

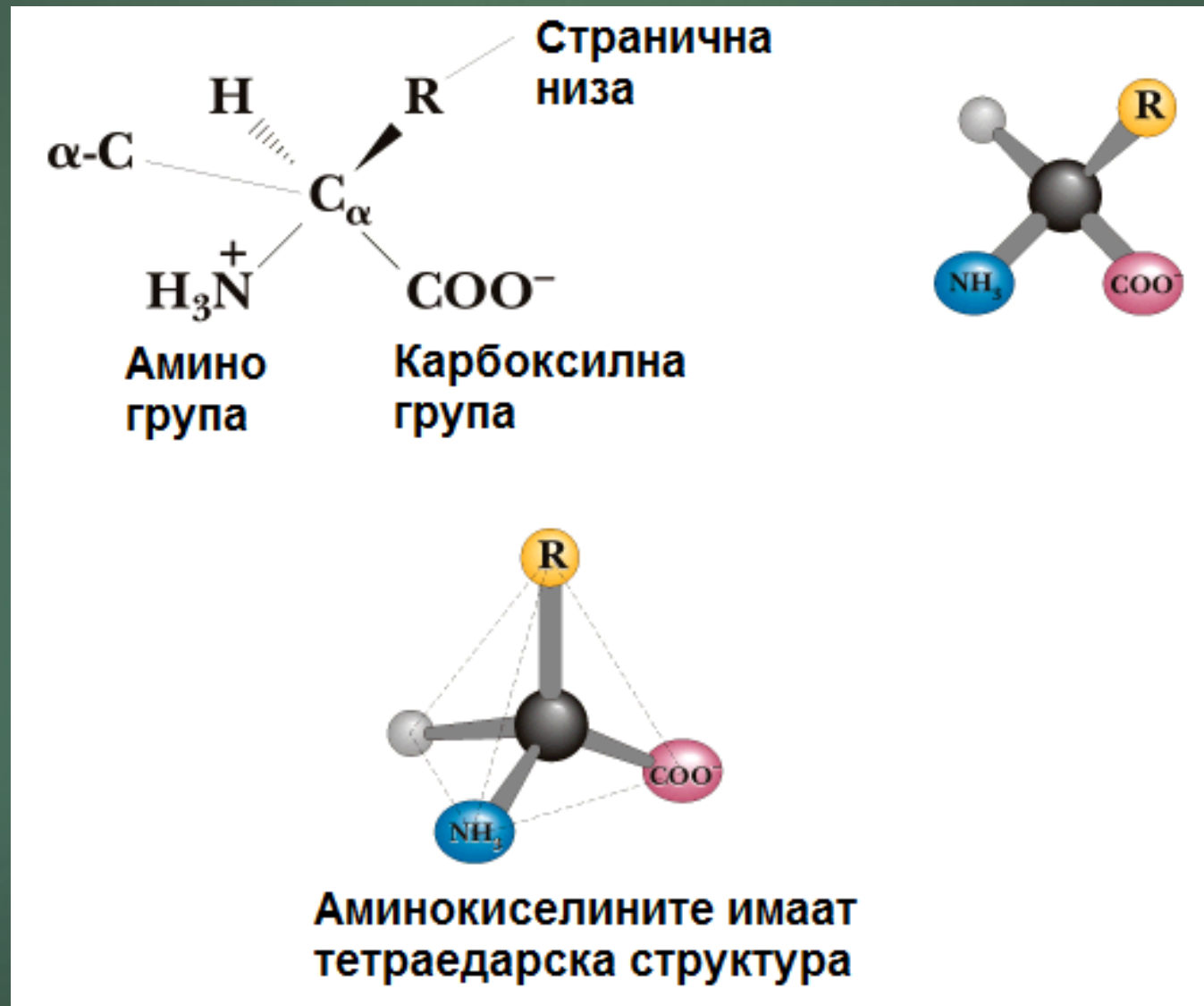


# Јонско-изменувачка хроматографија на аминокиселини и пептиди

# Разделување на аминокиселини

- ▶ Смесите од аминокиселини може да се разделат со хроматографските техники:
  - ▶ Јонско-изменувачка хроматографија
  - ▶ HPLC (High-performance liquid chromatography)

# Аминокиселини- градебни единици на протеините

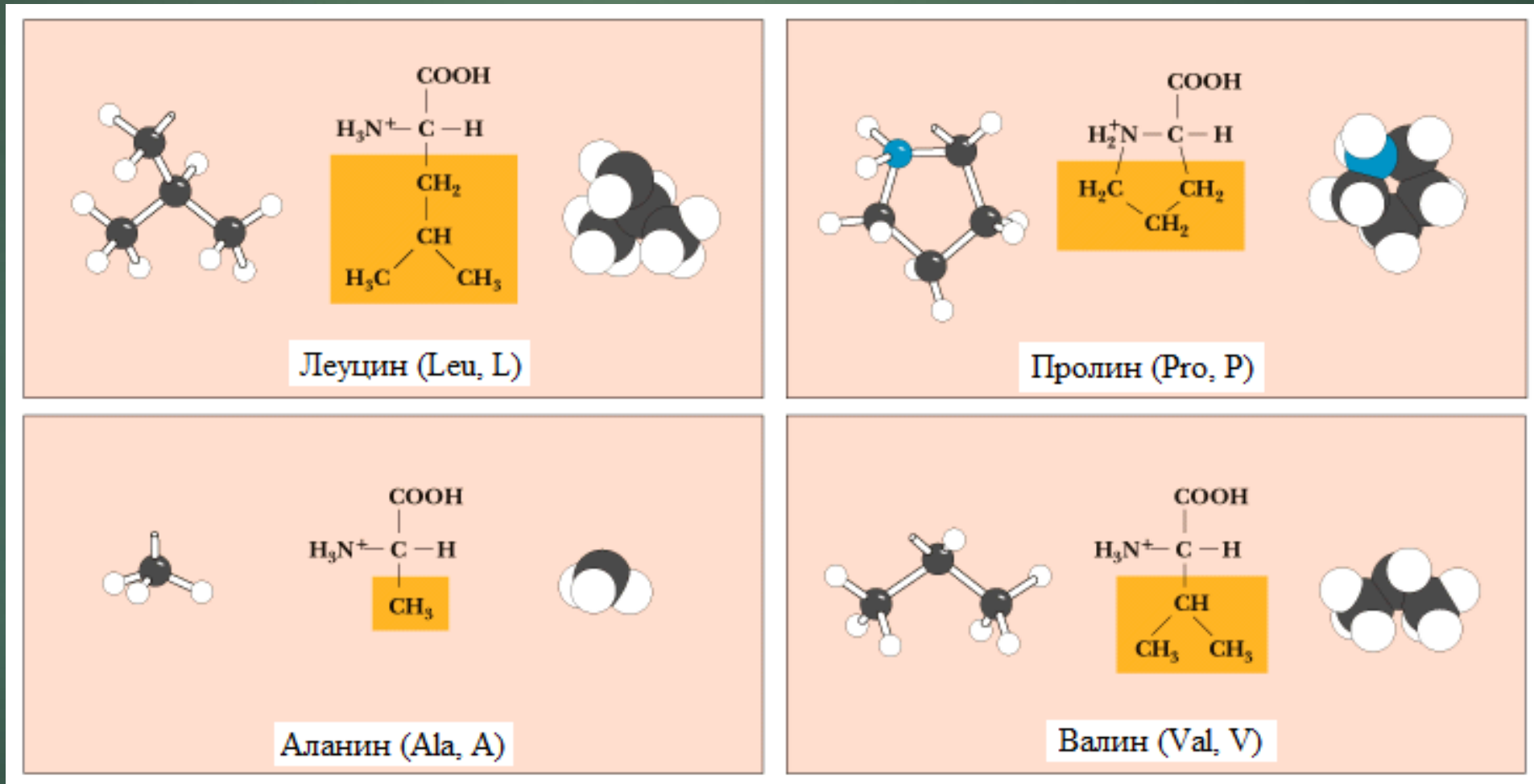


# Вообичаени аминокиселини

- ▶ Потсетување на имињата, структурите и нивните кратенки
  - ▶ Неполарни аминокиселини
  - ▶ Поларни аминокиселини
  - ▶ Кисели аминокиселини
  - ▶ Базни аминокиселини
- ▶ **pKa вредности**
  - ▶ Алфа карбоксилна група  $-pK_a = 2$
  - ▶ Алфа амино група  $-pK_a = 9$
- ▶ Овие вредности се приближни

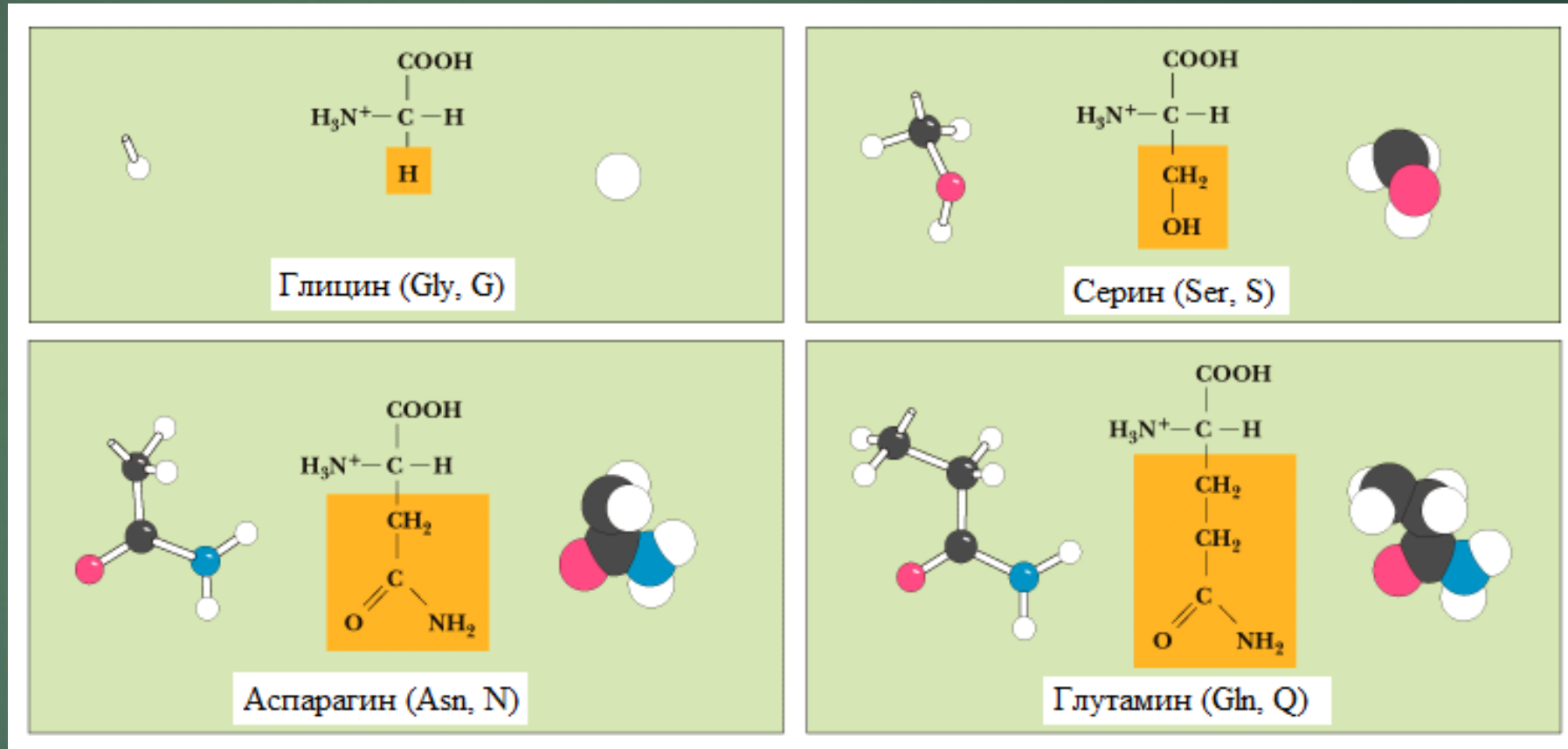
# Неполарни аминокиселини

## ► Хидрофобни

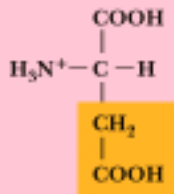
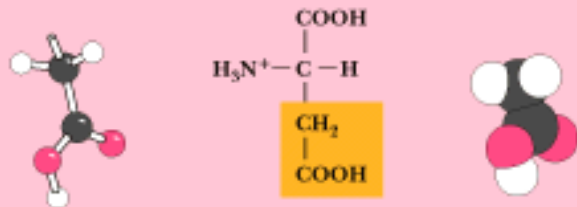


# Поларни аминокиселини

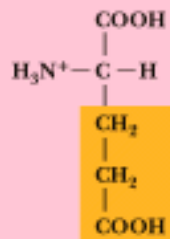
- ▶ Немаат полнеж
- ▶ Серин,  $pK_a = 13$



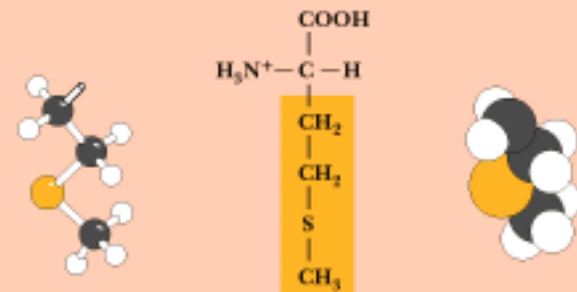
# Кисели аминокиселини



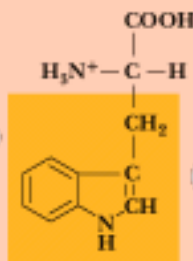
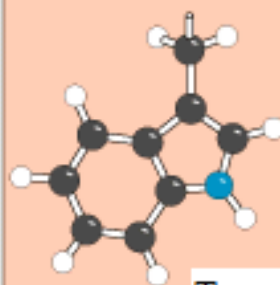
Аспартатна киселина (Asp, D)



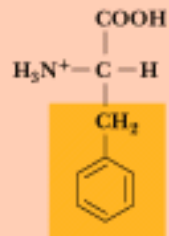
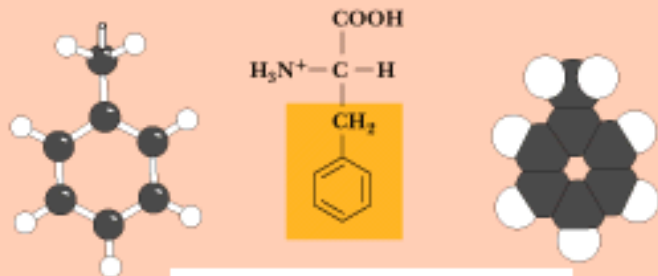
Глутаминска киселина (Glu, E)



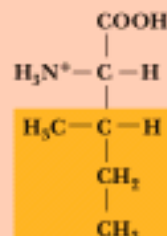
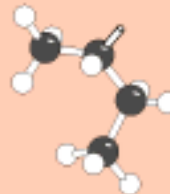
Метионин (Met, M)



Триптофан (Trp, W)



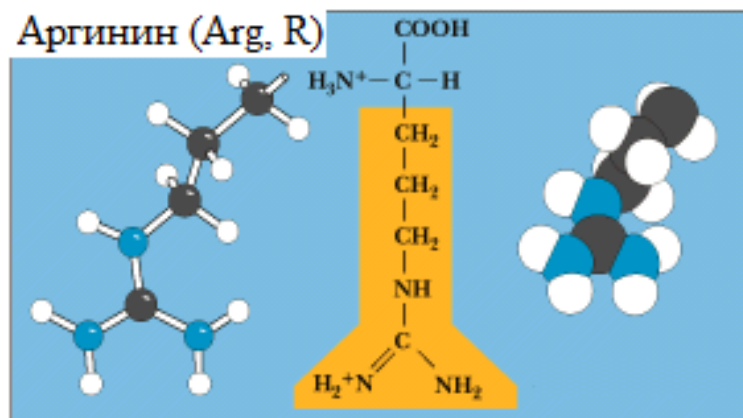
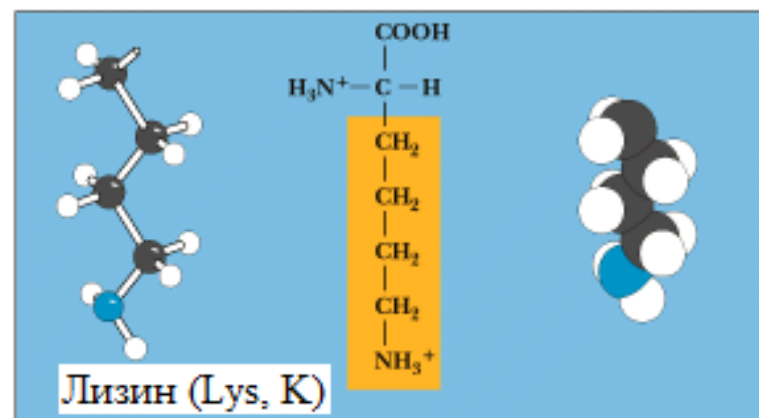
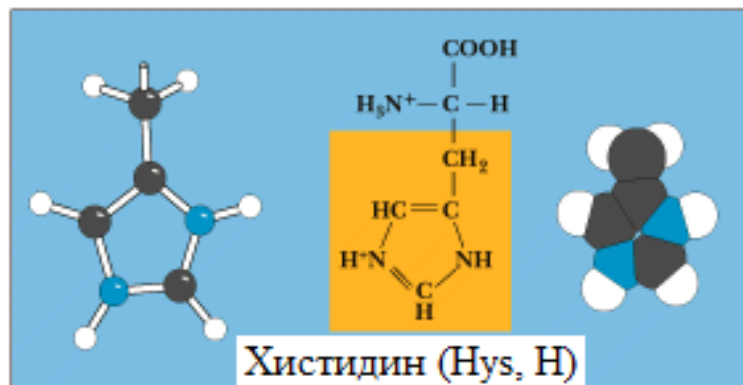
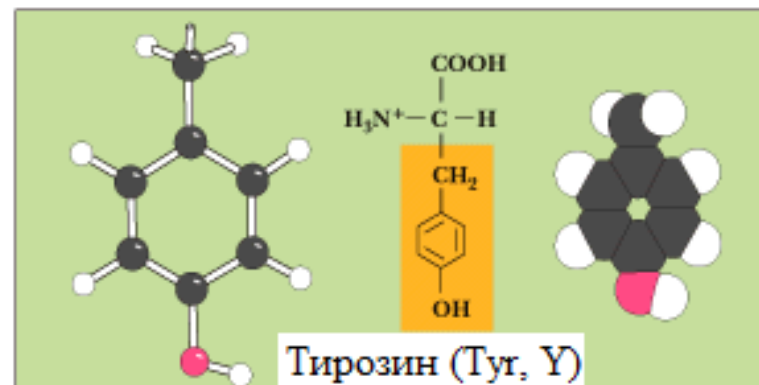
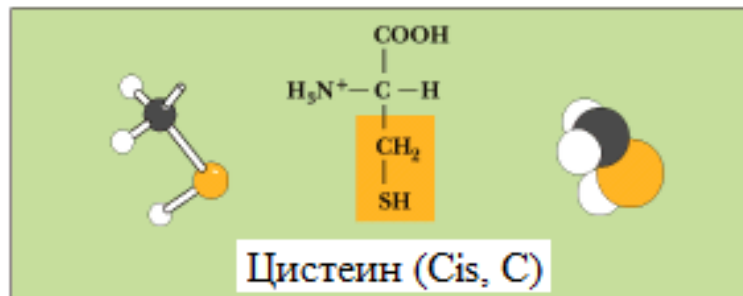
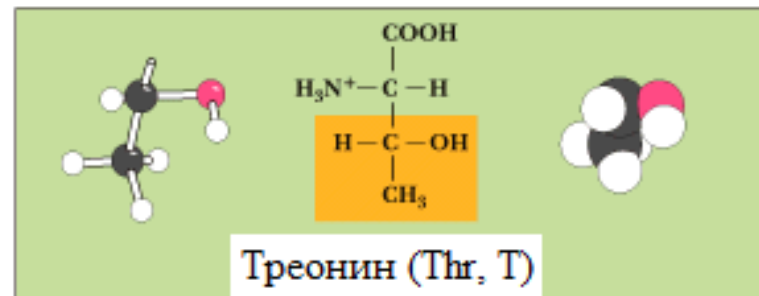
Фенилаланин (Phe, F)



Изолеуцин (Ile, I)

Аспартатна киселина,  $pK_a = 3.9$   
Глутаминска киселина,  $pK_a = 4.3$

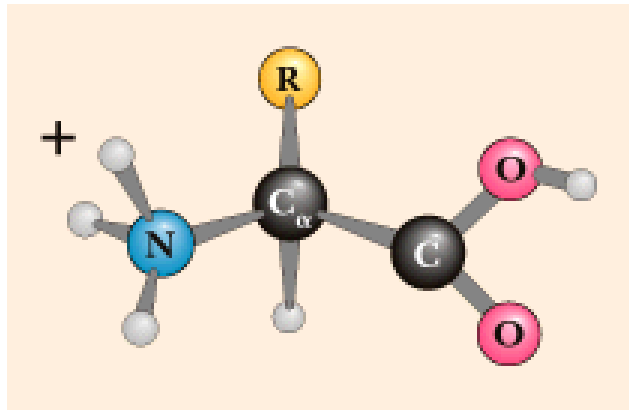
# Базни аминокиселини



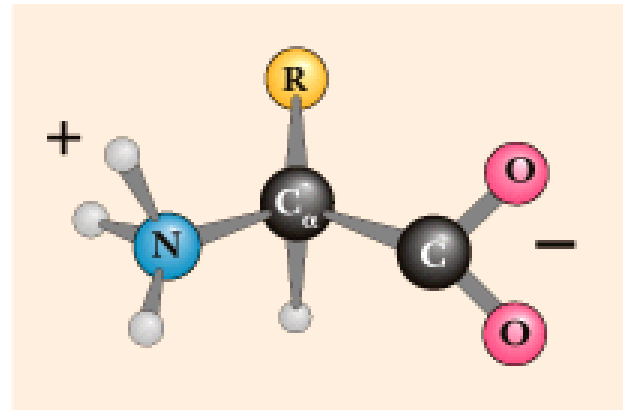
Треонин,  $pK_a = 13$   
 Цистеин,  $pK_a = 8.3$   
 Тирозин,  $pK_a = 10.1$   
 Хистидин,  $pK_a = 6.0$   
 Лизин,  $pK_a = 10.5$   
 Аргинин,  $pK_a = 12.5$

# Влијание на pH врз обликот на аминокиселината

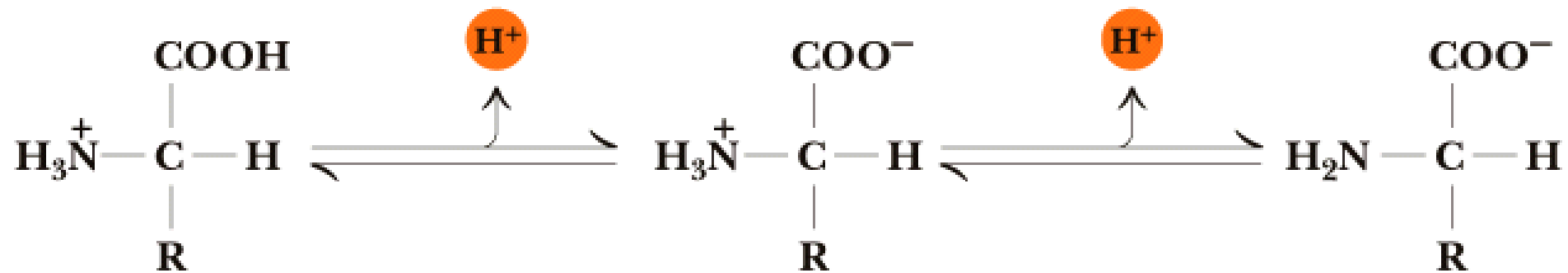
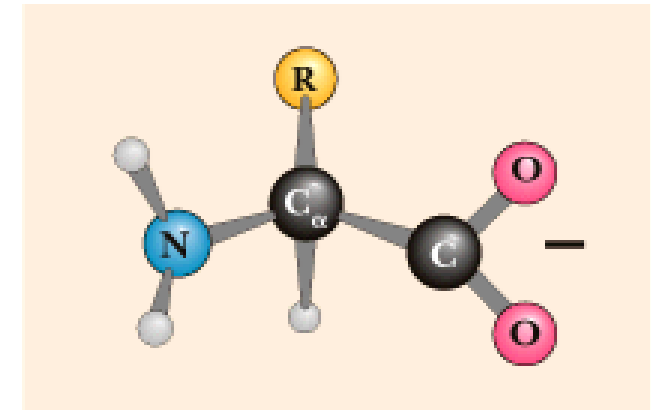
pH 1 **нето полнеж +1**



pH 7 **нето полнеж 0**



pH 13 **нето полнеж -1**

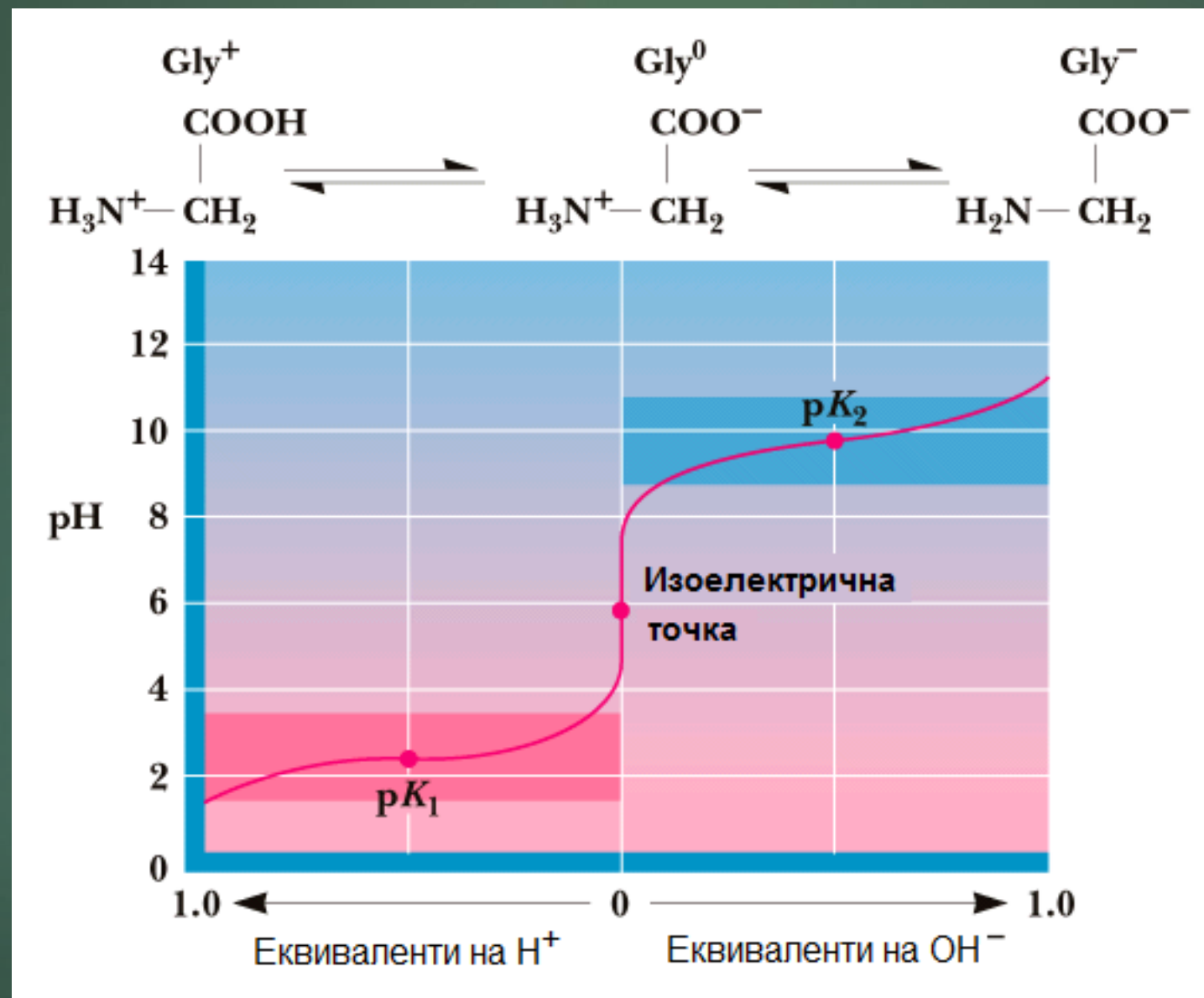


**Катјонска форма**

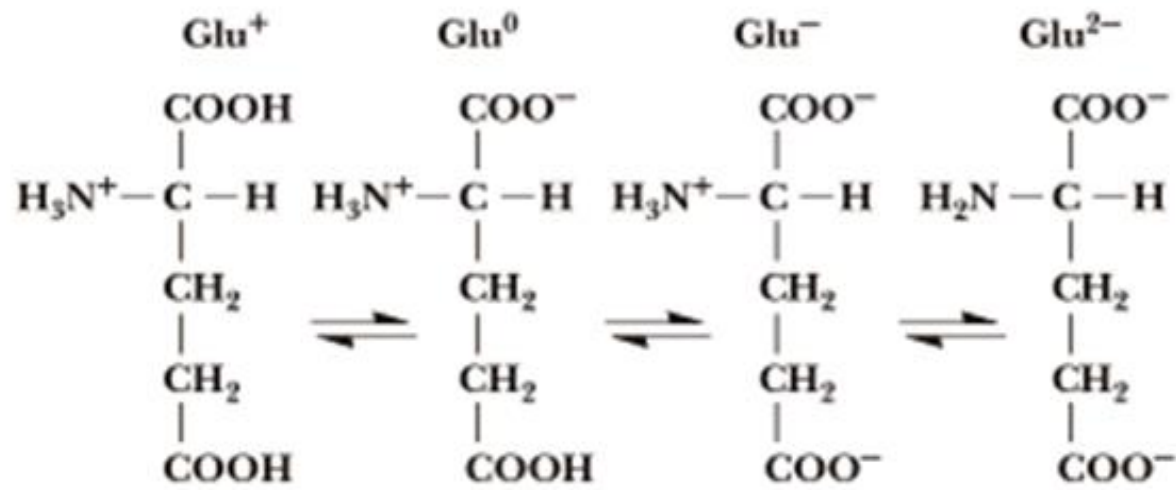
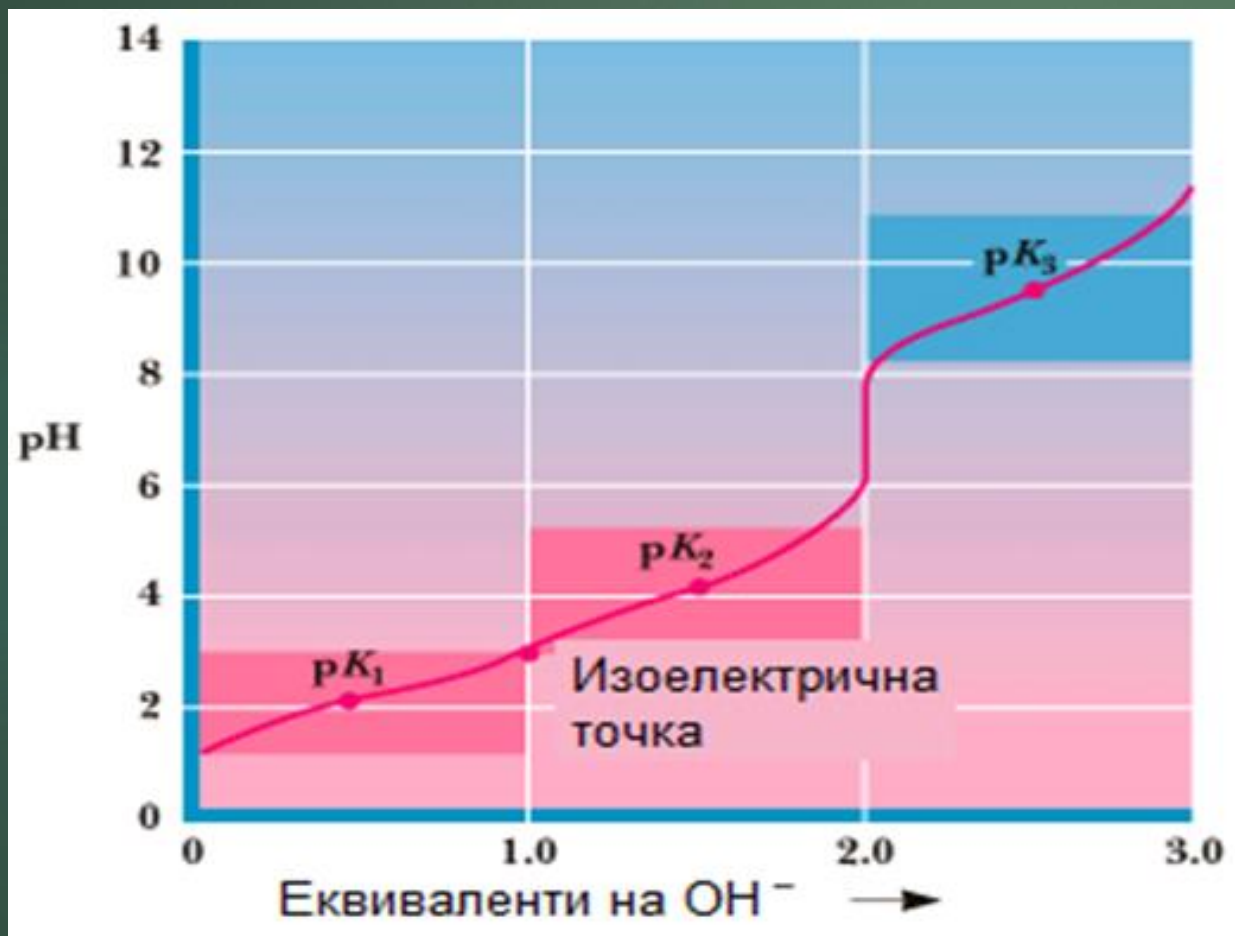
**Цвитерјон (неутрален)**

**Анјонска форма**

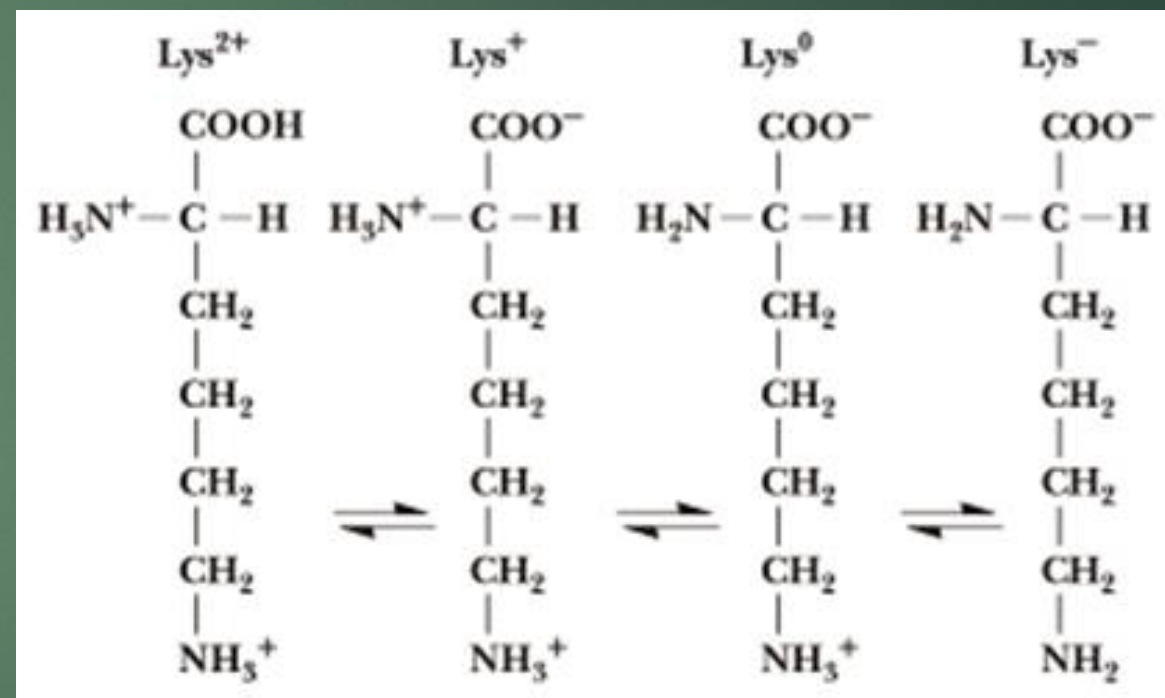
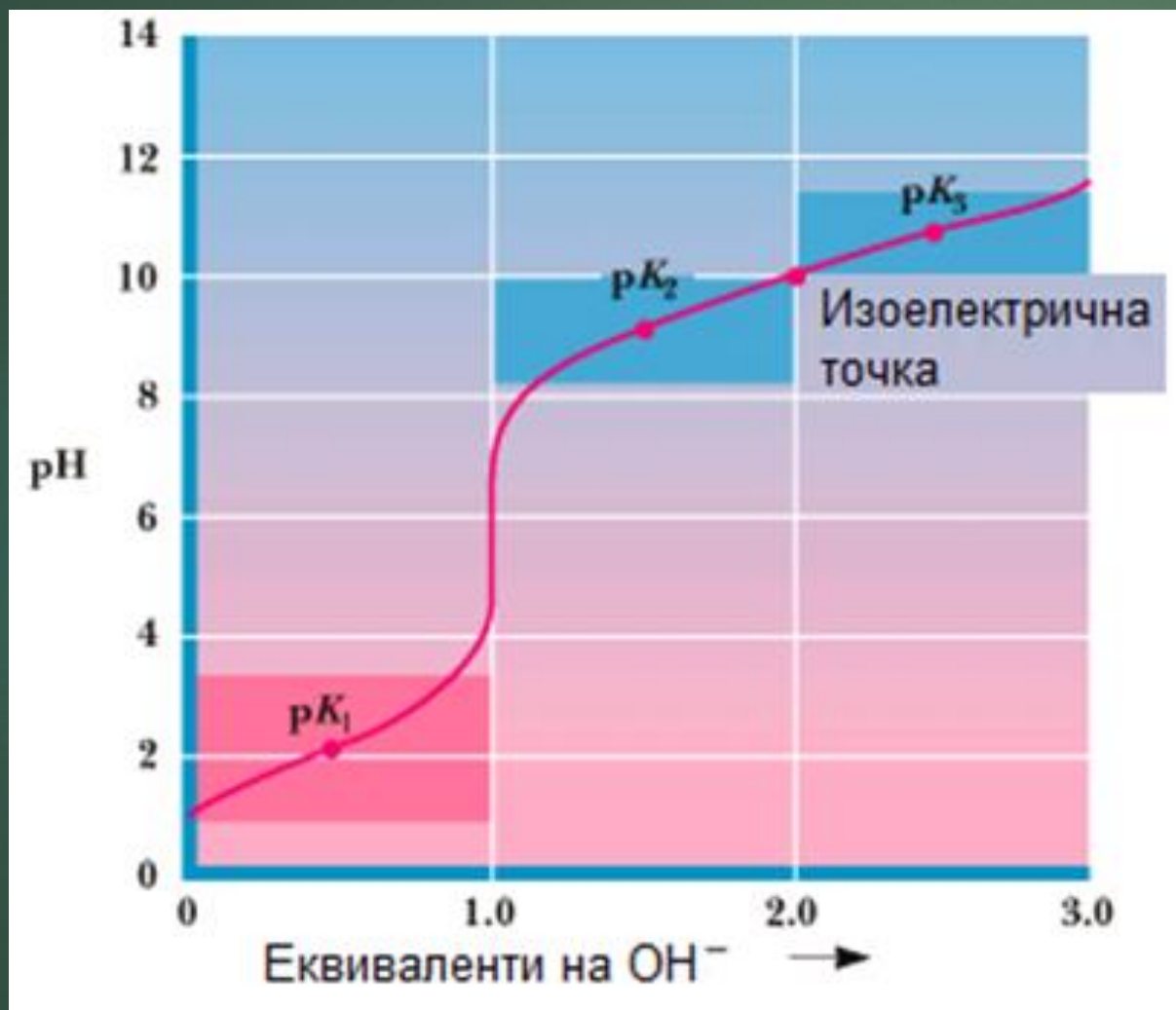
# pH метриска титрација на глицин



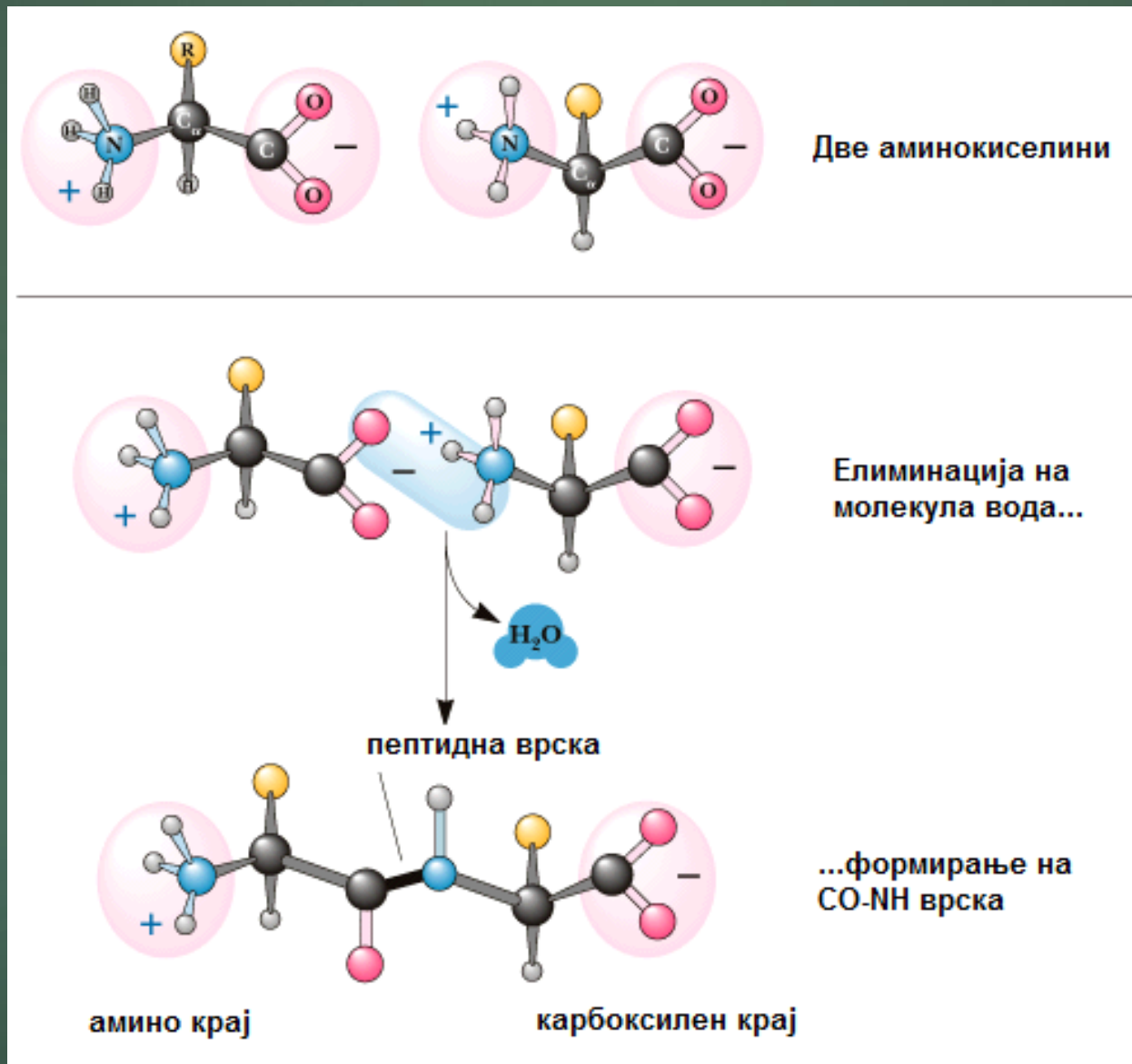
# pH метриска титрација на глутаминска киселина



# pH метриска титрација на лизин



# Пептидна врска



# Разделување на пептиди во однос на полнежот

- ▶ Сите пептиди имаат полнеж. Нивниот полнеж зависи од релативниот број на **киселински** и **базни** аминокиселини во примарната структура.
- ▶ Сите протеини и пептиди имаат pH вредност при која се неутрални (без полнеж). Тоа е **изоелектрична точка (pI)**.

$\text{H}_2\text{N}-$  Met Ala Asn Cys His Glu Ser Thr Glu Arg- $\text{COOH}$

# Разделување на пептиди во однос на полнежот



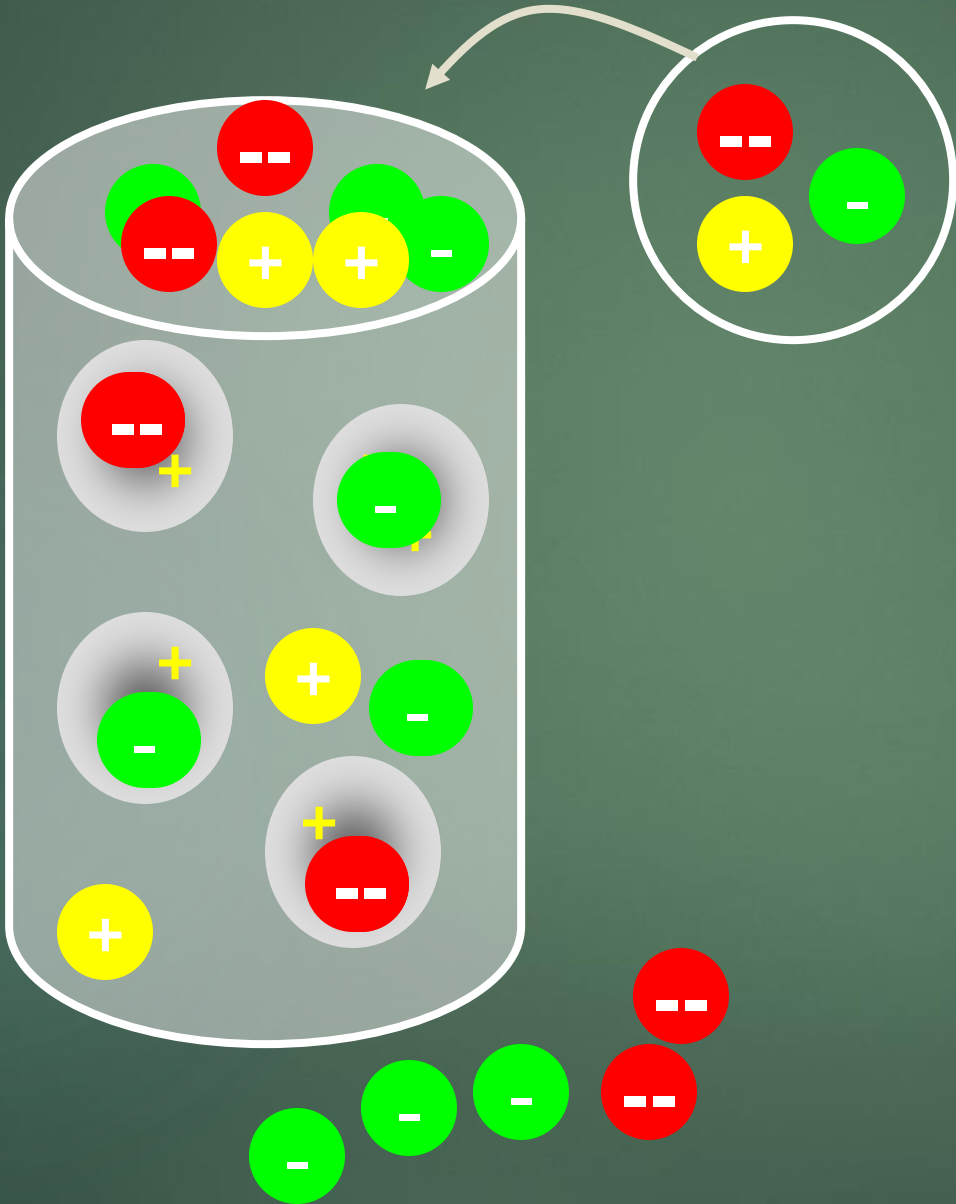
- ▶ His:  $\text{pH} = 6.0$
- ▶ Glu:  $\text{pH} = 4.1$
- ▶ Arg:  $\text{pH} = 12.5$
- ▶ N-терминален амин:  $\text{pH} = 8.0$
- ▶ C-терминална киселина:  $\text{pH} = 3.1$

За овој пептид:

$$\text{pI} = \Sigma \text{pKa} / N = 6.3$$

Позитивен полнеж при  $\text{pH} < 6.3$

Негативен полнеж при  $\text{pH} > 6.3$

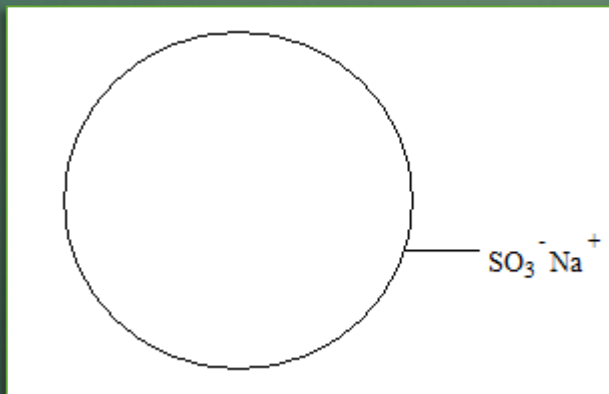


# Принцип на јонско - изменувачка хроматографија

- ▶ Разделувањето со јонско-изменувачка хроматографија се должи на **реверзibilните интеракции** меѓу наелектризираните јони од пробата и активните центри на јонско-изменувачката смола.
- ▶ **Постапка:**
  - ▶ Пакување на колоната со смола и нејзино активирање во средина на пуфер.
  - ▶ Се додава пробата со различно наелектризирани протеини.
  - ▶ Промивање со пуфер, при што се отстранува несврзаниот протеин (неутрален или ист понеж со смолата).
  - ▶ Елуирање со пуфер со зголемена концентрација на солта (поголема јонска сила) и истиснување на протеините со спротивен полнеж од смолата.
  - ▶ Последната фракција ја сочинуваат протеините со најголем нето полнеж.

# Јонско – изменувачки процеси

- ▶ Разделувањето со јонско - изменувачка хроматографија се базира на **компетитивноста на различните јонски соединенија од пробата кон активните центри на јонско-изменувачката смола.**
- ▶ Се воспоставува рамнотежа меѓу јоните во растворот и јоните кои се наоѓаат на површината од нерастворлив цврст матрикс со висока молекулска маса.

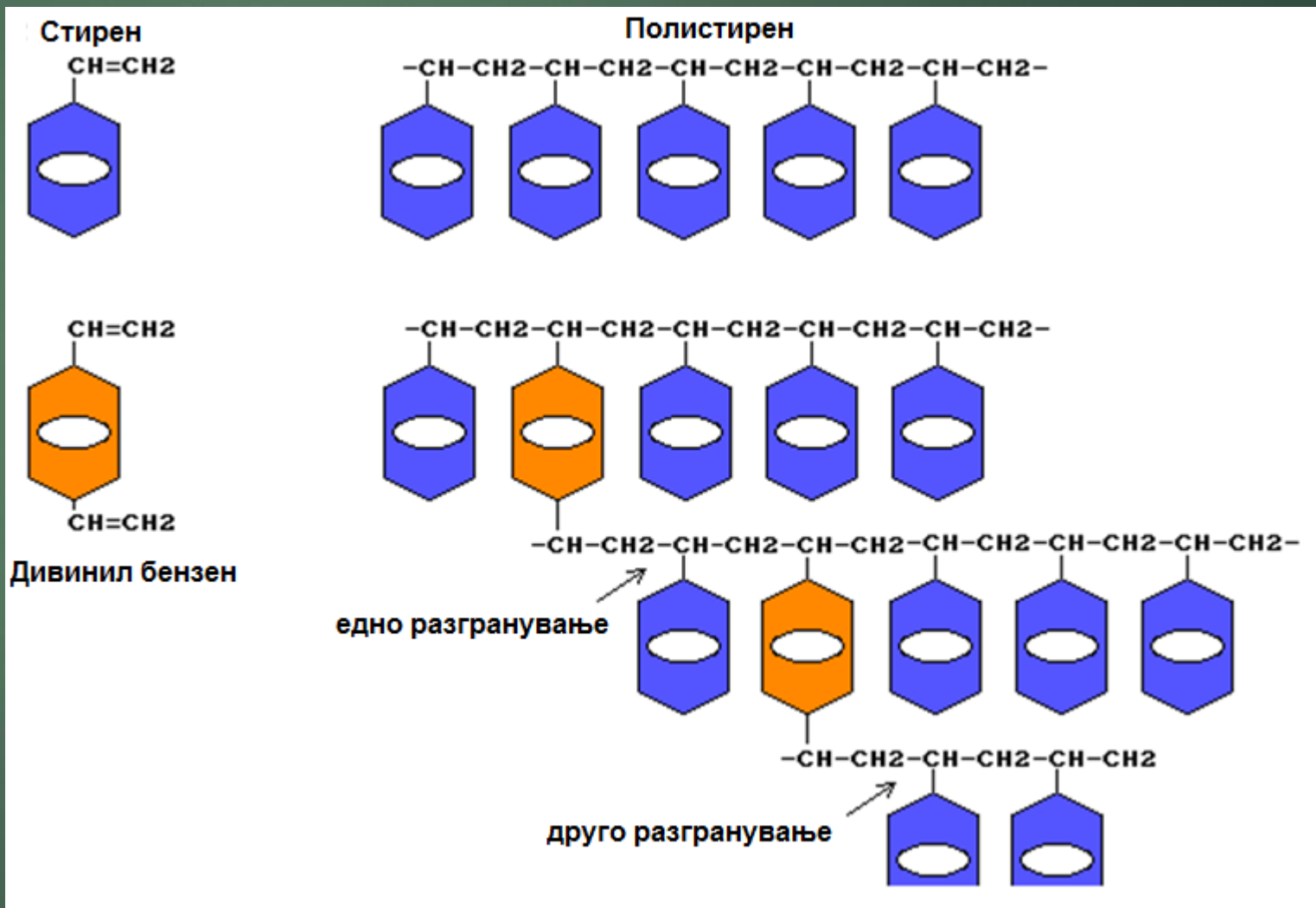


# Градба на јонско – изменувачки смоли

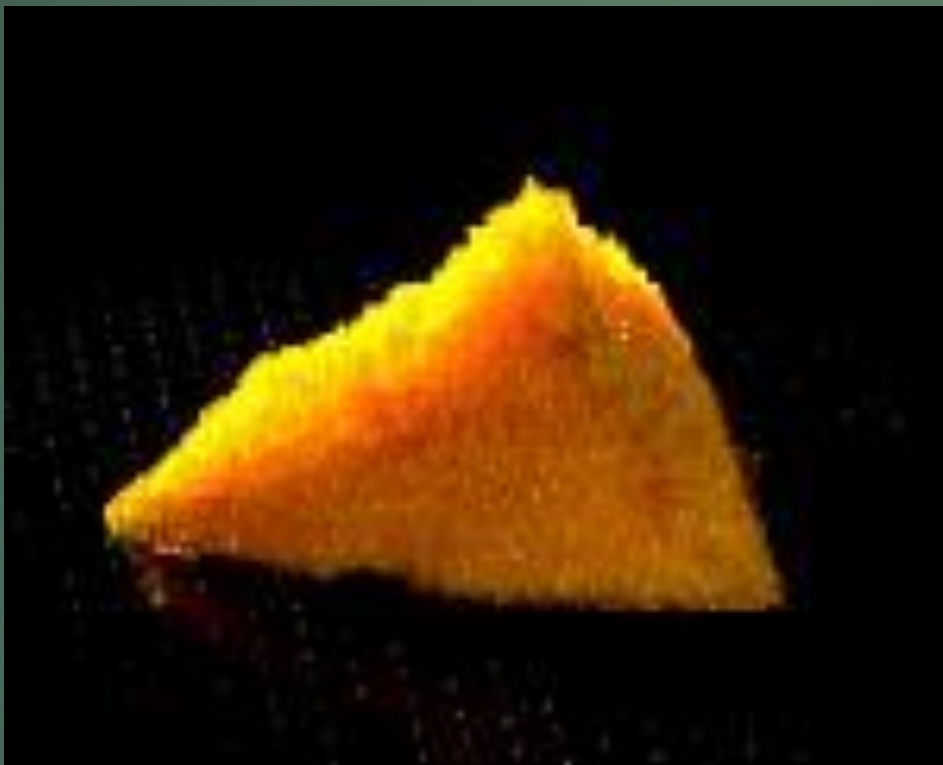
- ▶ Јонските изменувачи се составени од два дела:
  - ▶ Тридимензионален матрикс: полистирен, акрилни смоли, полисахариди (декстран) и целулоза
  - ▶ Наелектризирани функционални групи.

# Добивање на смоли со полимеризација и вмрежување

Вмрежување —  
вкрстени  
ковалентни врски  
(молекулско сито).  
Најдобрите смоли  
за прелиминарни  
истражувања имаат  
вмрежување од 8%.



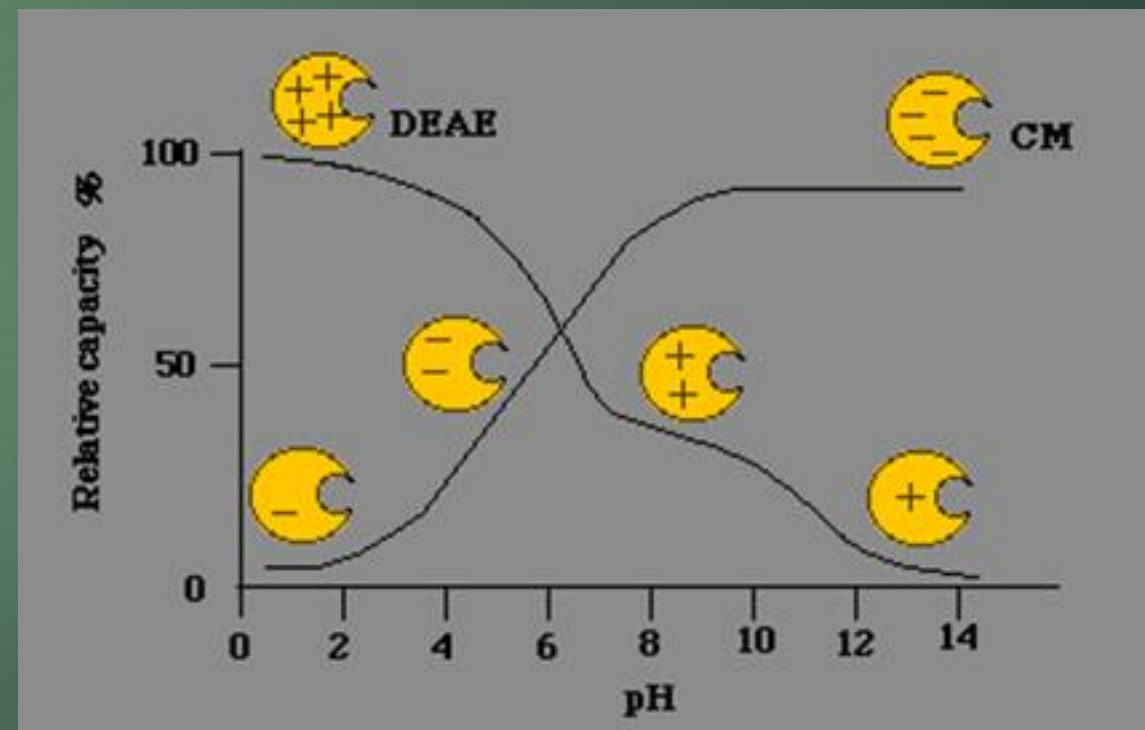
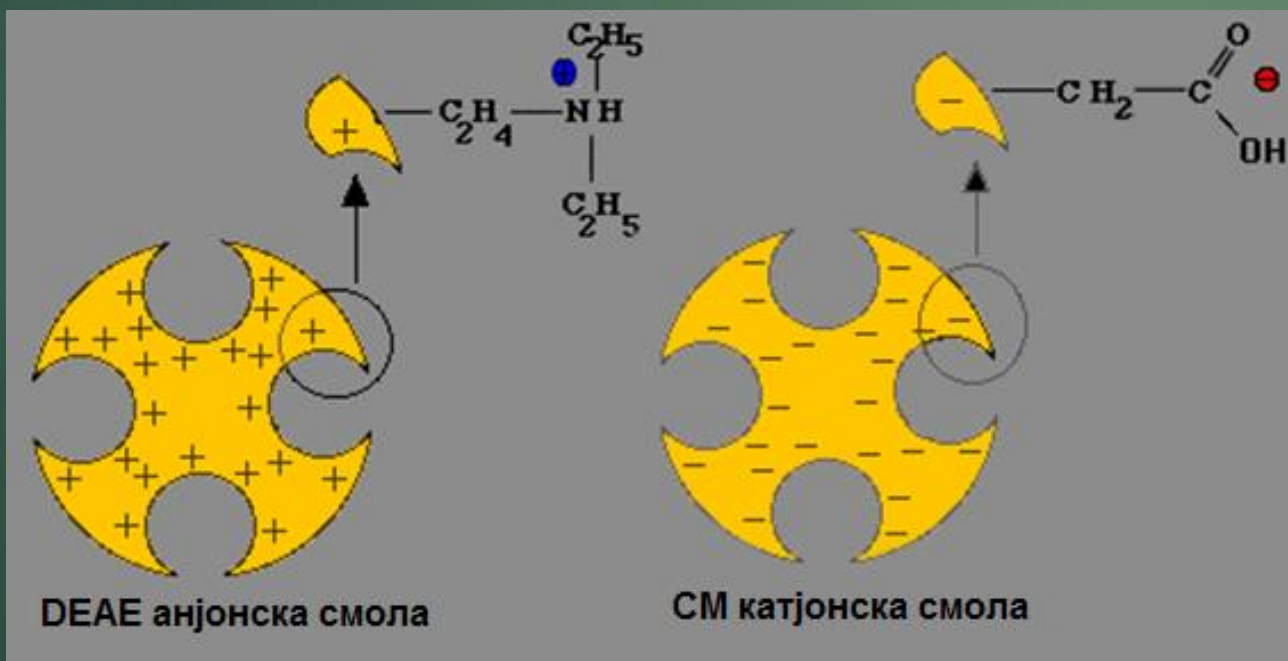
# Смоли за јонско-изменувачка хроматографија



# Капацитет на јонско – изменувачки смоли

Капацитет на јонска смола: способност на јонскиот изменувач за адсорпција на спротивно наелектризирани јони.

Вкупен капацитет: количество наелектризирани и потенцијално наелектризирани групи на единица маса сув изменувач (милiekвивалент/mg). Зависи од порозноста на матриксот.



# Поделба на јонски изменувачи според полнеж

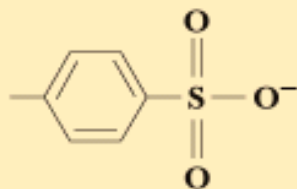
- ▶ Поделба на јонски изменувачи според полнежот на честичките што се изменуваат:
  - ▶ Катјонски : смолата има негативно наелектризирани функционални групи и изменува позитивни јони
  - ▶ Анјонски: смолата има позитивно наелектризирани функционални групи и изменува негативно наелектризирани јони
- ▶ Поделба на смолите според јачината на јонската сила на функционалната група:
  - ▶ јаки и слаби.

# Јонско – изменувачки смоли

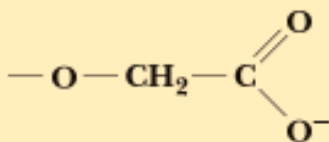
## (a) Катјонско - изменувачка смола

### Структура

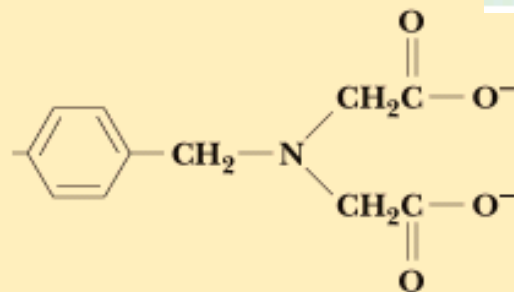
силно кисела, полистиренска смола (Dowex-50)



слабо кисела, карбоксиметил (CM) целулоза



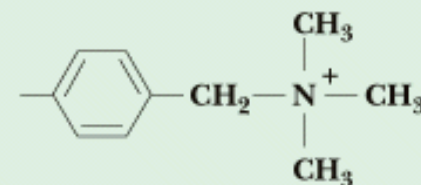
слабо кисела, хелат, полистиренска смола (Chelex-100)



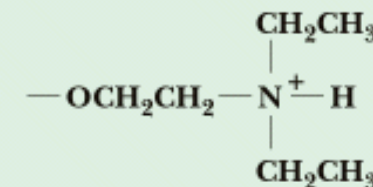
## (b) Анјонска изменувачка смола

### Структура

силно базна, полистиренска смола (Dowex-1)



слабо базна, диетиламиноетил (DEAE) целулоза



# Избор на јонски изменувач

- ▶ Разделување на мали стабилни биомолекули (аминокиселини, липиди, нуклеотиди, јаглехидрати, растителни пигменти) – синтетички смоли од полистирен.
- ▶ Разделување на големи биомолекули (пептиди, протеини, нуклеински киселини, полисахариди) – целулозни влакнести изменувачи, изменувачи од акрил или декстран со мала содржина на вмрежени врски.
- ▶ Разделување на амфотерни биомолекули – анјонски и катјонски изменувачи, проценка на pH интервалот на стабилност.

# Приготвување на јонски изменувач

- ▶ Според детално упатство од производителот.
- ▶ Достапни во форма на суспензија од набабрен атсорбент.
- ▶ Отстранување на малите честички.
- ▶ Чување на смолите
  - ▶ Во сув облик – стабилни неколку години,
  - ▶ Во форма на водна суспензија – стабилни неколку месеци
- ▶ Заштита од микроорганизми кај целулозни и декстрански изменувачи со реагенси за конзервирање
  - ▶ Катјонски: 0,02, натриум азид
  - ▶ Анјонски: 0,001% фенил меркури соли.

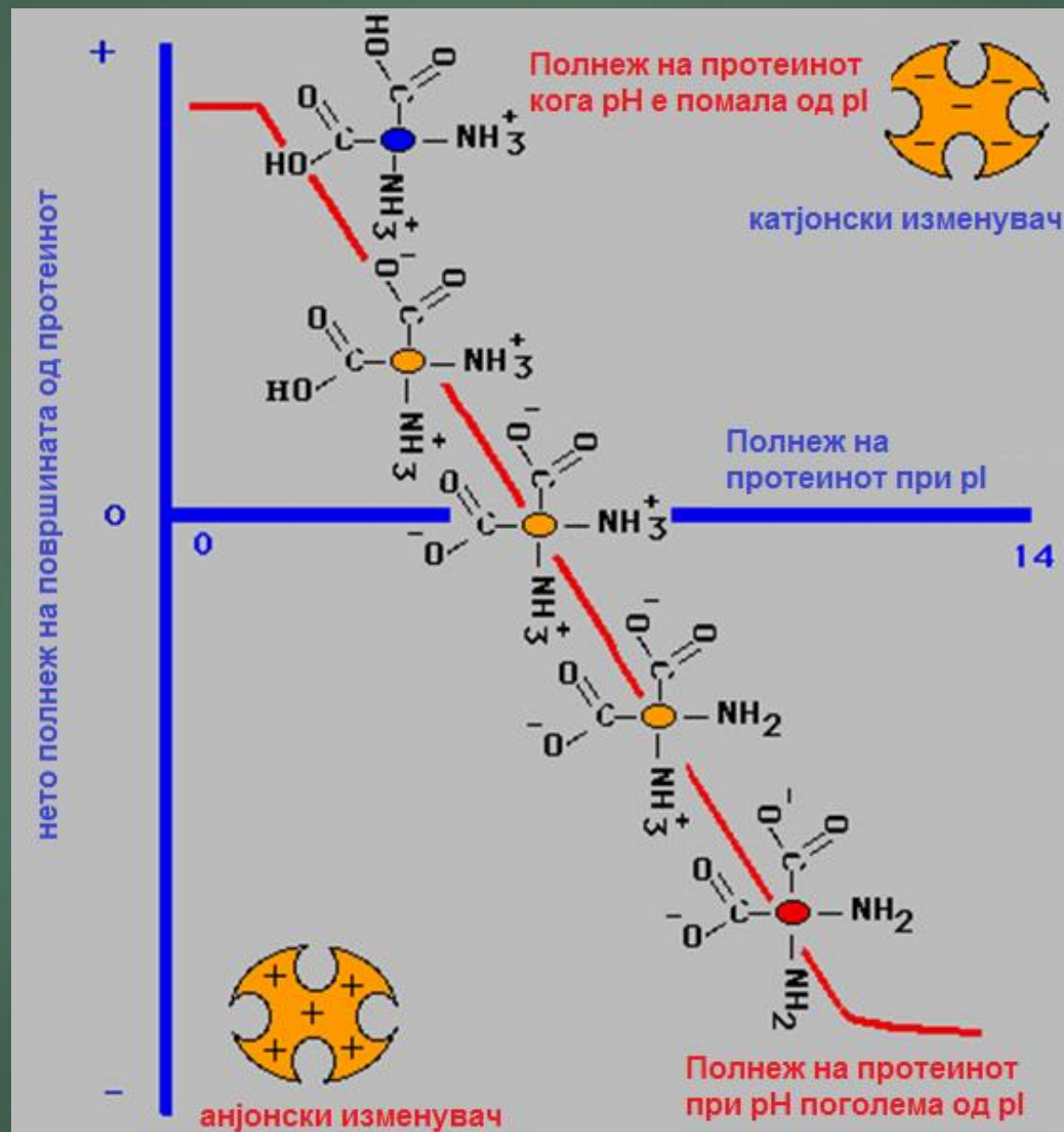
## Потсети се...

- ▶ Стационарната фаза е поларна.
- ▶ Повеќе поларните компоненти даваат посилни интеракции со стационарната фаза.
- ▶ Пополарните компоненти се придвижуваат многу бавно.
- ▶ Неполарните компоненти се движат многу брзо.

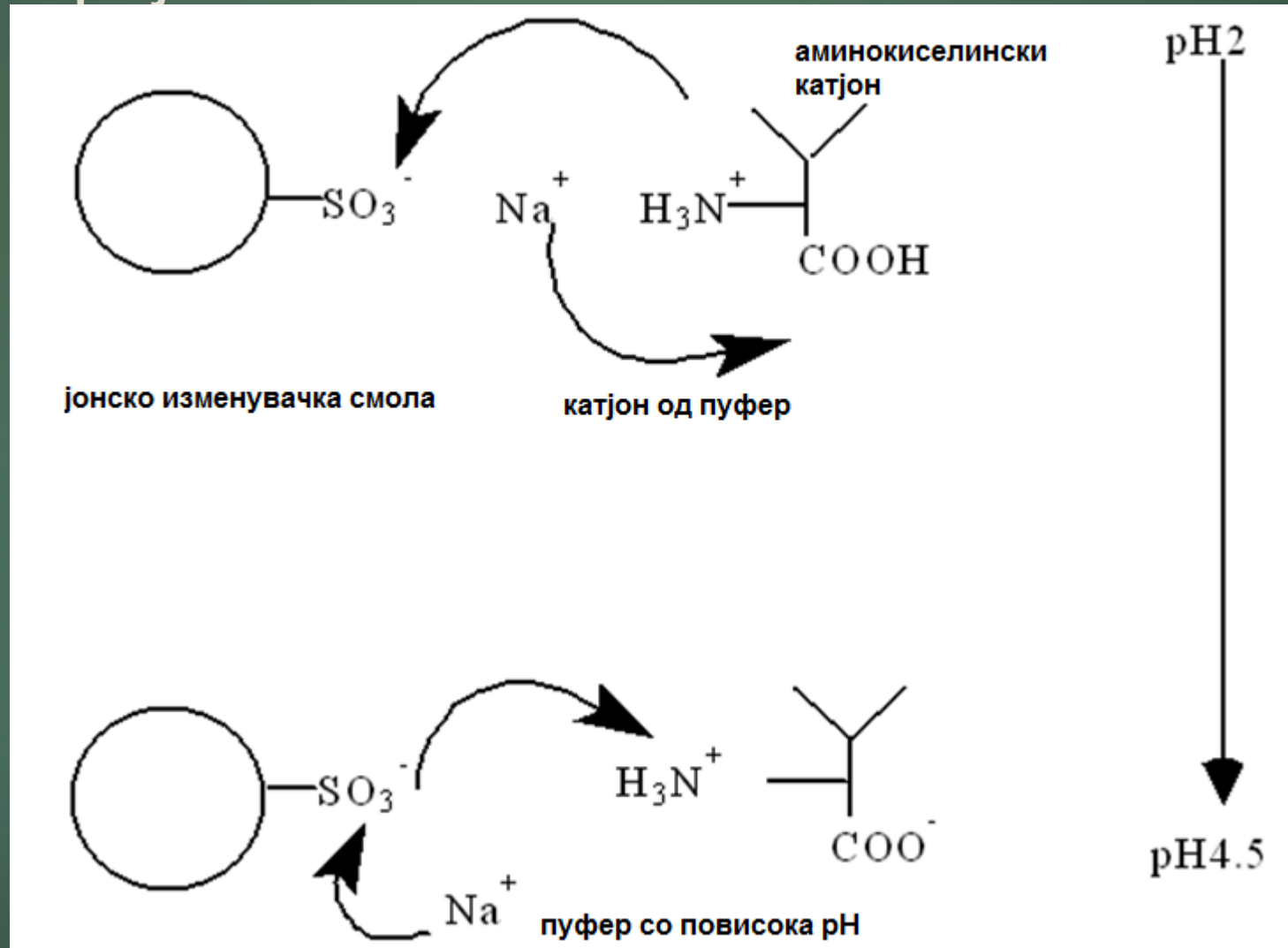
# Избор на мобилна фаза

- ▶ Мобилната фаза е пуфер.
- ▶ Избор на pH: молекулата да остане сврзана за смолата.
- ▶ Избор на јонска сила: релативно ниска 0,05 до 0,1M.
- ▶ Јоните на пуферот стапуваат во интеракција со наелектризираните групи од смолата (го намалуваат капацитетот):
  - ▶ За катјонски изменувачи се употребуваат анјонски пуфери.
  - ▶ За анјонски изменувачи се употребуваат катјонски пуфери.
- ▶ Да се спречи денатурација

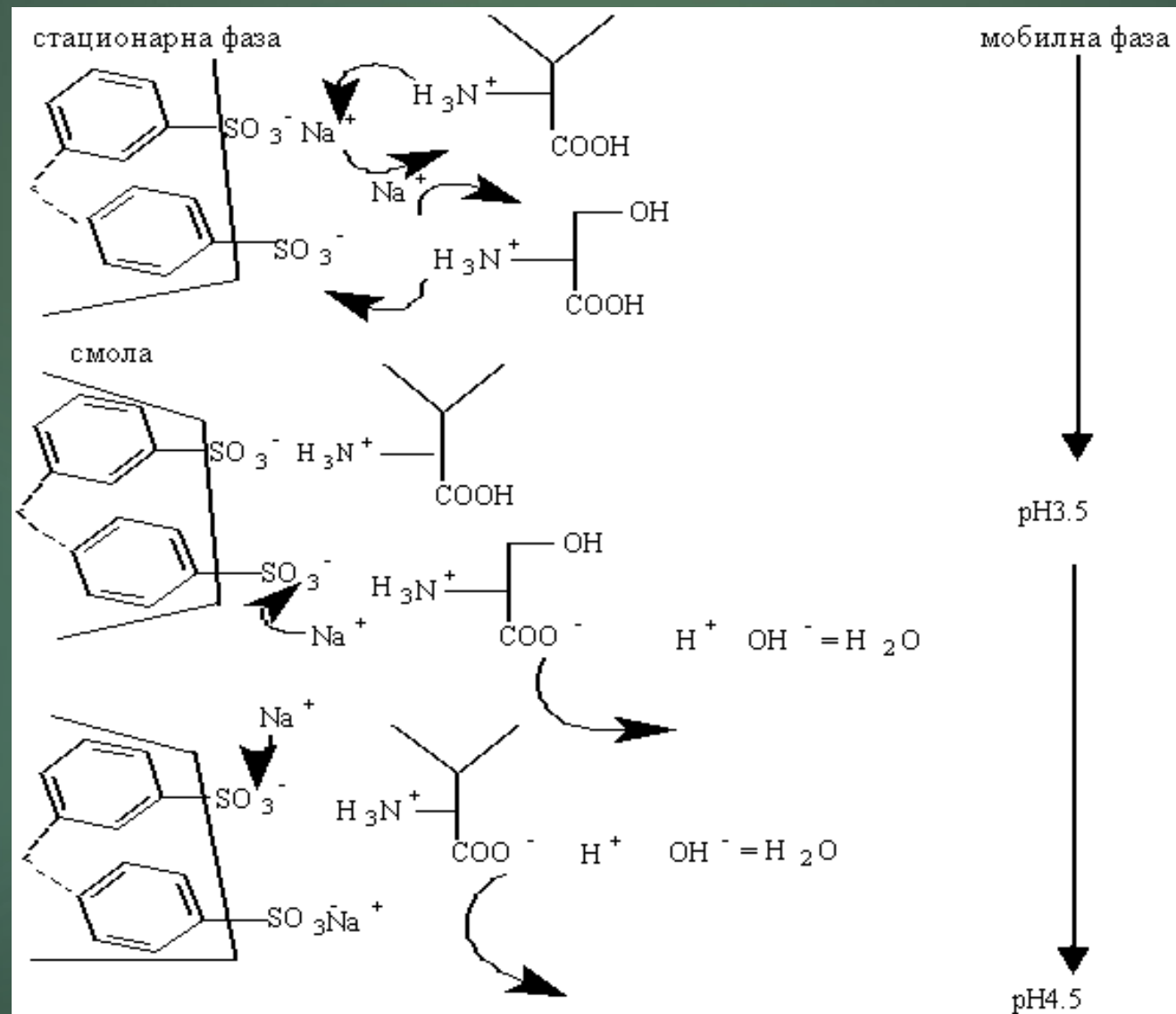
# Влијание на pH врз полнежот на пептидите



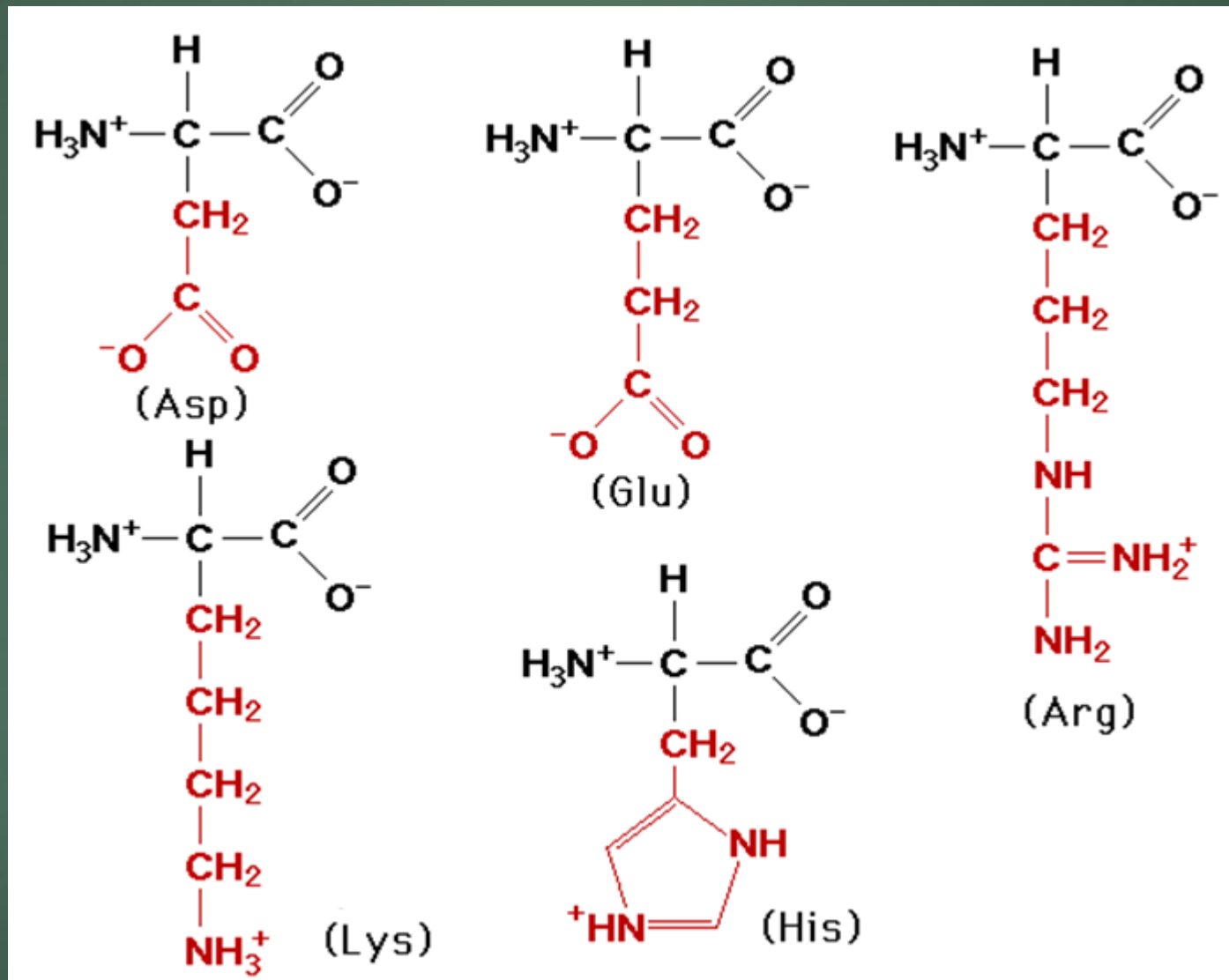
# Механизам на јонско-изменувачка хроматографија на аминокиселини



# Јонско-изменувачка хроматографија на аминокиселини

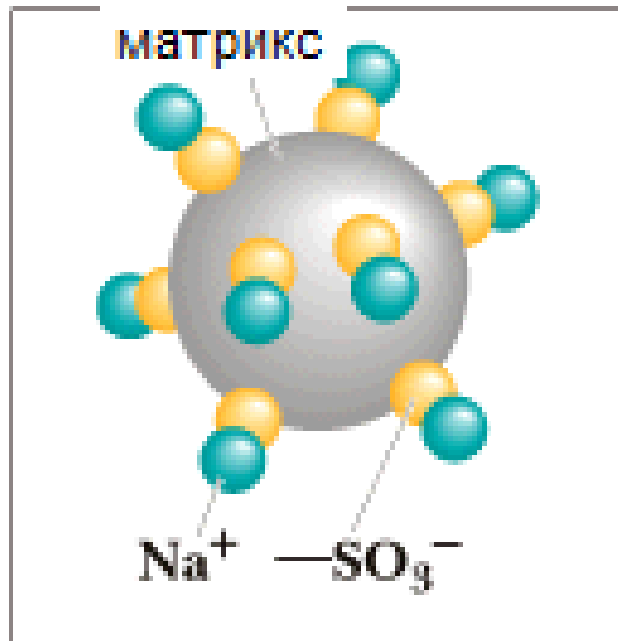


# Некои јонски форми на аминокиселини

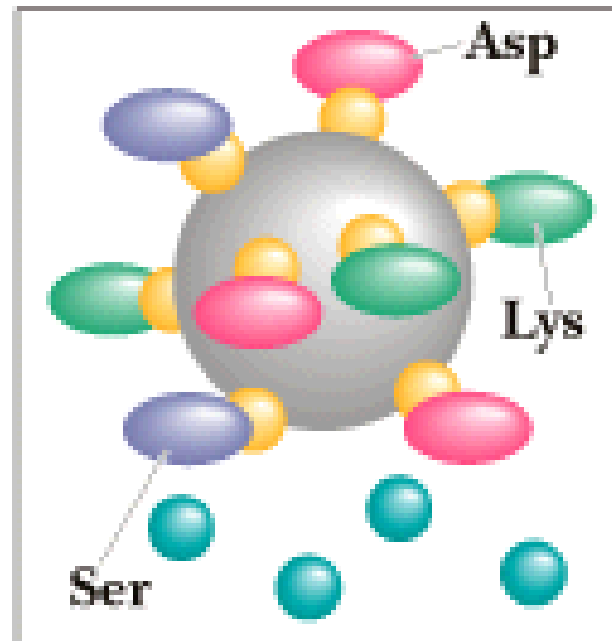


# Разделување на смеси од аминокиселини

катјонско-изменувачка  
смола

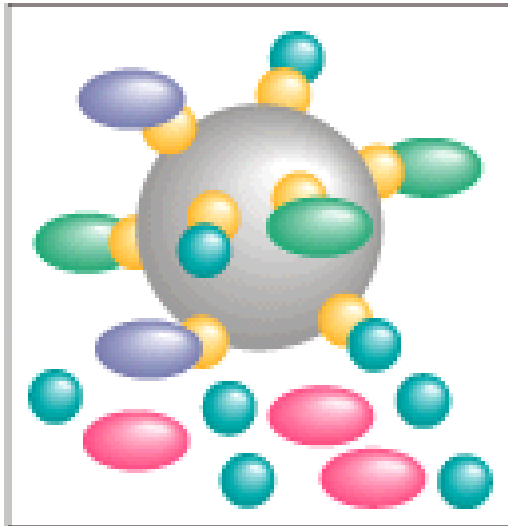


додавање на смеса од  
Asp, Ser и Lys



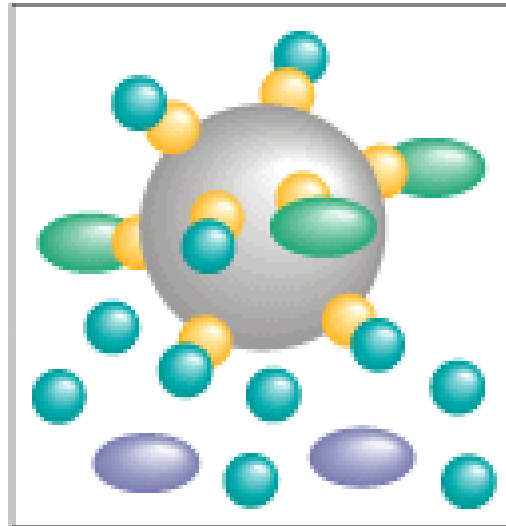
# Разделување на смеси од аминокиселини

додавање на  $\text{Na}^+$



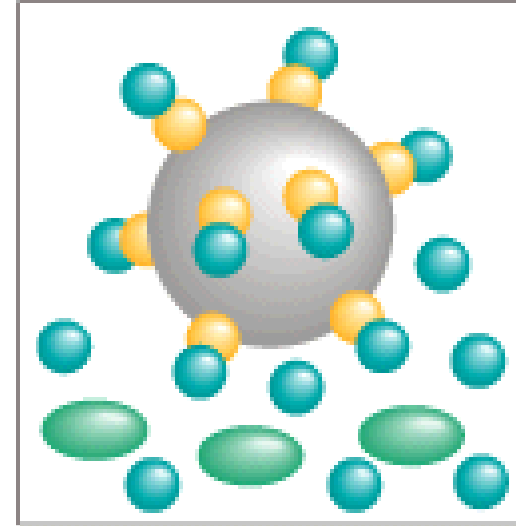
Прва елуира Asp,  
аминокиселината  
со најмал  
позитивен полнеж

зголемување на  $[\text{Na}^+]$



Потоа елуира Ser

зголемување на  $[\text{Na}^+]$



Lys, со најголем  
позитивен полнеж  
елуира последна

Смесата содржи  
неколку  
аминокиселини

Елуирање и разделување  
на смесата на дискретни  
зони

Катјонско-  
изменувачка  
смола

Собирање на елуатот на  
излезот од колоната

Некои фракции  
не содржат  
аминокиселини

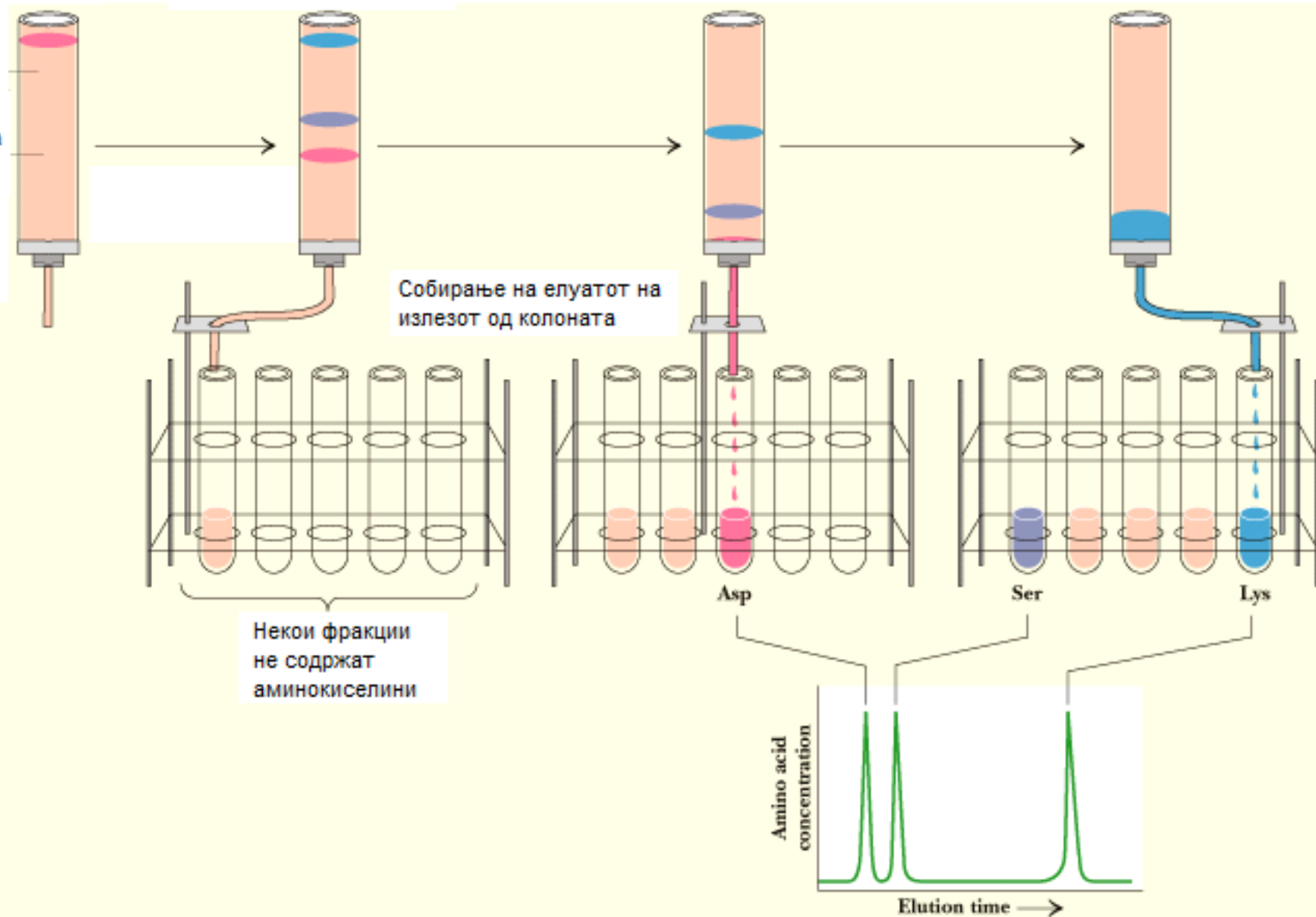
Asp

Ser

Lys

Amino acid  
concentration

Elution time →





**ЈОНСКО – ИЗМЕНУВАЧКИ КОЛОНИ ВО МАКРОСКАЛА**