе пищевых продуктов и фармацевтических препаратов. В отличие от газовой хроматографии этот метод используется для анализа термически нестойких, нелетучих или очень полярных соединений. Широко используется также сочетание тонкослойной хроматографии с ВЭЖХ. Например, такой прием применяют при анализе сточных вод.

В настоящем учебном пособии описаны основные и наиболее доступные для использования методы хроматографического анализа, применяемые в студенческих практикумах и при выполнении курсовых и дипломных работ.

Контрольные вопросы

1. В чем состоят теоретические основы методов хроматографии?
2. Каковы принципы классификации хроматографических методов?
3. Проанализируйте основные виды хроматографии и их применение в биологии и химии.

Литература

1. Казин, В. Н. Физико-химические методы исследования в экологии и биологии: учеб. пособие / В. Н. Казин, Г. А. Урванцева. – Ярославль: ЯрГУ, 2002. – 172с.
2. Шаповалова, Е. Н. Хроматографические методы анализа. Методическое пособие для специального курса / Е. Н. Шаповалова, А. В. Пирогов. – М.: Изд-во МГУ, 2007. – 204 с.
3. Хроматографические методы анализа объектов окружающей среды: метод. указания. – Екатеринбург, 2008. – 260 с.
4. Беленький, Б. Г. Капиллярная жидкостная хроматография / Б. Г. Беленький, Э. С. Ганкина, В. Г. Мальцев. – Л.: Наука, 1983. – С. 5–45, 168–189.

5. Евгеньева, И. И. Планарная хроматография и анализ органических веществ / И. И. Евгеньева // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 11. – С. 50–56.

6. Карцова, А. А. Жидкостная хроматография в медицине / А. А. Карцова // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 11. – С. 35–41.

7. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография / Ю. Кирхнер. – М.: Мир, 1981.

8. Хроматография в тонких слоях / под ред. Э. Шталя. – М.: Мир, 1965. – 508 с.

9. Лебухов, В. И., Физико-химические методы исследования: учебник / В. И. Лебухов, А. И. Окара, Л. П. Павлюченкова; под ред. А. И. Окара. – СПб.: Лань, 2012. – 480 с.

3.4. Жидкостная хроматография

Жидкостная хроматография, в свою очередь, разделяется на жидкостно-адсорбционную, жидкостно-жидкостную и ионообменную хроматографию.

3.4.1. Жидкостно-адсорбционная хроматография

В жидкостно-адсорбционной хроматографии неподвижной фазой служит твердый адсорбент, а подвижной – жидкость. Она основана на различии степени сорбции-десорбции разделяемых компонентов на неподвижной фазе.

Адсорбент в общепринятом смысле представляет собой твердое вещество, способное удерживать на своей поверхности молекулы. Эта способность особенно ярко выражена в тех случаях, когда поверхность адсорбента содержит большое количество мелких пор.

Адсорбенты подразделяются на неполярные (гидрофобные) – активированный уголь – и полярные (гидрофильные) – силикагель, оксид алюминия, искусственные и природные силикаты. Адсорбционное сродство полярных веществ с полярными адсорбентами значительно выше неполярных. Это различие используется при выборе адсорбентов. Сорбция может быть специфической, что позволяет избирательно адсорбировать одно вещество из смеси.

3.4.1.1. Хроматография на колонке

Колонка для адсорбционной хроматографии представляет собой стеклянную трубку, заполненную адсорбентом. На адсорбент в колонке наносят смесь веществ. Затем через них пропускают растворитель или смесь растворителей, служащих подвижной фазой, т. е., как правило, применяют проявительный способ хроматографии. Разделение основано на том, что вещества с более высоким эффективным коэффициентом распределения продвигаются на колонке с большей скоростью, отделяясь таким образом от веществ более низким коэффициентом.

Если исследуемые вещества окрашены, то при разделении можно видеть движение по колонке окрашенных зон. Образующиеся в результате разделения зоны извлекают одним из двух способов. В первом случае столбик сорбента выталкивают из колонки, зоны разделяют шпателем. Затем элюируют из зон разделенный материал. Другой способ состоит в том, что растворитель (элюент) пропускают через колонку до тех пор, пока не соберут все фракции по мере их выхода. Этот способ применяется чаще.

Если разделяемые с помощью хроматографии на колонке вещества не окрашены, то весь выходящий из колонки раствор (элюент) собирают в виде фракций, а потом анализируют их. При этом часто элюат контролируют, освещая, например, ультрафиолетовыми лучами. При выходе чистого растворителя флуоресценция отсутствует, а возникает во время появления примесей компонентов.

Для получения адсорбционных хроматограмм применяют растворители, обладающие слабой адсорбируемостью на применяемых адсорбентах. При выборе растворителя руководствуются правилом, согласно которому неполярные адсорбенты адсорбируют из полярных растворителей, особенно из воды и спирта, значительно хуже, чем из полярных; полярные же адсорбенты слабее адсорбируют из полярных растворителей. В большинстве случаев вымывание осуществляется за счет увеличения полярности растворителя (градиентная элюция).

Эффективность разделения зависит от правильного заполнения колонки адсорбентом. Если плотность заполнения колонки неодинакова, особенно у стенок, то при анализе окрашенных ве-

ществ можно обнаружить затекание, т. е. проникновение вещества из одной зоны в другие. Затекание может привести к сильному снижению эффективности разделения, оно особенно опасно при разделении неокрашенных веществ, так как в этом случае его трудно обнаружить в ходе хроматографии.

В настоящее время жидкостно-адсорбционная хроматография на колонке применяется при разделении и изучении состава углеводов, фенолов, углеводовородов, липидов, стероидов, производных аминокислот, компонентов нуклеиновых кислот, алкалоидов, пестицидов, витаминов и других веществ.

3.4.1.2. Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Тонкослойная хроматография занимает особое место среди других хроматографических методов благодаря простоте методики и доступности оборудования, широкой области применения, высокой экономичности, достаточно высокой селективности и чувствительности.

Данный метод успешно применяется для разделения очень малых количеств веществ (до 0,1–0,005 мкг). Впервые на тонком слое были разделены алкалоиды лекарственных растений. В отличие от колоночной хроматографии при ТСХ слой сорбента наносят на горизонтальную стеклянную, металлическую или пластмассовую пластинки (ТСХ с незакрепленным слоем) или применяют закрепление слоя крахмалом, сульфатом кальция и другими связывающими агентами. Кроме того, можно использовать выпускаемые промышленностью ЧССР (фирма Кавалиер) готовые пластинки для ТСХ с закрепленным слоем силикагеля на алюминиевой фольге (силуфоловые пластинки) или подобные им пластины для тонкослойной хроматографии «Sorbfil» отечественного производства.

Для приготовления незакрепленного слоя можно применять различные сорбенты, но чаще всего используют оксид алюминия и силикагель. На пластинку насыпают слой сорбента и раскатывают его валиком, снимая им избыточное количество вещества. Валиком может служить стеклянная палочка диаметром 10 мм и длиной несколько больше, чем ширина пластинки. На концы палочки надевают кольца из резиновой трубки, толщина которых определяет толщину слоя сорбента, т. е. трубку подбирают такой,

чтобы при накатывании образовался слой в 1 мм. Кольца надевают на палочку на таком расстоянии, чтобы по обеим сторонам пластинки оставались свободные от сорбента полосы. Для приготовления закрепленных слоев в качестве сорбентов чаще всего используют силикагель, оксид алюминия, целлюлозу, полиамид, кизельгур. В этом случае на стеклянную пластинку (9x12 см или 13x18 см) наносят смесь сорбента со связующими веществами и водой в виде кашицы. Смесь распределяют равномерно по всей поверхности пластинки слоем 100–300 мкм. Нанесенный слой оставляют на строго горизонтальной поверхности (20–25 ч). Для получения более активного слоя пластинку выдерживают при 110–120°C в течение 30 мин. При использовании готовых пластинок полоску материала нужного размера отрезают ножницами.

Процедура анализа смеси веществ методом ТСХ такова. На расстоянии 1,5–2 см от короткого края пластинки проводят поперечную линию, являющуюся линией старта, и на нее капиллярами, микропипетками или микрошприцами в виде точки или полоски наносят анализируемую смесь и стандартные вещества («свидетели»). В одну точку можно наносить 50 мкг 1 мг вещества. После нанесения образцов на сорбент пластинку переносят в герметичную камеру для хроматографического анализа и погружают в растворитель, который выполняет роль подвижной фазы. Растворитель (или смесь растворителей) заливают заранее в хроматографическую камеру, чтобы в ней установилась равновесная упругость паров. В противном случае растворитель, поднимаясь вверх по пластинке, будет интенсивно испаряться, что отразится на качестве разделения. При погружении пластинки в растворитель нужно следить за тем, чтобы стартовая линия была выше уровня растворителя. Под действием капиллярных сил растворитель движется вдоль слоя сорбента и с разной скоростью переносит компоненты смеси, что приводит к их разделению. Принцип разделения такой же, как в других видах хроматографии, – неодинаковое сродство разделяемых веществ к подвижной жидкой фазе и стационарному сорбенту. После достижения растворителем линии фронта пластинку высушивают и проводят идентификацию компонентов смеси. Многие вещества не обнаружива-

ются в видимой области, и для их определения невидимые зоны (пятна) проявляют опрыскиванием пластины ТСХ специальными реагентами. Неокрашенные вещества иногда выявляют также с помощью выдерживания пластинки в течение нескольких минут в парах йода, или ее облучают УФ-лучами или проводят термическую деструкцию разделяемых веществ.

Важной характеристикой степени разделения определяемых соединений является величина R_f – отношение расстояния от центра пятна на пластинке до линии старта (x) к расстоянию (y), пройденному растворителем от линии старта до линии фронта. Величина R_f является характеристикой природы определяемого соединения.

Поскольку величина R_f зависит от свойств сорбента и растворителя, используемых для разделения, необходимо сравнение величин R_f исследуемого вещества со стандартным веществом-«свидетелем», наносимым на ту же пластинку. «Свидетелем» служит предполагаемое чистое вещество. Идентификацию веществ (качественный анализ) можно проводить по равенству значений R_f анализируемого вещества и стандарта («свидетеля») как это показано на рис. 3.1.

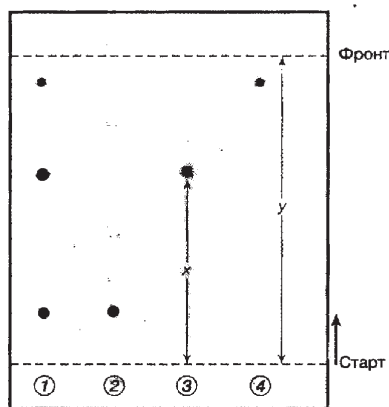


Рис. 3.1. Схема анализа методом ТСХ:
1-анализируемая смесь,
2-4 - стандартные вещества («свидетели»)

Количественный анализ осуществляют или непосредственно на хроматограмме, или анализируемое вещество вымывают из слоя сорбента и полученный раствор анализируют с помощью спектральных и радиометрических методов. Для количественных определений в ТСХ широко используются денситометры, которые измеряют интенсивность поглощения электромагнитного излучения при сканировании хроматографической пластинки.

В последние годы метод ТСХ получил новый импульс для развития и наблюдается возрастание его роли в хроматографических методах. Это связано с меньшей стоимостью оборудования для ТСХ, разработкой двумерного и радиального вариантов разделения, внедрением пластин для высокоэффективной хроматографии, появлением систем автоматизированного многократного хроматографического проявления (АМХП). В двумерной хроматографии пробу наносят в виде отдельного пятна в нижний угол пластинки и проводят разделение в одном направлении. Затем пластинку вынимают из камеры, высушивают и проводят разделение в другой системе растворителей в направлении, перпендикулярном первому. В радиальной хроматографии растворитель с регулируемой скоростью подают в центр пластинки, заставляя зоны перемещаться от центра к периферии. Это позволяет существенно ускорить процесс разделения.

Особенно перспективной является методика АМХП. Она удобна для определения пестицидов и продуктов их метаболизма в почвах, грязевых шламах, а также в питьевой воде и водах минеральных источников. Хроматографическое разделение проводят в АМХП-системе, работа которой управляется и контролируется при помощи компьютера. Проводят многократное хроматографическое проявление (прогон растворителя). При таких многоступенчатых проявлениях (до 25 шагов) возможно разделение до 40 веществ на разделительной полосе длиной 8 см.

Большое значение имеет развитие высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). За счет создания принудительного движения подвижной фазы с регулируемой скоростью, уменьшения размера частиц сорбента (до 5–7 мкм) и насыщения пространства над пластиной парами растворителя удается существенно ускорить процесс и повысить четкость разделения.

Как отмечалось, в настоящее время широко используется сочетание ТСХ с высокоэффективной жидкостной хроматографией. При этом первоначально анализируемый образец разделяют на колонках ВЭЖХ. После этого отдельные фракции наносят на пластинки ТСХ и проводят разделение с использованием методики АМХП. Таким образом, в анализируемой смеси разделяется до 30 отдельных фракций. В каждой из этих фракций, в свою очередь, на пластинке ТСХ определяется до 10 соединений. В отдельных случаях в образцах сточных вод обнаруживали до 300 веществ. Такой прием продемонстрировал эффективность совместного использования двух методов при определении веществ в диапазоне концентраций от нанограммов до пикограммов.

Использование пластинок с более толстым слоем адсорбента (до 5 мм) позволяет хроматографировать гораздо большее количество материала (препаративная ТСХ). При этом удается проводить не только анализ, но и получать достаточные для микрометодов количества чистых веществ. В этом случае пробу наносят не в виде пятен, а полосой вдоль одной из сторон пластинки. После хроматографирования соединения располагаются на пластинке в виде отдельных полос.

На практике в тонком слое сорбента адсорбционная хроматография часто сопровождается распределительной. Это происходит в тех случаях, когда разделение проводят на слабо активных сорбентах в системах, содержащих воду (например, на А1203).

Ниже приведены некоторые примеры использования метода ТСХ.

Практическая работа 5

Определение состава смеси аминокислот методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое

Объекты исследования: спиртовые растворы аминокислот – лейцина и глицина.

Оборудование и реактивы. Стеклопластиковые пластинки размером 9х12 см; пластинки «Sorbfil»; фарфоровая ступка с пестиком; термостат на 110°C; пульверизатор для опрыскивания нингидрином

хроматографических пластинок; цилиндры на 10, 50 мл; эксикаторы; электроплитка; асбестовая сетка; капиллярные пипетки; карандаш; лейцин и глицин: $C(\text{лейцина и глицина}) = 0,1$ моль/л в 20 %-ном этиловом спирте; 1 %-ный раствор нингидрина в ацетоне; бутанол; уксусная кислота; силикагель; гипс.

Выполнение работы

Приготовление закрепленного слоя силикагеля. В фарфоровой ступке растирают 2 г силикагеля, 100 мг гипса (можно использовать силикагель, содержащий 13 % гипса). Добавляют затем 5 мл воды и быстро смешивают. Образовавшуюся суспензию наливают на пластинку размером 9x12 см, которую держат при этом в горизонтальном положении большим и указательным пальцами левой руки. Нанесенный слой разравнивают сначала пестиком, затем осторожным покачиванием пластинки в поперечном и продольном направлениях, после чего пластинку оставляют на строго горизонтальной поверхности до полного закрепления нанесенного слоя (20–25 ч). Для приготовления более активного слоя сразу же после его получения пластинку нагревают в термостате при 80°C в течение часа или при 110°C в течение 30 мин. До употребления пластинки хранят в эксикаторах.

Хроматография аминокислот. В эксикаторы, служащие хроматографическими камерами, за 1 час до разделения наливают по 40 мл смеси бутанола, уксусной кислоты, воды в соотношении 4:1:1.

Для проведения анализа берут пластинки с закрепленным слоем силикагеля, силуфоловую пластинку или пластину для тонкослойной хроматографии «Sorbfil». Смесь аминокислот и стандартные растворы лейцина и глицина наносят на стартовую линию хроматографических пластинок, осторожно проведенную мягким простым карандашом на расстоянии 1,5 см от короткого края пластинок. Точки нанесения также отмечают карандашом так, чтобы между ними было расстояние не менее 1 см. Растворы аминокислот наносят специальными капиллярными пипетками с хорошо отшлифованными концами, стараясь не повредить слоя сорбента и не допуская расплывания нанесенного раствора до пятна диаметром более 0,2 см. В точки 1 и 2 наносят растворы отдельных аминокислот, а в точку 3 – их смесь (рис. 3.2).

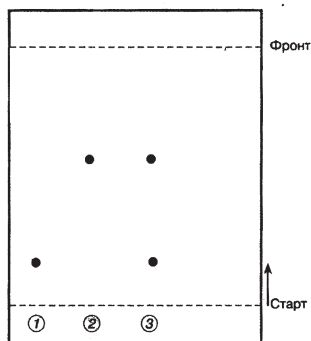


Рис. 3.2. Схема разделения веществ на пластинке с тонким слоем сорбента

Хроматографическую пластинку с нанесенными растворами аминокислот помещают в эксикатор с растворителями и закрывают его крышкой (нужно следить за тем, чтобы растворитель был ниже линии старта). Процесс хроматографирования длится около часа. По истечении указанного срока пластинку высушивают в сушильном шкафу или на электроплитке, покрытой асбестом. Высушенную пластинку опрыскивают с помощью пульверизатора 1 %-ным раствором нингидрина в ацетоне. Затем пластинку нагревают в течение 8–10 мин на электроплитке или выдерживают ее в термостате при температуре 110–130°C до появления пятен аминокислот. На основании полученных данных вычисляют для аминокислот значения Rf-индексов и сравнивают их между собой; сопоставляют положение пятен аминокислот на закрепленном слое силикагеля с гипсом и на готовых пластинках. Необходимо сделать рисунки хроматограмм и выводы по результатам опыта.

Практическая работа 6.

Определение углеводов

методом тонкослойной хроматографии

Объекты исследования. Культуральная среда, вода или водный экстракт из клеточной массы.

Оборудование и реактивы. Стеклопластинки размером 13x18 см; стеклянная камера для хроматографирования; сушиль-

ный шкаф; эксикатор; силикагель марки КСК; медицинский гипс; борная кислота: $C(\text{борной кислоты}) = 0,1$ моль/л; 20 %-ный раствор серной кислоты; 0,2 %-ный раствор нафторезорцина в этаноле; метилэтилкетон; этанол; уксусная кислота; пульверизатор.

Выполнение работы

Пластинки для получения тонкослойных хроматограмм получают быстрым нанесением на поверхность стекла смеси толщиной 0,1–0,2 мм, состоящей из 6,11 г силикагеля, 0,32 г медицинского гипса и 18 мл борной кислоты: $C(\text{борной кислоты}) = 0,1$ моль/л. Этот набор реактивов используется для приготовления одной пластинки размерам 13 x 18 см. Пластинки с нанесенной массой высушивают на воздухе, а затем нагревают 30 мин в сушильном шкафу для активирования (температура 110°C). До употребления пластинки хранят в эксикаторах, чтобы они не сорбировали влагу.

Культуральную среду или водный экстракт из клеточной массы наносят на хроматограмму в виде тонкой полоски на стартовой линии с последующим высушиванием. Объем исследуемой вытяжки зависит от концентрации углеводов и находится в пределах 1–5 мл.

Хроматографирование проводят в системе растворителей метилэтилкетон–этанол–уксусная кислота в соотношении 3:1:1 методом восходящей хроматографии. После подъема растворителей до края хроматограмм пластинки высушивают.

Обнаружение углеводов проводят опрыскиванием пластинки из пульверизатора смесью 20 %-ной серной кислоты и 0,2 %-ного раствора нафторезорцина в этаноле в соотношении 1:1. Обработанные проявителем хроматограммы высушивают в сушильном шкафу при температуре 105°C до появления пятен. При этом мальтоза окрашивается в красно-коричневый цвет ($R_f - 0,29$), глюкоза – в фиолетовый ($R_f - 0,42$).

Необходимо сравнить состав углеводов у различных объектов исследования, обосновать причины их разного состава, сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. На чем основано разделение веществ методом адсорбционной хроматографии?
2. Каковы методы приготовления закрепленного и незакрепленного слоев сорбентов для тонкослойной хроматографии?
3. Каковы основные этапы анализа смеси веществ методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое?
4. Что такое Rf-индекс, от чего он зависит и как рассчитать величину Rf на хроматограммах?
5. Каковы методы количественного определения веществ с помощью тонкослойной хроматографии?
6. Какова роль тонкослойной хроматографии и каковы сферы ее применения в биологических и экологических исследованиях?

Литература

1. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / М. Шаршунова, В. Шварц, Г. Михалец; под ред. В. Г. Березкина – М.: Мир, 1980. – Т. 1. – 295 с.
2. Ахрем, А. А. Тонкослойная хроматография / А. А. Ахрем, Л. И. Кузнецова. – М.: Наука, 1965. – 110 с.
3. Лейте, В. Определение органических загрязнений питьевых, природных и сточных вод / В. Лейте. – М.: Химия, 1975. – С. 95–98, 124, 150–152, 163.
4. Хроматография в тонких слоях / под ред. Э. Шталя. – М.: Мир, 1965. – 506 с.
5. Шеллард, Э. Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое / Э. Шеллард. – М.: Мир, 1971. – 138 с.
6. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография / Ю. Кирхнер. – М.: Мир, 1981.
7. Евгеньева, И. И. Планарная хроматография и анализ органических веществ / И. И. Евгеньева // **Соросовский образовательный журнал**. – 1999. – № 11. – С. 50–55.
8. Лебухов, В. И. Физико-химические методы исследования: учебник / В. И. Лебухов, А. И. Окара, Л. П. Павлюченкова; под ред. А. И. Окара. – СПб.: Лань, 2012. – 480 с.

3.4.2. Жидкостно-жидкостная (распределительная) хроматография

Теоретические основы метода

В жидкостно-жидкостной хроматографии разделение веществ осуществляется за счет их различной растворимости в подвижной фазе – элюенте и неподвижной фазе, физически сорбированной или химически привитой к поверхности твердого адсорбента. Следовательно, она основана на распределении веществ между двумя жидкими фазами, одна из которых неподвижна. По форме проведения процесса выделяются два вида распределительной хроматографии – на бумаге и на колонке. Иногда к распределительной хроматографии относят и метод тонкослойной хроматографии. Однако преобладание адсорбции при разделении веществ делает предпочтительным отнесение ее к адсорбционной хроматографии, как это и сделано в настоящем пособии.

Распределительная хроматография стала использоваться с 1941 г., когда А. Мартин и Р. Синдж впервые показали возможность использования для разделения смеси веществ различий в их коэффициентах распределения между двумя несмешивающимися жидкостями и разработали совместно с Р. Консденом и А. Гордоном метод бумажной хроматографии. За разработку распределительной хроматографии А. Мартин и Р. Синдж в 1952 г. была удостоены Нобелевской премии.

3.4.2.1. Хроматография на бумаге

В хроматографии на бумаге используют свойство хроматографической бумаги поглощать воду из атмосферы и задерживать ее между целлюлозными волокнами. Воду можно рассматривать поэтому как один из растворителей, она представляет собой неподвижную фазу. При движении по бумаге под действием капиллярных сил неводного растворителя (подвижная фаза) молекулы вещества распределяются между двумя фазами в соответствии с их коэффициентом распределения. Чем выше растворимость вещества в подвижной фазе, тем дальше оно продвинется по бумаге вслед за растворителем, и наоборот.

Часто подвижная фаза представляет собой смешивающийся с водой растворитель (например, бутанол). Казалось бы, что в таких случаях разделения не должно происходить, так как имеется только одна фаза. Однако комплекс воды с целлюлозой хроматографической бумаги по свойствам напоминает концентрированные водные раствора полисахаридов. Они не смешиваются с органическими растворителями, в том числе и с теми, которые смешиваются с водой.

Скорость движения веществ определяется величиной коэффициента скорости движения R_f , величина которого зависит от свойств бумаги, температуры, степени чистоты растворителей, однотипности процедур и аппаратуры.

Для проведения хроматографического разделения используют полоски хроматографической бумаги. Существует три сорта этой бумаги, отличающиеся различной толщиной и впитывающей способностью: медленная, средняя, быстрая. Одномерную хроматографию следует проводить по направлению волокон.

Принцип нанесения веществ на бумажные хроматограммы тот же, что и в ТСХ. Для разделения обычно применяют растворы с концентрацией 0,5–1 мг вещества в 1 мл. После подсушивания хроматограммы помещают в камеру с подвижной фазой так, чтобы бумага не касалась стенок камеры и растворитель не доходил до стартовой линии. Хроматографическая камера должна хорошо закрываться, чтобы исключить возможность испарения компонентов подвижной фазы. Хроматограмму вынимают, когда фронт растворителя приблизится к верхней кромке бумаги. После высушивания и соответствующего проявления определяют компоненты. В зависимости от направления распространения элюента на хроматограмме различают восходящую и нисходящую хроматографии.

При восходящей хроматографии бумажную полоску погружают нижним концом в растворитель. По мере продвижения растворителя под действием капиллярных сил вертикально вверх происходит разделение веществ. При нисходящей хроматографии верхний конец бумаги с образцом закрепляют в «лодочке» с растворителем, находящейся в верхней части камеры, а нижний конец бумаги опускают вниз так, чтобы он не соприкасался с налитым на дно растворителем. Роль налитого на дно камеры растворителя заключается

в поддержании равновесной упругости паров растворителя в камере. Под действием капиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает двигаться вниз по бумажной полосе, в ходе чего и происходит разделение. Восходящая хроматография более проста в работе и применяется чаще, но скорость движения растворителя при нисходящей хроматографии гораздо выше, чем при восходящей.

Для лучшего разделения веществ используют повторное хроматографирование в той или другой системе растворителей. Хорошее разделение сложных смесей веществ достигается при двухмерной хроматографии. В этом случае повторное разделение проводят в направлении, перпендикулярном первоначальному, и в другом растворителе или при сочетании электрофореза с хроматографией во взаимно перпендикулярном направлении (метод «пептидных карт» или «отпечатка пальцев»). Метод пептидных карт применяют чаще всего при сравнительном изучении близких по химическому строению белков.

Для определения местоположения пятен хроматограммы просматривают в ультрафиолетовом свете или опрыскивают специальными растворами. Использование бумажной хроматографии в препаративных целях ограничено. В тех случаях, когда такое разделение все же производится, участки хроматограмм, содержащие интересующее вещество, вырезают, а затем элюируют материал с помощью соответствующих растворителей.

Метод хроматографии на бумаге широко используется в биологии для разделения аминокислот, пептидов, углеводов, пигментов, органических кислот и других веществ. Бумажная хроматография применяется и в качестве аналитического метода определения смесей.

Практическая работа 7

Количественное определение

аминокислот методом хроматографии на бумаге

Оборудование и реактивы. Хроматографическая бумага марки «Ленинградская медленная»; хроматографическая камера; фотоэлектроколориметр; ножницы; пластинки стеклянные (3х32 см) – 3 шт.; держатель для хроматограмм; сушильный шкаф; микропипетки; пробирки с притертыми пробками; бюретка на 25 мл; стандартная смесь аминокислот; испытуемая смесь

аминокислот; бутанол, уксусная кислота, вода в соотношении 15:3:7, 1 %-ный раствор нингидрина в 95 %-ном ацетоне; этиловый спирт (75 %-ный), насыщенный медным купоросом.

Выполнение работы

Берут лист хроматографической бумаги размером 18x28 см и на расстоянии 3 см от его короткого края проводят простым карандашом горизонтальную линию. Затем ее делят на неравные отрезки в соответствии с прилагаемой схемой и выделяют стрелками границы нанесения стандартной и испытуемой смесей и делают соответствующие надписи простым карандашом (рис. 3.3).

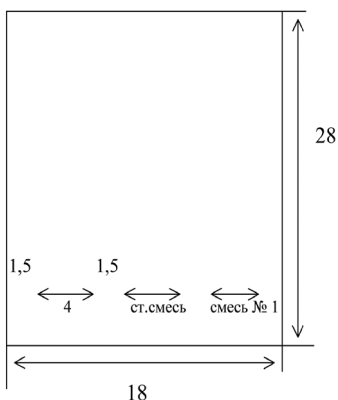


Рис. 3.3. Схема разметки бумажной хроматограммы

Бумагу укрепляют над поверхностью стола и на линию старта, ограниченную стрелками, наносят сначала стандартную смесь при помощи специальной микропипетки тонкой линией, пока весь раствор из микропипетки не будет перенесен на стартовую линию (микропипетку заполняют на 2–3 см). Измеряют массу нанесенного раствора, для чего взвешивают пипетку, заполненную стандартной смесью (до нанесения раствора), и пустую (после нанесения раствора). На бумагу обычно наносят 0,02–0,03 г стандартного раствора. Затем заполняют чистую пипетку испытуемой смесью аминокислот (выданной преподавателем для исследования), взвешивают ее и наносят смесь на линию старта с соответствующей пометкой.

Приготовленную хроматограмму помещают в хроматографическую камеру с предварительно налитой в нее системой растворителей для разделения смеси аминокислот, например смеси бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 15:3:7. Разделение ведут методом восходящей хроматографии в течение 4–5 ч, пока линия фронта не дойдет на 2–3 см до верхнего края хроматографической бумаги. После этого хроматограмму вынимают из камеры и верхний конец бумаги немедленно вставляют в держатель, сделанный из трех скрепленных резиновым кольцом стеклянных палочек, и помещают на 20 мин в вытяжной шкаф для удаления из бумаги растворителей.

Высушенную хроматограмму обмакивают в 1 %-ном растворе нингидрина в ацетоне для обнаружения на ней положения пятен аминокислот. Затем хроматограмму помещают на 10 мин в вытяжной шкаф для удаления ацетона и переносят в сушильный шкаф, где оставляют ее на 15 мин при 70°C. Аминокислоты стандартной и испытуемой смесей обнаруживают в виде синевioletовых пятен, расположенных цепочкой по направлению движения системы растворителей от линии старта к верхнему краю хроматограммы.

Идентификацию аминокислот, содержащихся в испытуемой смеси, ведут по совпадению на хроматограмме позиций, занимаемых аминокислотами стандартной и испытуемой смесей (рис. 3.4).

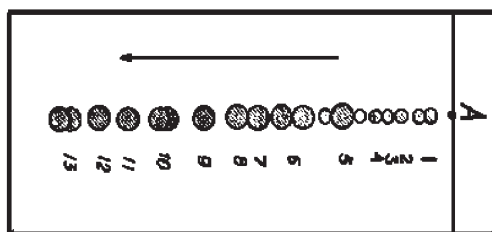


Рис.3.4. Схема расположения аминокислот на хроматограмме:
 А – точка нанесения смеси аминокислот; 1 – цистин и цистеин;
 2 – лизин; 3 – гистидин; 4 – аргинин; 5 – аспарагиновая кислота, серин
 и глицин; 6 – глутаминовая кислота и треонин; 7 – аланин;
 8 – пролин; 9 – тирозин; 10 – валин и метионин; 11 – триптофан;
 12 – фенилаланин; 13 – лейцин и изолейцин

Для определения количественного содержания аминокислот в испытуемых смесях хроматограмму расчерчивают простым карандашом так, чтобы лежащие на одном уровне окрашенные зоны, соответствующие одной и той же аминокислоте, оказались заключенными внутри примерно одинаковых прямоугольников (рис. 3.5).

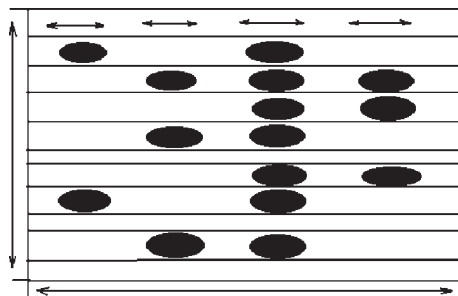


Рис. 3.5. Схема расположения аминокислот на хроматограмме:
 I – смесь № 1; II – смесь № 2; IV – смесь № 3;
 III – стандартная смесь аминокислот

Очерченные участки бумаги вырезают и помещают в пробирки, номера которых должны соответствовать номерам пятен на хроматограммах. В каждую пробирку наливают из бюретки по 10 мл 75 %-ного раствора этилового спирта, насыщенного сульфатом меда (к 500 мл этилового спирта добавляют 0,2 мл насыщенного раствора сульфата меди). Пробирку закрывают пробкой и, периодически перемешивая, добиваются полного перехода кирпично-красной окраски (медной соли сине-фиолетового Руэмана) с бумаги в раствор. На это уходит 15–20 мин. Оптическую плотность стандартного и испытуемого растворов измеряют на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром (540 нм). В поток сравнения устанавливают кювету с 75 %-ным раствором этилового спирта с сульфатом меди.

Количественное содержание аминокислот в исследуемом растворе рассчитывают по соотношению экстинкций исследуемой и стандартной проб.

Пример расчета. Допустим, что в стандартной смеси содержится 1,8 мг глицина в 1 мл, на стартовую полосу нанесено 0,02 г этого стандартного раствора. Следовательно, на хроматограмму

поступило $(1,8 \times 0,02) = 0,036$ мг глицина. Условимся далее, что оптическая плотность окрашенных растворов составила 0,288 для стандарта и 0,336 для неизвестной смеси. Тогда содержание глицина в исследуемой смеси, нанесенной на хроматограмму, составит $(36 \times 0,336) : 0,288 = 42$ мкг. Если далее принять, что исследуемая смесь нанесена на хроматограмму в количестве, например 0,0250 г, то содержание глицина в 1 мл исследуемого раствора составит $(42 : 0,0250) = 1680$ мкг, или 1,68 мг/мл.

Оформите результаты собственного эксперимента, сделайте по ним выводы.

Контрольные вопросы

1. На чем основано разделение веществ методом хроматографии на бумаге?
2. Какие существуют виды бумажной хроматографии?
3. Каковы этапы качественного анализа аминокислот методом хроматографии на бумаге?
4. Какова методика количественного определения аминокислот с помощью хроматографии на бумаге?

Литература

- Хроматография на бумаге / под ред. И. М. Хейса, К. Мацека. – М., 1962.
2. Шеллард, Э. Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое / Э. Шеллард. – М.: Мир, 1971. – 188 с.
 3. Лебухов, В. И. Физико-химические методы исследования: учебник / В. И. Лебухов, А. И. Окара, Л. П. Павлюченкова; под ред. А. И. Окара. – СПб.: Лань, 2012. – 480 с.

3.4.3. Ионообменная хроматография

Теоретические основы метода

Ионообменная хроматография основана на обратимом стехиометрическом обмене ионов, находящихся в растворе, на ионы, входящие в состав ионообменника. Разделение достигается за счет обратимого взаимодействия анализируемых ионизирующихся веществ с ионными группами сорбента-ионита. Широкое применение ионообменных процессов в практике началось после создания синтетических ионообменников – так называемых ионообменных смол или ионитов. Используемые ранее естественные ионообменники (различные алюмосиликаты и другие соединения) не обладали достаточной воспроизводимостью свойств, не были химически устойчивыми и поэтому существенного практического значения не имели. Применяемые в настоящее время синтетические ионообменники имеют высокую **обменную емкость** и воспроизводимые ионообменные и другие свойства, устойчивы к действию кислот и оснований, не разрушаются в присутствии многих окислителей и восстановителей и т. д. Обычно синтетический ионообменник представляет собой высокомолекулярный полимер, например поперечно-сшитый полистирол, содержащий различные функциональные группы, которые и определяют наиболее характерные свойства смол. Известны также синтетические неорганические иониты, например активированный оксид алюминия, гели на основе соединений железа или циркония. Однако органические ионообменные смолы имеют намного большее применение.

В зависимости от знака заряда функциональных групп ионообменные смолы являются катионитами или анионитами. Катиониты содержат кислотные функциональные группы ($-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$; $-\text{PO}_3^-$), поэтому каркас катионита, несущий фиксированные отрицательные заряды, заряжен отрицательно. Отрицательные заряды каркаса компенсируются положительными зарядами противоионов, так что в целом катионит остается электронейтральным. Однако противоионы, в данном случае катионы, в отличие от функциональных групп каркаса, обладают подвижностью и могут переходить в раствор в обмен на эквивалентное количество ионов из раствора. Этот обмен приводит к установлению подвижного равновесия между ионами, находящимися в фазе смолы, и ио-

нами в растворителе. Наиболее распространенными катионитами являются сульфокислоты, образованные сульфированными продуктами сополимеризации стирола и дивинилбензола. Это отечественные смолы КУ-2, СДВ-3 и др., иностранные дауэкс-50, амберлит IR-120 и др. Сульфокатиониты характеризуются высокой химической стойкостью и механической прочностью, большой скоростью установления ионообменного равновесия.

Функциональными группами каркаса анионитов являются четвертичные $-NR_3^+$, третичные $-NR_2H^+$ или первичные $-NH_3^+$ аммониевые, пиридиновые или другие основания, а в качестве подвижных противоионов выступают анионы. Анионообменные смолы получают также путем проведения реакций полимеризации или поликонденсации с использованием различных аминоксоединений. Так были получены аниониты АН-1, АН-2Ф, амберлит. Широкое распространение получил полифункциональный анионит ЭДЭ-10П, содержащий амины различной степени замещения, включая четвертичные. Амфотерные иониты или амфолиты способны осуществлять одновременный обмен катионов и анионов.

Взаимодействие ионообменной смолы с раствором электролита включает несколько сложных процессов, наиболее важными из которых являются собственно ионный обмен, физическая абсорбция ионов и молекул на смоле и набухание смолы за счет поглощения растворителя и проникновения электролита внутрь смолы.

К настоящему времени установлено несколько эмпирических закономерностей, связывающих константы ионного обмена со свойствами ионов. Так, в частности, найдено, что с ростом заряда сродство ионов к смоле увеличивается. С повышением температуры избирательность поглощения несколько уменьшается, хотя этот эффект не очень велик.

Введение в раствор веществ, способных образовывать комплексные соединения с присутствующими ионами, сдвигает равновесие ионного обмена, так как в результате комплексообразования уменьшается равновесная концентрация иона в растворе.

Ионообменная хроматография используется преимущественно для разделения ионов. Количественные определения компонентов после разделения могут быть выполнены любым подходящим методом.

Простейшая методика ионообменного разделения состоит в поглощении компонентов смеси ионитом и последовательном элюировании каждого компонента подходящим растворителем. Например, катионы щелочных металлов легко элюируются разбавленным раствором соляной кислоты (0,1 М HCl).

Известны ионообменные методики для разделения изотопов. Большое практическое значение имеет основанный на ионном обмене процесс деминерализации воды.

Одним из вариантов разделения на ионитах является ионная хроматография. В этом методе используются поверхностно-слойные сорбенты с небольшой емкостью, небольшим размером частиц, повышенное давление на входе в колонку и высокочувствительные детекторы с автоматической записью сигнала. Ионная хроматография удобна для экспресс-анализа, характеризуется высокой разделительной способностью.

Детекторы ионообменных разделений должны регистрировать концентрацию анализируемых ионов в элюате в присутствии ионов элюента. Особенно широко в ионной хроматографии используют кондуктометрический детектор, являющийся универсальным, так как он реагирует на все ионы в растворе. Применяют также селективные детекторы: электрохимические (полярографический, кулонометрический) и спектрофотометрический.

Методом ионной хроматографии определяют очень многие анионы в питьевой и технической воде, в продуктах технологической переработки, в пищевой, фармацевтической и других отраслях промышленности. Описаны методики определения свыше 70 анионов неорганических и органических кислот, в том числе галогенидов, нитрита, нитрата, сульфата, ацетата. Число определяемых катионов значительно меньше.

Этим методом определяют главным образом катионы щелочных и щелочно-земельных металлов, а также органические катионы замещенных солей аммония. Определение многих других

катионов оказывается ненадежным, так как они выпадают в осадок в колонке с сильно основной смолой.

Ионная хроматография успешно применяется в анализе объектов окружающей среды (атмосферы, воды и т. д.), в клинических исследованиях и многих отраслях промышленности.

В основу одной из разновидностей жидкостной хроматографии – ион-парной хроматографии – положены принципы классической экстракции ионных веществ из водной в органическую фазу в виде ионных пар. Для этого в подвижную фазу добавляется противоион, способный вступить в селективное комплексобразование с анализируемыми компонентами с образованием ионной пары. Основные преимущества такого варианта заключаются в том, что одновременно могут быть проанализированы вещества кислотного, основного и нейтрального характера.

Контрольные вопросы

1. В чем состоит сущность ионообменной хроматографии?
2. Каковы области применения ионообменной и ионной хроматографии?

Литература

1. Карцова, А. А. Жидкостная хроматография в медицине / А. А. Карцова // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 11. С. 35–40.
2. Долгонос, А. Н., Ионный обмен и ионная хроматография / А. Н. Долгонос, М. М. Сенявин, И. Н. Волощик. – М.: Наука, 1993. – 222 с.
3. Eith, C. Практическая ионная хроматография / C. Eith, M. Kolb, A. Seudert. – Herisau; Москва, Switzerland; Россия, 2005. – 178 с.
4. Основы аналитической химии: учебник для вузов: в 2 кн. – Кн. 1: Общие вопросы. Методы разделения / под ред. Ю. А. Золотова. – М.: Высшая школа, 2002. – 351 с.

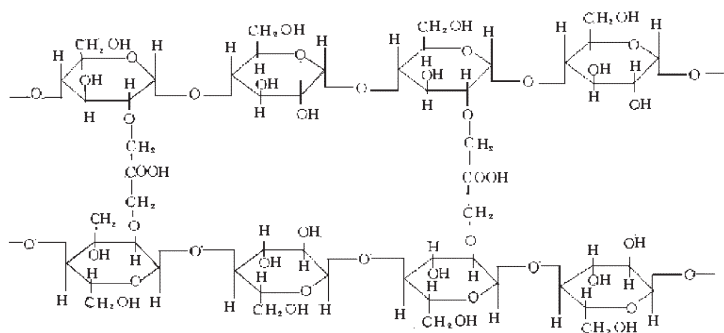
3.4.4. Проникающая или эксклюзионная хроматография

Теоретические основы метода

Подвижной фазой в проникающей хроматографии является растворитель (жидкость), а неподвижной – та же жидкость, заполнившая поры сорбента (геля), т. е. и подвижную, и неподвижную фазы составляет одно и то же вещество или одна и та же смесь веществ. Гель готовят на основе декстрана, полиакриламида или других природных и синтетических соединений.

Наиболее часто в проникающей хроматографии применяют органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой, придающей им свойства гелей. К числу таких соединений относятся декстраны с поперечными сшивками (сефадекс). Сефадекс – это полимер в виде гранул, построенных из молекул бактериального полисахарида декстрана (1,6-глюкана), «сшитых» через определенные промежутки поперечными связями за счет взаимодействия с эпихлоргидрином.

Примерная структура ячейки сефадекса:



Чем больше число поперечных сшивок, тем меньше размеры отверстий молекулярного сита. Сефадексы очень хорошо набухают в воде, растворах солей. Получается гель-сефадекс. В зависимости от степени сшивки молекул декстрана друг с другом различные сефадексы отличаются набуханием гранул сефадекса и пределами эксклюзии (выражаемой значениями молекулярной массы веществ, еще способных войти внутрь гранул сефадекса), в связи с чем и построена классификация сефадексов.

Способность молекул анализируемого вещества проникать в растворитель, поглощенный частицами набухшего геля, зависит от степени пористости частиц геля и от размера молекул соединения. Распределение веществ на колонке, заполненной набухшим гелем, зависит от общего объема растворителя внутри и снаружи частиц геля.

Для данного вида геля распределение анализируемого вещества в растворителе внутри и снаружи геля определяется коэффициентом распределения K_d , который зависит от размера молекул вещества. Если молекулы крупные, в растворителе внутри частиц геля их будет мало, величина K_d в этом случае практически равна 0. Если молекулы вещества достаточно малы и могут беспрепятственно проникать внутрь частиц геля, то $K_d = 1$. Поскольку размеры пор варьируют, молекулы среднего размера будут проникать в растворитель, находящийся в порах, лишь частично; следовательно, величина K_d в этом случае будет находиться между 0 и 1. Это позволяет разделять на данном геле вещества, молекулярные массы которых различаются лишь весьма незначительно.

Проникающая (эксклюзионная) хроматография используется для очистки высокомолекулярных биологических соединений. Так проводят очистку и разделение вирусов, белков, ферментов, гормонов, антител, нуклеиновых кислот и полисахаридов. Этим методом можно отделять аминокислоты от пептидов, фракционировать пептиды, образующиеся в результате гидролиза белков, а также олигонуклеотиды из гидролизатов нуклеиновых кислот. Метод проникающей хроматографии позволяет определять молекулярные массы неизвестных белков, проводить обессоливание белков и концентрирование их растворов, а также удалять фенол из растворов нуклеиновых кислот, моносахариды отделять от полисахаридов и аминокислоты от белков. С помощью этого вида хроматографии в Институте вирусологии в Москве в 1990 г. был выделен вирус СПИДа.

Гель-проникающая хроматография на колонке используется для очистки пестицидов и жирорастворимых витаминов перед их определением методом ВЭЖХ.

Практическая работа 8.

Разделение белков

методом гель-фильтрации через сефадекс

Оборудование и реактивы. Однолучевой сканирующий спектрофотометр Unicо, модель 2802; коллектор фракций; колонка для гель-фильтрации; пробирки химические (150–200 штук); склянка на 5 л; трубки каучуковые (диаметр 0,5–0,7 см); зажим винтовой; насос, сефадекс G-75; хлорид натрия: $C(\text{хлорида натрия}) = 0,09$ моль/л; реактивы для определения белка; яичный альбумин с $M = 45000$, трипсин с $M = 22680$; рибонуклеаза с $M = 13700$.

Выполнение работы

Готовят гель сефадекса. Для этого 25 г сефадекса G-75 предварительно заливают в двухлитровом стакане 1,5 л раствора хлорида натрия: $C(\text{NaCl}) = 0,09$ моль/л, хорошо перемешивают и оставляют на 24 ч. Через сутки набухший сефадекса промывают 5 раз раствором хлорида натрия $C(\text{NaCl}) = 0,02$ моль/л путем декантации. Полученным гелем сефадекса заполняют колонку. Заполнение колонки ведут осторожно, заливая его медленно и непрерывно по стенке колонки, что предохраняет от захвата им пузырьков воздуха.

Сразу после внесения сефадекса в колонке создают рабочее давление, подключая к колонке пятилитровую склянку с элюирующим раствором (раствором хлорида натрия: $C(\text{NaCl}) = 0,09$ моль/л). Этим раствором немедленно начинают промывку колонки и ведут ее около 12 ч.

Содержание белка в растворе, подлежащем гель-фильтрации, должно быть около 10 мг/мл. Поэтому готовят смесь белков в соотношении: яичный альбумин – 5 мг, трипсин – 3 мг, рибонуклеаза – 2 мг, и растворяют ее в 1 мл раствора хлорида натрия: $C(\text{NaCl}) = 0,09$ моль/л.

Перед нанесением образца, предназначенного для фракционирования, отключают склянку с элюирующим раствором от колонки. Слегка ослабляют кран колонки и устанавливают уровень элюирующего раствора вровень с поверхностью сефадекса. Осторожно, стараясь ни в коем случае не взмутить верхний слой сефадекса, пипеткой наслаивают 1 мл смеси белков. Ослабляя зажим в нижней части колонки, нанесенный образец вводят в сефадекс и очень осторожно, наслаив по каплям или по стенке при помощи

пипетки элюент, подключают к колонке склянку с раствором хлорида натрия: $C(\text{NaCl}) = 0,09$ моль/л и начинают элюцию (рис. 3.6.).

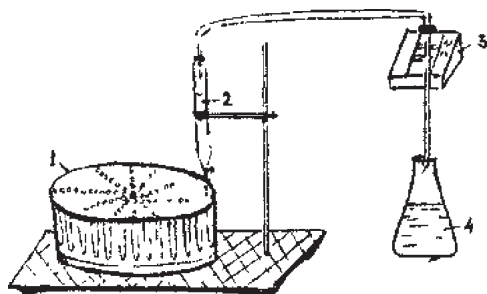


Рис. 3.6. Установка для колоночной хроматографии:
1 – коллектор фракций; 2 – колонка с сефадексом; 3 – насос;
4 – склянка с элюирующим раствором

Собирают фракции по 5 мл при помощи коллектора фракций со скоростью 1 мл в минуту. Элюцию завершают после сбора 30 фракций. Содержание белка по всех исследуемых фракциях можно определять спектрофотометрически, измеряя абсорбцию каждой пробы на спектрофотометре. Строят выходную кривую (рис. 3.7).

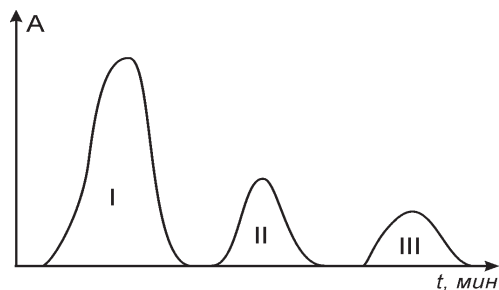


Рис. 3.7. Выходная кривая:
A – абсорбция вещества во фракциях, t – время их выхода;
I, II, III – белковые фракции

Отчет по работе. Он должен содержать схему прибора, рисунок выходной кривой, построенной по результатам определения количества белков во фракциях на однолучевом сканирующем спектрофотометре Unicо, модель 2802.

Контрольные вопросы

1. В чем сущность метода гель-проникающей хроматографии?
2. Какова структура ячейки сефадекса и чем отличаются различные марки сефадекса?
3. Каков принцип разделения смеси белков с различной молекулярной массой на геле сефадекса?
4. Каковы области применения метода?

Литература

1. Детерман, Г. Гель-хроматография / Г. Детерман. – М.: Мир, 1970. – 253 с.
2. Жидкостная колоночная хроматография: в 3 т. / под ред. В. Г. Березина. – М.: Мир, 1978. – Т. 2. – 471 с.
3. Филиппович, Ю. Б. Практикум по биохимии / Ю. Б. Филиппович, Т. А. Егорова, Г. А. Севастьянова. – М.: Просвещение, 1975. – С. 42–45, 75–76.
4. Карцова, А. А. Жидкостная хроматография в медицине / А. А. Карцова // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 11. – С. 35–40.
5. Казин, В. Н. Физико-химические методы исследования в экологии и биологии: учеб. пособие / В. Н. Казин, Г. А. Урванцева. – Ярославль: ЯрГУ, 2002. – 172 с.

3.4.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Теоретические основы метода

Жидкостная хроматография в ее классическом варианте (при атмосферном давлении) и высокоэффективная жидкостная хроматография (при повышенном давлении) используются для определения химически и термически нестойких, нелетучих или очень полярных веществ, но в то же время могут быть применены для анализа веществ, которые обычно определяются с помощью высокоэффективной газовой хроматографии. Начав развиваться с середины 1970-х гг., метод ВЭЖХ в первое время существенно проигрывал из-за отсутствия подходящих сорбентов для заполнения колонок. Однако с появлением привитых фаз насадоч-

ные колонки стали обеспечивать воспроизводимые результаты, что сделало ВЭЖХ идеальным инструментом для определения большинства пестицидов, включая хлор- и фосфорорганические производные, полиароматических углеводородов, относительно нелетучих высокомолекулярных загрязнителей. С помощью жидкостной хроматографии можно разделять также белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, красители, полисахариды, взрывчатые вещества, лекарственные препараты, метаболиты растений и животных.

Блок-схема прибора для жидкостной хроматографии представлена на рис. 3.8.

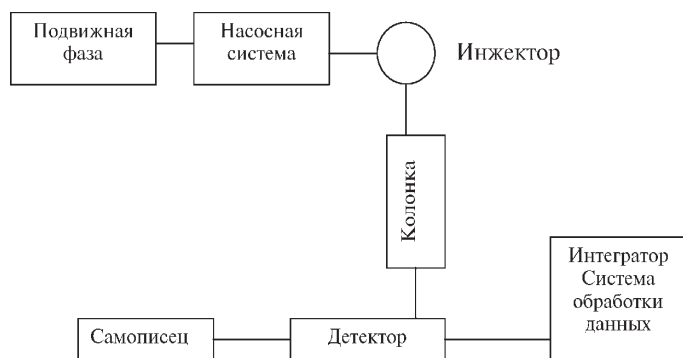


Рис. 3.8. Блок-схема жидкостного хроматографа

Для эффективного хроматографического разделения определяемых компонентов чаще всего применяют колонки длиной до 25 см и внутренним диаметром 4–5 мм, заполненные сферическими частицами силикагеля размером от 5 до 10 мкм с привитыми октадецильными группами. Появление в последние годы колонок меньшего диаметра, заполненных более мелкими частицами силикагеля, привело к уменьшению расхода растворителей и продолжительности анализа, увеличению эффективности разделения.

Следует отметить, что колонки для ВЭЖХ довольно дорогие. Поэтому их защищают от загрязнения предохранительным картриджем (предколонкой). Очень сложные смеси лучше предварительно разделять другими методами, а при переходе от одного растворителя к другому следует избегать резких скачков их

полярности. Растворы проб и растворители перед вводом в колонку необходимо фильтровать.

Для обнаружения анализируемых веществ в ВЭЖХ широко применяются устройства, работа которых основана на измерении поглощения в ультрафиолетовой области, флуоресценции или электрохимических характеристик. Возможно также сочетание жидкостного хроматографа с масс-спектрометром. Чаще всего применяется УФ-детектор. Он представляет собой высокочувствительный СФ-спектрометр с проточной микроячейкой, который регистрирует оптическую плотность раствора при определенной длине волны.

На практике часто бывает необходимо проводить измерение на различных длинах волн одновременно, когда определяемые соединения плохо разделяются хроматографически. Высокочувствительная запись спектров стала реальностью с помощью детекторов на диодной матрице, так как это обеспечивает получение аналитических данных с гораздо большей степенью достоверности.

В частности, с появлением УФ-В-детектора на диодной матрице ВЭЖХ стала стандартным методом контроля качества природной и питьевой воды на содержание пестицидов. Известно, что многие из них термически нестабильны, например производные феноксипусусной кислоты. Анализируемые вещества извлекают из воды с помощью жидкостной или твердофазной экстракт.

Контрольные вопросы

1. Каковы особенности разделения веществ методом ВЭЖХ?
2. Как построена блок-схема жидкостного хроматографа?
3. Каковы области применения ВЭЖХ?

Литература

1. Федорова, Г. А. Применение микроколоночной жидкостной хроматографии для анализа биологических жидкостей / Г. А. Федорова, Л. А. Кожанова // Хроматография на благо России / ред. А. А. Курганов. – М.: Граница, 2007. – С. 666–684.
2. Федорова, Г. А. Применение микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии в медицине. Ч. 1 / Г. А. Федорова, Л. А. Кожанова, Е. М. Полянская // Вестник восстановительной медицины. – 2008. – № 1 (23). – С. 35–41.

3. Федорова, Г. А. Применение микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии в медицине. Ч. 2 / Г. А. Федорова, Л. А. Кожанова, И. Н. Азарова // Вестник восстановительной медицины. – 2008. – № 2 (24). С. 47–50.

Практическая работа 9
**Определение пестицидов методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Данная методика позволяет определять в воде одновременно 9 гербицидов на основе феноксикислот с пределом обнаружения 20 нг/л при стандартном отклонении 6–10 %. Диапазон определяемых концентраций составляет 20–1000 нг/л.

Оборудование и реактивы. Жидкостной хроматограф, колба объемом 1 л, испаритель, воронка, фильтровальная бумага, универсальная индикаторная бумага. Фосфорная кислота, хлорид натрия, этилацетат, безводный сульфат натрия, ацетонитрил, вода, этанол.

Выполнение работы

Пробу воды объемом 1 л подкисляют фосфорной кислотой до $\text{pH} = 2,0$, добавляют 30 г хлорида натрия и экстрагируют последовательно тремя порциями по 100 мл этилацетата. Объединенные экстракты фильтруют через 20 г безводного сульфата натрия, промывают осадок на фильтре двумя порциями по 10 мл этилацетата и удаляют растворитель сначала упариванием до объема 4–5 мл в ротационном испарителе, а затем испарением в токе азота. Сухой остаток растворяют в смеси ацетонитрил:вода = 15:85 и вводят 25 мкл пробы в жидкостной хроматограф. Разделение пестицидов осуществляют на колонке 100x4,6 мм Hypersil ODS с градиентом концентрации подвижной фазы (В) от 15 до 55 % в течение 22 мин при температуре 45⁰С. В качестве подвижных фаз применяют растворы KHPO_4 с С (KHPO_4) = 0,005 моль/л с 0,01 % CH_3COOH в воде (фаза А) и 0,01 % CH_3COOH в смеси ацетонитрил:метанол = 1:1 (фаза В). Параметры детектирования: длина волны 230 нм, ширина полосы 12 нм, длина волны сравнения – 180 нм, ширина полосы сравнения – 80 нм. Идентификацию веществ проводят по временам удерживания и по библиотечным спектрам исследуемых соединений для УФ-диапазона.

В случае твердофазной экстракции пробу воды объемом 2 л подкисляют фосфорной кислотой до $\text{pH} = 2,0$, добавляют 200 г хлорида натрия и пропускают через картридж С со скоростью 1 000 мл/ч. Затем картридж высушивают током азота в течение 20 мин и элюируют определяемые вещества 4 мл ацетона. Элюент испаряют в токе азота до сухого остатка, растворяют в 0,5 мл смеси ацетонитрил:вода в соотношении 15:85 и подвергают хроматографированию. Картридж перед употреблением промывают последовательно 5 мл этанола и 6 мл воды, подкисленной до $\text{pH} = 2$.

Контрольные вопросы

1. Какова суть определения пестицидов методом ВЭЖХ?
2. Для какой цели необходимо определение пестицидов?

Литература

1. Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию: пер. с англ. / под ред. Д. Исии. – М.: Мир, 1991. – 240 с., ил.
2. Карцова, А. А. Жидкостная хроматография в медицине / А. А. Карцова // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 11. – С. 35–40.
3. Майстренко, В. Н. Эколого-аналитический мониторинг супертоксикантов / В. Н. Майстренко, Р. З. Хамитов, Г. К. Будников. – М.: Химия, 1996. – С. 270–277.
4. Орлов, В. И. Теоретические основы ВЭЖХ / В. И. Орлов, А. А. Аратсков. – Дзержинск: Научно-техническая компания «Синтеко», 1997. – 41 с.
5. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии / под ред. А. Хенмен. – М.: Мир, 1988. – 649 с.

3.4.6. Понятие об аффинной, или биоспецифической, хроматографии

Особое место в жидкостной хроматографии занимает так называемая аффинная, или биоспецифическая, хроматография (от англ. *affinity* – средство). Аффинная хроматография основана на исключительной способности биологически активных веществ связывать специфически и обратимо другие вещества. Научные

основы метода заложены в 1951 г. в США, хотя первые экспериментальные указания на большие потенциальные возможности аффинной хроматографии были получены еще в 1910 г. Штаркенштейном, использовавшим крахмал для выделения амилазы. В основе аффинной хроматографии лежит уникальное свойство биологически активных соединений узнавать строго определенные вещества, в процессе которого реализуется так называемый принцип молекулярного распознавания. Фермент узнает свой субстрат, антиген – антитело, гормон – рецептор.

Процесс разделения веществ с использованием аффинной хроматографии включает несколько самостоятельных этапов. Хроматографическую колонку заполняют носителем, ковалентно связанным с каким-либо биологически активным веществом (лигандом). Лигандами могут служить самые различные соединения: белки, пептиды, аминокислоты, витамины, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, углеводы и многие другие вещества. В качестве носителей в аффинной хроматографии получили широкое распространение гранулированные гели агарозы и полиакриламида (биогель Р), полистирольные смолы с химически активными группами, целлюлоза и ее производные и т. д. Затем через колонку пропускают анализируемую смесь веществ, к одному из которых иммобилизованный лиганд обладает биологическим сродством. Выбирая из смеси требуемое соединение, лиганд образует с ним комплекс. Остальные компоненты пройдут через колонку, не задерживаясь. Специфически адсорбированный компонент может быть освобожден из комплекса изменением природы элюента, рН или ионной силы (см. рис. 3.9).

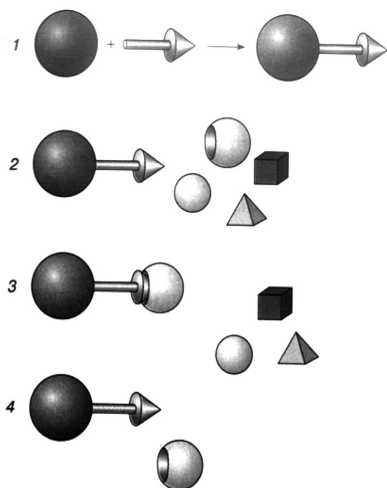


Рис. 3.9. Основные этапы аффинной хроматографии:
 1 – подготовка сорбента для аффинной хроматографии, иммобилизация лиганда поверхностью носителя;
 2 – дозирование в хроматографическую колонку анализируемой смеси;
 3 – элюирование (подача подвижной фазы), в процессе которого происходит специфическое связывание лигандом требуемого компонента;
 4 – замена подвижной фазы для разрушения комплекса и выделения связанного биологически активного вещества

Контрольные вопросы

1. На чем основан метод аффинной хроматографии?
2. Каковы основные этапы аффинной хроматографии?

Литература

1. Безвершенко, А. И. Аффинная хроматография / А. И. Безвершенко. – Киев: Наукова думка, 1973. – 126 с.
2. Карцова, А. А. Жидкостная хроматография в медицине / А. А. Карцова // Соросовский образовательный журнал. 2000. № 11. С. 35–40.

3.5. Газовая хроматография

Газовая хроматография – универсальный метод разделения смесей разнообразных веществ, испаряющихся без разложения. Этот метод впервые был реализован в 1952 г. Джеймсом и Мартином для разделения летучих жирных кислот.

Теоретические основы метода

Подвижной фазой в газовой хроматографии является газ или пар. В зависимости от состояния неподвижной фазы газовая хроматография подразделяется на газо-адсорбционную, когда неподвижной фазой является твердый адсорбент, и газо-жидкостную, когда неподвижной фазой является жидкость, а точнее, пленка жидкости на поверхности частиц твердого сорбента. Принцип разделения – неодинаковое сродство органических веществ к летучей подвижной фазе и стационарной фазе в колонке.

В первом случае происходит непрерывное распределение компонентов смеси между движущейся газовой фазой, называемой газом-носителем, и твердым адсорбентом, обусловленное чередованием процессов сорбции и десорбции. Чем хуже вещество сорбируется, тем раньше оно выходит из колонки.

Во втором случае происходит чередование растворения компонента в пленке жидкой фазы, нанесенной на твердый носитель, с обратным выделением в газовую фазу, т. е. в поток газа-носителя.

Твердый носитель, применяемый в газовой хроматографии, должен иметь большую площадь поверхности и однородный размер частиц. Обычно используются частицы размером 0,25–0,35 мм.

В то время как в газо-адсорбционной хроматографии сорбентами служат активные адсорбенты (активированный уголь, силикагель, молекулярные сита), в газо-жидкостной хроматографии применяются твердые инертные носители типа диатомита, используется также фарфор, стекло, пластмассы. Имеются различные типы твердых носителей промышленного изготовления.

Количество твердых фаз все же ограничено, поэтому поверхность твердого носителя часто покрывают тонким слоем жидкости (неподвижная фаза). Обычно применяются жидкости

с низкой упругостью паров, химически инертные по отношению ко всем компонентам смеси. Число жидких фаз, пригодных для хроматографии, во много раз превышает число адсорбентов, что позволяет в каждом отдельном случае подобрать наиболее эффективную жидкость. Последняя может быть твердой при низкой температуре, но обязательно должна быть жидкой и практически нелетучей при температурах, обеспечивающих разделение компонентов смеси.

Основной характеристикой жидкой фазы является степень ее полярности. При прочих одинаковых условиях более полярные фазы дают лучшее разделение. Неполярные фазы, как правило, имеют больший молекулярный вес и устойчивы при высоких температурах. Полярные фазы обладают высокой избирательностью, однако они менее устойчивы при повышенных температурах, разлагаясь, могут нарушать процесс разделения. Количество жидкой фазы в процентах к твердому носителю варьирует в широких пределах от 1 до 30–50 %, что зачастую позволяет влиять на быстроту и качество разделения смесей. Примером неполярной жидкой фазы служит, например, вазелиновое масло. К полярным жидким фазам относятся полигликоли, полиэфиры. Обычно для анализа биологических объектов используют силиконовые производные.

При выборе жидкой фазы полезным оказалось старое правило – «подобное растворяется в подобном». В соответствии с этим правилом для разделения смеси двух веществ выбирают жидкую фазу, близкую по химической природе одному из компонентов. Ограниченность такого подхода для веществ с близкими свойствами или смесями сложного состава очевидна. Эффективным оказалось применение колонок, содержащих несколько неподвижных фаз или сложные сорбенты.

Компоненты смеси селективно удерживаются неподвижной фазой, а затем выходят из колонки и регистрируются детектором. Сигналы детектора записываются в виде хроматограммы автоматическим потенциометром (самописцем) или же регистрируются на экране компьютера.

3.5.1. Аппаратурное оформление газовой хроматографии

Основными узлами газового хроматографа являются источник газа-носителя и блок подготовки газов, испаритель, термостат колонок и сами хроматографические колонки, детектор, система регистрации и обработки данных (рис. 3.10.).

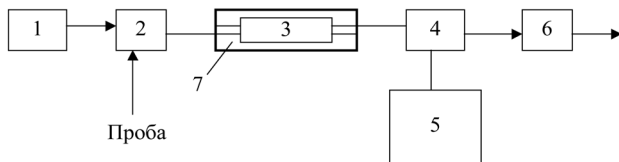


Рис. 3.10. Принципиальная схема газового хроматографа:

- 1 – газ-носитель, 2 – испаритель, 3 – хроматографическая колонка,
4 детектор, 5 – самопишущий регистратор,
6 – измеритель скорости потока, 7 – термостат

Для точного количественного отбора пробы и введения ее в хроматографическую колонку используют дозатор. Одним из основных требований к дозатору является воспроизводимость размера пробы и постоянство условий ее введения в колонку. Кроме того, введение пробы не должно вызывать резкого изменения условий работы колонки и других узлов хроматографической установки, а внутренняя поверхность дозатора не должна обладать каталитической или адсорбционной активностью по отношению к пробе.

Газообразные и жидкие пробы обычно вводят с помощью специальных шприцев, прокалывая в месте ввода пробы резиновую мембрану. Применяются газовые шприцы для газообразных проб и микрошприцы для жидких. Микрошприцы позволяют вводить в хроматограф пробы объемом от долей до десятков микролитров. Нередко в лабораторной практике в качестве дозатора применяется медицинский шприц.

Твердые пробы вводятся в хроматограф или после перевода их в раствор или непосредственным испарением пробы в нагретом дозаторе, куда она вводится с помощью игольного ушка. Известны и другие устройства.

Испаритель служит для перевода жидкой пробы в паровую фазу.

Сердце газового хроматографа – хроматографическая колонка. Существует два основных типа колонок: насадочные и капиллярные. Насадочные колонки представляют собой стеклянные или металлические трубки длиной от 1 до 5 м с внутренним диаметром от 1,5 до 5 мм. Они заполнены «насадкой» – твердой основой с нанесенной на нее неподвижной фазой. В качестве твердой основы используются различные пористые вещества, на поверхности которых должна образоваться тончайшая пленка неподвижной фазы.

Можно использовать саму стенку колонки как твердую основу. Тогда речь идет о капиллярной колонке. Технология изготовления капиллярной колонки – это нанесение на стенку длинного капилляра из кварцевого стекла (как правило, до 30 м) тончайшего слоя неподвижной фазы. Эта технология позволила существенно улучшить параметры разделения смесей. У капиллярных колонок предпочтение отдают малым диаметрам (0,25 мм). Для выполнения хроматографического анализа необходимо подобрать характеристики колонки. Наиболее важный этап – выбор стационарной фазы. Неподвижная фаза должна соответствовать следующим критериям: химическая стойкость, низкое давление пара в диапазоне рабочих температур колонки, достаточные коэффициенты распределения и селективность по отношению к исследуемым веществам, низкая вязкость.

Использование легких газов-носителей (гелий) ускоряет анализ, а относительно тяжелых (азот) улучшит качество разделения в ущерб скорости. Скорость газа выбирают экспериментально для достижения хорошего разделения компонентов смеси и максимального ускорения времени анализа. Так как характер разделения находится в зависимости от температуры, хроматографическая колонка размещается в программируемом термостате. Разделение смеси веществ с широким диапазоном температур кипения начинают при низкой температуре термостата, а затем программируют постоянное повышение температуры для элюирования высококипящих компонентов. Казалось бы, с увеличением длины колонки и уменьшением скорости передвижения эффективность разделения должна возрастать. Но при этом вещества размываются из-за диффузии. Поэтому существует оптимальный компромисс между эффективностью работы колонки, диффузией и временем анализа.

Эволюция газовой хроматографии во многом – история совершенствования систем детектирования. Детектор фиксирует изменение какого-либо свойства газа-носителя при попадании в поток исследуемого вещества. В настоящее время в газовой хроматографии применяются следующие основные виды детекторов: детектор по теплопроводности (катарометр), пламенно-ионизационный детектор, термоионный детектор, детектор электронного захвата, масс-спектрометр. Кроме того, достаточно широко применяются фотоионизационный детектор, детектор хемиллюминесценции, атомно-эмиссионный детектор, спектрофотометрические детекторы.

Одним из наиболее распространенных дифференциальных детекторов является катарометр. Принцип его работы основан на измерении сопротивления нагретой платиновой или вольфрамовой нити, которое зависит от теплопроводности омывающего газа. Количество теплоты, отводимое от нагретой нити при постоянных условиях, зависит от состава газа. Чем больше теплопроводность определяемых компонентов смеси будет отличаться от теплопроводности газа-носителя, тем большей чувствительностью будет обладать катарометр. Наиболее подходящим газом-носителем с этой точки зрения является водород, теплопроводность которого значительно превышает соответствующую характеристику большинства других газов. Однако в целях техники безопасности чаще применяется гелий (азот), теплопроводность которого также достаточно высока. В последнее время металлические нити в катарометре успешно заменяются термисторами, имеющими более высокий, чем у металлов, температурный коэффициент электрической проводимости. Достоинствами катарометра являются простота, достаточная точность и надежность в работе. Однако из-за сравнительно невысокой чувствительности он не применяется для определения микропримесей.

Принцип действия пламенного детектора основан на том, что температура водородного пламени горелки изменяется при попадании в него органических веществ. Наибольшей чувствительностью обладают ионизационные детекторы, например пламенно-ионизационный (ПИД), позволяющий обнаруживать до 10 г анализируемых веществ. В этих детекторах измеряют электрическую проводимость пламени водородной горелки. Чисто водородное пламя обладает очень низкой

электрической проводимостью. При появлении в водороде примесей органических соединений происходит ионизация пламени, пропорциональная концентрации примеси, что легко может быть измерено. Высокая чувствительность детекторов этого типа к органическим соединениям обусловила их широкое применение.

Выбор детектора принципиально важен для анализа проб. Критериями выбора являются чувствительность и диапазон применения. Катарометр позволяет определить вещество, содержание которого в пробе составляет 10 %. Чувствительность ионизационных детекторов к органическим веществам значительно выше (10 %). Для термоионного детектора чувствительность по отношению к фосфорорганическим соединениям возрастает еще на 3–4 порядка. Электрозахватный детектор практически нечувствителен к соединениям без атомов галогенов, зато по отношению к полигалогенпроизводным он на 2–3 порядка чувствительнее, чем ионизационно-пламенный детектор. Таким образом, при правильном выборе колонки, детектора и с учетом малого объема пробы предел обнаружения веществ методом газовой хроматографии превосходит многие другие методы анализа.

Применение масс-спектрометра в качестве детектора газового хроматографа явилось событием такого масштаба, что потребовало самостоятельного наименования. Эта разновидность метода называется хромато-масс-спектрометрия. Масс-спектрометр обладает способностью не только зарегистрировать появление в нем разделяемого компонента, но и установить его структуру. Широкое применение хромато-масс-спектрометров вызвало необходимость создания гигантских библиотек – баз данных масс-спектрометров всевозможных соединений.

Итак, в методе газожидкостной хроматографии широко варьируются температура, скорость газа-носителя, параметры хроматографической колонки, жидкая фаза, тип детектора. Это создает совершенно уникальные условия для решения различных аналитических задач.

3.5.2. Качественный и количественный анализ

Что такое хроматограмма? Каждому компоненту смеси на хроматограмме соответствует отдельный пик (рис. 3.11). Время от начала хроматограммы до появления вершины пика называется временем удерживания. При строгом воспроизведении всех условий время

удерживания является такой же физико-химической характеристикой вещества, как его плотность, показатель преломления и т. д.

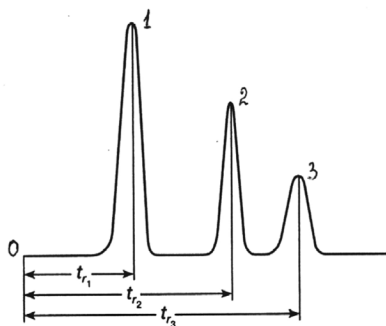


Рис. 3.11. Хроматограмма трехкомпонентной смеси:
0 – момент введения пробы в прибор;
1, 2, 3 – хроматографические пики компонентов смеси;
 t_{r1} , t_{r2} , t_{r3} – время удерживания компонентов

Определение качественного состава смеси проводится путем сопоставления времени удерживания данного компонента и эталона-вещества известной структуры. Совпадение времени удерживания эталона и определяемого компонента может указывать на их идентичность. Эталон чаще всего добавляется в исследуемую смесь (метод метки). При этом число пиков на хроматограмме не должно изменяться, а интенсивность пика одного из компонентов должна увеличиваться.

Определение количественного состава смеси основано на допущении того, что интенсивность пика каждого компонента пропорциональна его содержанию в смеси. В качестве меры интенсивности принимается площадь пиков S . Обычно для этого умножают его высоту (h) на ширину (w), измеренную на полувысоте пика: $S = h \cdot w$. Анализ данных в современных хроматографах автоматизирован. Как правило, полученные данные обрабатываются ЭВМ, сопоставляются с базами данных, подвергаются статистической обработке.

Основными в количественной хроматографии являются методы: нормировки, нормировки с калибровочными коэффициентами, внутренней стандартизации и абсолютной калибровки.

При использовании **метода нормировки** принимают сумму высот всех пиков или сумму их площадей за 100 %. Тогда отношение высоты отдельного пика к сумме высот или отношение площади одного пика к сумме площадей, умноженное на 100, будет характеризовать массовую долю (%) компонента в смеси. Вполне понятно, что такой метод предполагает существование одинаковой зависимости величины измеряемого параметра от концентрации для всех компонентов смеси.

В методе нормировки с калибровочными коэффициентами за 100 % принимается сумма параметров пиков с учетом чувствительности детектора. Различие в чувствительности детектора учитывается с помощью поправочных коэффициентов для каждого компонента. Один из преобладающих компонентов смеси считают сравнительным и поправочный коэффициент для него принимают равным единице. Калибровочные коэффициенты (K) рассчитывают по формуле:

$$K_i = S_{ct} / S_i$$

где S_{ct} – площадь пика стандартного вещества; S_i – площадь пика определяемого вещества.

Концентрация компонентов в анализируемой смеси рассчитывается по формуле:

$$\% = (S_i \cdot K_i / \sum S_i \cdot K) \cdot 100$$

Наиболее точным является **метод абсолютной калибровки**. В этом методе экспериментально определяют зависимость высоты или площади пика от концентрации вещества и строят градуировочные графики. Далее определяют те же характеристики пиков в анализируемой смеси и по градуировочному графику находят концентрацию анализируемого вещества. Этот простой и точный метод является основным методом определения микропримесей. Кроме того, метод не требует разделения всех компонентов смеси, а ограничивается лишь теми, определение которых необходимо в данном конкретном случае.

Метод внутреннего стандарта основан на введении в анализируемую смесь точно известного количества стандартного вещества. В качестве стандартного выбирают вещество, близкое по физико-химическим свойствам к компонентам смеси. После

хроматографирования измеряют параметры пиков анализируемого компонента и стандартного вещества. Если стандартное вещество не входит в состав анализируемой смеси, массовую долю компонента (%) рассчитывают по формуле

$$\omega_i = (S_i / S_{\text{ст}}) \cdot r \cdot 100,$$

где S_i и $S_{\text{ст}}$ – площади пиков анализируемого компонента и стандарта соответственно; r – отношение массы внутреннего стандарта к массе пробы.

3.5.3. Применение газовой хроматографии

Газовая хроматография находит применение в нефтяной, металлургической, химической, фармацевтической, пищевой и других отраслях промышленности. С повышением экологических требований к среде обитания, продуктам, лекарствам резко возросла роль газовой хроматографии как аналитического метода анализа. Так, этот метод широко используется в настоящее время в анализе органических суперэкоотоксикантов. Как отмечалось выше, с помощью метода газовой хроматографии определяют хлор-, азот- и фосфорорганические пестициды, полихлорированные и полибромированные бифенилы, нитроароматические соединения и многие другие вещества.

Метод хромато-масс-спектрометрии позволяет определять полихлорированные дибензо-*p*-диоксины, полихлорированные дибензофураны, полихлорированные бифенилы и многие другие высокотоксичные ксенобиотики в природных объектах и биопробах. Кроме того, газовая хроматография используется во многих областях медицины, в гигиене и экологии для определения содержания вредных примесей в воздухе, воде и пищевых продуктах. Этот метод используют также в токсикологии и судебной медицине для диагностики отравлений техническими жидкостями (хлорпроизводными углеводородами, алкоголем и его суррогатами), в фармакологии и фармации для контроля качества препаратов, исследования метаболизма лекарственных средств.

Применение газовой хроматографии в биохимических целях сравнительно долго не получало должной оценки. Считалось, что биологические объекты недостаточно летучи и мало устойчивы

к различным физико-химическим воздействиям, применяемым в газохроматографическом анализе. Успехи в разработке методов расщепления липидов, углеводов и белков до более простых компонентов и превращение их в летучие соединения открыли широкую дорогу для применения метода в биохимическом анализе. Особенно велики успехи в исследовании липидов, в особенности жирных кислот. Возможность определения индивидуального состава жирных кислот тех или иных липидов является мощным инструментом в познании структуры и функции биологических мембран, процессов внутриклеточного метаболизма. Газохроматографическое определение спектра карбоновых кислот цикла Кребса внесло большой вклад в понимание процессов метаболизма при различных патологических состояниях. Газовая хроматография используется в медицинской микробиологии и диагностике врожденных нарушений метаболизма. Перспективой применения данного метода является концепция метаболических профилей – систем интегральной оценки метаболизма. С унификацией основных техник газовой хроматографии, ростом чувствительности детекторов станет возможно повседневное использование метаболических профилей в целях практической диагностики.

Практическая работа 10
Анализ многокомпонентной смеси
углеводородов методом
газо-жидкостной хроматографии

Оборудование и реактивы: хроматограф; медицинские шприцы на 1 см; колбы с притертыми пробками объемом 10 мл; толуол; ксилол; ацетон; изопропилбензол; циклогексан; этилацетат.

Задание 1. Анализ смеси компонентов методом нормировки с калибровочными коэффициентами

Выполнение работы

Из компонентов, входящих в состав анализируемой пробы, готовят искусственные (калибровочные) смеси известного процентного содержания (например, смешивают толуол, ксилол, этилацетат и

изопропилбензол в объемных соотношениях **1:1:1:1** и т. д.). Смеси составляют в колбочках с притертыми пробками с помощью пипеток, набирая жидкости грушей. Для каждой жидкости необходимо иметь специальную пипетку. Нельзя загрязнять чистые вещества, используя одну пипетку для нескольких жидкостей без тщательной просушки. Анализируемую смесь получают у лаборанта.

Для определения времени удерживания компонентов, входящих в состав смеси, необходимо сначала записать хроматограммы чистых компонентов. Чистые компоненты, искусственные смеси и анализируемую пробу вводят в испаритель хроматографа последовательно в количестве **0,05** мл. Перед каждым отбором проб шприц следует просушить для удаления следов предыдущей пробы. Следующую пробу вводят в испаритель только после записи всех пиков предыдущей пробы. Если проба введена неудачно (когда проба мала, пики получаются низкими, велика – тумблер зашкаливает), анализ пробы следует повторить после выхода всех компонентов. На хроматограммах нужно сделать соответствующие пометки.

Качественный анализ основан на сравнении времени удерживания известных чистых компонентов с временем удерживания веществ, входящих в состав анализируемой пробы.

Количественный анализ. Содержание отдельных компонентов рассчитывают по площадям полученных пиков. Замер площади отдельного пика осуществляется следующим образом: измеряют высоту **h** от базовой (нулевой) линии до вершины пика, делят ее пополам и на расстоянии, равном половине высоты, измеряют отрезок **a** – отрезок, параллельный нулевой линии на высоте **1/2 h**. Отрезок измеряют или по ширине линии, вычерченной пером самописца, или от внешней стороны одной линии до внешней стороны другой (см. рис. 3.12).

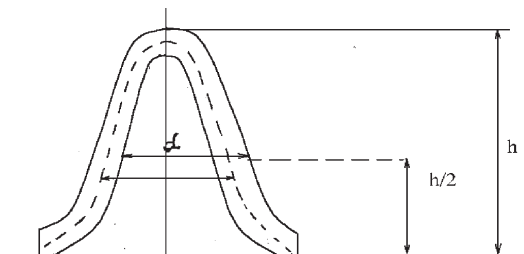


Рис. 3.12. Параметры хроматографического пика

Концентрация компонентов в анализируемой смеси рассчитывается методом нормировки с калибровочными коэффициентами по формуле:

$$\% = (S_i \cdot K_i / \sum S_i \cdot K_i) \cdot 100.$$

Примечание: данный метод расчета процентного содержания компонентов в смеси может быть использован только в том случае, если все компоненты смеси дают хорошо записанные хроматографические пики и имеют различные времена удерживания.

Задание 2. Анализ смеси методом внутреннего стандарта. Преимущество метода внутреннего стандарта заключается в том, что в отличие от предыдущего метода нет необходимости идентифицировать все пики хроматограмм: достаточно определить необходимые пики. Метод основан на добавлении в анализируемую смесь известного количества определенного вещества, называемого внутренним стандартом. При этом стандарт не должен реагировать с компонентами смеси. Например, при анализе смеси гомологов стандарт должен быть членом этого гомологического ряда. Время удерживания стандарта должно быть равно среднему времени удерживания компонентов смеси.

Выполнение работы

После хроматографирования искусственных смесей измеряют параметры пиков анализируемых компонентов и стандартного вещества и строят калибровочные кривые. По оси ординат откладывают отношение площадей пиков определяемого вещества и внутреннего стандарта, а по оси абсцисс – отношение объемных или весовых процентных содержаний обоих веществ (рис. 3.13.)

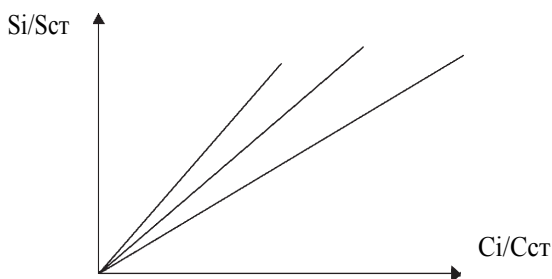


Рис. 3.13. Калибровочные кривые для определения состава смеси

Затем получают у лаборанта анализируемую смесь, содержащую компоненты, для которых были построены калибровочные кривые. Добавляют к этой пробе определенное количество внутреннего стандарта (например, толуола) в таком количестве, чтобы концентрация стандарта соответствовала среднему ее значению в искусственных смесях. Хроматографируют анализируемую смесь и определяют отношение площадей компонентов $S_i/S_{ст}$ для всех компонентов.

Пользуясь калибровочными кривыми (рис. 3.13), находят отношение ($S_i/S_{ст}$) для всех компонентов и рассчитывают их концентрацию. Если идентифицируются и определяются все компоненты смеси, то можно проверить полученный результат: сумма всех концентраций должна составлять 100 %.

Контрольные вопросы

1. В чем состоят теоретические основы газо-жидкостной хроматографии?
2. Принцип выбора газа-носителя, жидкой фазы, твердого носителя.
3. Неполярные и полярные жидкие фазы.
4. Качественный анализ.
5. Способы количественного обсчета хроматограмм.
6. Зависимость времени удерживания от различных факторов.
7. Принципиальная схема хроматографической установки.
8. Каков принцип работы дифференциальных детекторов?
9. В чем сущность капиллярной газо-жидкостной хроматографии?
10. Каковы области применения газовой хроматографии?

Литература

1. Аранович, Г. А. Справочник по физико-химическим методам исследования окружающей среды / Г. А. Аранович, Ю. Н. Коршунов, Ю. С. Ляликов. – Л., 1979. – 647 с.
2. Яворовская, С. Ф. Газовая хроматография – метод определения вредных веществ в воздухе и в биологических средах / С. Ф. Яворовская. – М.: Медицина, 1972. – С. 5–32.

3. Гольберт, К. А. Курс газовой хроматографии / К. А. Гольберт, М. С. Вигдергауз. – М.: Химия, 1974. – С. 160–202.
4. Митрука, Б. М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине / Б. М. Митрука. – М.: Медицина, 1978. – С. 15–85.
5. Зеленин, К. Н. Газовая хроматография в медицине / К. Н. Зеленин // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 11. – С. 20–25.
6. Столяров, Б. В. Практическая газовая и жидкостная хроматография / Б. В. Столяров и др. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 1998. – 610 с.
7. Васильев, В. П. Аналитическая химия: в 2 ч. Ч. 2: Физико-химические методы анализа: учебник для химико-технол. спец. вузов / В. П. Васильев. – М.: Высш. шк., 1989. – 384 с.
8. Васильев, В. П. Аналитическая химия: в 2 ч. Ч. 2: Физико-химические методы анализа: учебник для химико-технол. спец. вузов / В. П. Васильев. – М.: Высш. шк., 1989. – С. 327–328.
9. Практикум по физико-химическим методам анализа / под ред. О. М. Петрухина. – М.: Химия, 1987. – 248 с.
10. Вольтамперометрия органических и неорганических соединений / под ред. П. К. Аганесяна, С. И. Жданова. – М.: Наука, 1985. – 248 с.
11. Кнорре, Д. Г. Физическая химия / Д. Г. Кнорре, Л. Ф. Крылова, В. С. Музыкантов. – М.: Высш. шк., 1990. – 416 с.
12. Алесковский, В. Б. Физико-химические методы анализа: практическое руководство / В. Б. Алесковский, В. В. Бардин, М. И. Булатов. – Л.: Химия, 1988. – 376 с.
13. Ольшанова, К. М. Практикум по хроматографическому методу анализа / К. М. Ольшанова. – М.: Высш. шк., 1970. – 312 с.
14. Казин, В. Н., Урванцева Г. А. Физико-химические методы исследования в экологии и биологии: учеб. пособие / В. Н. Казин, Г. А. Урванцева. – Ярославль: ЯрГУ, 2002. – 172 с.
15. Орлова, Т. Н. Физические методы анализа в химии; учеб. пособие / Т. Н. Орлова и др. – Ярославль, 2008. – 166 с.
16. Лебедев, А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии / А. Т. Лебедев. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2003. – 493 с.

4. Основы метода полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод, который позволяет найти в исследуемом клиническом материале небольшой участок генетической информации любого организма, специфичный только для данного вида организмов, среди огромного количества других участков и многократно размножить это.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была открыта в 1983 г., и американский журнал «Science» назвал это открытие самым выдающимся открытием последних лет.

С быстротой молнии метод распространился по всему миру. ПЦР используется для проведения научных и практических исследований. Но прежде всего метод нашел широкое применение в области микробиологической диагностики.

Принцип метода: метод ПЦР основан на естественной репликации ДНК, включающей расплетение двойной спирали ДНК, расхождение нитей ДНК и комплементарное дополнение обеих.

Репликация ДНК в ПЦР-методе может начаться не в любой точке, а только в определенных *стартовых блоках* – коротких двунитевых участках ДНК. Суть метода заключается в том, что, маркируя такими блоками специфический только для данного вида организмов участок ДНК, можно многократно воспроизвести (*амплифицировать*) именно этот участок.

Для того чтобы осуществить такой процесс *in vitro* (в пробирке), используют две генетические пробы, называемые *праймерами*, которые служат в качестве затравки для синтеза выбранного участка ДНК. При внесении в исследуемую пробу праймеры подобно паре генетических детективов прочесывают раствор в поисках участка, которому они комплементарны и, следовательно, способны присоединиться, образовав двунитчатый стартовый участок. После присоединения праймеров (*отжиг*) начинается воспроизведение специфического фрагмента ДНК с помощью фермента *Taq-полимеразы*. Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации – это и есть цепная полимеразная реакция в ПЦР-методе. В результате

ее количество копий специфического участка ДНК увеличивается в геометрической прогрессии и через 25 циклов амплификации синтезируются 10^6 копий фрагмента. В течение 30–40 циклов нарабатывается количество ДНК, достаточное, чтобы визуально учитывать результаты реакции после электрофореза в агарозном геле. Протекание ПЦР (т. е. переход от стадии к стадии и от цикла к циклу) регулируется изменением температуры рабочей смеси:

А) *температура денатурации ДНК* является функцией ионной силы используемого буфера;

Б) *температура отжига* – температура, при которой возможно связывание праймера с матрицей, зависит от длины праймера и его первичной структуры;

В) *температура элонгации*, зависит от типа используемой ДНК-полимеразы.

Чувствительность: очень высокая – около 10 бактериальных клеток, в то время как чувствительность иммунологических и микроскопических тестов колеблется в пределах 10^3 – 10^6 клеток.

Специфичность: 100 %.

Для ПЦР-анализа пригоден любой материал, в том числе и гистологические препараты.

Количество исследуемого материала составляет несколько десятков мл, но при низкой концентрации возбудителя может быть увеличен в сотни и тысячи раз за счет необходимости экстракции ДНК и РНК.

Исследуемый материал можно дезинфицировать химической или термической обработкой в момент его забора, и, следовательно, исключается возможность инфицирования персонала в процессе проведения ПЦР.

Оборудование и реагенты

В настоящее время метод ПЦР автоматизирован, довольно прост в исполнении и доступен любой молекулярно-биологической лаборатории. Для получения ответа на интересующие вопросы диагностики достаточно лишь смешать в пробирке:

1) ДНК-мишень, 10 нг/мкл;

2) праймеры – короткие олигонуклеотиды (20–30 нукл.) – затравки, комплементарные 3'-концевым последовательностям антипараллельных цепей ДНК гена, 2 шт., концентрация каждого 5 пмоль/мкл;

- 3) дезоксирибонуклеозидтрифосфаты 4 типов, смесь 2мМ;
- 4) *Taq*-ДНК-полимераза термостабильная, 5 Е/мл (название свое фермент получает по имени штамма-продуцента);
- 5) ПЦР-буфер (ТРИС-буфер (рН 8.4), 200мМ; КСl, 500мМ; 0.01 % Tween 20);
- 6) раствор MgCl₂, 25мМ;
- 7) вода деионизованная;
- 8) программируемый термостат (*амплификатор*), который по заданной программе автоматически проводит смену температур реакционной среды.

Определение можно проводить в разнообразном клиническом материале (кровь, сыворотка, мокрота, слюна, желудочный сок, биопсийный материал, мазки, смывы) и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва).

Проведение анализа

ПЦР состоит из 3 основных процедур:

- 1) подготовки исследуемой пробы материала (выделение ДНК);
- 2) собственно ПЦР;
- 3) детекции продукта ПЦР (амплифицированной ДНК).

Пятью основными компонентами ПЦР являются следующие:

- а) фермент *Taq*-ДНК-полимераза;
- б) пара олигонуклеотидных праймеров;
- в) 4 типа дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATФ, dГТФ, dЦТФ, dТТФ);
- г) копируемая ДНК;
- д) ионы Mg⁺².

Вспомогательными компонентами являются буферный раствор и минеральное масло.

Поскольку праймеры каждый раз встраиваются в амплифицируемые фрагменты ДНК-матрицы (*амплификоны*), то они в реакционной смеси ПЦР присутствуют в избытке.

Как правило, праймеры для ПЦР-детекции инфекционных возбудителей создают на консервативные участки их ДНК, которые редко подвергаются генетическим перестройкам. Поиски таких участков осуществляют при помощи специальных компьютерных программ.

Результаты получают через несколько часов, то есть в течение одного рабочего дня.

Клинико-диагностическое значение. ПЦР в настоящее время является наиболее совершенным диагностическим методом, позволяющим выявлять единичные клетки возбудителей многих инфекционных заболеваний за счет амплификации специфических для этих возбудителей фрагментов ДНК.

ПЦР позволяет обнаруживать патогенные для человека бактерии и вирусы даже в тех случаях, когда другими способами (иммунологическим, бактериологическим, микроскопическим) их выявление невозможно.

Тест-системы на основе ПЦР эффективны при диагностике трудно культивируемых, не культивируемых и персистирующих форм патогенных бактерий. С этим приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, а также при тестировании объектов внешней среды.

Метод позволяет определять число копий возбудителя в пробе и тем самым контролировать вирусемию или бактеремию в процессе лечения.

Метод также пригоден для выявления носителей дефектных генов (например, ген HbS серповидно-клеточной анемии).

ПЦР-диагностикумы, в отличие от иммунологических тест-систем, позволяют избежать проблем, связанных с перекрестно-реагирующими антигенами, тем самым обеспечивая абсолютную специфичность определения патогенного организма.

Контрольные вопросы

1. В чем суть метода полимеразной цепной реакции (ПЦР)?
2. Каковы области применения метода?

Литература

1. Лабораторная диагностика ЗППП и полимеразная цепная реакция / под ред. Г. Б. Смирнова. – М.: ЛАГИС, 2004. – 16 с.
2. Выявление микобактерий туберкулёзного комплекса методом полимеразной цепной реакции с одновременной идентификацией вида *M. Tuberculosis* / А. Б. Беклемишев и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – Т. 4, № 7. – С. 50–53.

5. Абсорбционная спектроскопия в анализе биомолекул

Абсорбционная спектроскопия имеет дело со спектрами, характеризующими способность веществ поглощать энергию электромагнитного излучения. Абсорбция вещества (A) – безразмерная величина, измеряется от нуля (абсолютно прозрачные растворы) до бесконечности (абсолютно непрозрачные растворы). Концентрацию растворенного вещества можно определить без каких-либо химических операций, измеряя абсорбцию в монохроматических лучах с заранее выбранной длиной волны. Каждое вещество имеет свой строго индивидуальный спектр поглощения.

Принцип ультрафиолетовой спектроскопии основан на свойстве молекул вещества поглощать излучение в диапазоне длин волн 190–380 нм (УФ-диапазон). Теоретические основы метода подробно изложены в других учебных пособиях, приведенных в списке литературы [4, 5].

Практическая работа 11

Определение белка спектрофотометрическим методом

Оборудование и реактивы. Однолучевой сканирующий спектрофотометр Unicо, модель 2802; сыворотка крови.

Сущность спектрофотометрических методов определения содержания белков в растворе состоит в том, что оптическая плотность раствора в определенных зонах ультрафиолетовой части спектра (а для ряда белков – в видимой) линейно связана с концентрацией белка. В видимом диапазоне спектра способностью поглощать свет обладают только окрашенные белки (так называемые хромопротеины, например гемоглобин, цитохромы и др.). В ультрафиолетовой области спектра поглощающей способностью обладают в той или иной степени практически все белки. Наиболее часто для количественных определений используют определение экстинкции белковых растворов при 280 нм, поскольку при этой длине волны большинство белков обладают максимумом поглощения, обусловленным наличием в их составе тирозина и триптофана.

Выполнение работы

Спектрофотометрический метод наиболее прост и быстр, поскольку все определение сводится к измерению оптической плотности раствора или сыворотки крови при 280 нм. В том случае, если поглощение раствора слишком велико, производят его разбавление растворителем в 10 или более раз и измеряют экстинцию разбавленного раствора; при количественных расчетах учитывают произведенное разбавление. Контролем при измерениях всегда служит тот раствор, в котором находится исследуемый белок (вода или определенный буферный раствор).

Определению белка данным методом мешает наличие в растворе нуклеотидов, нуклеиновых кислот и некоторых других веществ, поглощение которых находится вблизи данной области, поэтому метод целесообразно применять тогда, когда есть уверенность в отсутствии этих соединений, например, на заключительных этапах очистки белков.

Этот метод дает хорошие результаты с гетерогенной смесью белков. При работе со смесями белков условно принимают, что 1 ед. оптической плотности раствора при 280 нм соответствует суммарной концентрации белков, приблизительно, 1 мг/мл (при этом используют кварцевую кювету с квадратным сечением 1x1 см).

Спектрофотометрический метод применяется в современной биохимии очень широко: помимо вышеперечисленных, дополнительным достоинством метода является возможность дальнейшего использования раствора белка после определения абсорбции. Особенно удобно использовать данный метод для контроля за изменениями концентрации белков в элюате при хроматографическом разделении белковых смесей на колонках, то есть для построения так называемых «профилей элюции» белков (см. работу № 1).

Практическая работа 12

Исследование спектральных свойств макромолекул

Цель работы: исследовать образцы биополимеров методом спектрофотометрии.

Оборудование и реактивы: Однолучевой сканирующий спектрофотометр Unicо, модель 2802, кварцевые кюветы, пробирки, водные растворы ароматических аминокислот, белка и ДНК, дистиллированная вода, пипетки, водяная баня, лед, фильтровальная бумага.

Свойство атомов и молекул поглощать свет с определенной длиной волны, характерной для данного вещества, используется для качественных и количественных исследований. Поглощение света связано с электронными переходами между энергетическими уровнями в молекулах, поэтому измерение спектров поглощения позволяет судить о строении молекул, химическом составе вещества и его состоянии в биологических структурах.

Поглощение кванта электромагнитной энергии атомами и молекулами осуществляется в широком диапазоне длин волн. Классификация областей электромагнитного излучения представлена в табл.5.1 .

Таблица 5.1

Классификация областей электромагнитного спектра

<i>Область спектра</i>	<i>Спектральные характеристики</i>	
	<i>λ, нм</i>	<i>ν, см⁻¹</i>
Вакуумный ультрафиолет	10-200	5·10 ⁴ -10 ⁶
Ультрафиолет	200-400	2,5·10 ⁴ -5·10 ⁴
Видимая	400-750	1,3·10 ⁴ -2,5·10 ⁴
Ближняя инфракрасная	750-2,5·10 ⁴	400-1,3·10 ⁴
Дальняя инфракрасная	2,5·10 ⁴ -10 ⁶	10-400

Белки имеют два типа хромофорных групп: собственно пептидные связи, боковые группы аминокислотных остатков. Они поглощают свет в УФ области и не поглощают в видимой области. В ближнем ультрафиолетовом диапазоне спектра поглощением обладают только три аминокислоты: триптофан, тирозин, фенилаланин.

Максимумы поглощения, специфические для каждой аминокислоты, лежат в области 260–280 нм.

Таблица 5.2

Спектральные свойства аминокислот при нейтральном рН

<i>Аминокислоты</i>	<i>Коэффициент молярной экстинкции, моль⁻¹-см⁻¹-л</i>	<i>Максимум поглощения,</i>
		<i>нм</i>
Триптофан	5,6·10 ³	280
Тирозин	1,38·10 ³	275
Фенилаланин	0,18·10 ³	257

При включении аминокислот в структуру белка их спектры не очень изменяются. Поэтому оптическая плотность раствора белка равняется сумме оптических плотностей триптофана, тирозина и фенилаланина.

Аминокислоты в свободном состоянии содержат свободные карбоксильные и аминогруппы, поэтому их спектры поглощения могут изменяться с изменением рН. Наибольшие изменения при изменении рН раствора претерпевает спектр поглощения тирозина. В щелочной среде тирозин переходит в ионизированную форму – тирозинат. Спектр поглощения тирозината смещается в длинноволновую область с максимумом поглощения 294 нм. Спектры поглощения триптофана изменяются при применение высоких концентраций H_2SO_4 , что приводит к ионизации NH -группы триптофана. В результате спектр поглощения триптофана изменяет форму и смещается в длинноволновую область.

Методом спектрофотометрического анализа оценивают чистоту белковых препаратов и отсутствие в них нуклеиновых кислот. С этой целью определяют значения оптической плотности на длинах волн 260 и 280 нм. Соотношение D_{280}/D_{260} является показателем чистоты белкового препарата. Если соотношение $> 1,6-1,7$ – это показатель высокой чистоты образца.

Нуклеиновые кислоты поглощают только в УФ области (180–220 и 240–280 нм). Их хромофорами являются, в основном, пуриновые и пиримидиновые основания. Основные полосы поглощения всех нуклеотидов, кроме цитидина, сосредоточены около 260 нм; у цитидина – при 270 нм. Коэффициенты молярной экстинкции хромофорных групп биополимеров зависят от природы растворителя, рН, длины волны. В табл. 5.3 приведены коэффициенты молярной экстинкции при 260 нм для четырех оснований.

Таблица 5.3

***Коэффициенты поглощения пуриновых
и пиримидиновых оснований***

<i>Основание</i>	<i>Коэффициент молярной экстинкции, моль⁻¹-см⁻¹-л</i>
Аденин	13,410 ³
Гуанин	7,2-10 ³
Цитидин	5,55-10 ³
Тимин	7,4-10 ³

Спектр поглощения ДНК есть суммарный спектр поглощения мономерных нуклеотидов; их основная полоса поглощения расположена при 260 нм. Однако поглощение нативной ДНК заметно меньше, чем поглощение всех оснований входящих в ее состав. При переходе от нативной ДНК (полинуклеотида) к мононуклеотидам происходит прирост поглощения – *гиперхромный эффект*. Гиперхромизм проявляется уже в динуклеотидах (от 2 до 11 %). Эффект возрастает с увеличением длины цепи и достигает максимального значения у олигонуклеотидов из 5–6 остатков.

Гиперхромизм проявляется при переходе от двухспиральных структур к односпиральным (однако в меньшей степени, чем при переходе от полинуклеотидов к мононуклеотидам). Он обусловлен тем, что в двойной спирали ДНК плоскости оснований параллельны (в виде стопок): такая конфигурация приводит к сильному взаимодействию оснований и снижению поглощения. Гиперхромный эффект широко используется как критерий денатурации ДНК.

Выполнение работы

Задание 1. Измерение спектра поглощения раствора ДНК.

Измерить спектр поглощения водного раствора ДНК в диапазоне длин волн 220–320 нм через каждые 5 нм (а в участке спектра 250–270 нм – через 3 нм).

Задание 2. Определение гиперхромного эффекта ДНК.

Раствор ДНК, используемый в задании 1, залить в пробирку с притертой пробкой. Опустить пробирку в горячую водяную баню ($T = 95^{\circ}\text{C}$) на 10–15 минут. Затем пробирку с раствором ДНК остудить на льду. Измерить спектр поглощения денатурированной ДНК в таком же диапазоне длин волн, как и в задании 1. Проанализировать полученный спектр и оценить величину гиперхромного эффекта.

Задание 3. Измерение спектров поглощения ароматических аминокислот в свободном состоянии.

Подготовить к работе прибор (Однолучевой сканирующий спектрофотометр Unicо, модель 2802) в соответствии с инструкцией.

Приготовить водный раствор триптофана в концентрациях 0,1 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,025 мг/мл, при $\text{pH}=7$. Снять спектры поглощения полученных растворов в области 210–320 нм через 5 нм. Проанализировать полученные спектры.

Приготовить два раствора триптофана (0,05 мг/мл) в 5 М и 13 М серной кислоте. Измерить спектры поглощения в области 210–320 нм через 5 нм. Сравнить данные спектры со спектром раствора триптофана при $\text{pH} = 7$ для концентрации 0,05 мг/мл. Объяснить наблюдаемый эффект. Рассчитать коэффициенты молярной экстинкции в максимумах для водного и кислотного растворов триптофана.

Задание 4. Измерение спектров поглощения растворов белков.

Приготовить водные растворы белков яичного альбумина и трипсина в концентрациях 0,2 мг/мл и 0,6 мг/мл, по две концентрации растворов каждого белка. Измерить спектры поглощения белков в области 210–320 нм через 5 нм. По полученным спектрам оценить степень чистоты белковых препаратов, значение коэффициентов экстинкции в максимумах для обоих образцов.

Контрольные вопросы

1. Основные свойства хромофоров белковых молекул.
2. Основные свойства хромофоров нуклеиновых кислот.
3. Понятие гиперхромного эффекта. Почему при переходе ДНК от полинуклеотида к мононуклеотидам наблюдается прирост поглощения?

Литература

1. Владимиров, Ю. А. Физико-химические основы фотобиологических процессов / Ю. А. Владимиров А. Я. Потапенко. – М.: Высшая школа, 1989. – 190с.
2. Чанг Р. Физическая химия с приложением к биологическим системам / . – М.: Мир, 1980. – 660 с.
3. Гавриленко, В. Ф. Большой практикум по фотосинтезу / В. Ф. Гавриленко, Т. В. Жигалова; под ред. Н. М. Ермакова. – М.: Академия, 2003. – 256 с.
4. Шмидт, В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов / В. Шмидт. – М.: Техносфера, 2007. – 368 с.
5. Казин, В. Н. Физико-химические методы исследования в экологии и биологии: учеб. пособие / В. Н. Казин, Г. А. Урванцева. – Ярославль, 2002. – 172 с.

Практическая работа 13
Определение удельной активности
кислой фосфатазы
спектрофотометрическим методом

За единицу активности фермента (Е) принимают такое его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль вещества за 1 мин. Число единиц фермента в тканях определяют по формуле:

*Количество превращенного субстрата, мкмоль/ навеска ткани, г * время инкубации, мин = nЕ.*

Часто находят удельную активность фермента: она равна числу единиц фермента в образце, деленному на массу белка (в мг) в этом образце. Удельной активностью особенно часто пользуются при очистке ферментов: по мере удаления посторонних белков доля выделяемого фермента в препарате увеличивается, следовательно, возрастает удельная активность. По возрастанию удельной активности оценивают эффективность отдельных стадий очистки.

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента имеет линейный характер. Поскольку в большинстве случаев количество фермента невозможно измерить в абсолютных величинах (например, в граммах), то приходится пользоваться единицами, основанными на линейной зависимости скорости реакции от количества фермента. В нашем случае для облегчения расчетов находят удельную активность кислой фосфатазы, выраженную в мкмоль/мин.

Оборудование, реактивы: однолучевой сканирующий спектрофотометр Unicо, модель 2802; кюветы, набор пипеток и микропипеток, штативы с пробирками, 0,2 М ацетатный буфер (рН 4,8), 0,2 М раствор NaOH, п-нитрофенилфосфат, тканевые экстракты, термостат на 37°C.

Выполнение работы

Исследуемый белковый экстракт разбавляют в 50 раз дистиллированной водой. В одну пробирку (опыт) вносят 0,1 мл полученного раствора, добавляют 1,5 мл 0,2 М ацетатного буфера (рН 4,8) и 1,5 мг п-нитрофенилфосфата. В другую пробирку (контроль) помещают только два последних реактива без раствора, содержащего белок. Содержимое обеих пробирок тщательно пе-

ремешивают и инкубируют при 37°C в течение 20 мин. Затем реакцию останавливают добавлением 0,2 М раствора NaOH в каждую пробирку, и только после этого в контроль вносят 0,1 мл разбавленного в 50 раз белкового экстракта. На спектрофотометре при длине волны 415 нм измеряют разницу оптической плотности между опытом и контролем и производят расчет удельной активности кислой фосфатазы по формуле:

$$A = B_{415} / t \cdot m,$$

где A – удельная активность, мкмоль/мин; t – время инкубации с субстратом, мин; m – белок, мг; B415 – разница показаний спектрофотометра между опытом и контролем при длине волны 415 нм.

Литература

1. Справочник биохимика: пер. с англ. / Р. Досон и др. – М.: Мир, 1991. – 554 с.

Оглавление

Введение.....	4
1. Центрифугирование.....	6
1.1. Общие принципы центрифугирования.....	6
1.2. Разделение клеточных органелл дифференциальным центрифугированием.....	7
1.3. Разделение фракций в градиентах плотности.....	9
1.4. Способы центрифугирования в градиентах плотности.....	9
Практическая работа 1. Осаждение ядер из гомогената печени....	11
2. Электрофорез.....	15
2.1. Общие принципы электрофореза.....	15
2.2. Электрофорез на бумаге и ацетате целлюлозы.....	19
2.3. Электрофорез в гелях.....	20
2.4. Диск-электрофорез.....	23
2.5. Применение метода диск-электрофореза.....	24
Практическая работа 2. Фракционирование белков методом электрофореза в полиакриламидном геле.....	25
2.6. Метод энзимэлектрофореза в полиакриламидном геле.....	31
Практическая работа 3. Обнаружение α -амилазы в тканях животного происхождения методом электрофореза в полиакриламидном геле.....	32
Практическая работа 4. Обнаружение кислой фосфатазы методом электрофореза в полиакриламидном геле.....	34
3. Хроматографические методы анализа.....	37
3.1. Общие принципы хроматографии.....	37
3.2. Классификация хроматографических методов.....	39
3.3. Применение методов хроматографии.....	41
3.4. Жидкостная хроматография.....	43
Практическая работа 5. Определение состава смеси аминокислот методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое.....	49
Практическая работа 6. Определение углеводов методом тонкослойной хроматографии.....	51

Практическая работа 7. Количественное определение аминокислот методом хроматографии на бумаге.....	56
Практическая работа 8. Разделение белков методом гель-фильтрации через сефадекс.....	67
Практическая работа 9. Определение пестицидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	72
3.5. Газовая хроматография.....	76
Практическая работа 10. Анализ многокомпонентной смеси углеводов методом газо-жидкостной хроматографии.....	85
4. <i>Основы метода полимеразной цепной реакции (ПЦР)</i>	90
5. <i>Абсорбционная спектроскопия в анализе биомолекул</i>	94
Практическая работа 11. Определение белка спектрофотометрическим методом.....	94
Практическая работа 12. Исследование спектральных свойств макромолекул.....	95
Практическая работа 13. Определение удельной активности кислой фосфатазы спектрофотометрическим методом.....	100

Учебное издание

Урванцева Галина Александровна
Грачева Екатерина Леонидовна

Методы анализа живых систем

Учебное пособие

Редактор, корректор М. В. Никулина
Правка, верстка Е. Б. Половкова

Подписано в печать 11.07.2013. Формат 60×84¹/16.
Усл. печ. л. 6,04. Уч.-изд. л. 5,0.
Тираж 60 экз. Заказ .

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе ЯрГУ.

Ярославский государственный университет
им. П. Г. Демидова.
150000, Ярославль, ул. Советская, 14.



Г. А. Урванцева, Е. Л. Грачева

Методы анализа ЖИВЫХ СИСТЕМ

