



Хроматографія

Володимир ШВАДЧАК

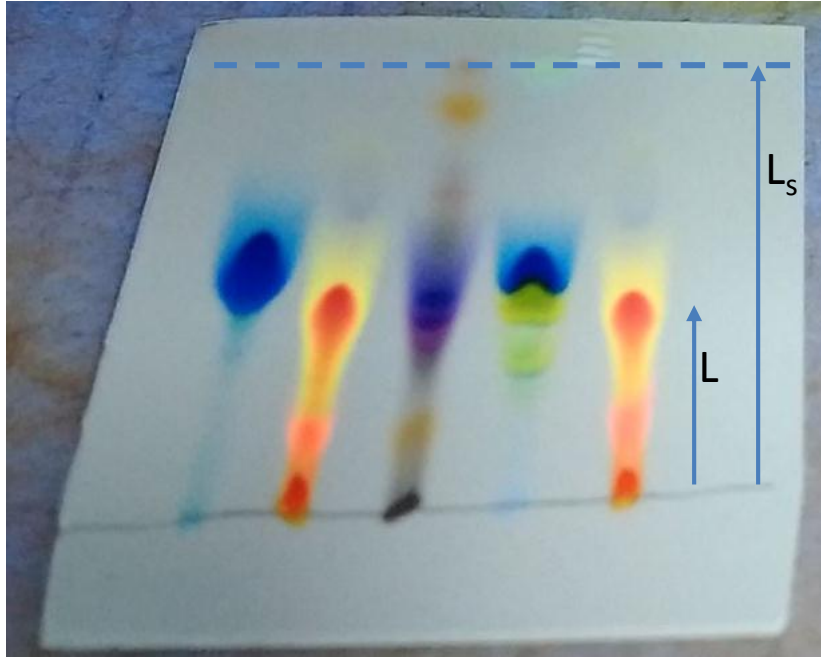
ПНУ

23-02-2023

Зміст лекції

1. *Що таке хроматографія.*
2. *Принципи HPLC (ВЕРХ).*
3. *Препаративна та аналітична хроматографія. Типи колонок.*
4. *Іонообмінна хроматографія.*
5. *Витісна хроматографія (SEC)*
6. *Афінна хроматографія*

Хроматографія



Тонкошарова хроматографія

- Папір
- Силікагель

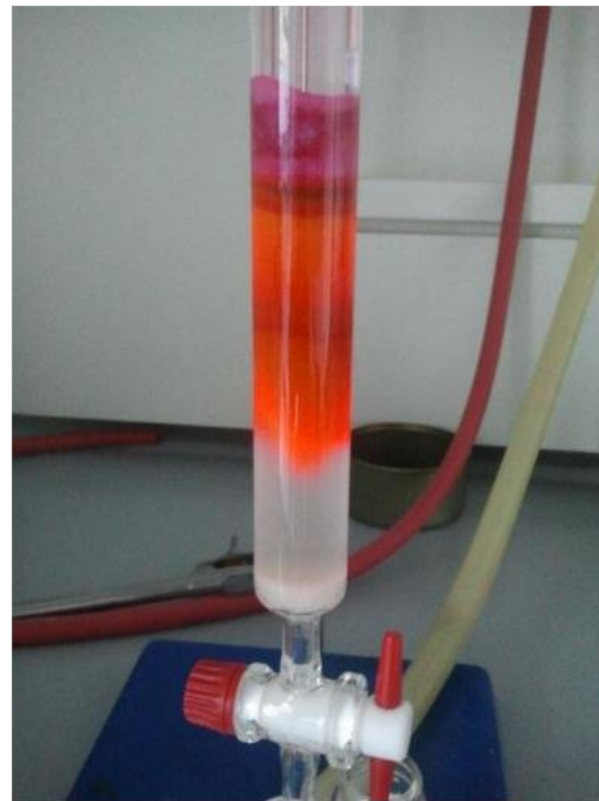
Чим краще речовина
зв'язується з нерухомою
фазою (папір/силікагель) ти
повільніше вона
просувається

$$R_f = L/L_s$$

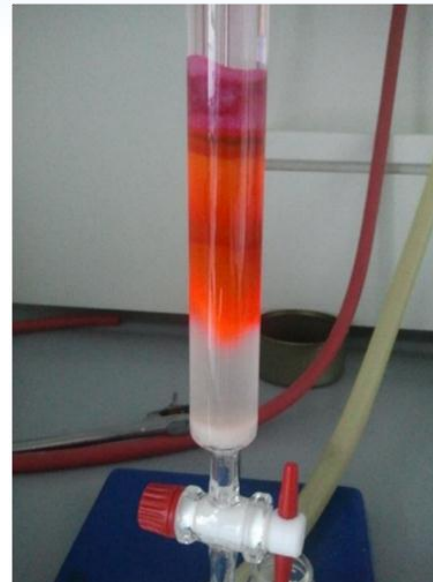
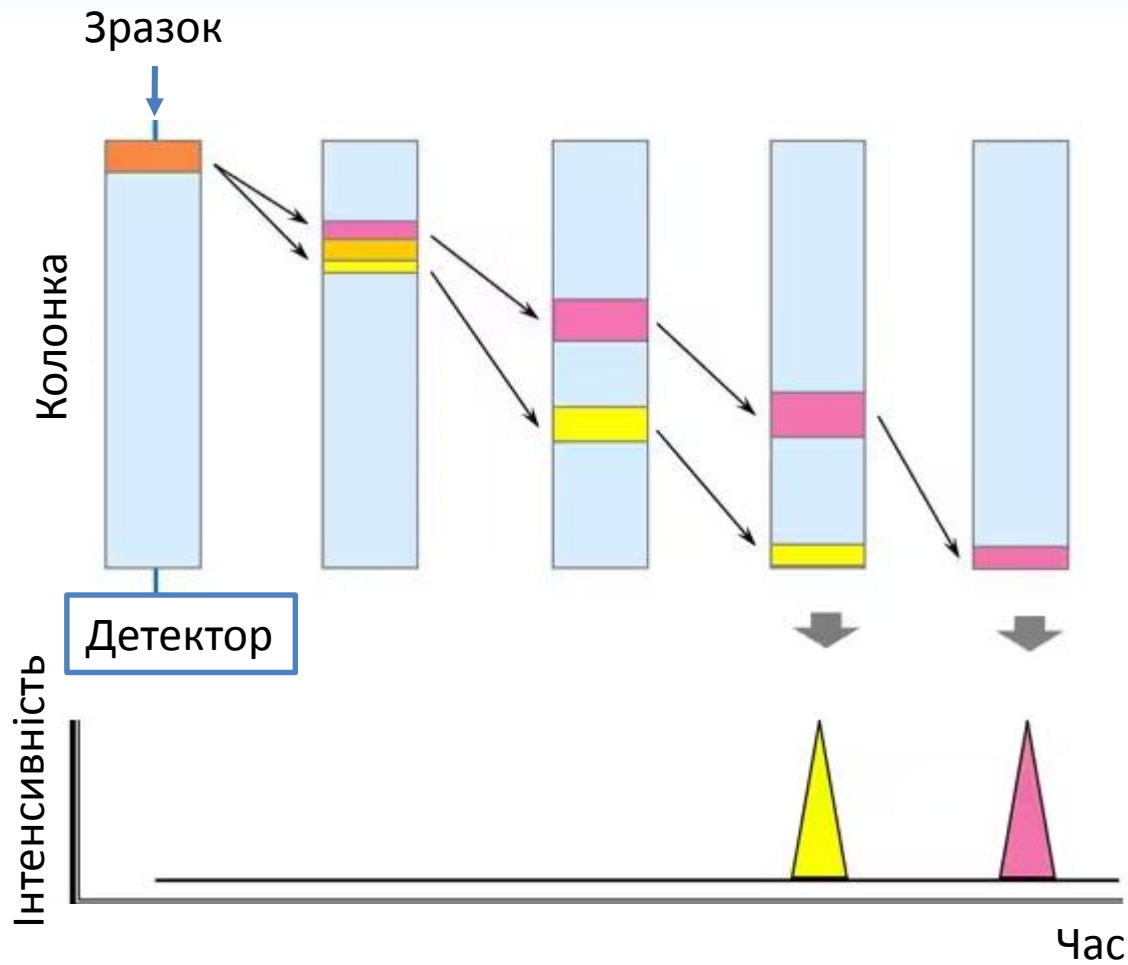
L – шлях пройдений речовиною

L_s – шлях пройдений розчинником

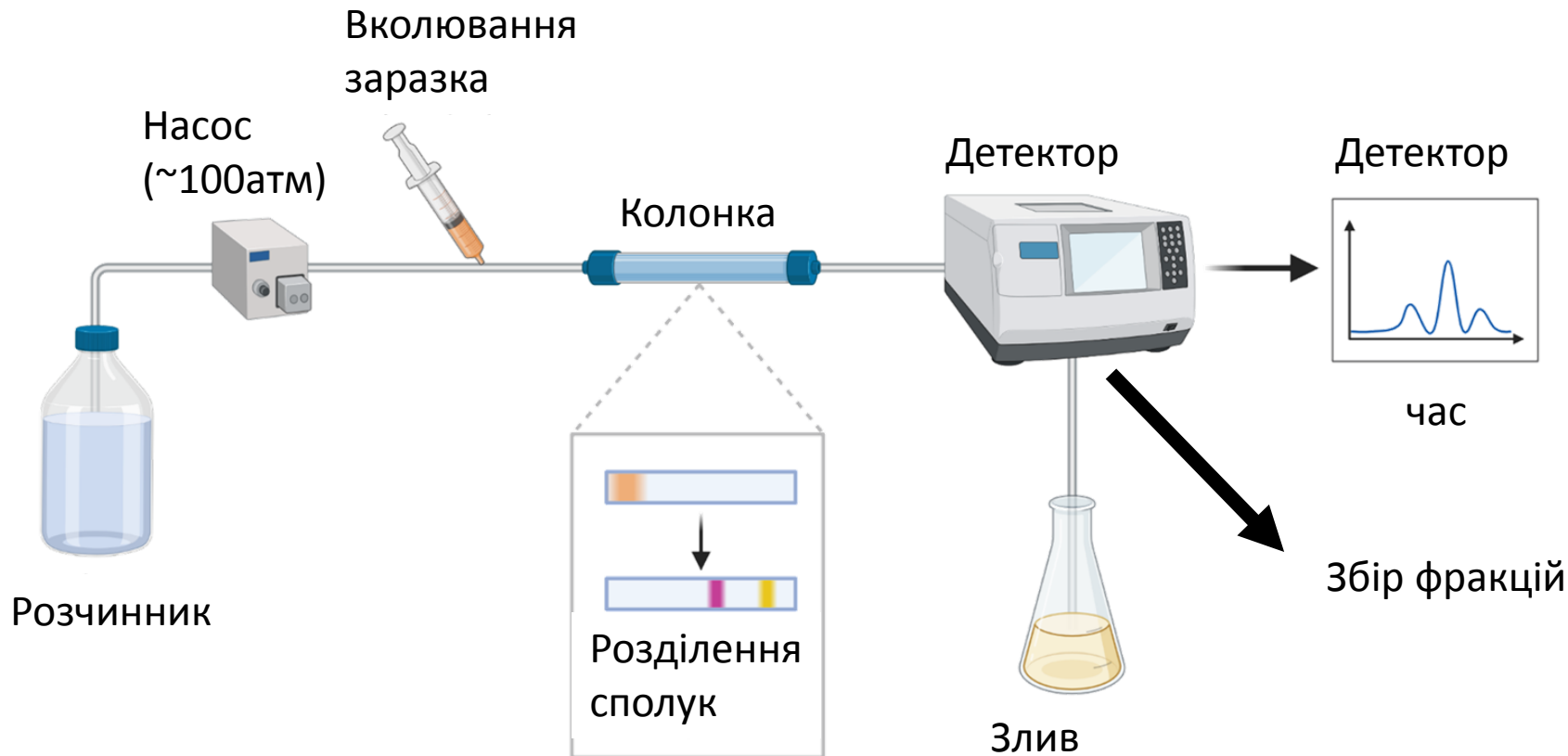
Колоночна хроматографія



Розділення на колонці



HPLC (ВЕРХ)



HPLC (ВЕРХ)

Розчинник А Розчинник В



Петля вколювання (ручна)

Шприц

Іонообмінна
колонка

Олівець

Змішувач розчинів

Препаративна С8
колонка (не підключена)



Колектор фракцій

Препаративна і аналітична хроматографія



Колектор фракцій

HPLC (BEPX)



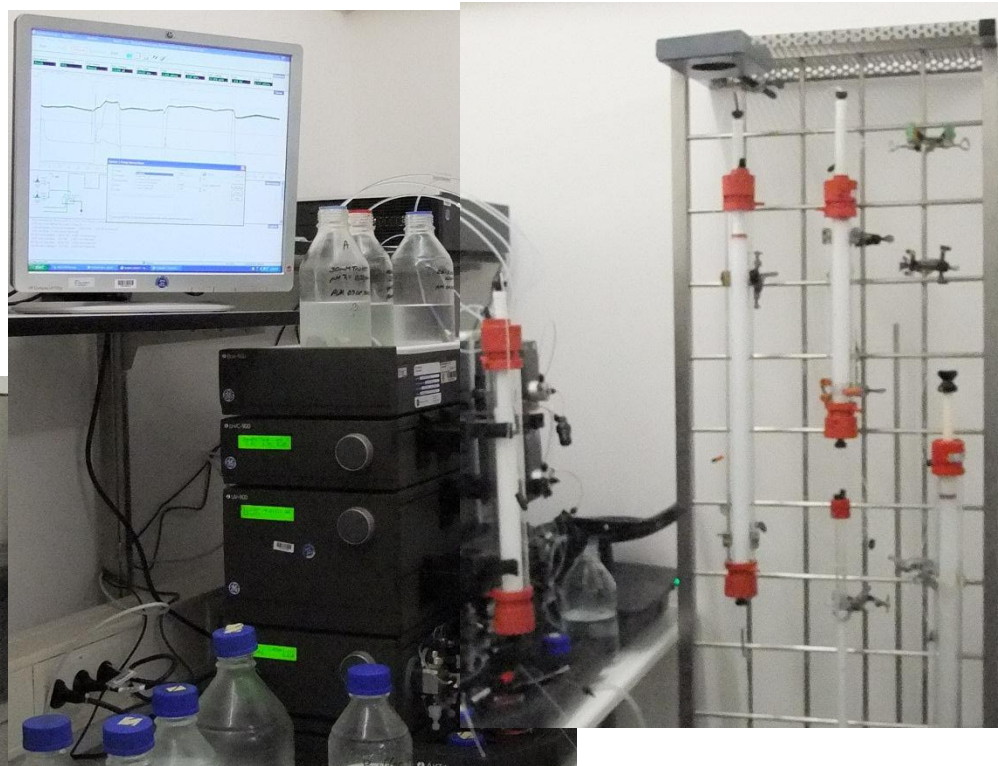
HPLC (BEPX)



Препаративна і аналітична хроматографія



Препаративна і аналітична хроматографія



Типи хроматографії

За ціллю: **Аналітична / Препаративна**

За рухомою фазою: **Газова / Рідинна**

За типом зв'язування:

- **Хроматографія витіснення**
- **Іонна хроматографія**
- **Афінна хроматографія**
- **Класична сорбційна**

Рухома фаза

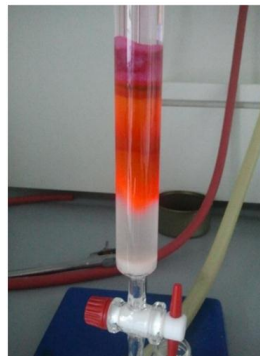
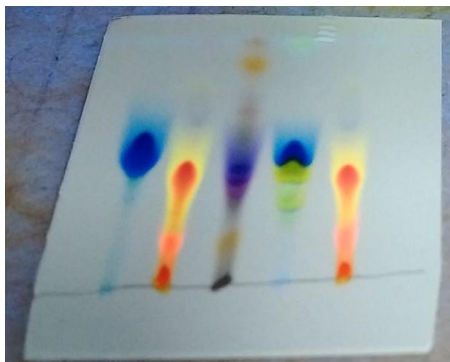


Стационарна фаза



За формою:

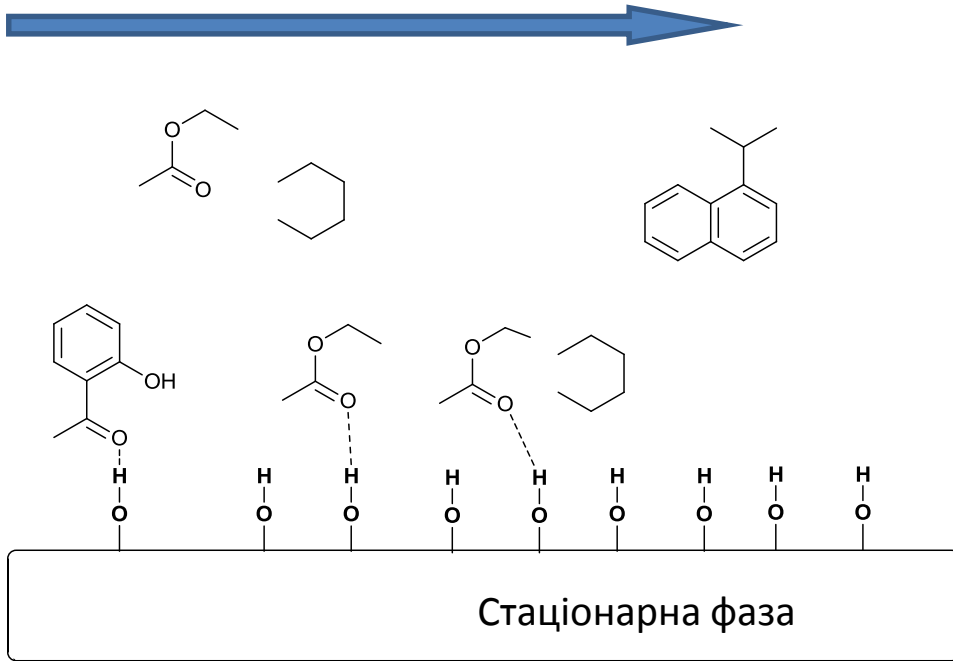
- **Тонкошарова**
- **Колоночна**



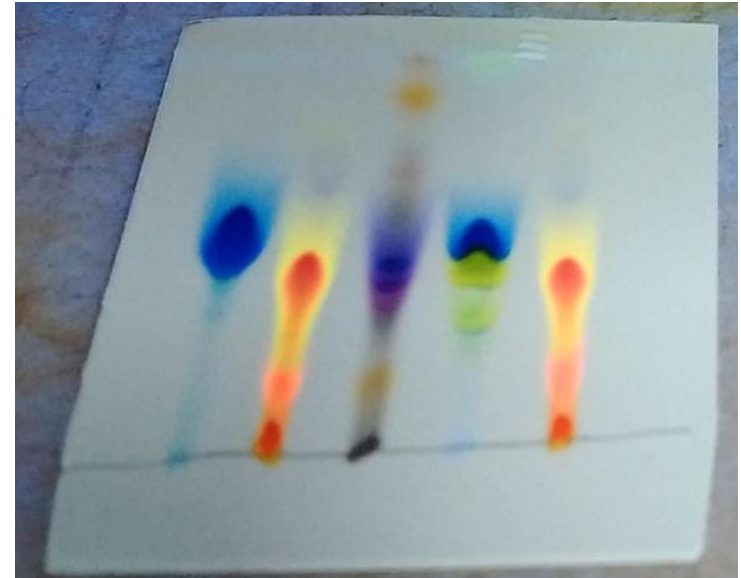
Класчна сорбційна хроматографія

Класична: сорбент = силікагель, рухома фаза = гептан ... метанол

Полярні речовини рухаються **повільніше**
бо краще чіпляються за поверхню



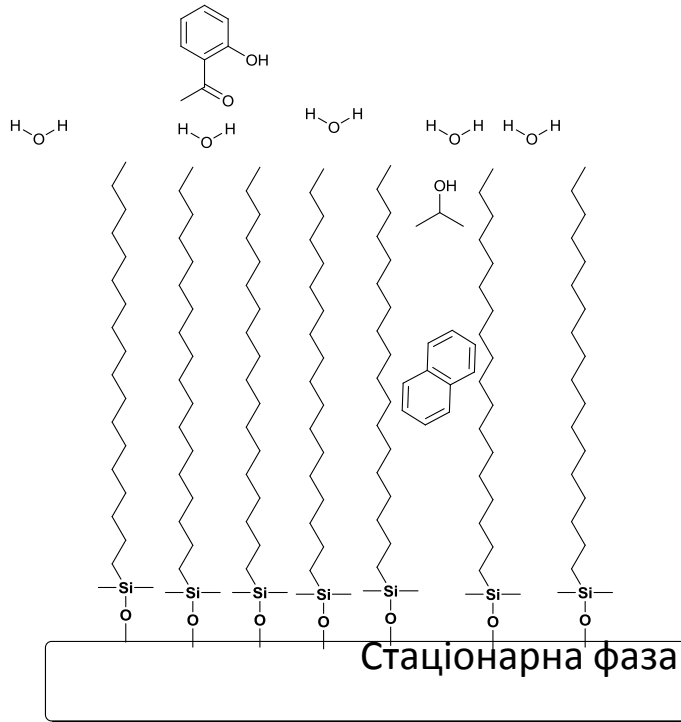
Приклад: ТШХ (TLC) чорнила різних маркерів та гелевих ручок



HPLC

RP HPLC: рухома фаза - ацетонітрил/вода

Полярні речовини рухаються **швидше** бо краще чіпляються за поверхню



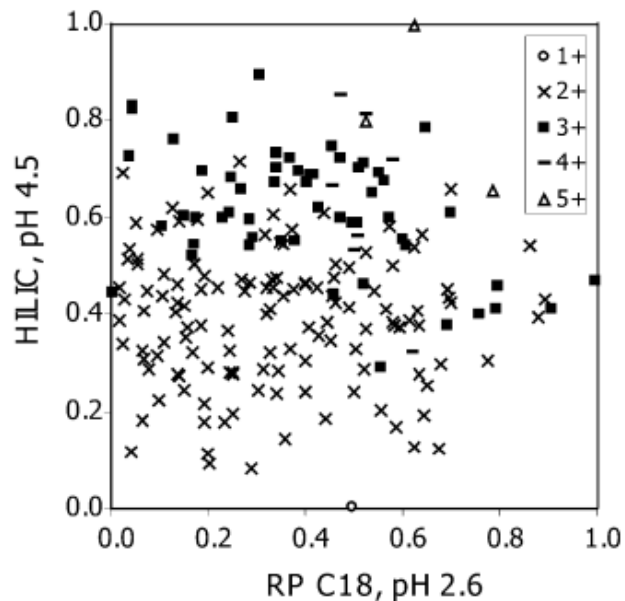
C4-C8 - пептиди
C18 – малі молекули

Приклад: перепаративна очистка пептидів

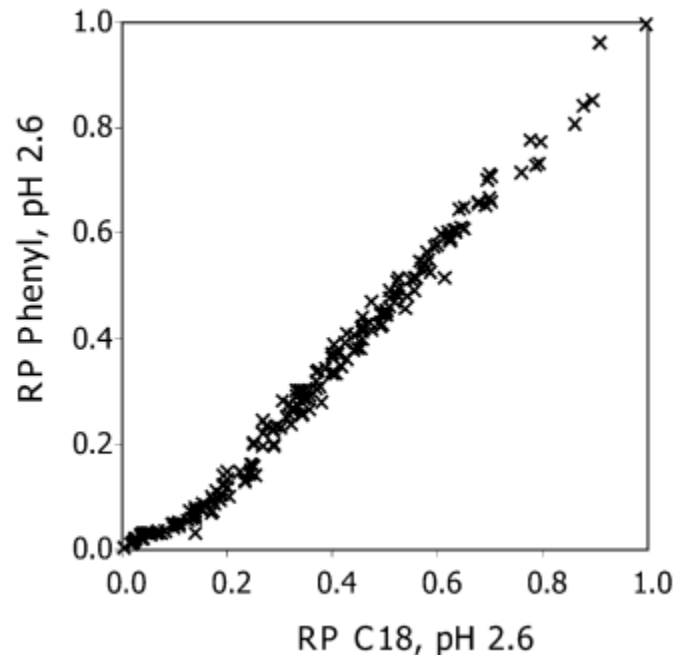


Типи колонок

Хороша ортогональність



Погана ортогональність



Деякі колонки сильно різняться за принципом розділення й те що речовина не ділиться на одному з типів не значить що вона не поділиться на іншому, ортогональному

Іонообмінна

RP HPLC: сорбент = модифікована сефароза,
рухома фаза = буфер без солі ... Буфер з 1M NaCl

Заряджені речовини рухаються **повільніше** бо
краще чіпляються за поверхню

Можна підбирати pH для кращого очищення

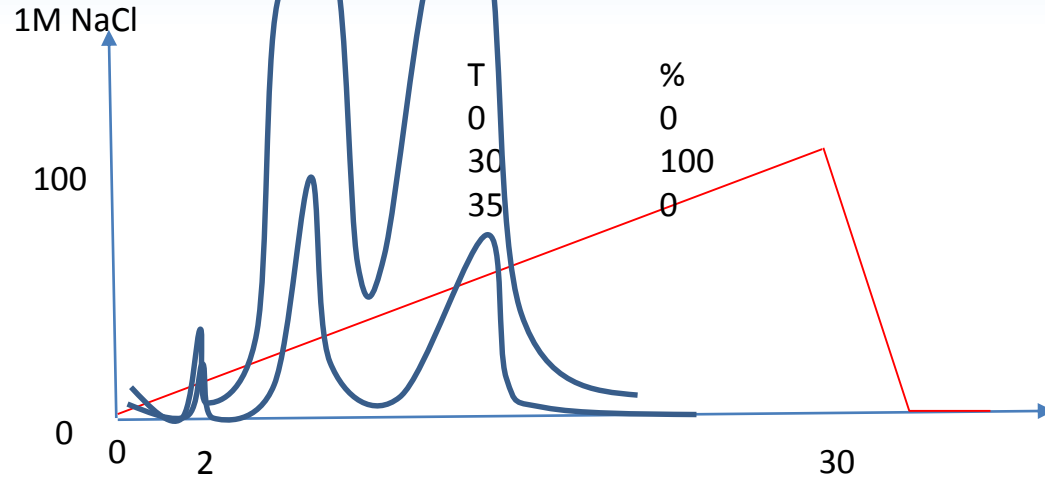
Можна робити градієнт pH щоб відрізнати по
ізоелектриній точці

Біля 15 атм

Приклад: перепаративна
очистка протеїнів

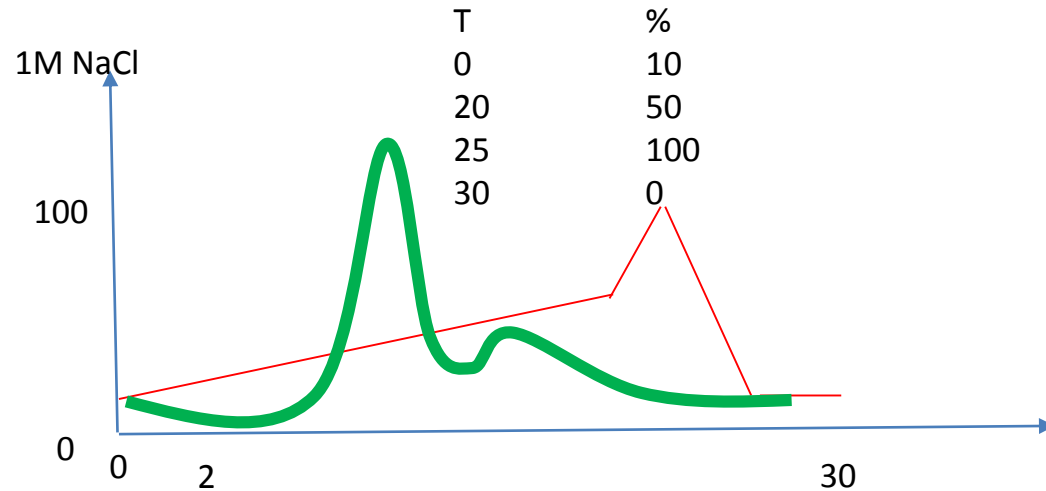


Підбір градієнтів

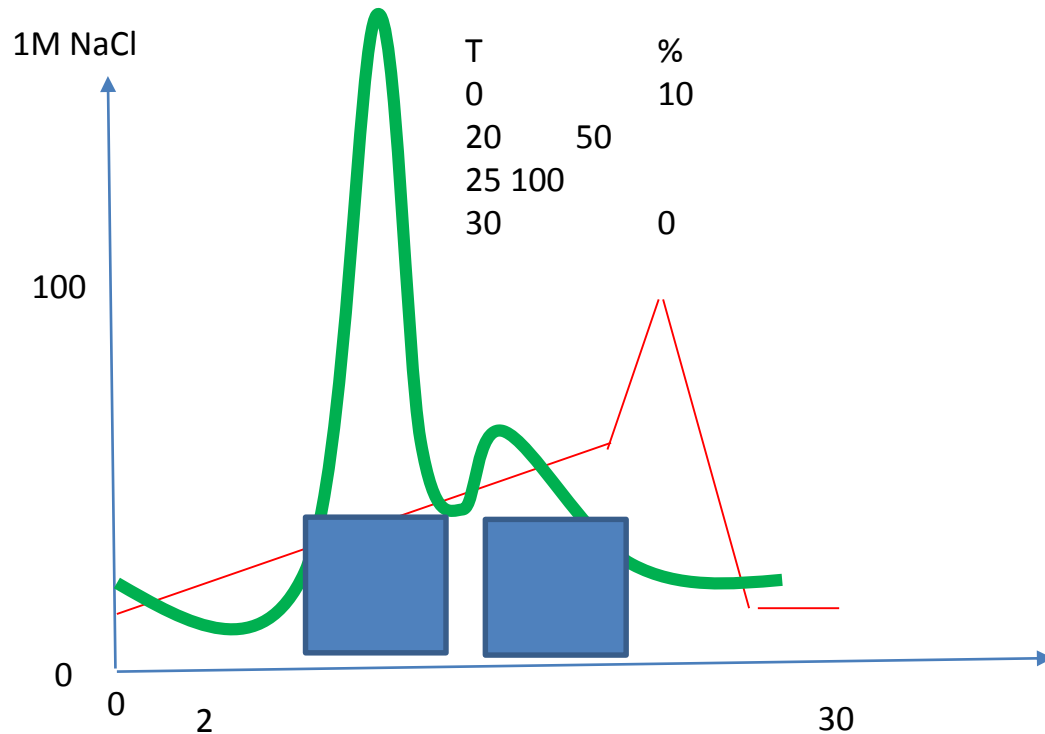


Гرادієнт краще починати й закінчувати на однакових значеннях

Доводим до максимуму щоб промити колонку



Пологіший градієнт на момент виходу піку – краще розділення



Для препаративної
хроматографії критично щоб
на пік речовини що очищають
не налавив інший пік **зліва**

Більше речовини завантажили
на колонку – **ширші піки**, але
швидша очистка

Пам'ятайте про зашкали
детектора (часто це абсорбція >2)

SEC (хроматографія витіснення)

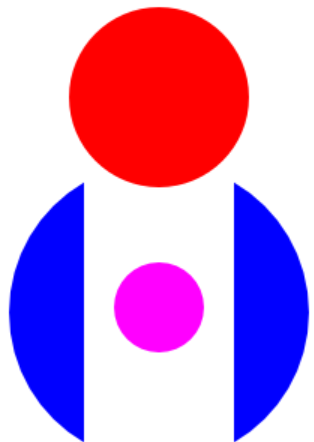
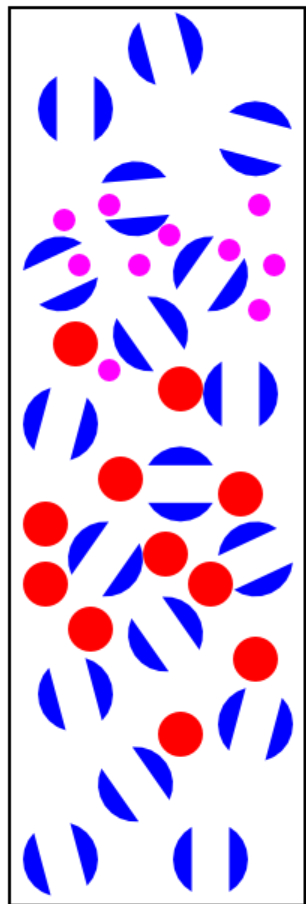
Сорбент - пористий (напр. Агароза)
рухома фаза - буфер

малі протеїни
рухаються швидше

Біля 1 атм

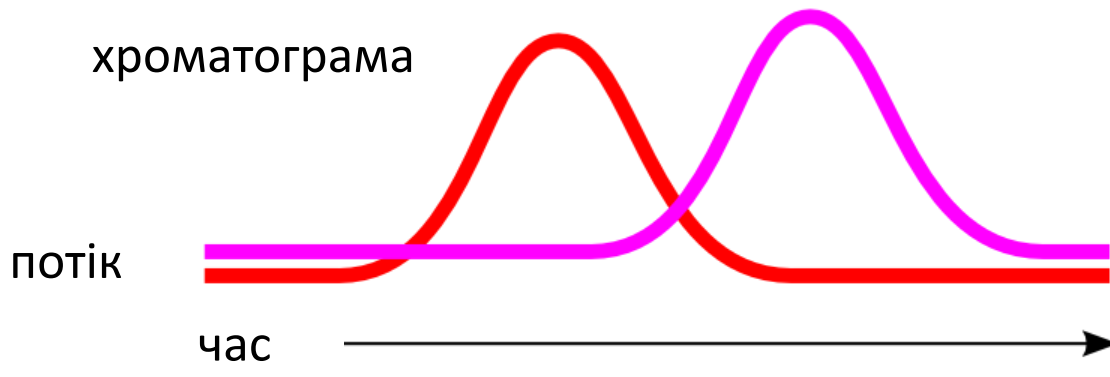


SEC (хроматографія витіснення)

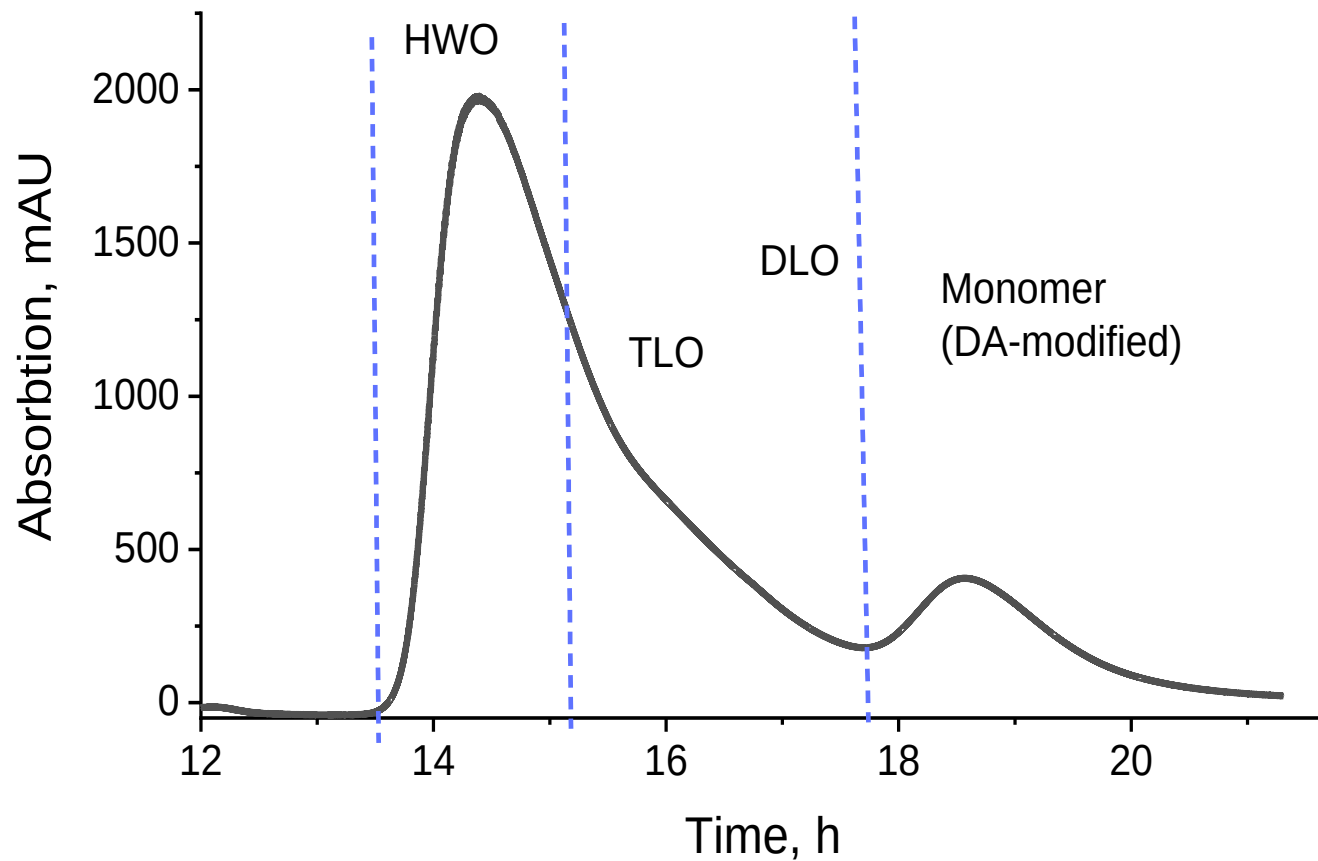


Частина пор замала для великих частинок тому вони рухаються доволі прямими траєкторіями й виходять швидше

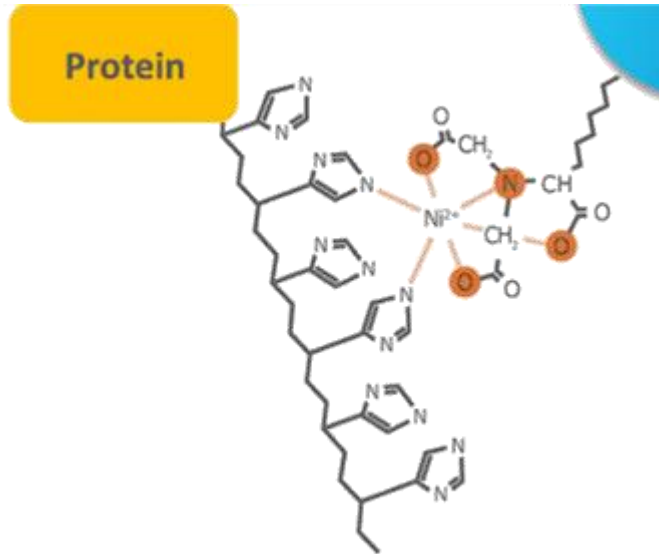
Малі частинки заходять в більшу кількість пор, проходять довший шлях, **виходять пізніше**



SEC (хроматографія витіснення)



Афінна хроматографія



1. Протеїн- His-таг на колонку
2. Змиваємо неспецифічне
3. Змиваємо протеїн імідазолом
4. Відрізаємо His-таг протеазою*
5. Порізану суміш на колонку
(протеїн проходить, His-таг сідає)

Ідеально коли протеаза містить His-таг

