



EBERHARD KARLS
UNIVERSITÄT
TÜBINGEN



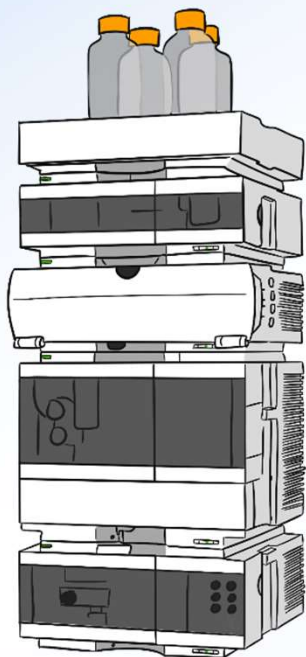
Supported by:

DAAD

Deutscher Akademischer Austauschdienst
German Academic Exchange Service



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



Хроматографія

Володимир ШВАДЧАК

ПНУ

Зміст лекції

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

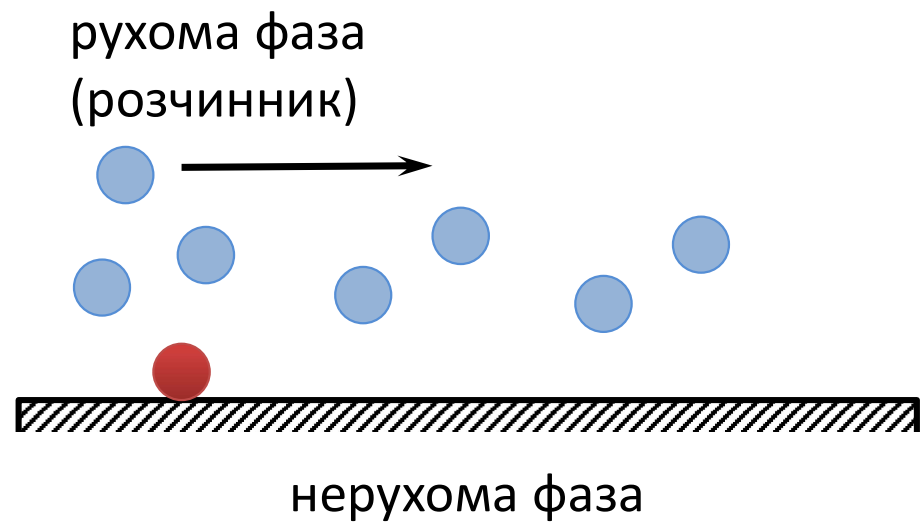
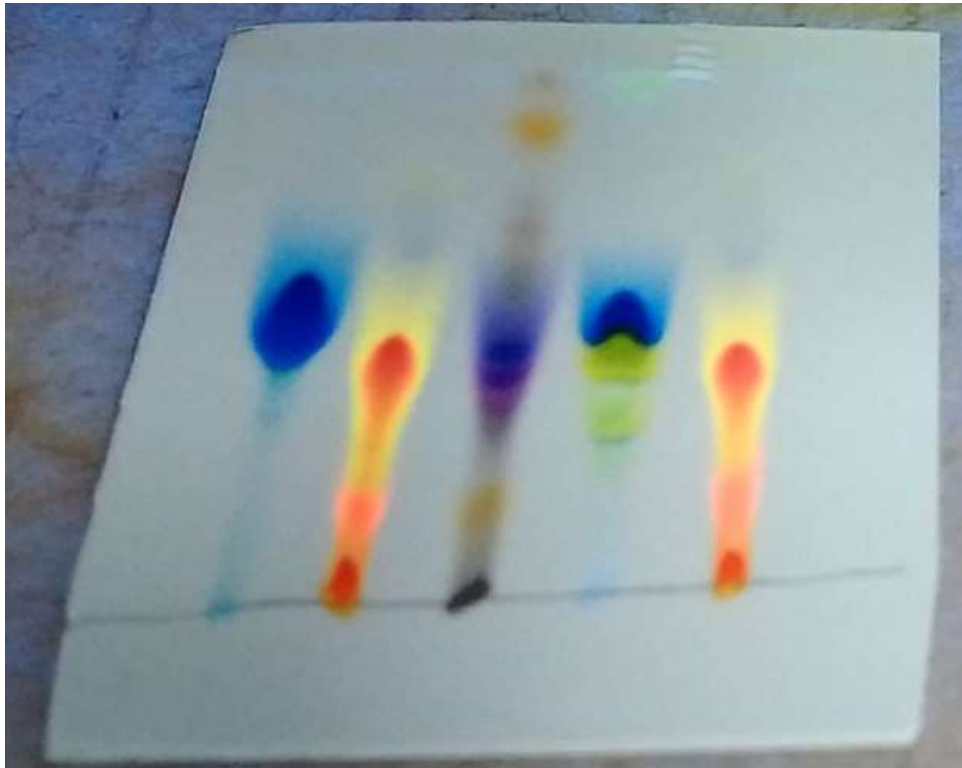
Хроматографія



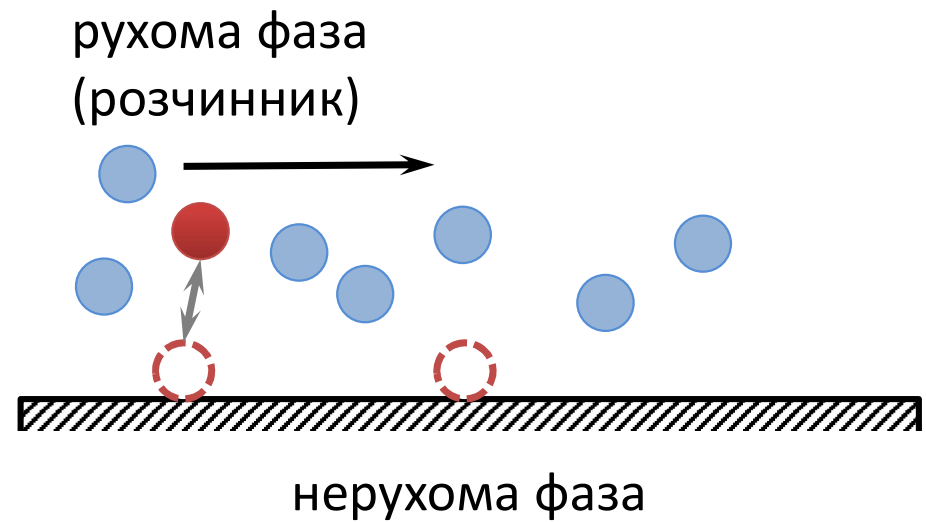
Хроматографія – розділення речовин за рахунок різного зв'язування в системах з рухомою та нерухомою фазами

Тонкошарова хроматографія для розділення барвників у канцелярському маркері

Хроматографія

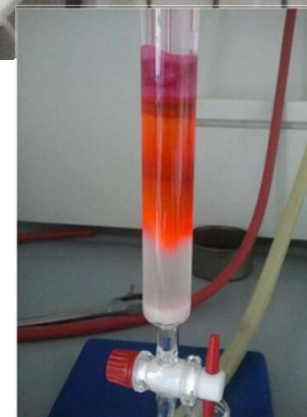


Хроматографія



Чим краще речовина зв'язується
з нерухомою фазою тим
повільніше вона просувається

Типи хроматографії



Типи хроматографії

За ціллю: **Аналітична / Препаративна**

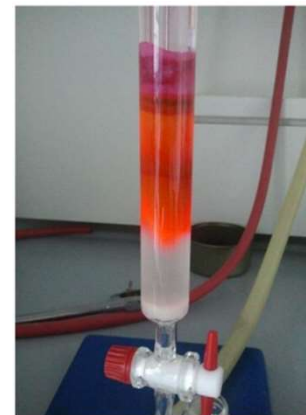
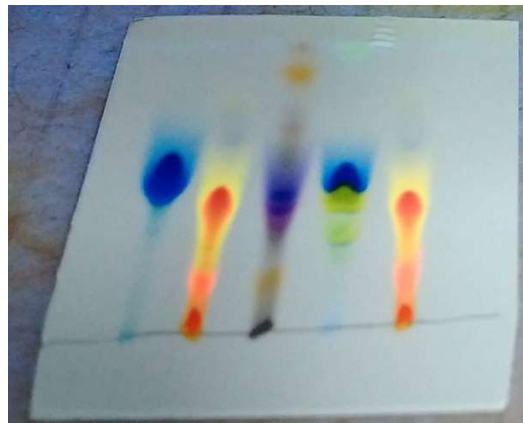
За рухомою фазою: **Газова / Рідинна**

За типом зв'язування:

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

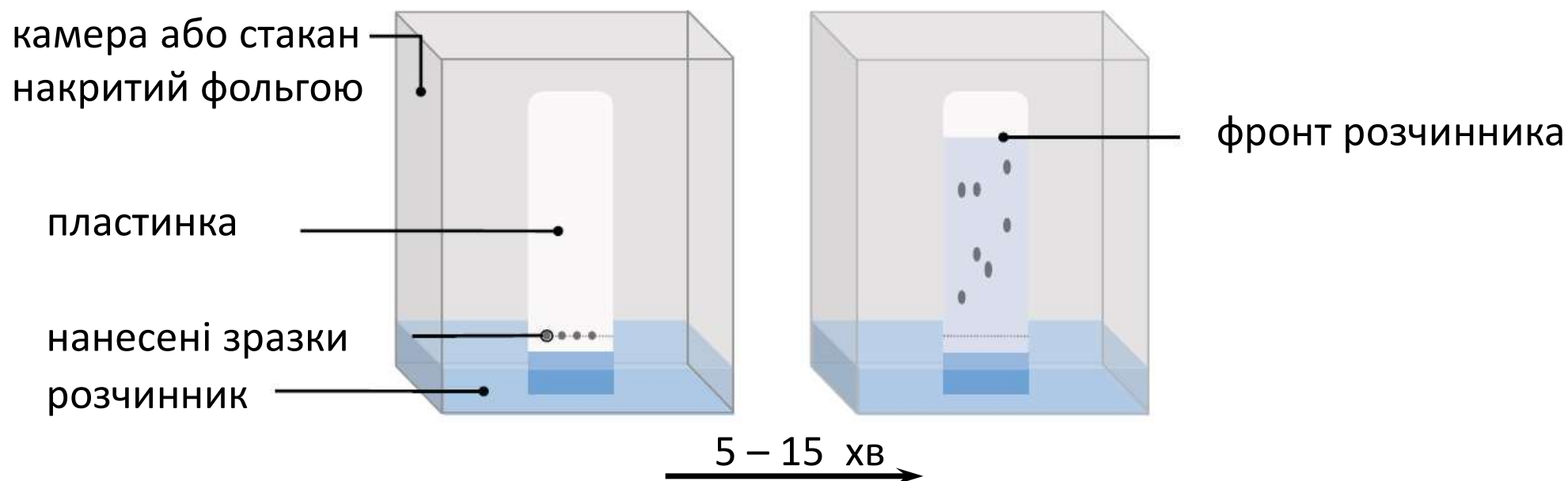
За формою:

- **Тонкошарова**
- **Колоночна**



Тонкошарова хроматографія

Тонкошарова хроматофія



Рухома фаза: вода, органічні розчинники
рухається за рахунок капілярних сил

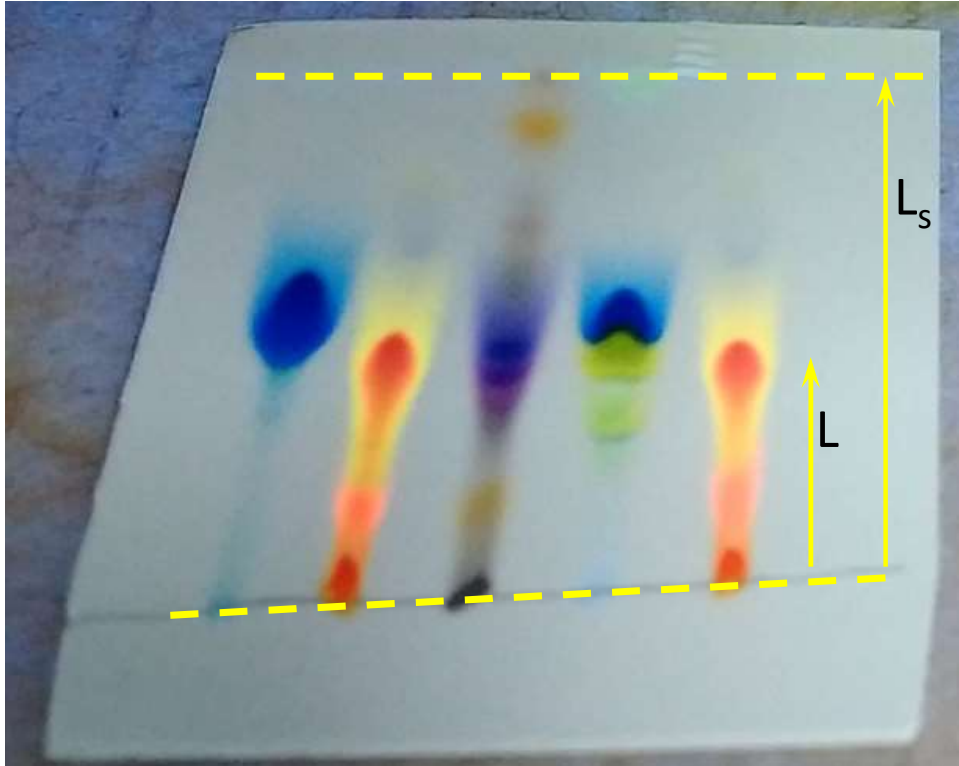
Нерухома фаза:

- папір
- силікагель на фользі (силуфол)

Тонкошарова хроматофія – ТШХ – TLC

Дешево
Швидко

Тонкошарова хроматографія: Rf



Переважно аналітична
препаративне застосування до 1мг

$$R_f = L/L_s$$

L – шлях пройдений речовиною

L_s – шлях пройдений розчинником

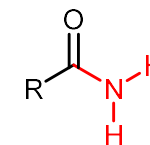
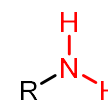
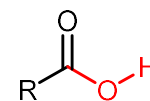
Класична ТШХ

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

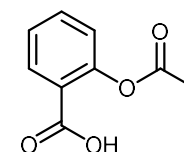
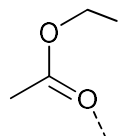
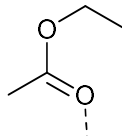
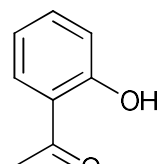
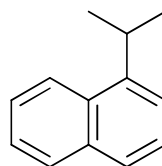
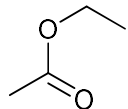
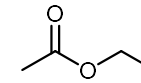
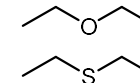
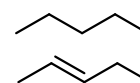
Полярні речовини рухаються **повільніше**
бо краще чіпляються за поверхню



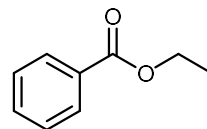
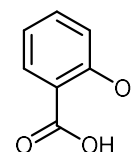
Полярні



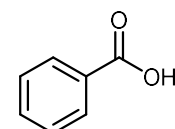
Аполярні



>



>



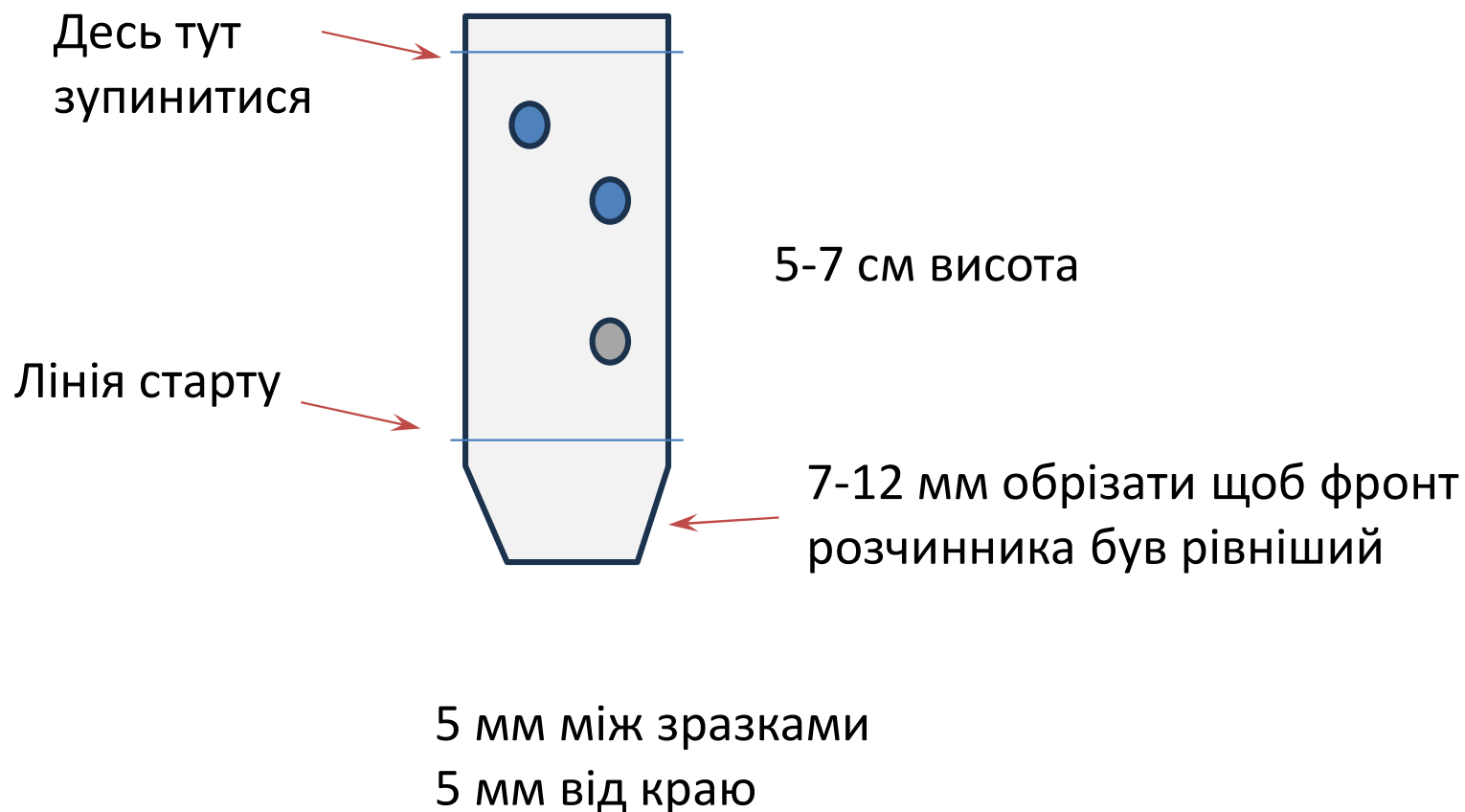
Стаціонарна фаза

Розчинники

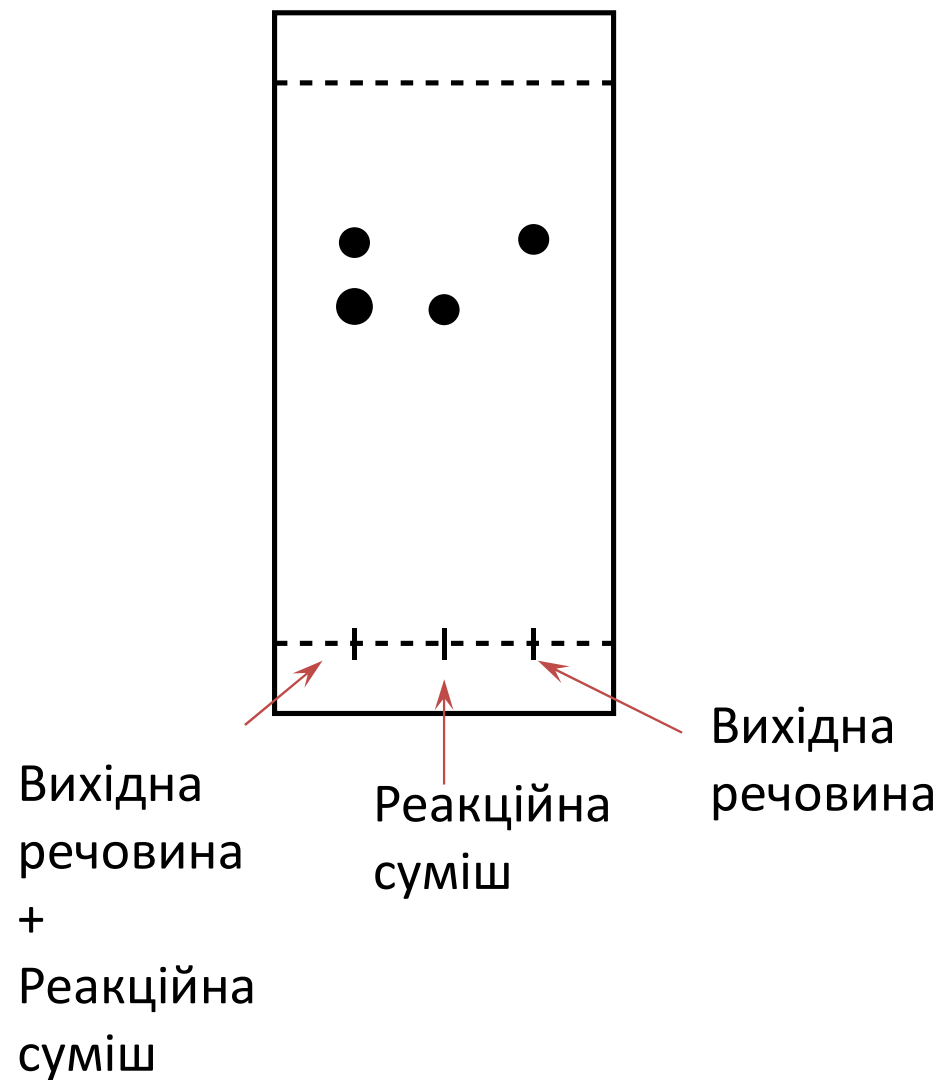
Розчинник	Відносна сила	$t_{\text{кипіння}}$	в'язкість	Прозорість в УФ до, нм
Гексан	0	65	0.3	195
Толуол	0.22	111	0.59	284
Хлороформ	0.26	61	0.57	245
Дихлорметан (DCM)	0.30	40	0.44	233
Диетилетер Et ₂ O	0.38	35	0.24	218
MeOtBu	0.48	55	0.27	210
Етилацетат	0.48	77	0.45	256
Ацетонітрил	0.52	82	0.36	190
Тетрагідрофуран (THF)	0.53	66	0.55	212
Ацетон	0.53	56	0.36	330
Ізопропанол	0.6	82	2.4	205
Метанол	0.7	65	0.55	205

Сильніший розчинник → швидше рухаються речовини
грає роль здатність розчинника бути донором чи акцептором водневих зв'язків
(кислотність/основність)

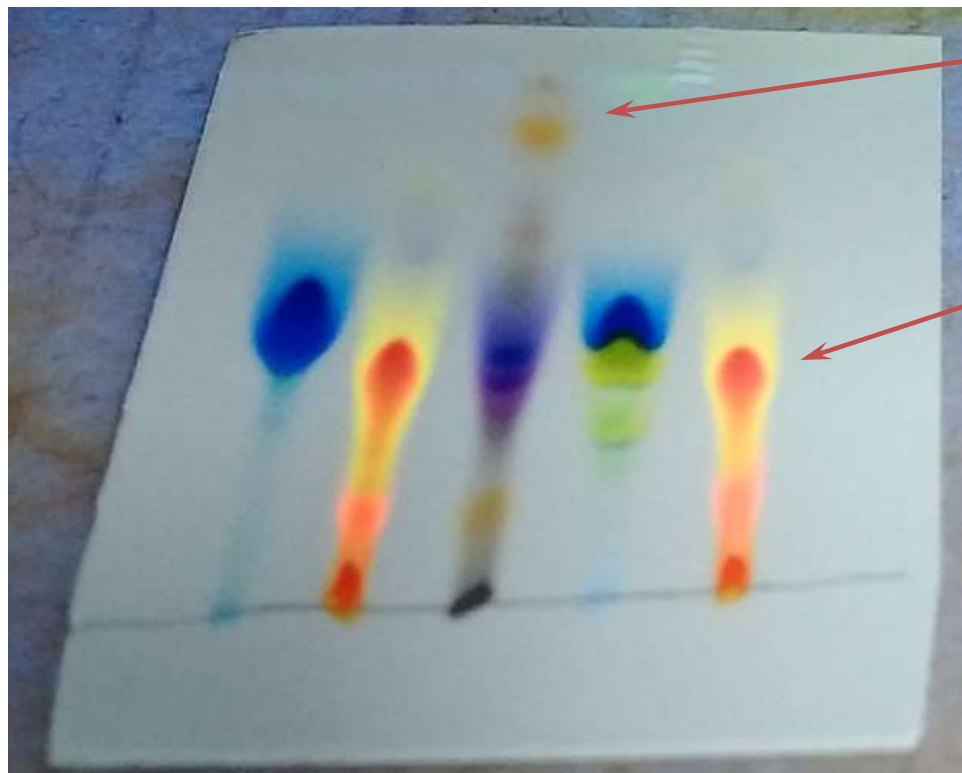
ТШХ: барвників на силуфолі



ТШХ: барвників на силуфолі



ТШХ: барвників на силуфолі



завеликі об'єми чи
концентрації → зразок
розпливається

Пляма зручної інтенсивності

Ці піки сильно
перевантажені, потрібно

Аналіз сумішей органічних
речовин, перевірка на домішки

Детекція:

- візуальна
- UV 265 нм (флуоресценція силуфолу)
- UV 365 нм (флуоресценція речовин)
- проявники (нінгідрин, йод, ...)

Колоночна хроматографія

Класична колоночна хроматографія

Нерухома фаза:

- силікагель (засипаний в скляну колонку)
- інші сорбенти

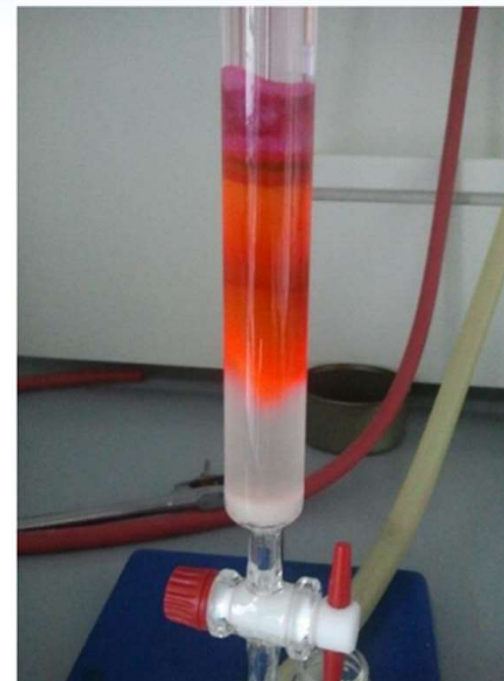
Рухома фаза: органічні розчинники
рухається за рахунок сили тяжіння чи
насоса

Переважно препаративна

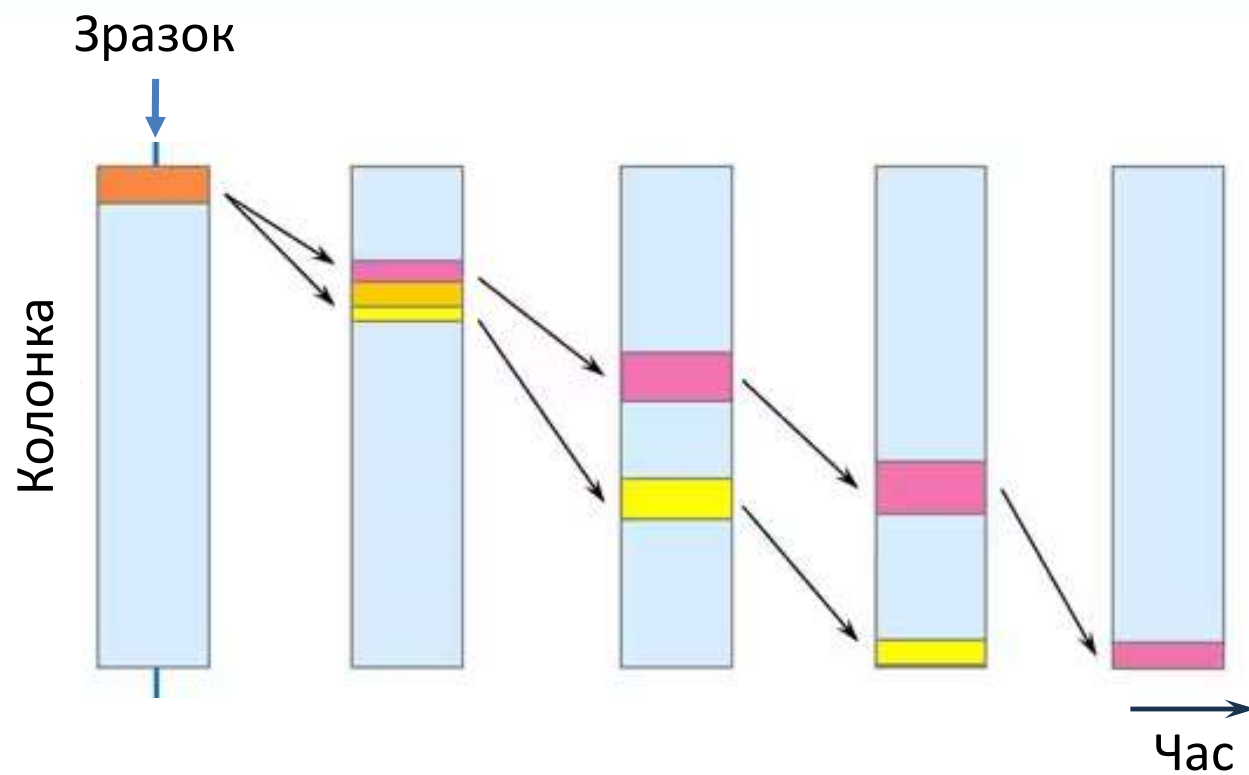
Детектор: (немає) – переважно збір
фракцій і аналіз згодом

Дешево

Швидко

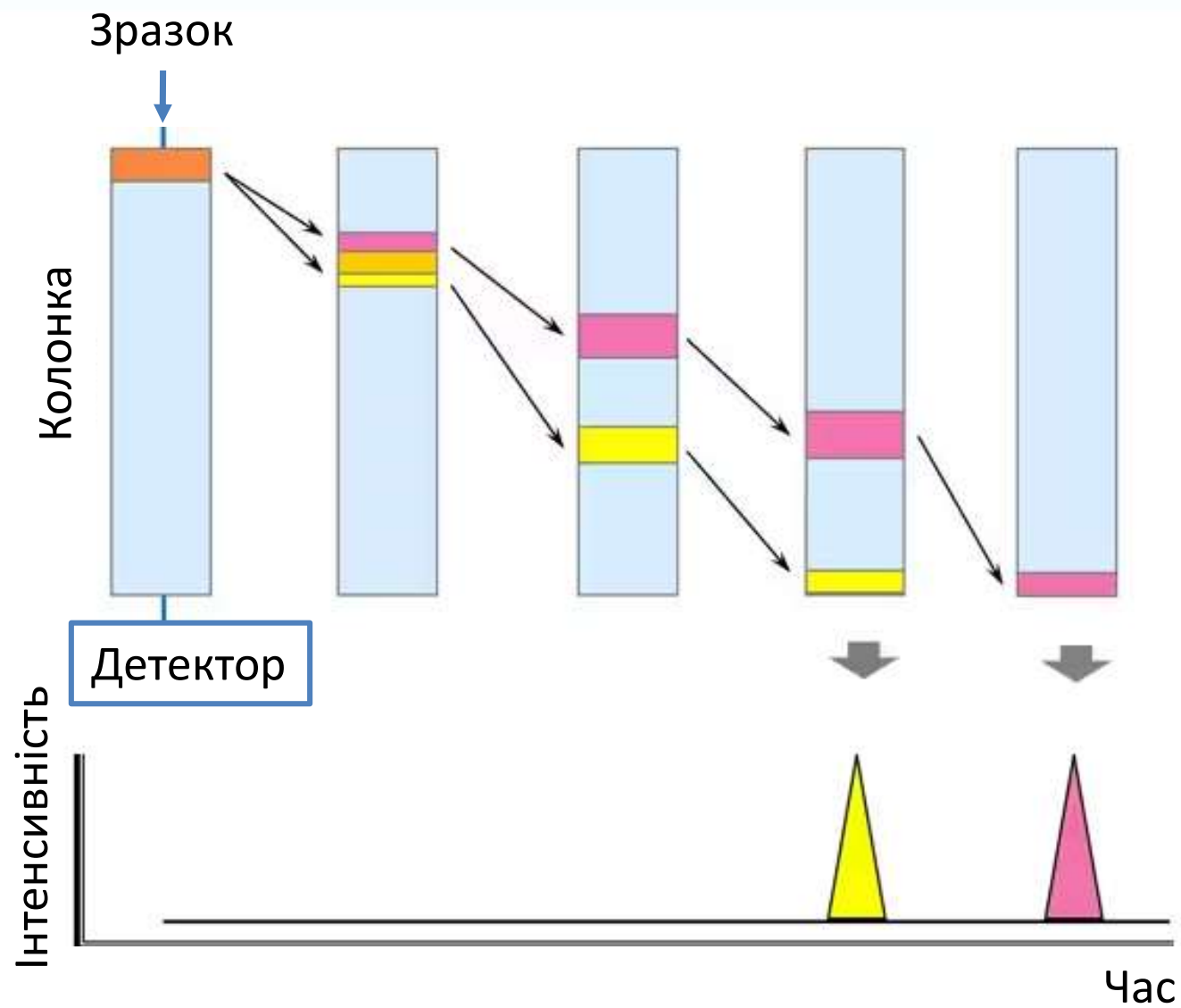


Колоночна хроматофія

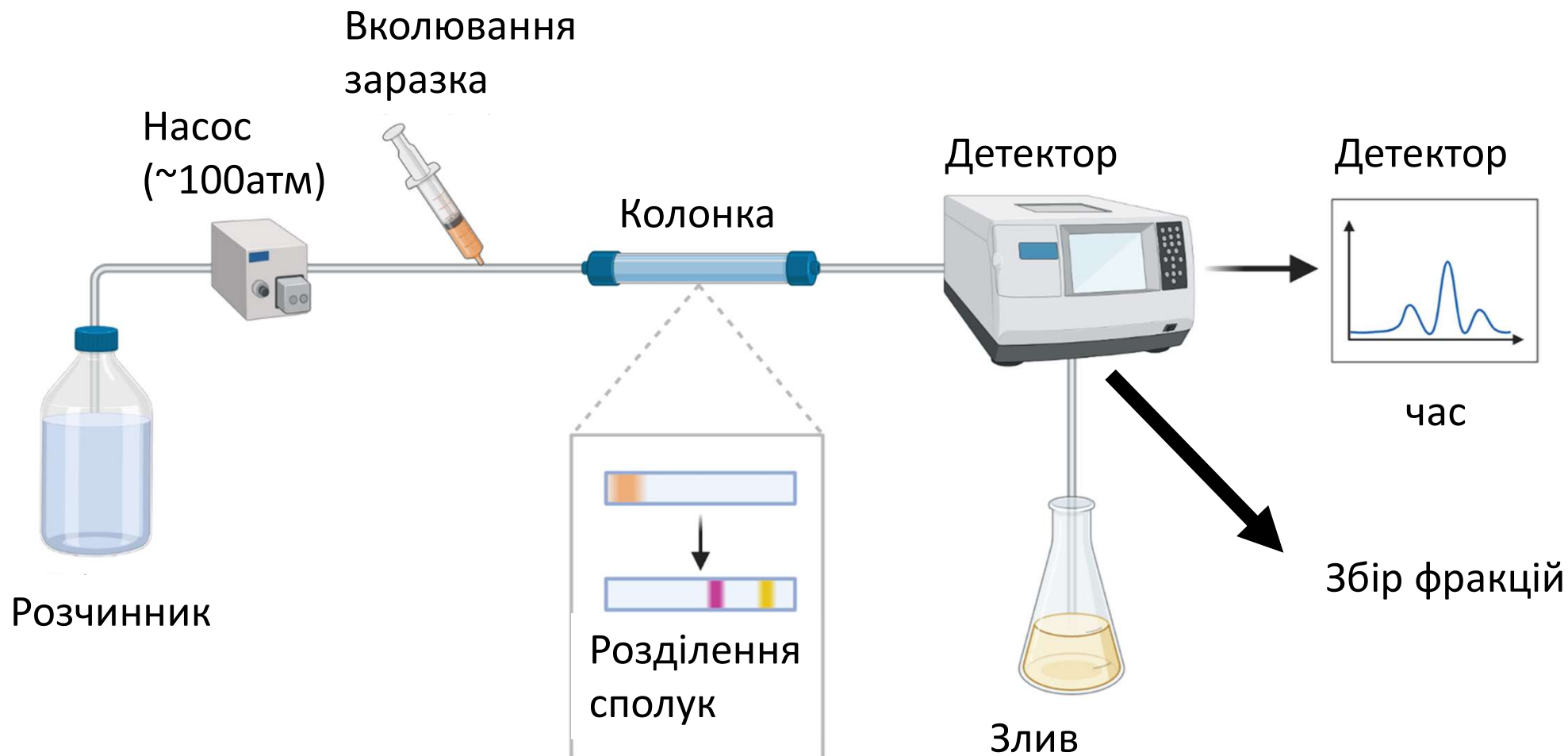


HPLC

Колоночна хроматографія



HPLC (ВЕРХ)



HPLC (ВЕРХ)

Високоєфективна рідинна хроматографія – ВЕРХ – HPLC



Нерухома фаза:

- силікагель в металевій колонці

Рухома фаза: вода, органічні розчинники
рухається за рахунок насоса

Як аналітична, так і препаративна

Детектор: різні (Спектрофотометр,
nd, флуоресценція, MS ...)

Пристрій порядку 50 к\$

Час на аналіз біля 40хв

HPLC (ВЕРХ)

Розчинник А Розчинник В



Препаративна і аналітична хроматографія



Колектор фракцій

Препаративна і аналітична хроматографія

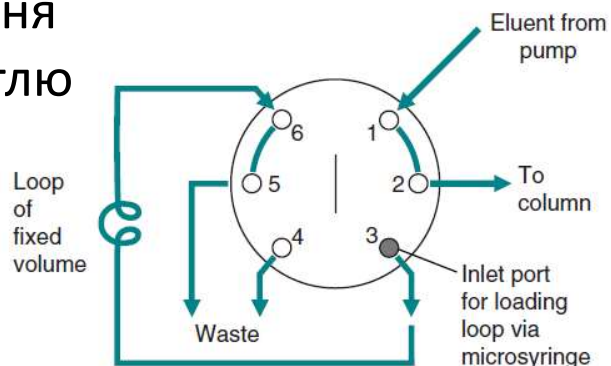


Ручні ін'єктори та петлі для введення аналітичних кількостей зразка

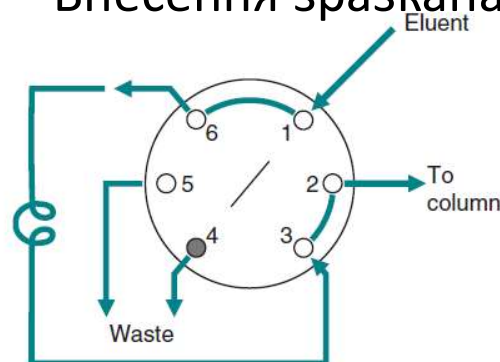


Ін'єктори та петля для введення 5 мл зразка

Завантаження зразка в петлю



Внесення зразка в колонку



HPLC (BEPX)



1980-ті, Waters



2000-ні, Schimatzu

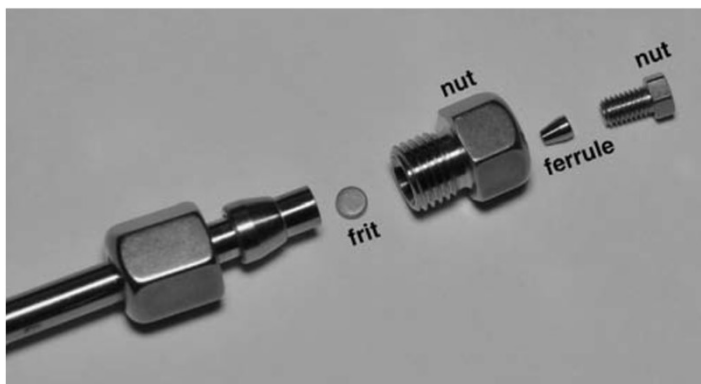
HPLC (BEPX)



Препаративна і аналітична хроматографія



Колонки

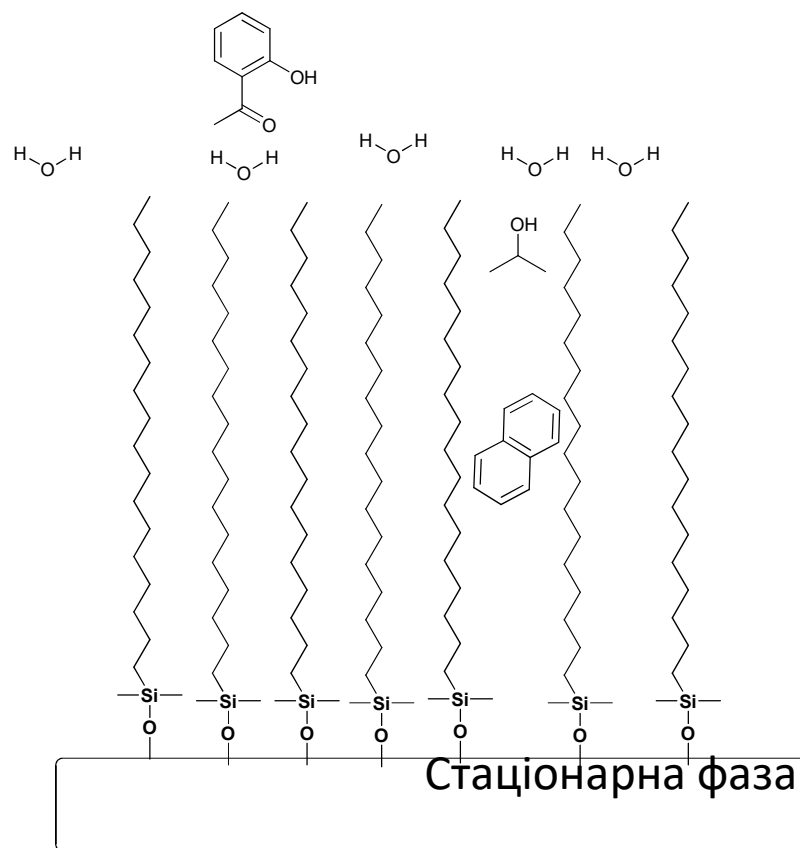


HPLC: зворотня фаза

обернена фаза (reverse phase)

RP HPLC: рухома фаза - ацетонітрил/вода

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

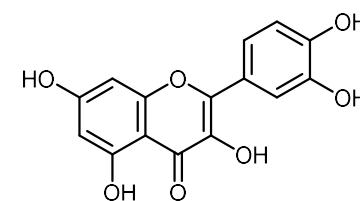
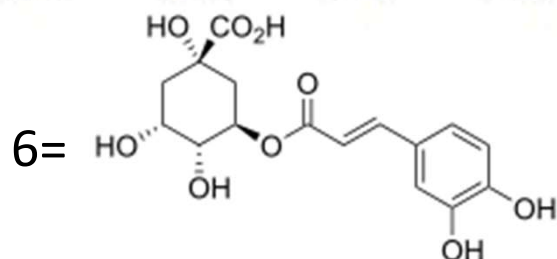
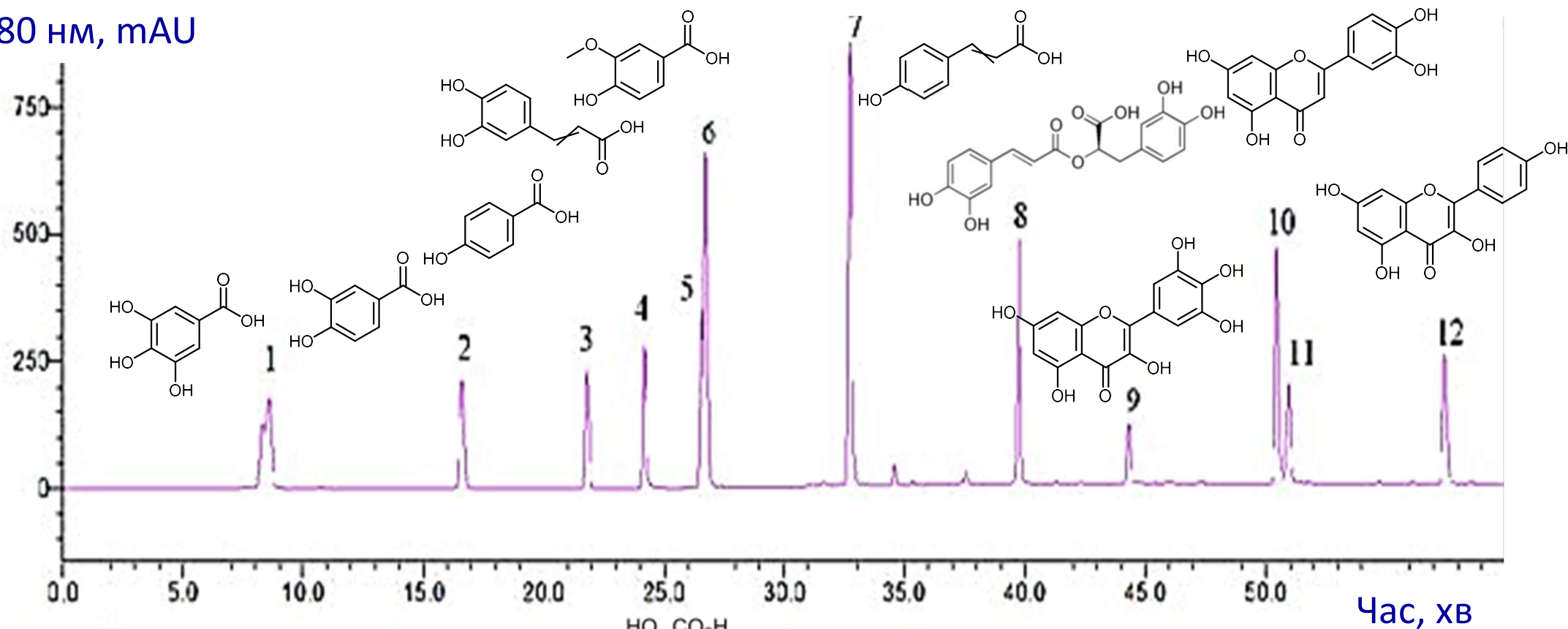


C4-C8 - пептиди

C18 – малі молекули

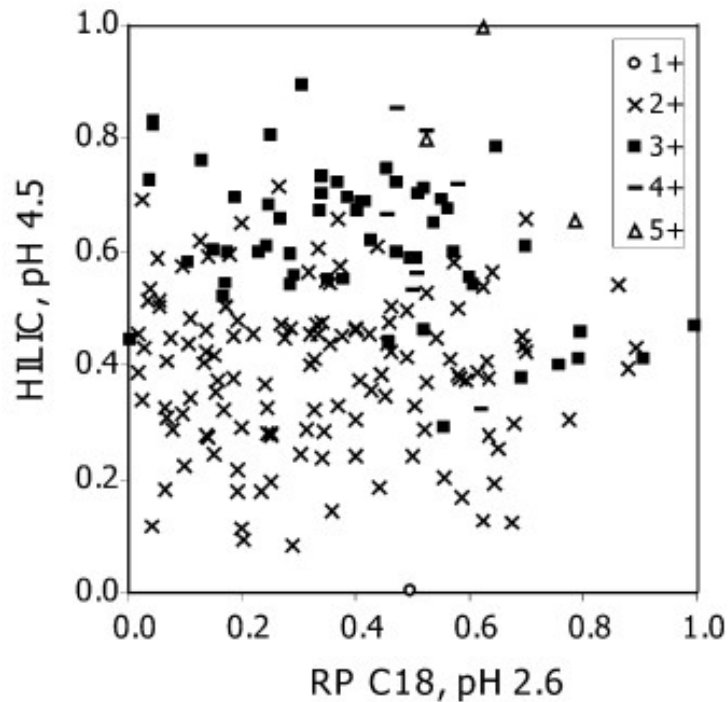
Хроматограми

поглинання на
280 нм, mAU

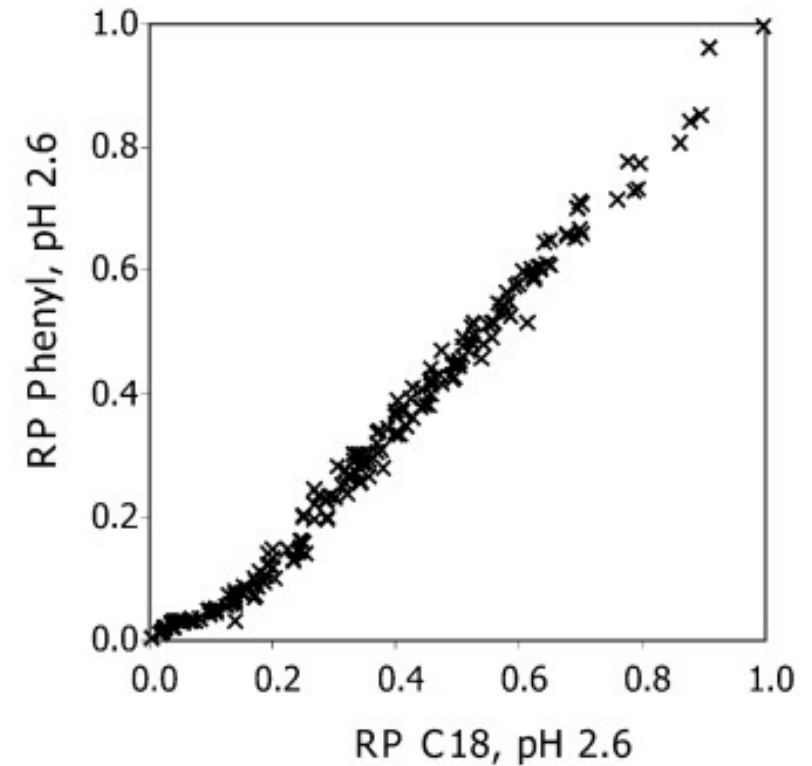


Типи колонок

Хороша ортогональність

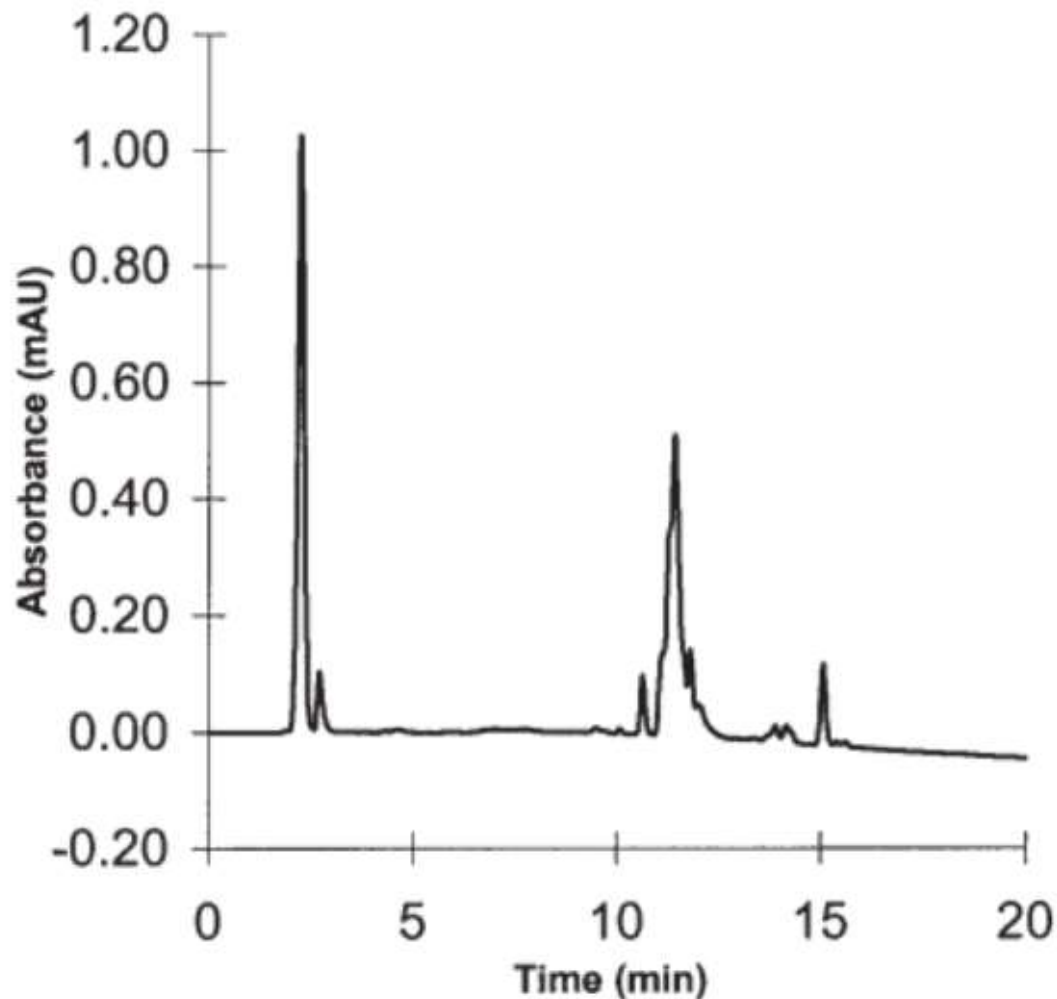


Погана ортогональність



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

Градiєнт розчинника при хроматографії

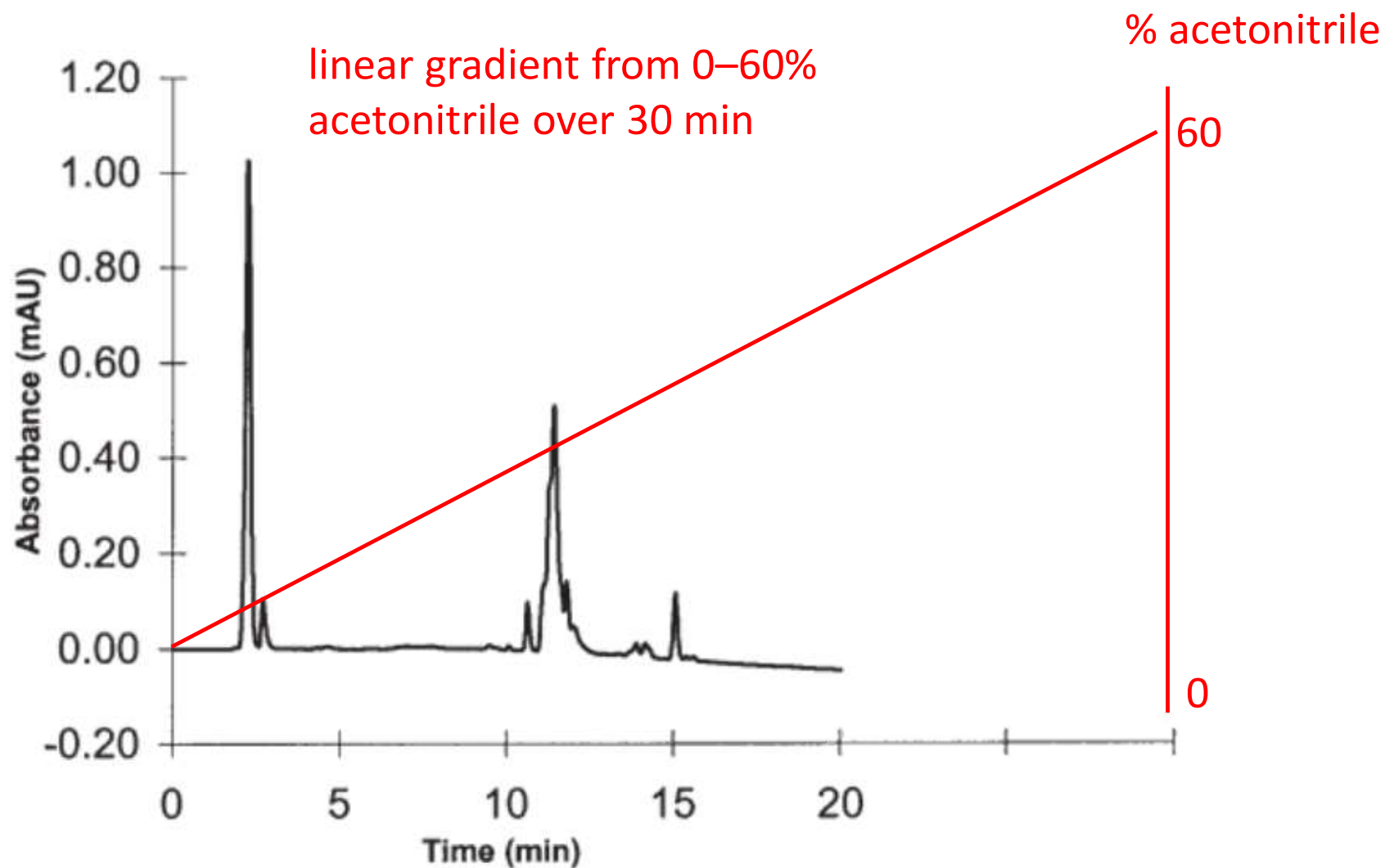


RP-HPLC elution profile illustrating the purification of a synthetic peptide. Analytical profile (1 mg) of a crude peptide mixture from solid phase peptide synthesis.

Column: Zorbax 300 RP-C18, 25 cm × 4.6 mm id, 5- μ m particle size, 30 nm pore size.

Conditions: linear gradient from 0–60% acetonitrile with 0.1%TFA over 30 min, flow rate of 1 mL/min, 25°C.

Гرادієнт розчинника при хроматографії



Гرادієнт розчинника при хроматографії

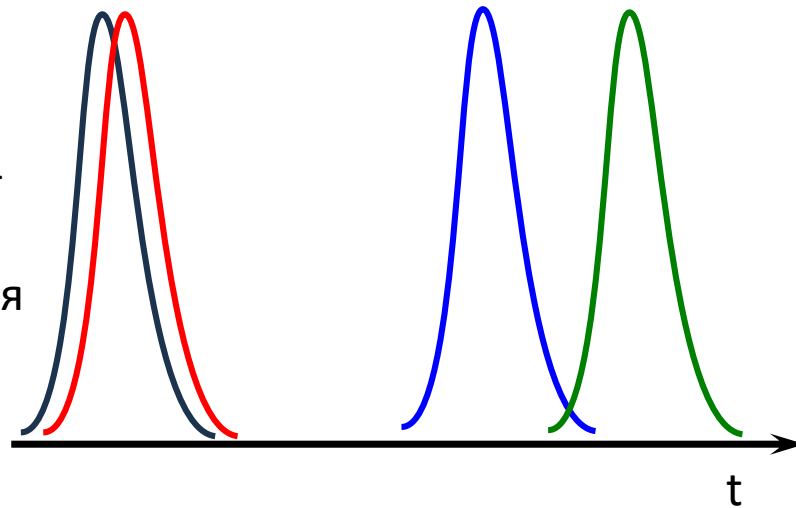


саме для створення градієнтів і використовуються два насоси

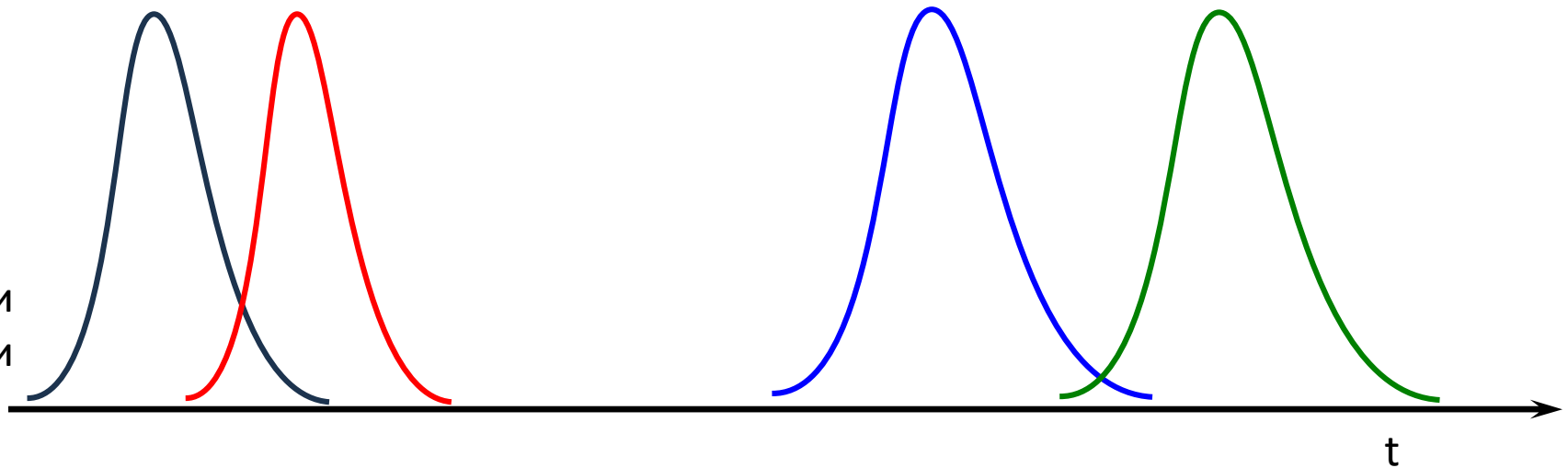
переваги градієнтів над ізократичною хроматографією – суміш а речовин з дуже різними полярностями не можна розділити в одному розчиннику

Градiєнт розчинника при хроматографії

сильний розчинник -
піки близько до
початку накладаються



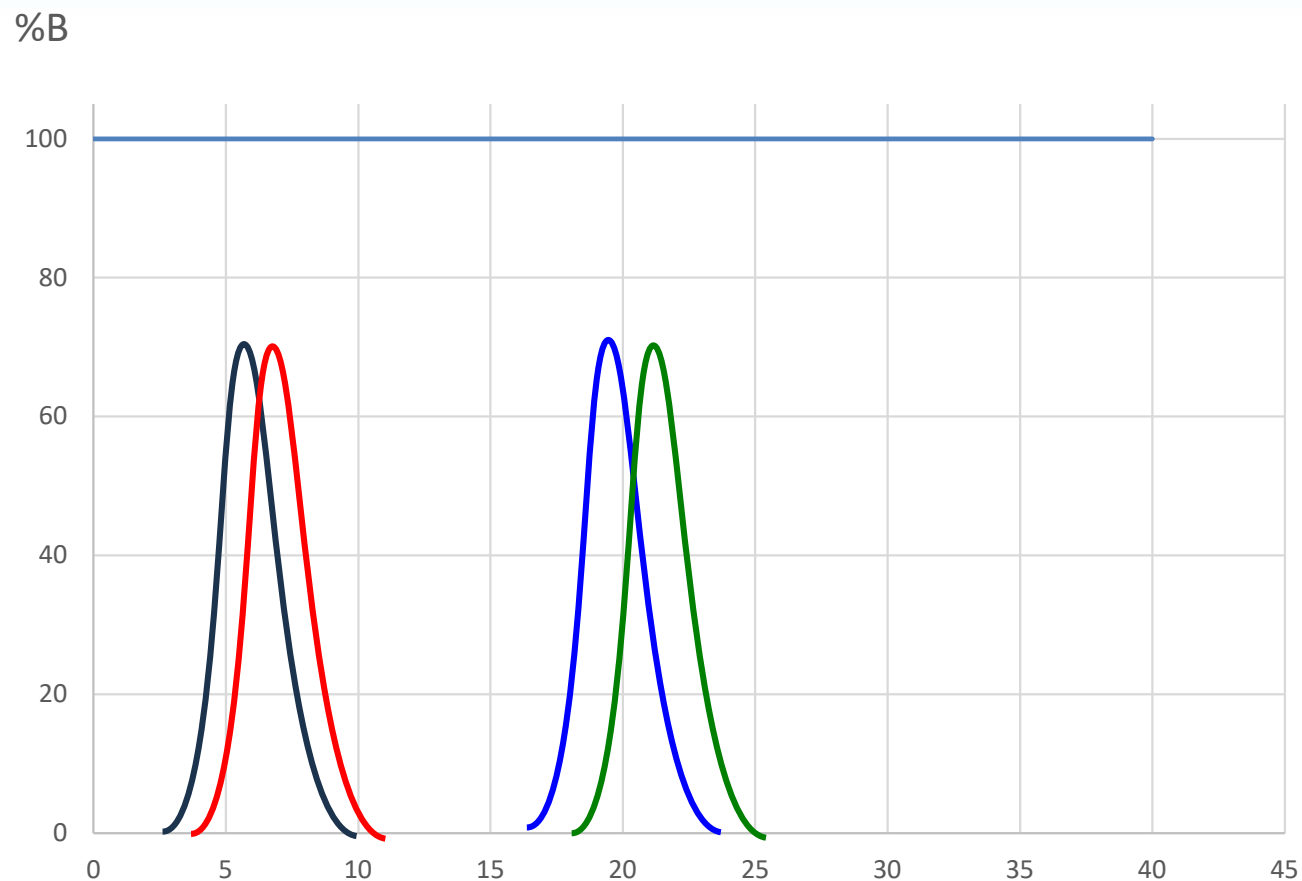
слабкий розчинник
- надто довго чекати
щоб вийшли всі піки



Градiєнт розчинника при хроматографії

t, min	%B
0	100
30	100
35	100
40	100

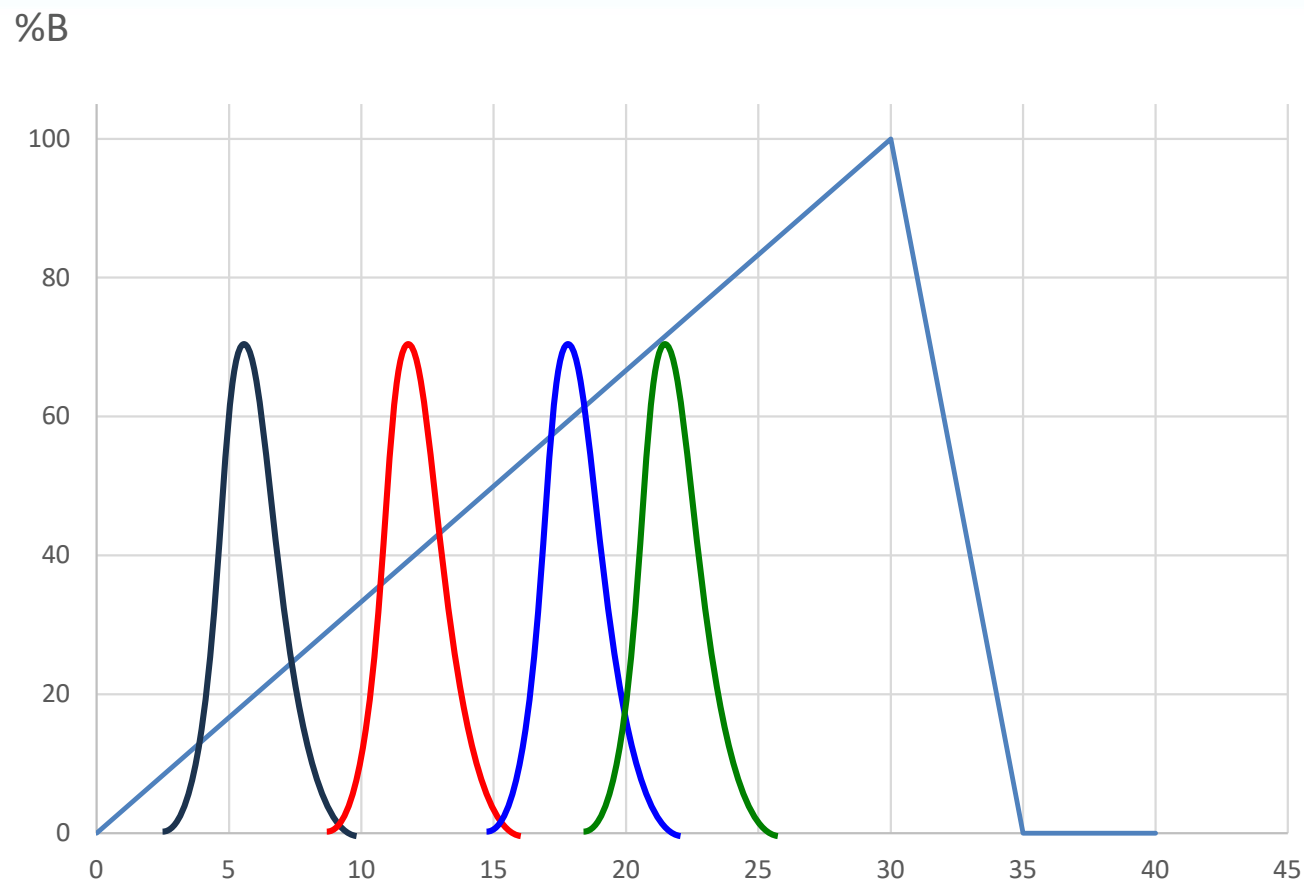
ізократичний
потік



Градiєнт розчинника при хроматографії

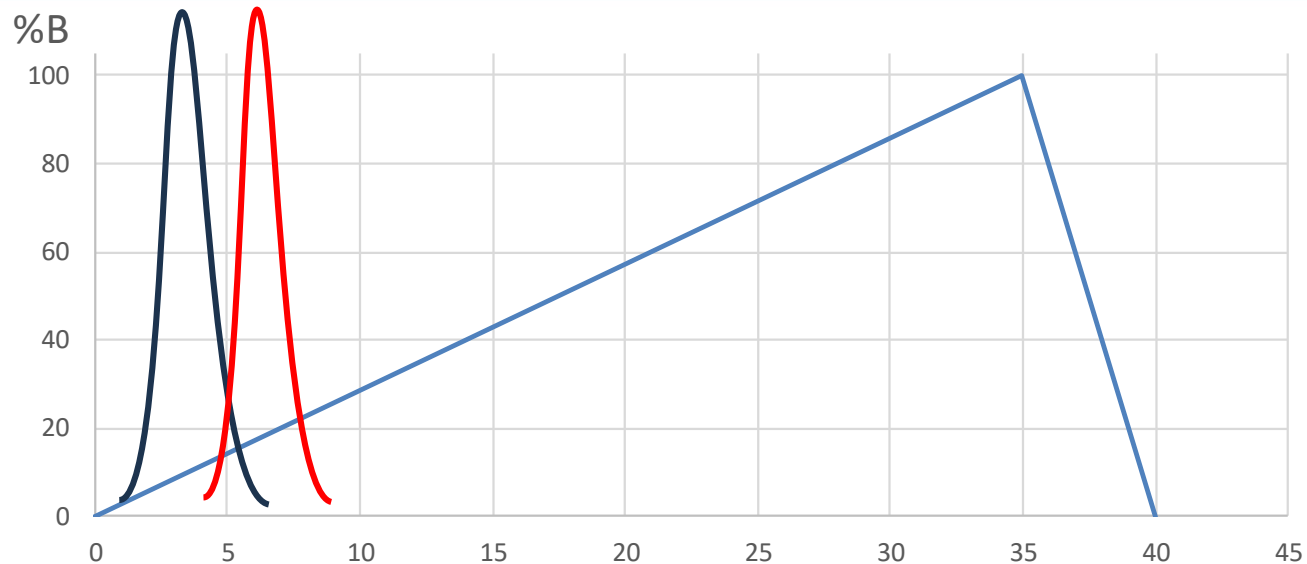
t, min	%B
0	0
30	100
35	0
40	0

простий лінійний
градієнт – дозволяє
рознести піки далі

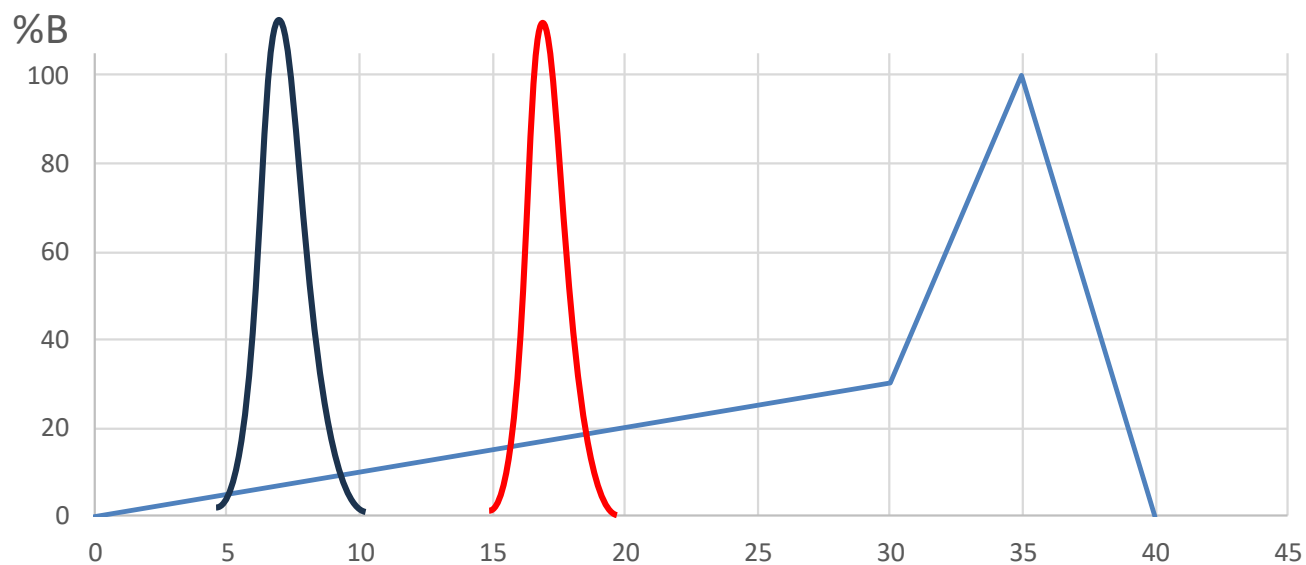


Градiєнт розчинника при хроматографії

t, min	%B
0	0
35	100
40	0
45	0



t, min	%B
0	0
30	30
35	100
40	0
45	0

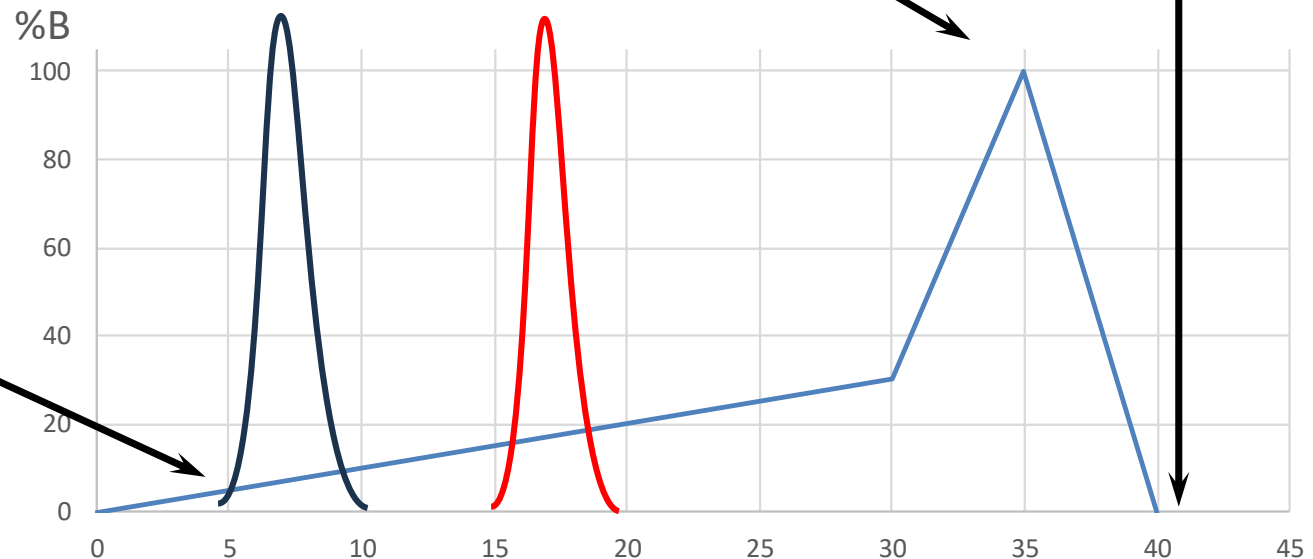


Гرادієнт розчинника при хроматографії

Пологіший градієнт на момент виходу піку – краще розділення

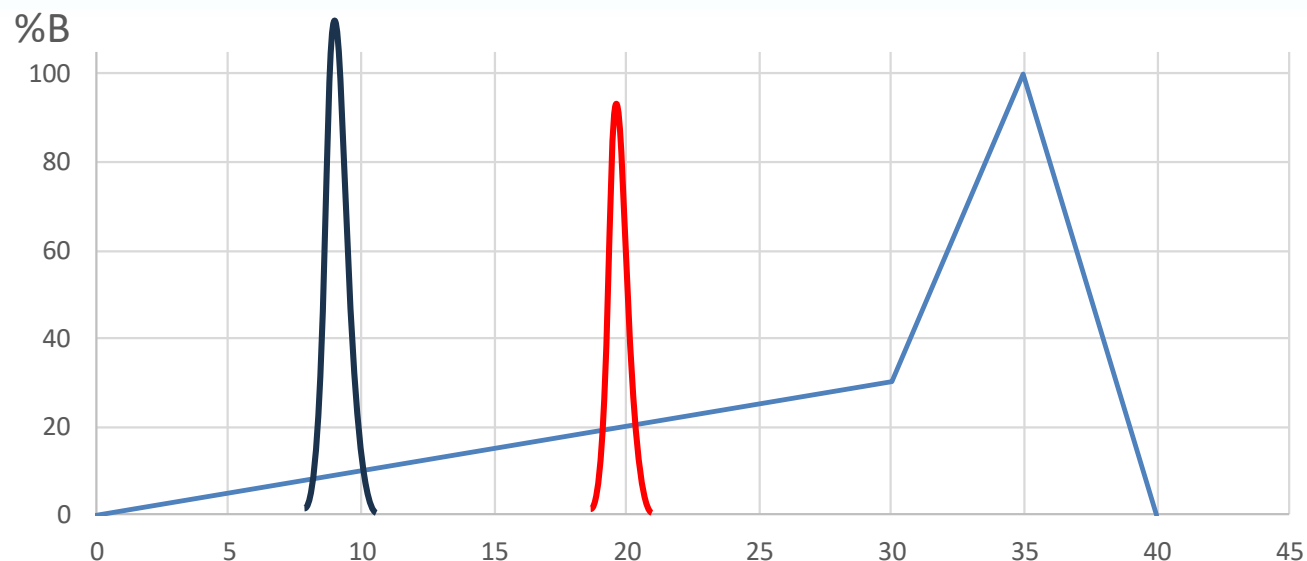
Доводим до максимуму щоб промити колонку

Градiєнт краще починати й закінчувати на однакових значеннях

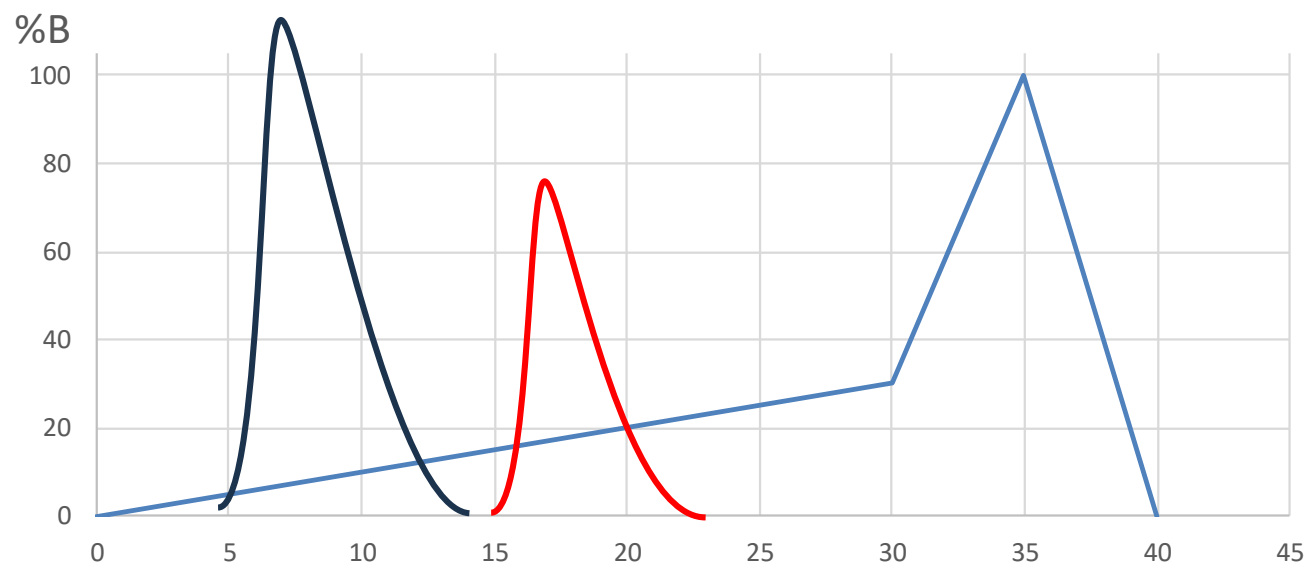


Прикладні аспекти: препаративна очистка

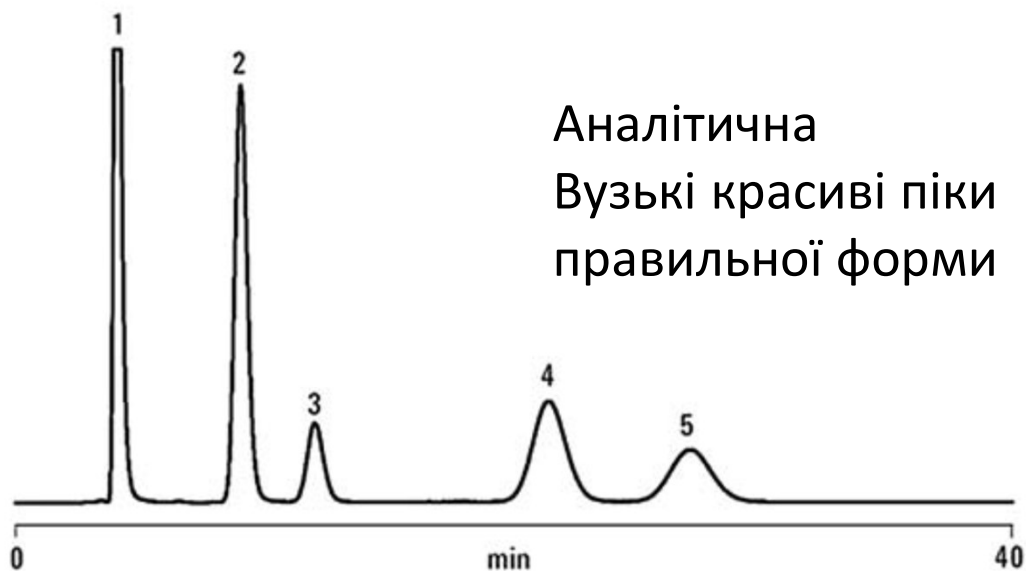
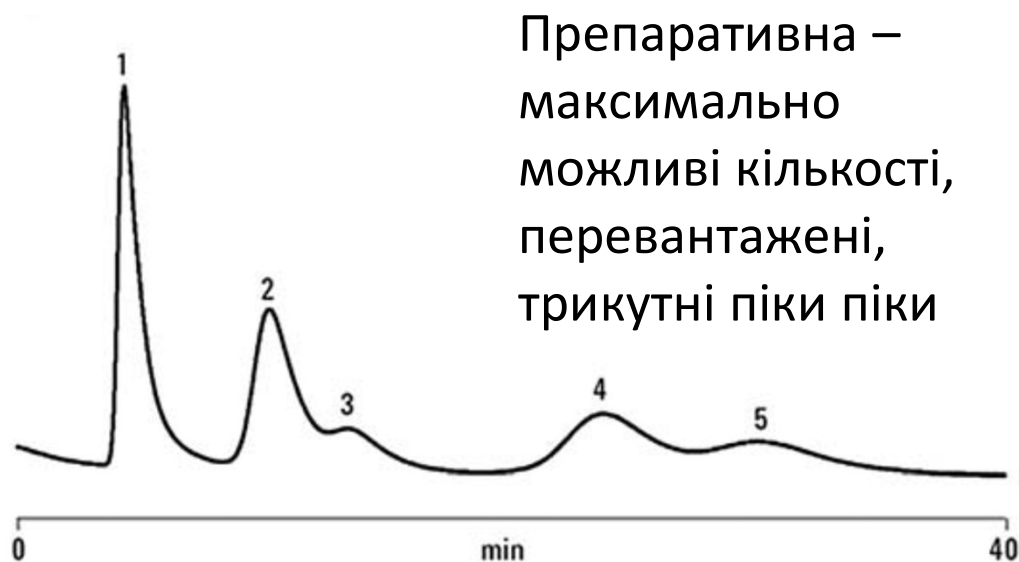
Аналітична
Вузькі красиві піки
правильної форми



Препаративна –
максимально
можливі кількості,
перевантажені,
трикутні піки піки

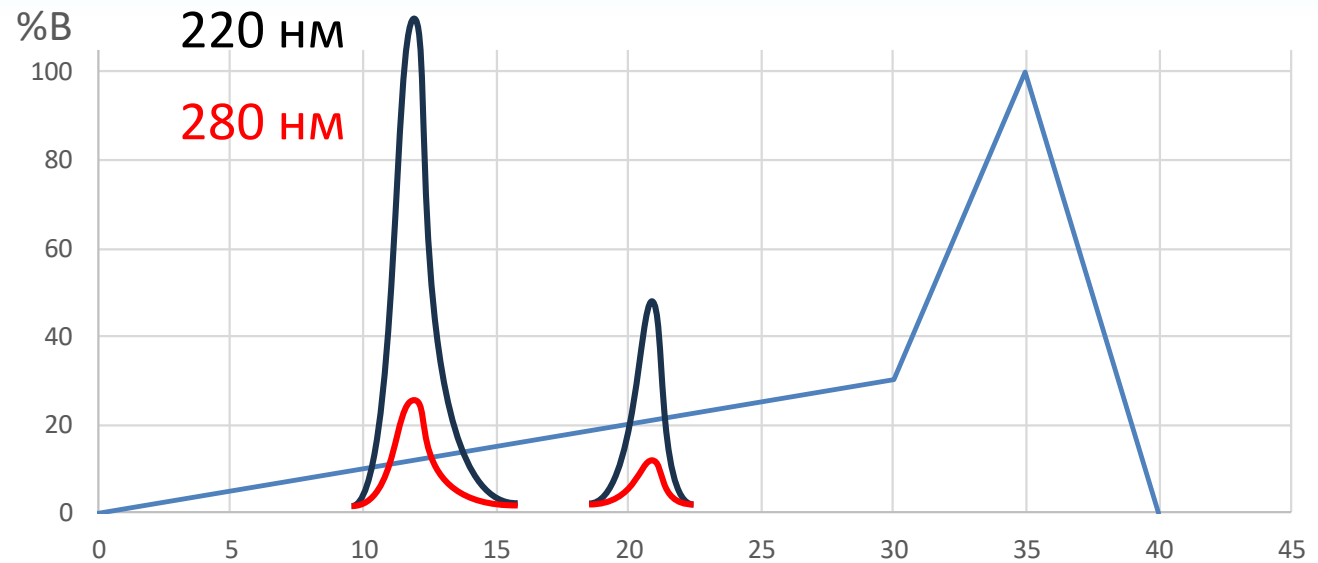


Прикладні аспекти: препаративна очистка

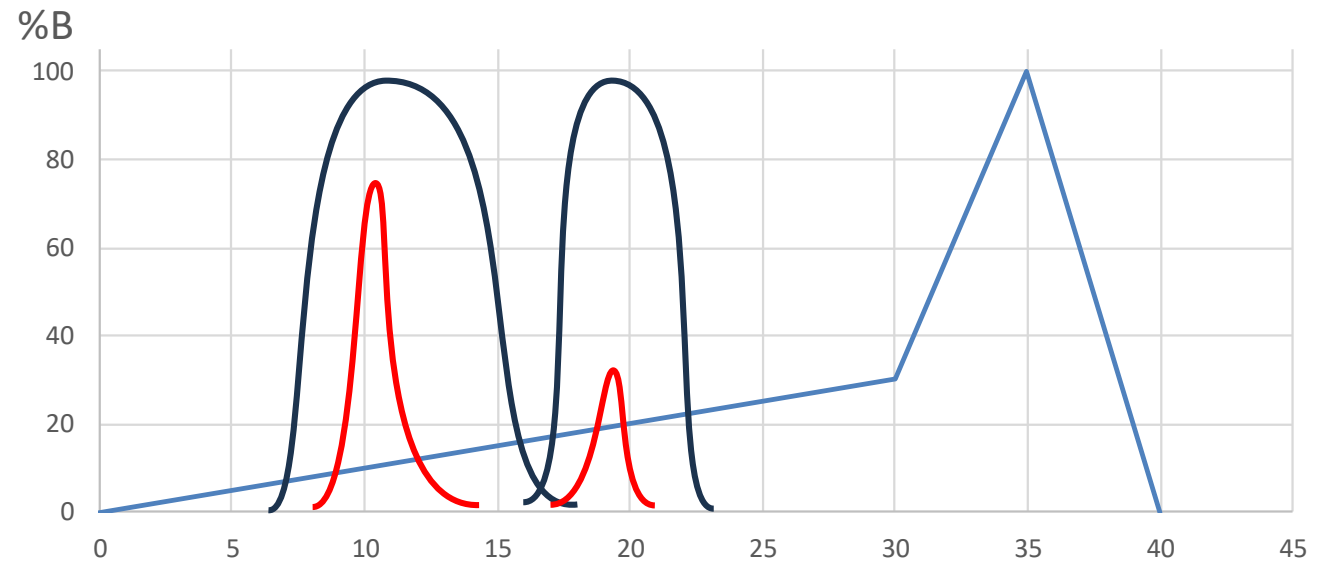


Прикладні аспекти: детектори

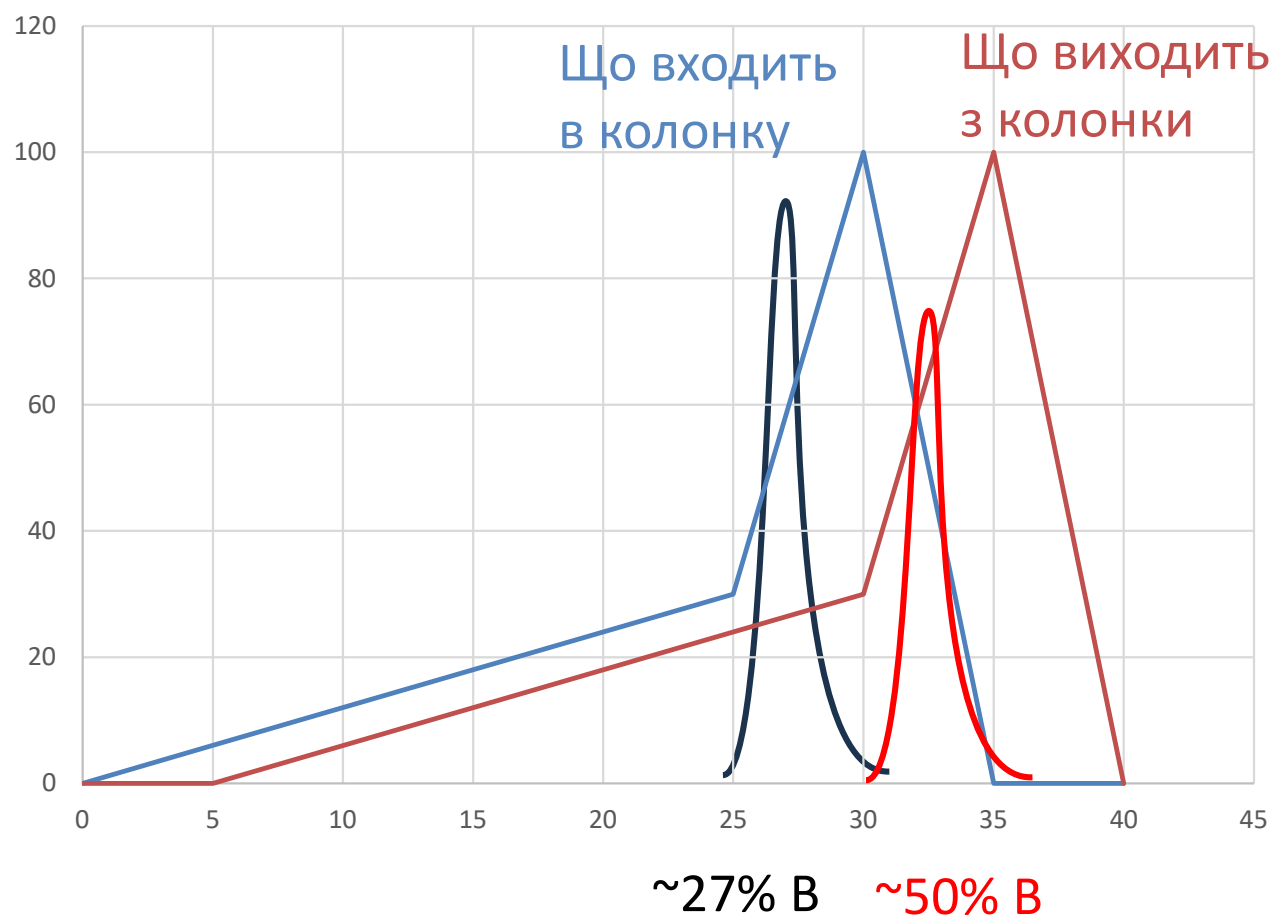
Аналітична



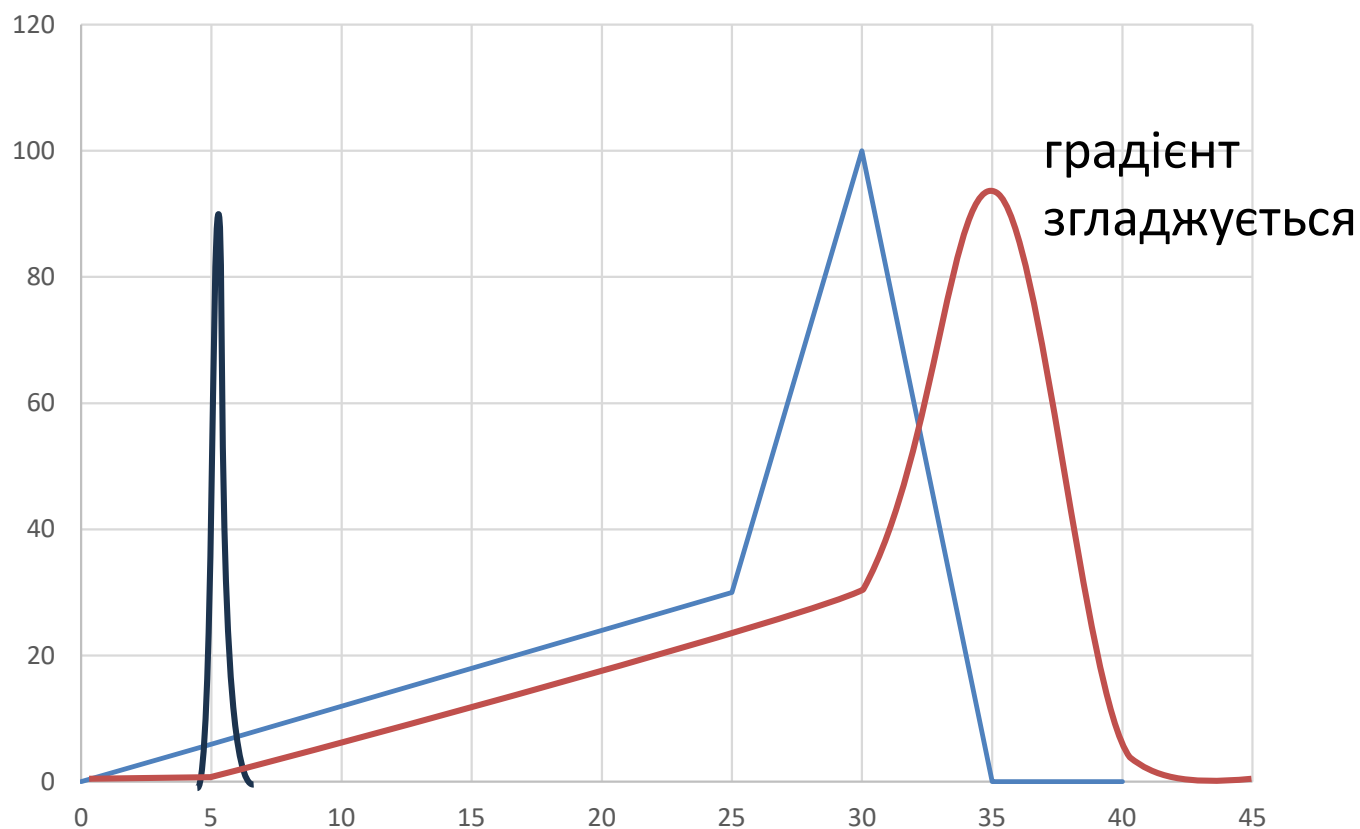
Препаративна –
часті зашкали
детекторів на
OD=2



Прикладні аспекти: врахуйте час проходження колонки



Прикладні аспекти: врахуйте час проходження колонки



Ін'єкційний пік – те що взагалі не затрималось на колонці і вийшло за час проходження розчинника
Час залежить від об'єму колонки і ін'єкційної петлі та потоку

Іонообмінна хроматографія

Іонообмінна хроматографія

Нерухома фаза:

- модифікована сефароза (катіонна чи аніонна)

Рухома фаза: Буфер без солі ... Буфер з 1М NaCl
рухається за рахунок насоса

І аналітична і препаративна

Детектор: поглинання,
електропровідність

Дешево
Швидко

Іонообмінна хроматофія

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

Приклад: перепаративна очистка протеїнів

Можна підбирати рН для кращого очищення

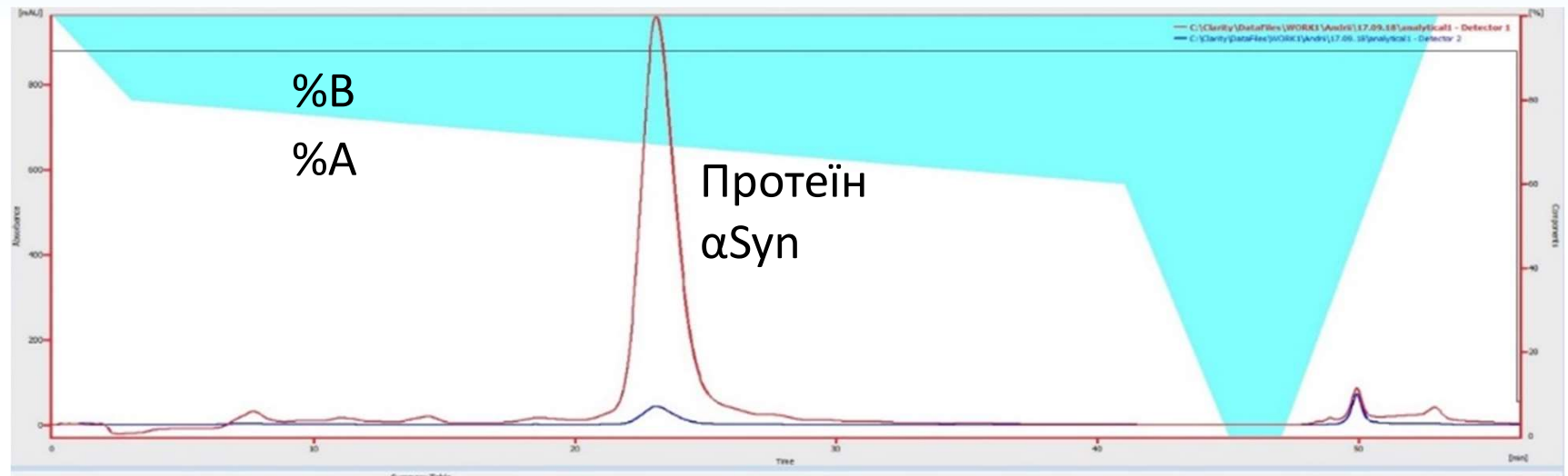
Можна робити градієнт рН щоб відрізнати по ізоелектриній точці

Біля 15 атм



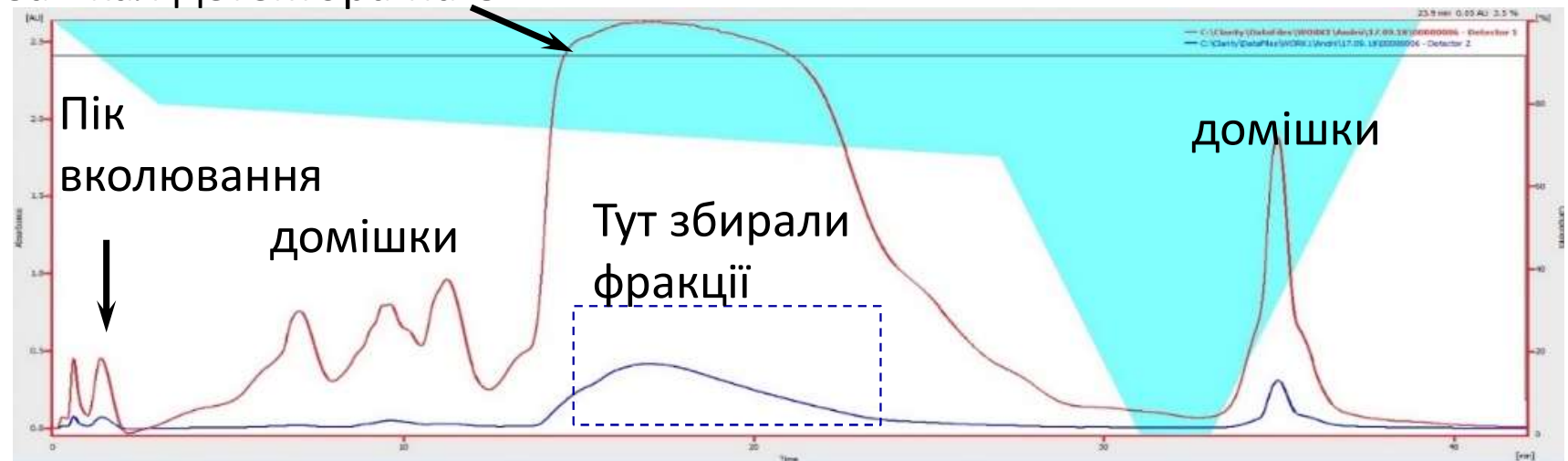
Приклад очистки протеїну

Аналітична



зашкал детектора на OD=2

препаративна



A = Na/PO₄ buff, pH 7.4 B = Na/PO₄ buff, pH 7.4 1M NaCl

Хроматографія витіснення

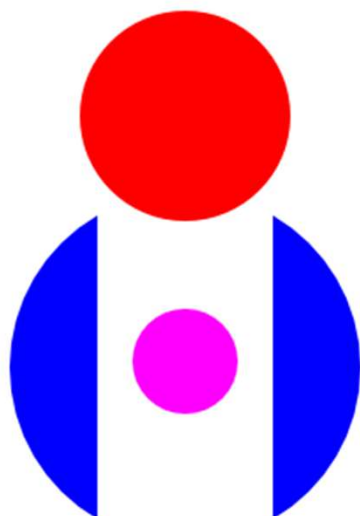
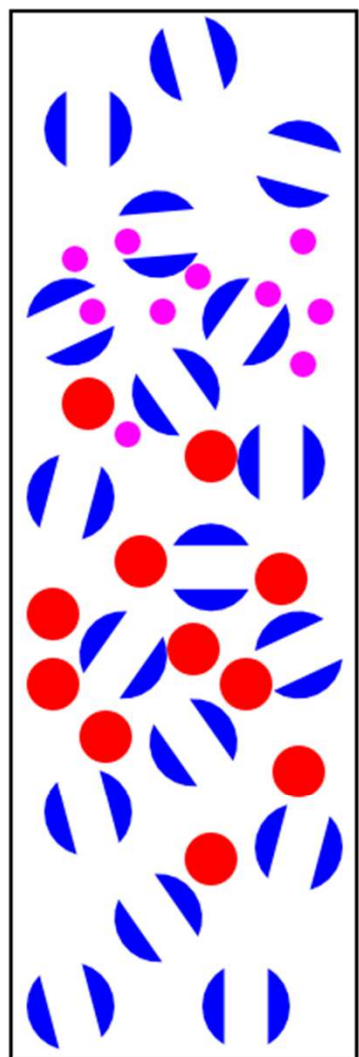
SEC (хроматографія витіснення)

Сорбент - пористий (напр. Агароза)
рухома фаза - буфер, повільний
потік
великі протеїни
рухаються швидше

Біля 1 атм

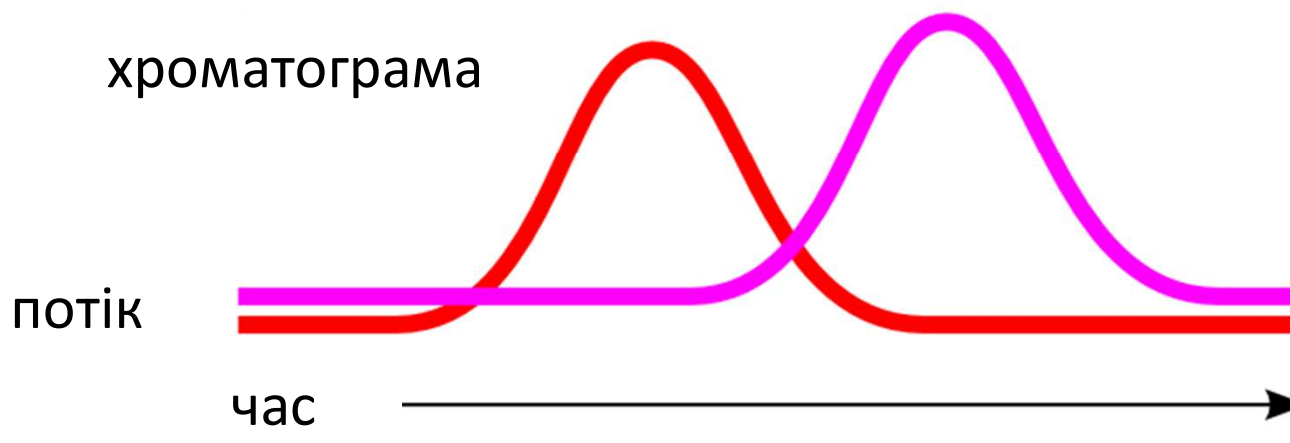


SEC (хроматографія витіснення)

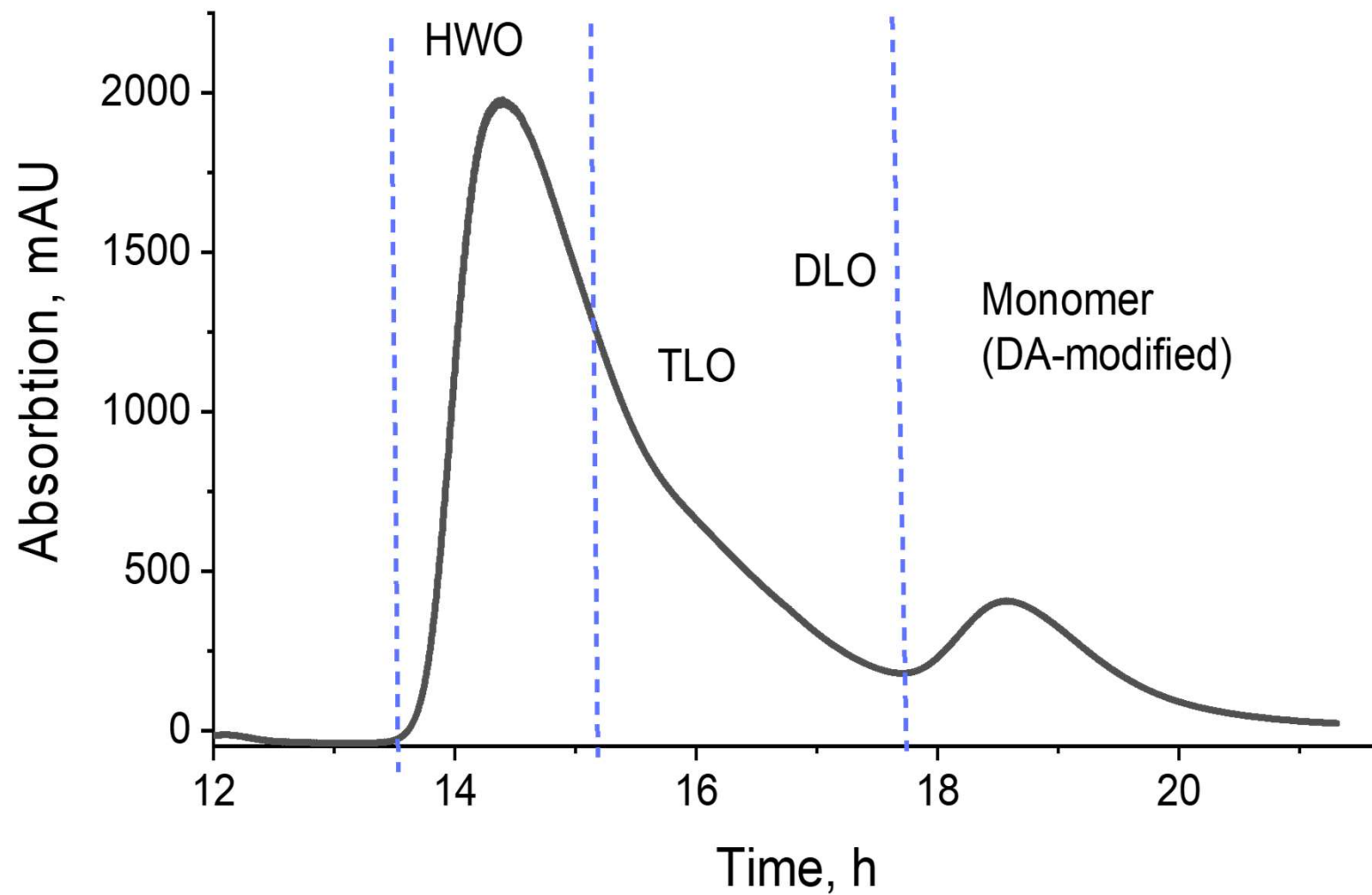


Частина пор замала для великих частинок тому вони рухаються доволі прямими траєкторіями й виходять швидше

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



SEC (хроматографія витіснення)

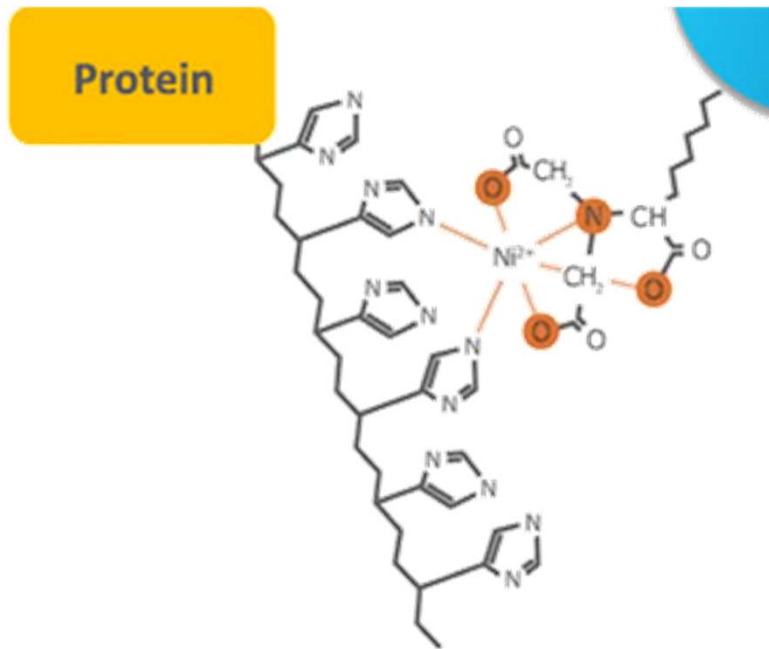


Афінна хроматографія

Афінна хроматографія

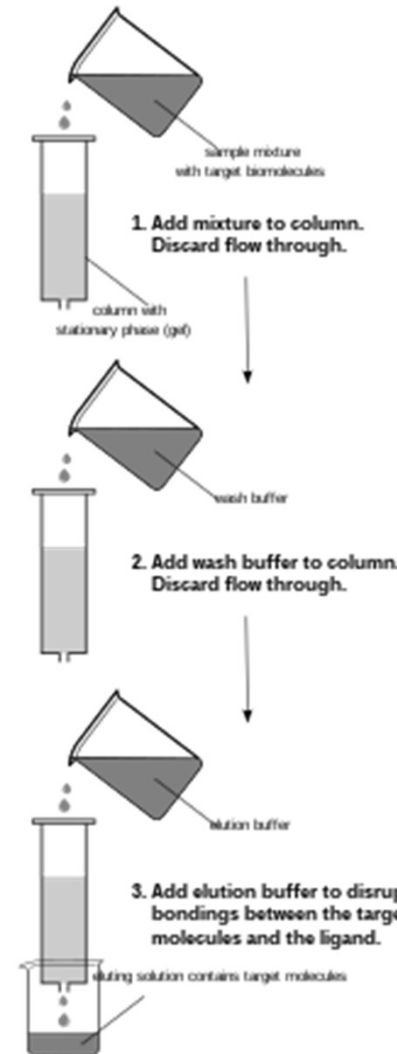
- ▶ найбільш селективний методо хроматографічного очищення
- ▶ нерухома фаза ковалентно модифікована лігандом, який зв'язує цільову молекулу
- ▶ Коли складна суміш молекул проходить через колонку, цільова молекула зв'язується, тоді як більшість інших молекул проходять крізь неї.
- ▶ Цільову молекулу вимивають розчином вільного ліганду або за рахцунк зміни умов

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



Афінна хроматографія

