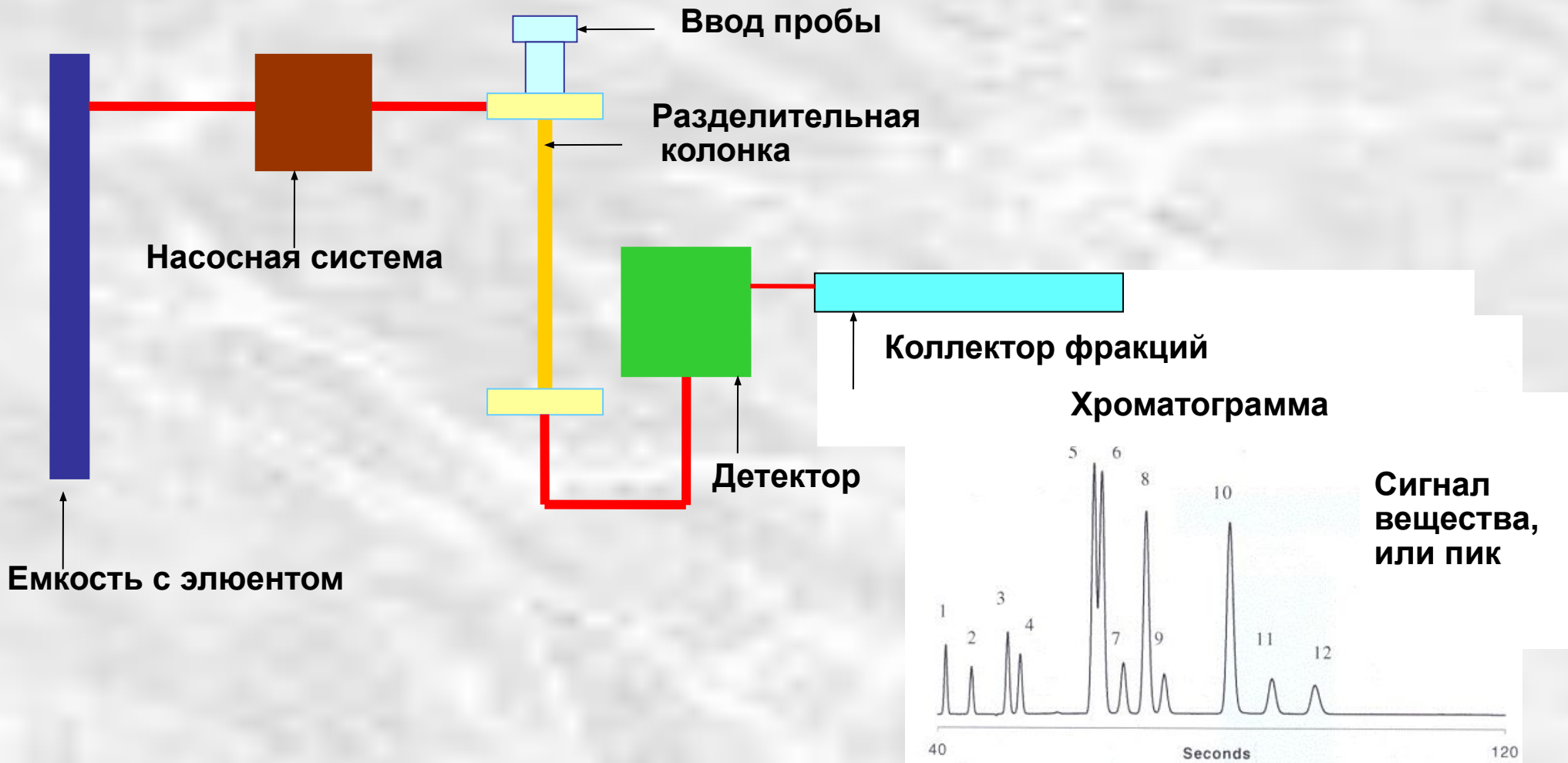


# Колоночная хроматография

стационарная фаза находится в колонке;  
прием используется как в газовой, так и в жидкостной хроматографии

*Принципиальная схема хроматографа для колоночной хроматографии*



# Колоночная хроматография

<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences/service-and-support/handbooks>

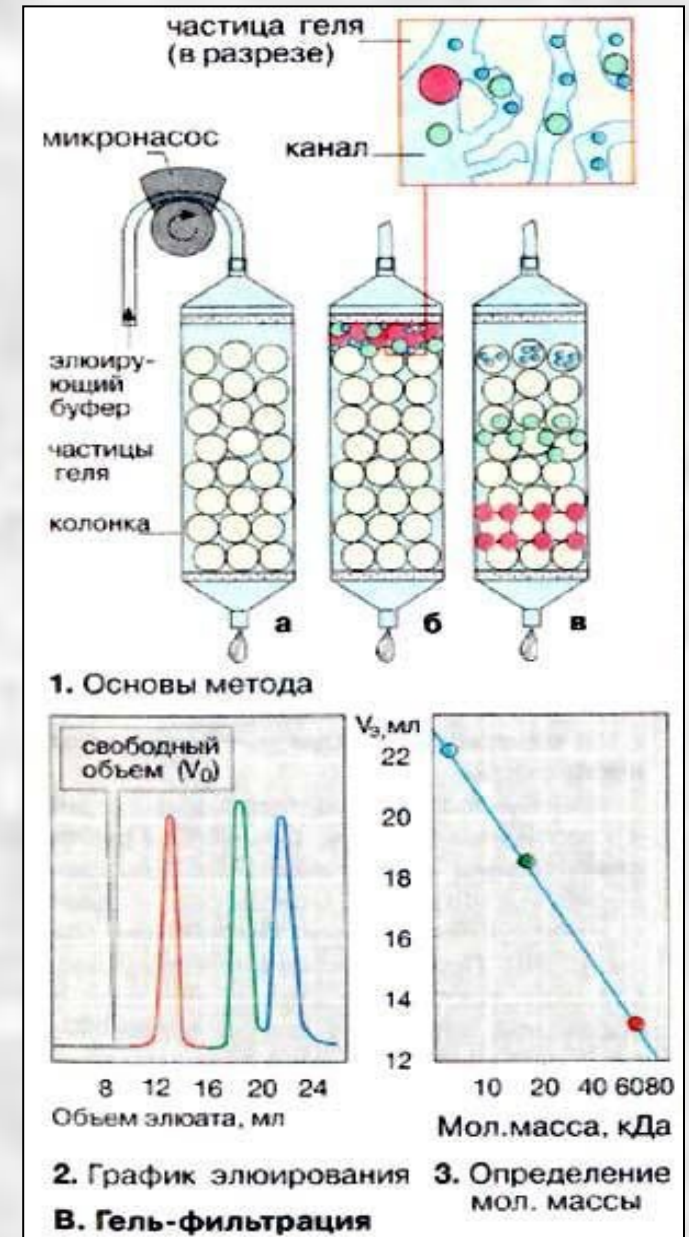
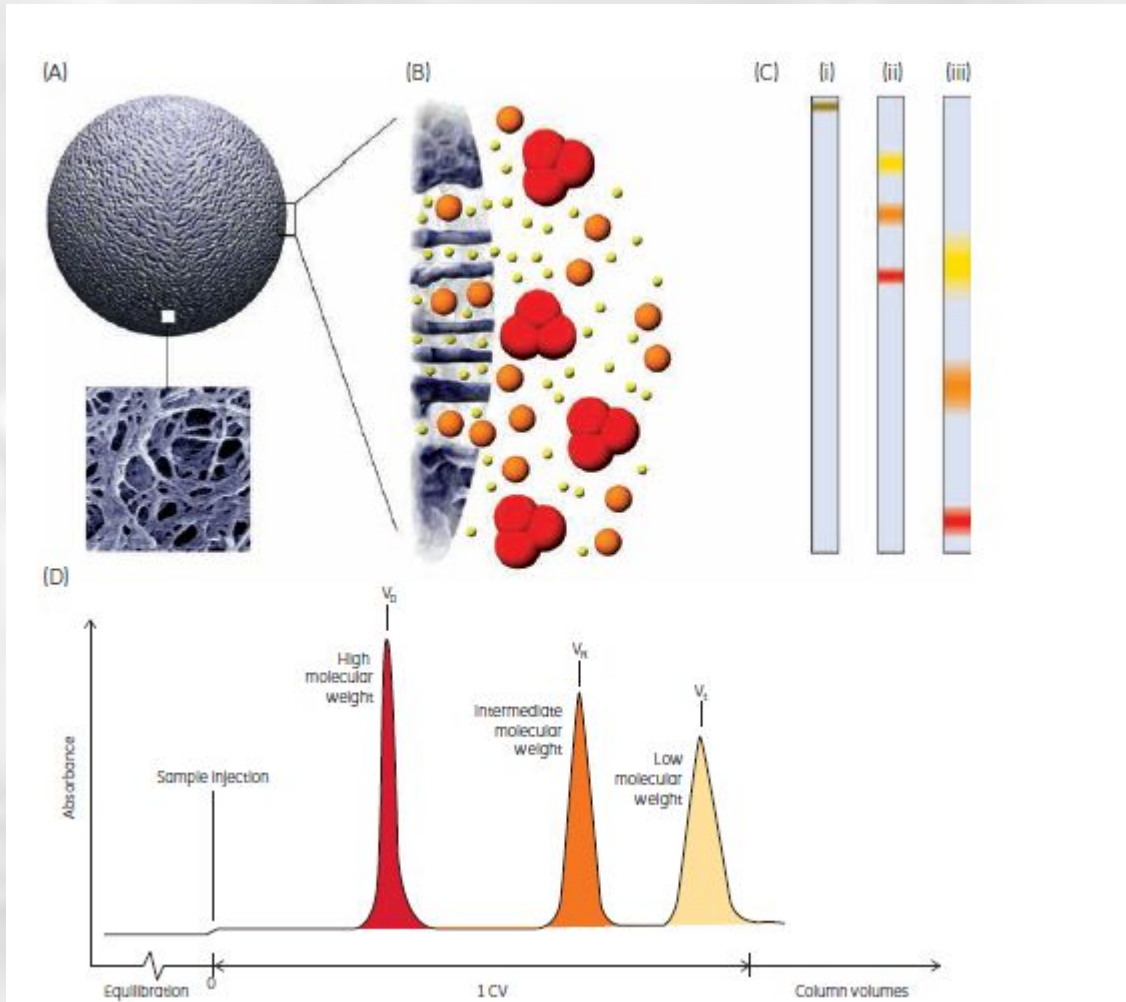
[www.gelifesciences.com/protein-purification](http://www.gelifesciences.com/protein-purification)



*ÄKTAprime plus*

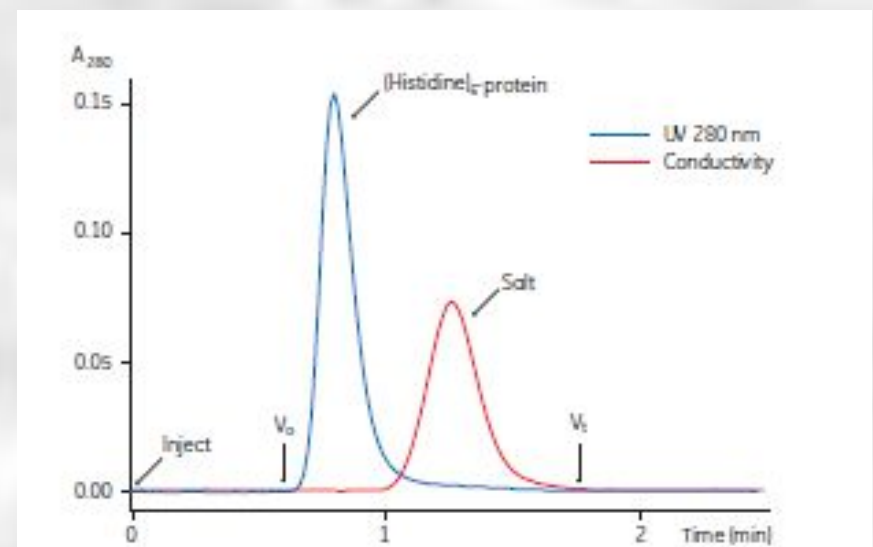
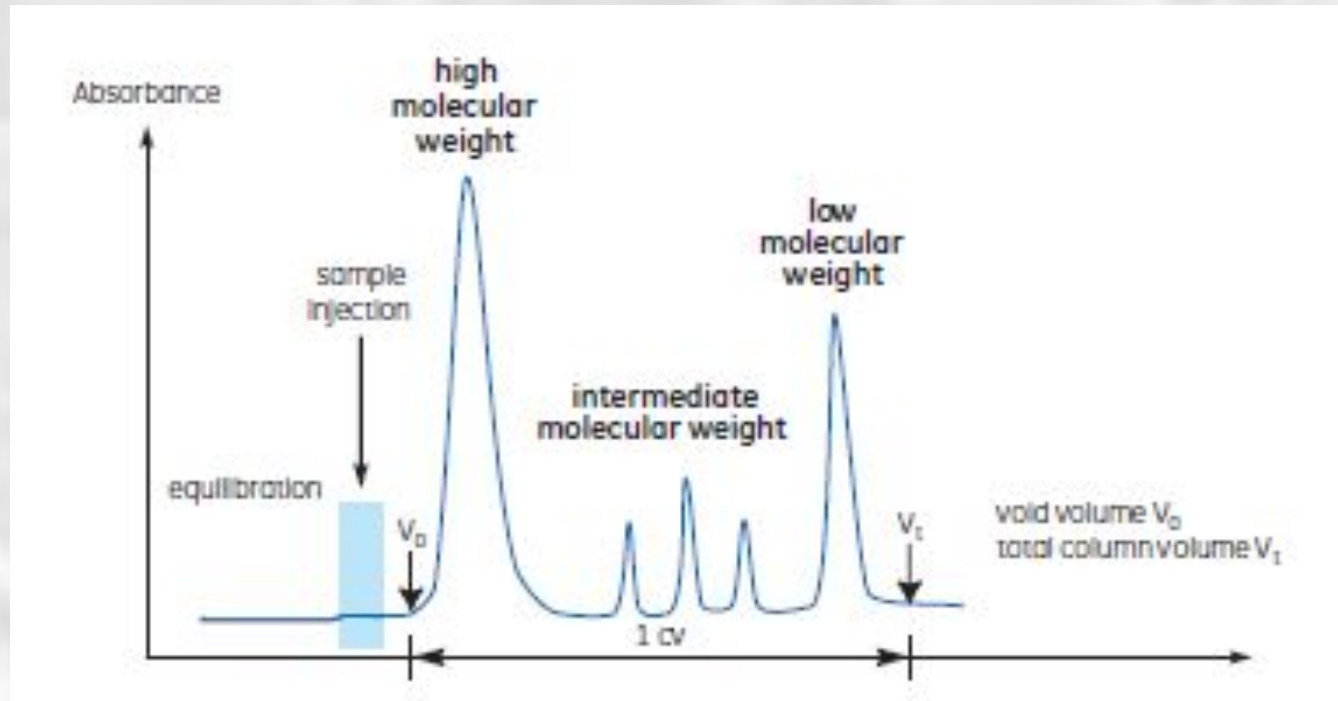
# Методы хроматографии

## Гель-фильтрация



# Методы хроматографии

# Гель-фильтрация





# Методы хроматографии

## Гель-фильтрация

Фирма и название геля	Код геля	Тип геля	Используемый интервал фракционирования для глобулярных молекул (мол. массы)
Bio-Rad Биогели	P-2*	Полиакриламид	100—1800
	P-4*	»	800—4000
	P-6*	»	1000—6000
	P-10*	»	1500—20 000
	P-30*	»	2500—40 000
	P-60	»	3000—60 000
	P-100	»	5000—100 000
	P-150	»	15 000—150 000
	P-200	»	30 000—200 000
	P-300	»	60 000—400 000
	A-0,5 m	Агароза	1000—0,5·10 <sup>6</sup>
	A-1,5 m	»	2000—1,5·10 <sup>6</sup>
	A-5,0 m	»	4000—5·10 <sup>6</sup>
A-15 m*	»	60 000—15·10 <sup>6</sup>	
A-50 m*	»	200 000—50·10 <sup>6</sup>	
A-150 m*	»	1·10 <sup>6</sup> —150·10 <sup>6</sup>	
LKB Ультрагели	AcA22	Агароза/полиакриламид	60 000—1·10 <sup>6</sup>
	AcA34	То же	20 000—400 000
	AcA44	» »	12 000—1 300 000
	AcA54	» »	6 000—70 000
LKB Агарозы	A2*	Агароза	120 000—20·10 <sup>6</sup>
	A4*	»	55 000—9·10 <sup>6</sup>
	A6*	»	25 000—2,4·10 <sup>6</sup>
Pharmacia Сефадексы	G-10*	Декстран	50—700
	G-15*	»	50—1500
	G-25*	»	1000—5000
	G-50	»	1500—30 000
	G-75	»	3000—70 000
	G-100	»	4000—150 000
	G-150	»	5000—300 000
	G-200	»	5000—600 000
Pharmacia Сефарозы	6B	Агароза	10 000—4·10 <sup>6</sup>
	4B	»	60 000—20·10 <sup>6</sup>
	2B*	»	70 000—40·10 <sup>6</sup>
	CL-6B	Поперечно-сшитая агароза	10 000—4·10 <sup>6</sup>
Pharmacia Сефакрилы	CL-4B	То же	60 000—20·10 <sup>6</sup>
	CL-2B*	» »	70 000—40·10 <sup>6</sup>
	S-200	Декстран/бисакриламид	5000—300 000
	S-300	То же	10 000—800 000
	S-400	» »	20 000—2·10 <sup>6</sup>
	S-500	» »	Мультиферментные комплексы с мол. массой >10 <sup>6</sup>
	S-1000*	» »	>10 <sup>6</sup>

*Гидрофильные гели* – это декстрановые гели или сефадексы. Они представляют собой полисахаридные цепи, сшитые эпихлоргидрином.

Тип сефадекса	Размеры частиц в сухом состоянии, мкм	Область применения (молярная масса · 10 <sup>-3</sup> )		Объем матрицы (сухой гель), мг · г <sup>-1</sup>	Время набухания, ч	
		пептиды и глобулярные белки	декстран		при 20°C	при 90°C
G-10	40-120	0.7	0.7	2 – 3	3	1
G-15	40-120	1.5	1.5	2.5 – 3.5	3	1
G-25 крупный	100-300	1 – 5	0.1 – 5	4 – 6	3	1
средний	50-100					
мелкий	20-80					
супермелкий	10-40					
G-50 крупный	100-300	1.5 – 30	0.5 – 10	9 – 11	3	1
средний	50-150					
мелкий	20-80					
супермелкий	10-40					
G-75	40-120	3 – 80	1 – 50	12 – 15	24	3
супермелкий	10-40	3 – 70				
G-100	40-120	4 – 150	1 – 100	15 – 20	72	5
супермелкий	10-40	4 – 100				
G-150	40-120	5 – 300	1 – 150	20 – 30	72	5
супермелкий	10-40	5 – 150		18 – 22		
G-200	40-120	5 – 600	1 – 200	30 – 40	72	5
супермелкий	10-40	5 – 250		20 – 25		



*Полиакриламидные гели*, как уже указывалось выше, при высокой концентрации сшивающего агента обладают высокой механической прочностью. Такие гели выпускаются под названием био-гель Р (Bio-Gel R).

Тип геля	Размер частиц в набухшем состоянии, мкм	Область применения (мольная масса · 10 <sup>-3</sup> ) для пептидов и глобулярных белков	Объем матрицы в сухом состоянии, мг · г <sup>-1</sup>
P-2	150-300 80-150 40-80, < 40 150-300	0.1-1.8	3.5
P-4	80-150 40-80, < 40 150-300	0.8-4	5
P-6	80-150 40-80, < 40 150-300	1-6	8
P-10	80-150 40-80, < 40 150-300	1.5-20	9
P-30	80-150, < 40 150-300	2.5-40	11
P-60	80-150, < 40 150-300	3-60	14
P-100	80-150, < 40 150-300	5-100	15
P-150	80-150, < 40 150-300	15-150	18
P-200	80-150, < 40 150-300	30-200	25
P-300	80-150, < 40	60-400	30

\* В сухом состоянии

*Агарозные гели* находят применение при разделении высокомолекулярных полимеров и в качестве матриц для сорбентов в аффинной хроматографии

Тип геля	Концентрация агарозы, %	Размеры частиц в набухшем состоянии, мкм	Область применения (молекулярная масса) для глобулярных белков
Сефароза 2В	2	60-200	$7 \cdot 10^4 - 4 \cdot 10^7$
Сефароза 4В	4	60-140	$6 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^7$
Сефароза 6В	6	45-165	$10^4 - 10 \cdot 10^6$
Био-гель А-150m*	1	150-300 80-150	$10^6 - 1.5 \cdot 10^8$
Био-гель А-50m	2	150-300 150-300	$10^5 - 5 \cdot 10^7$
Био-гель А-15m	4	80-150 40-80 150-300	$4 \cdot 10^4 - 15 \cdot 10^6$
Био-гель А-5m	6	80-150 40-80 150-300	$10^4 - 5 \cdot 10^6$
Био-гель А-1.5m	8	80-150 40-80 150-300	$10^4 - 1.5 \cdot 10^6$
Био-гель А-0.5m	10	80-150 40-80	$10^4 - 5 \cdot 10^5$

\* У био-гелей А пределы эксклюзии (исключения) отражены в маркировке, например био-гель А-5m имеет предел эксклюзии  $5000000 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$ .



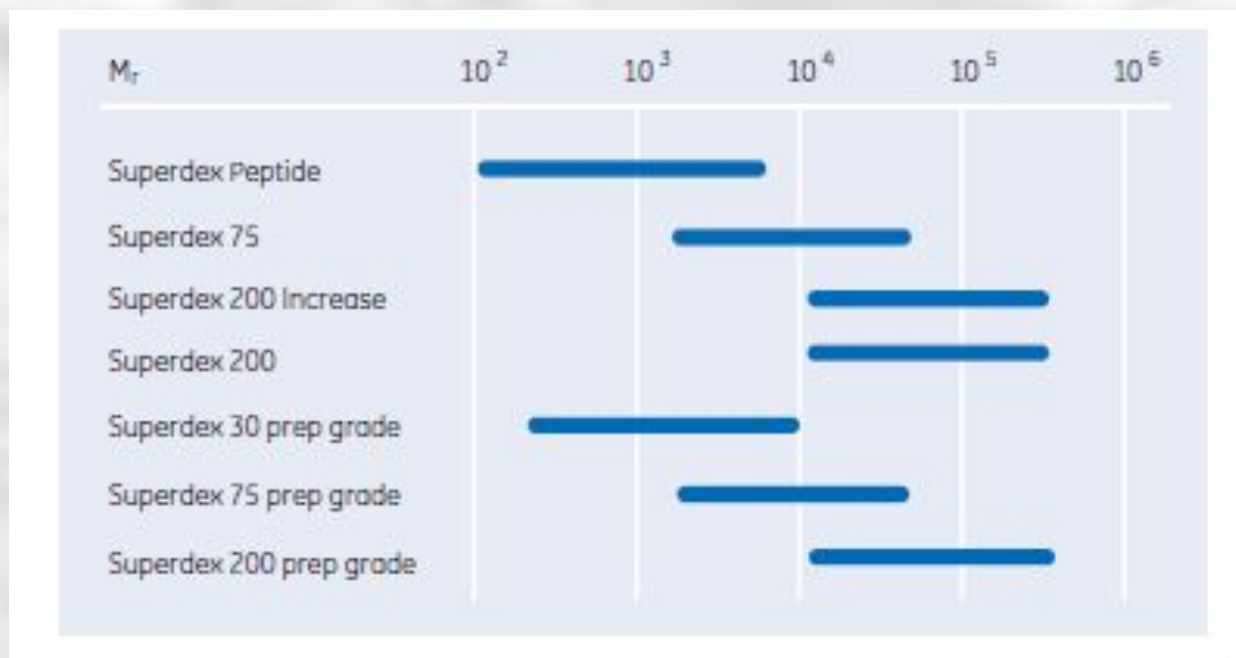
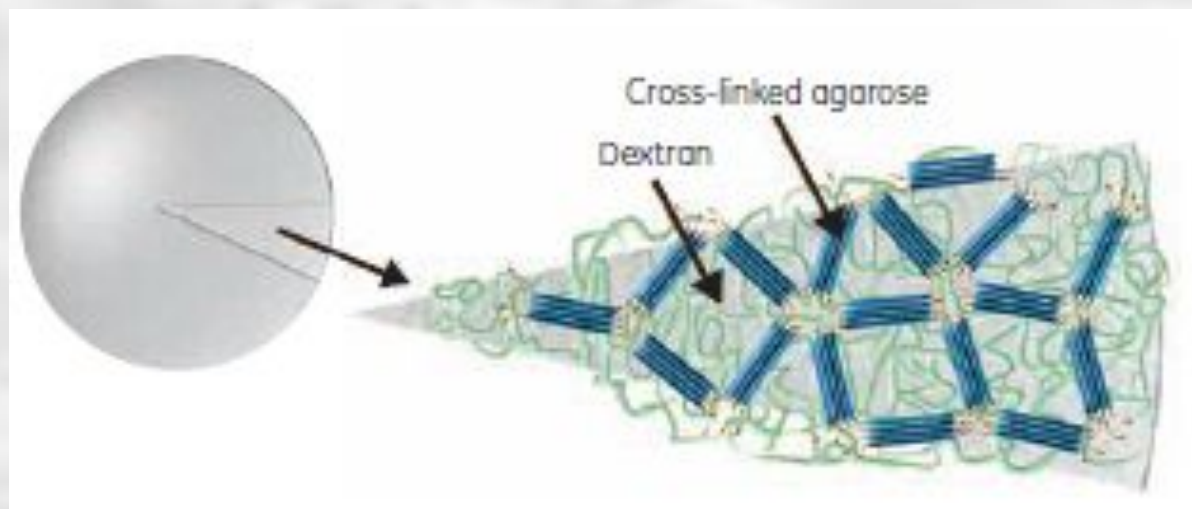
*Сефакрил* – сополимер декстрана, несущего аллильные группы, и  $N,N'$ -метилен-бис-акриламида. Гранулы геля обладают высокой механической прочностью, химически устойчивы (стабильны в области рН 3–11, выдерживают стерилизацию в автоклаве при рН=7 и температуре до 120 °С); вследствие жесткой структуры устойчивы к действию органических растворителей. При переходе от воды к полярным органическим растворителям объем геля изменяется незначительно. Маркировка и области применения сефакрила приведены в таблице 10.

Тип сефакрила	Область фракционирования, тыс. Дальтон	
	для глобулярных белков	для декстранов
S-200	5—250	1—80
S-300	10—1500	1—750
S-400	20—8000	10—2 000
S-500	—	40—20 000
S-1000	—	500—100 000

# Методы хроматографии

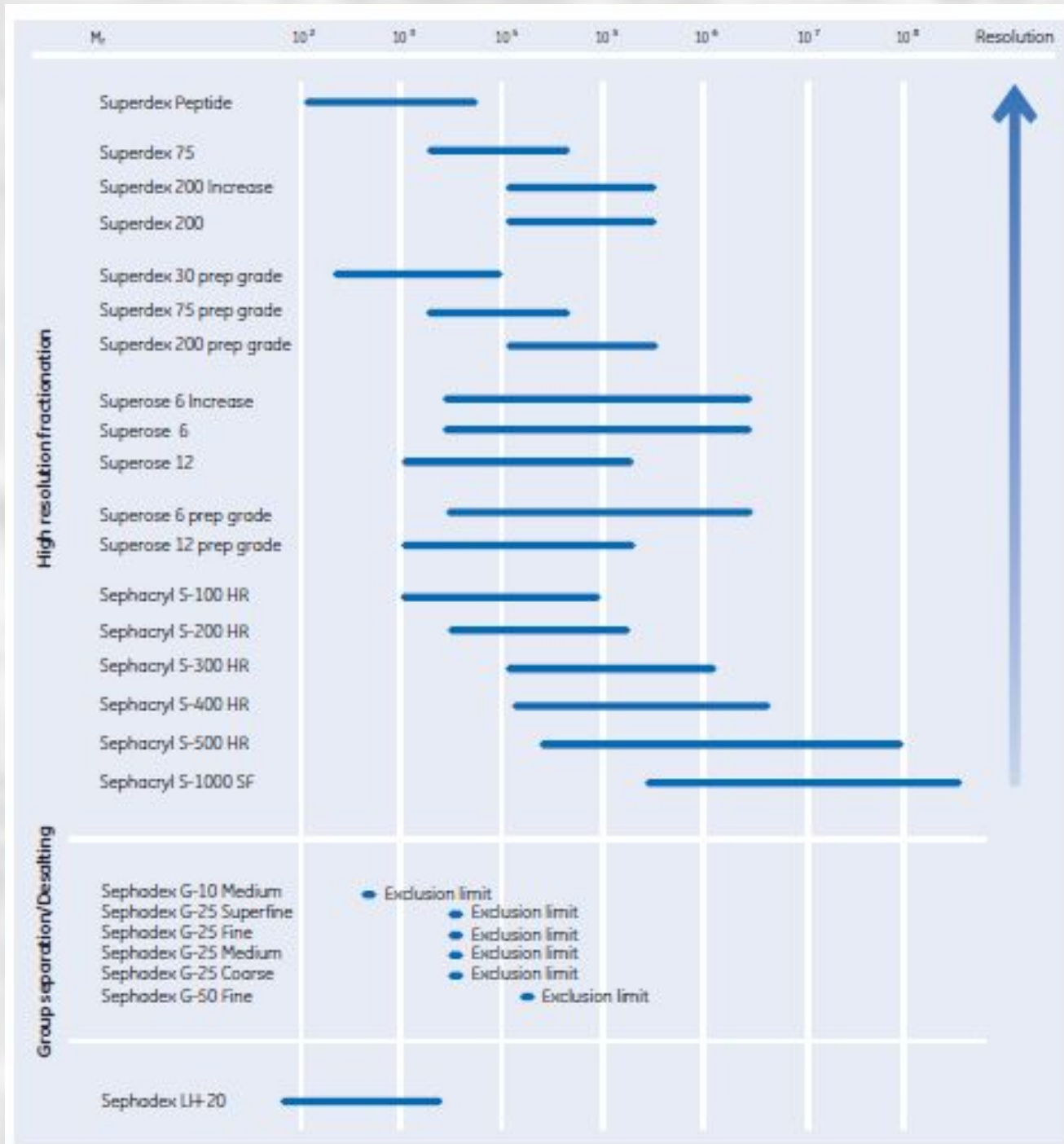
## Гель-фильтрация

Superdex



# Методы хроматографии

# Гель-фильтрация





# Методы хроматографии

## Гель-фильтрация

$$K_{av} = \frac{V_R - V_0}{V_t - V_0} \cdot$$

коэффициент  
доступности

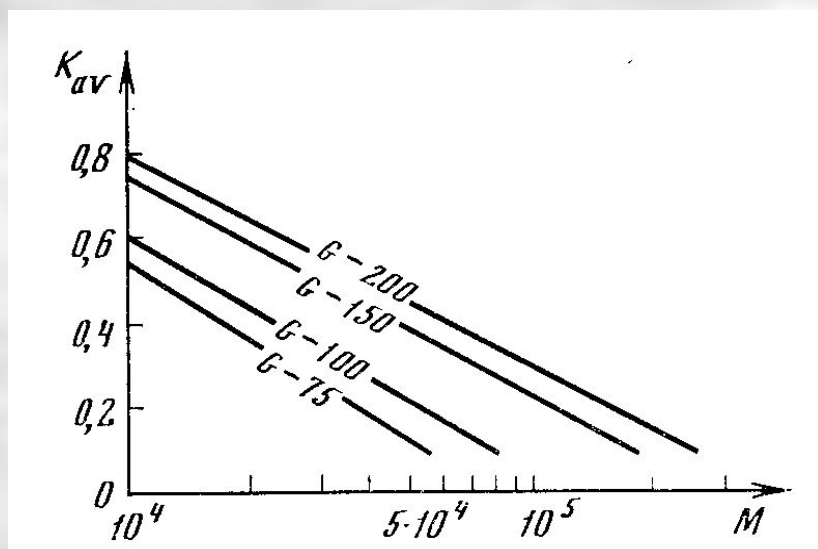
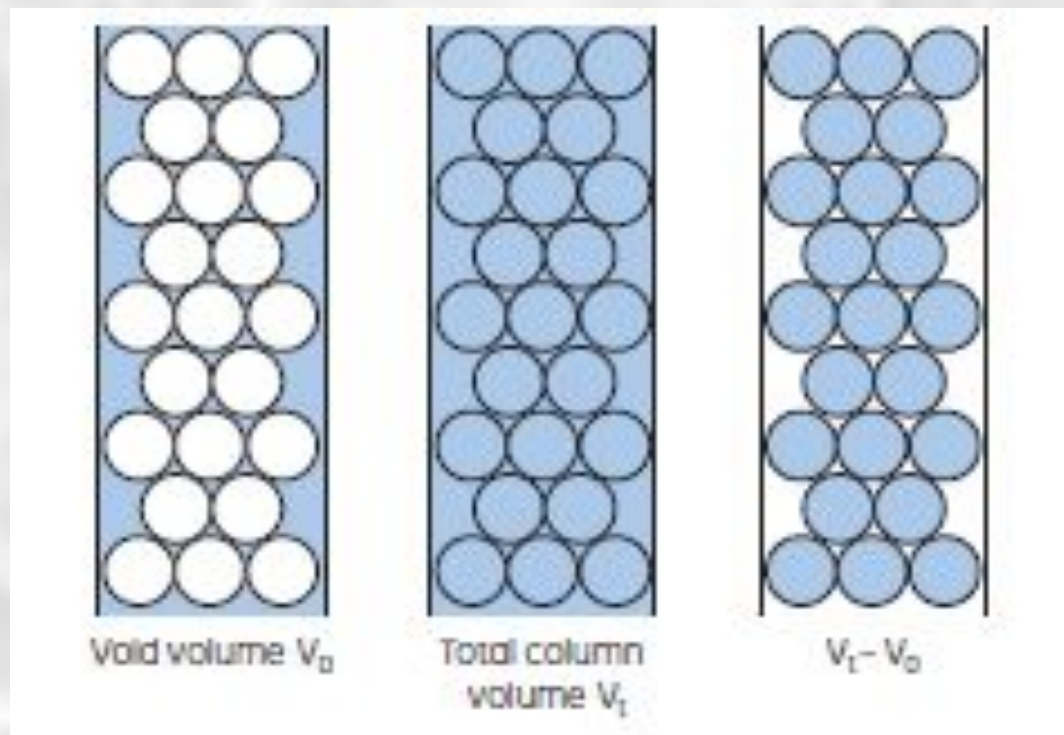
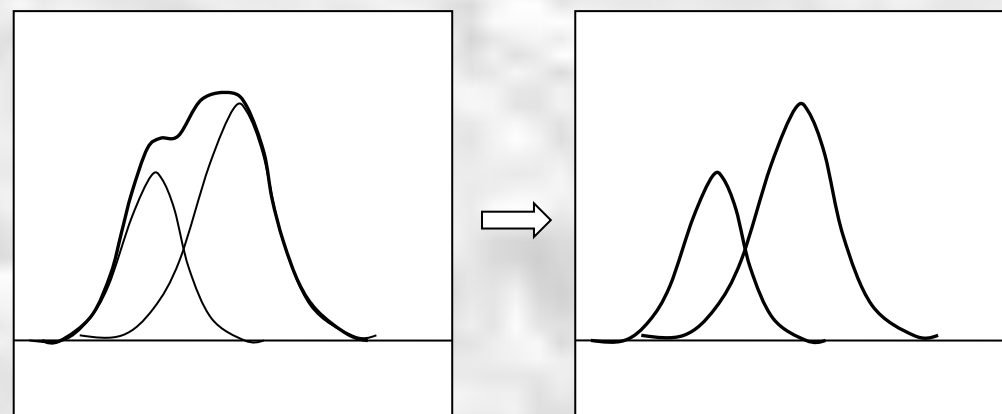


график  
селективности



Математическая  
обработка  
хроматограммы

# Методы хроматографии

## Распределительная хроматография

### Нормально-фазовая хроматография

неподвижная фаза – водный раствор,  
подвижная фаза – органич. растворители

Движение веществ:

более гидрофильное



менее гидрофильное

### Обращенно-фазовая хроматография

неподвижная фаза – органич. растворители  
подвижная фаза – водный раствор

Движение веществ:

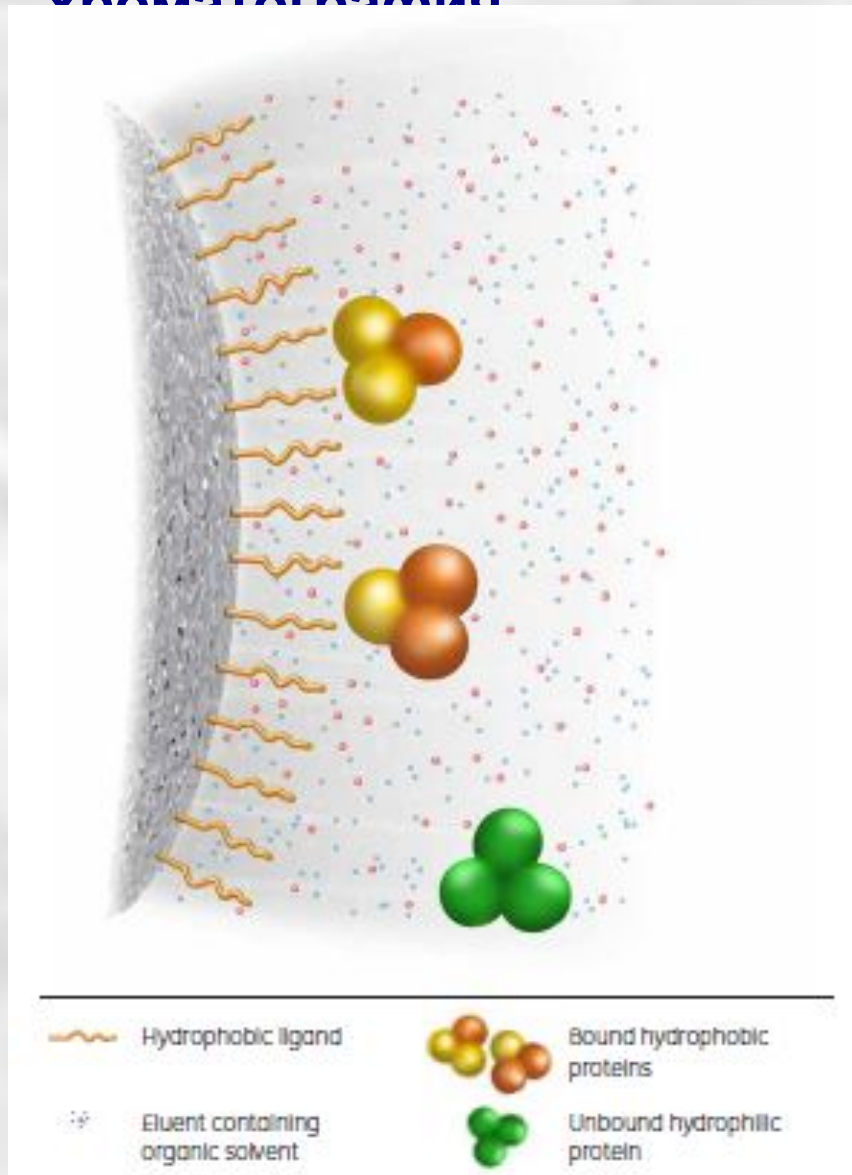
менее гидрофильное



более гидрофильное

# Методы хроматографии

## Распределительная хроматография



### Обращенно-фазовая хроматография

неподвижная фаза – органич. растворители  
подвижная фаза – водный раствор

Движение веществ:

менее гидрофильное

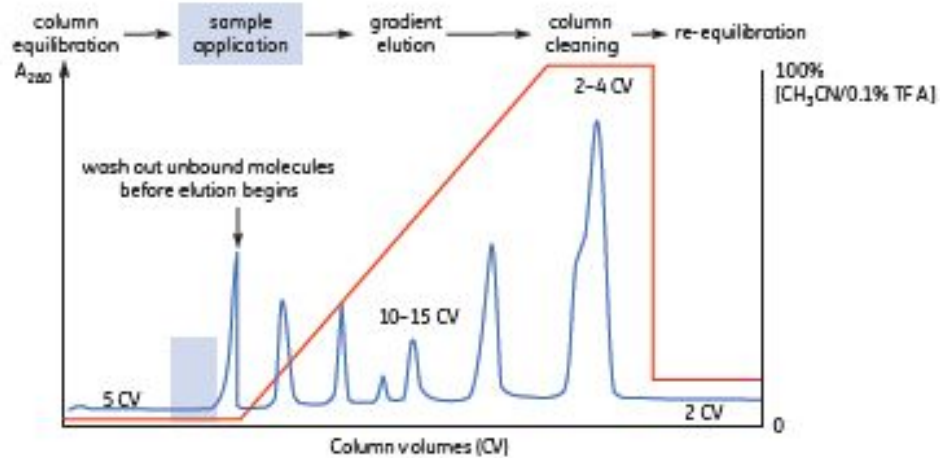


более гидрофильное



# Методы хроматографии

## Распределительная хроматография



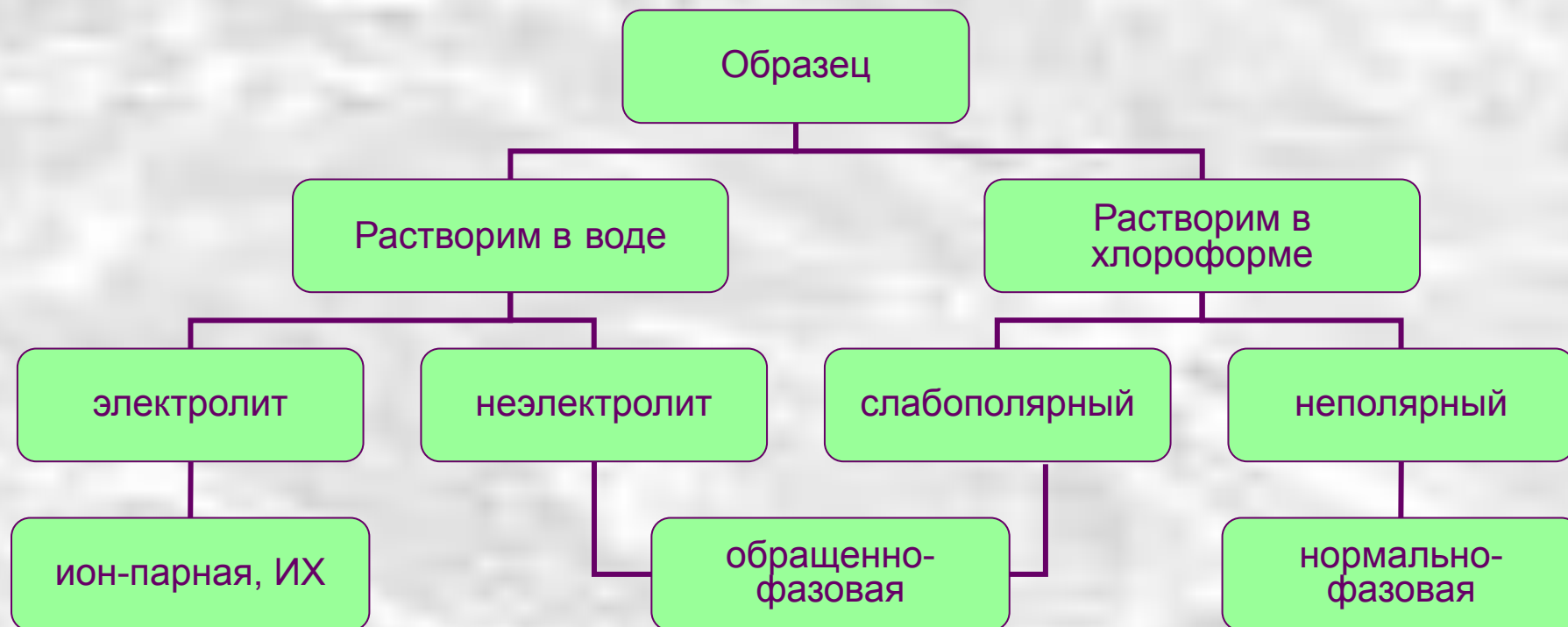
## Обращенно-фазовая хроматография

неподвижная фаза – органич. растворители  
подвижная фаза – водный раствор

Движение веществ:  
менее гидрофильное

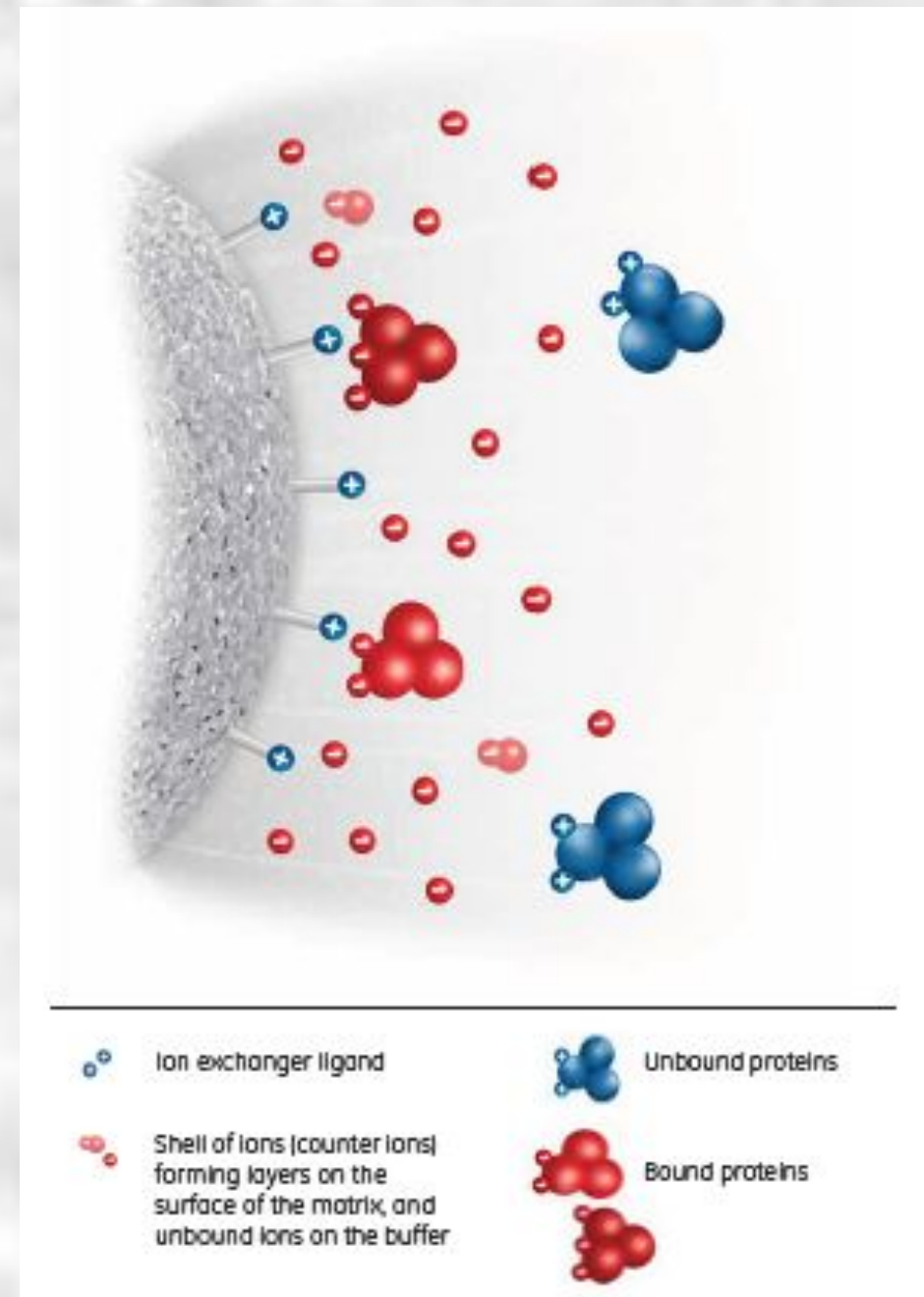
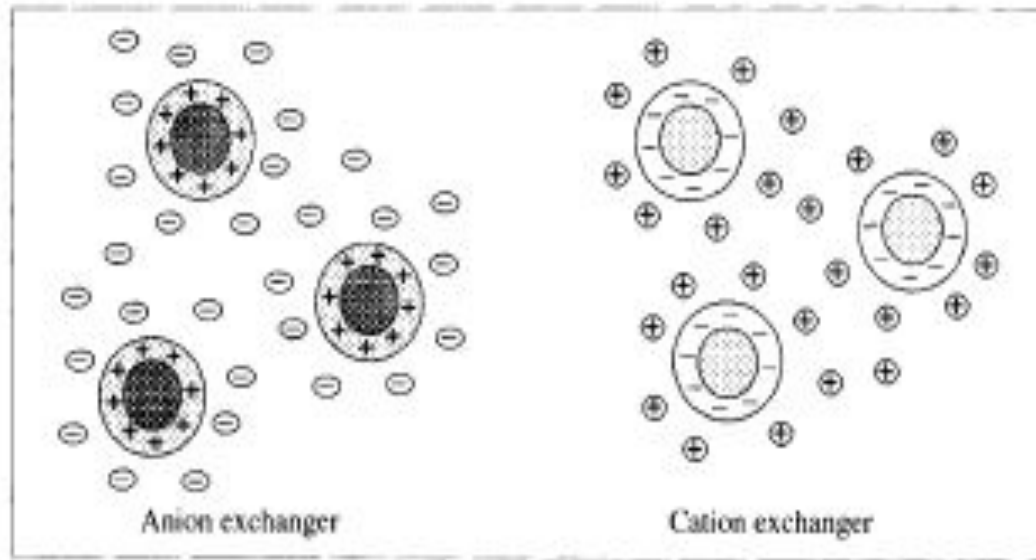
↓  
более гидрофильное

# Методы хроматографии



# Методы хроматографии

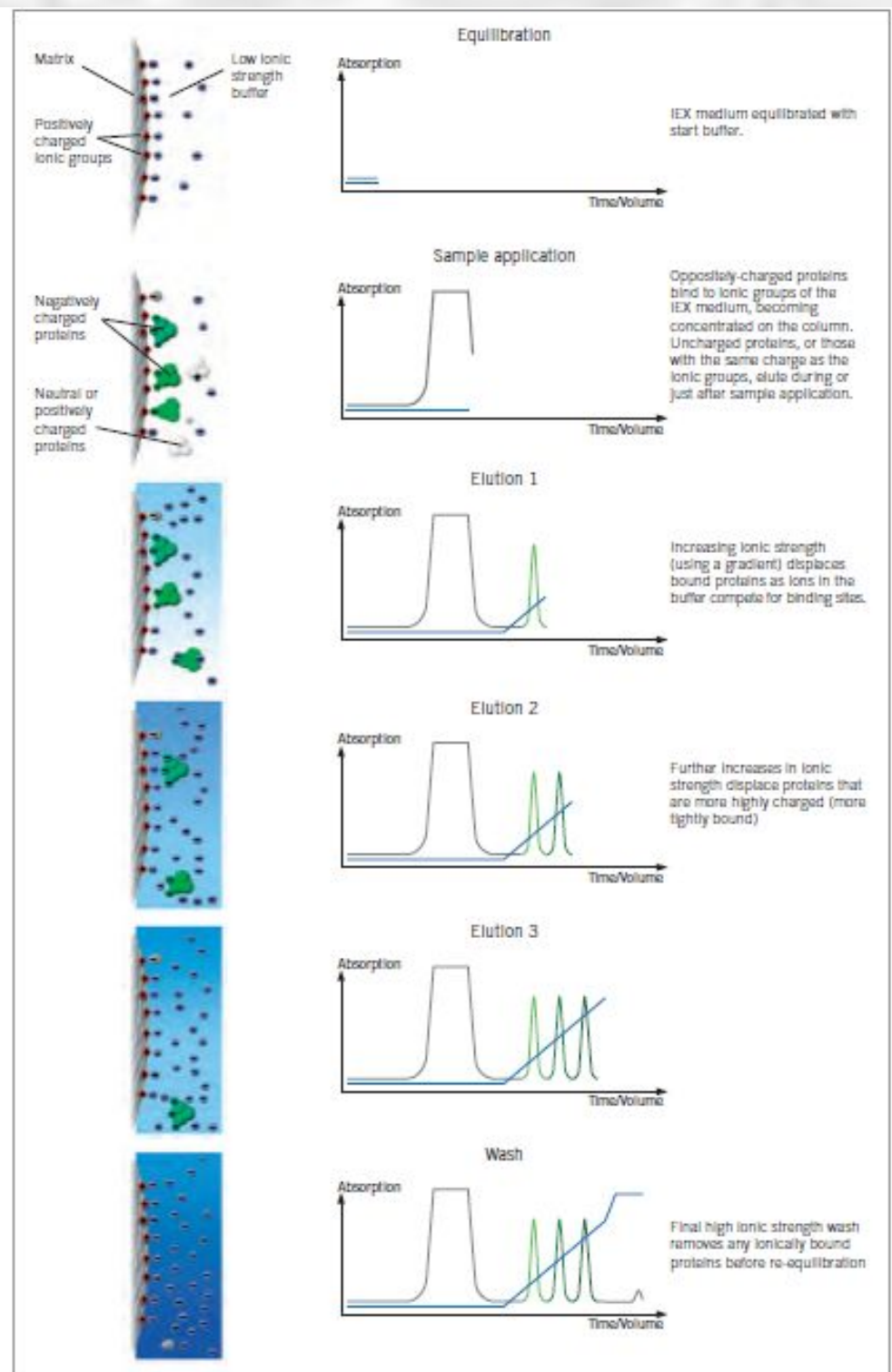
## Ионообменная хроматография





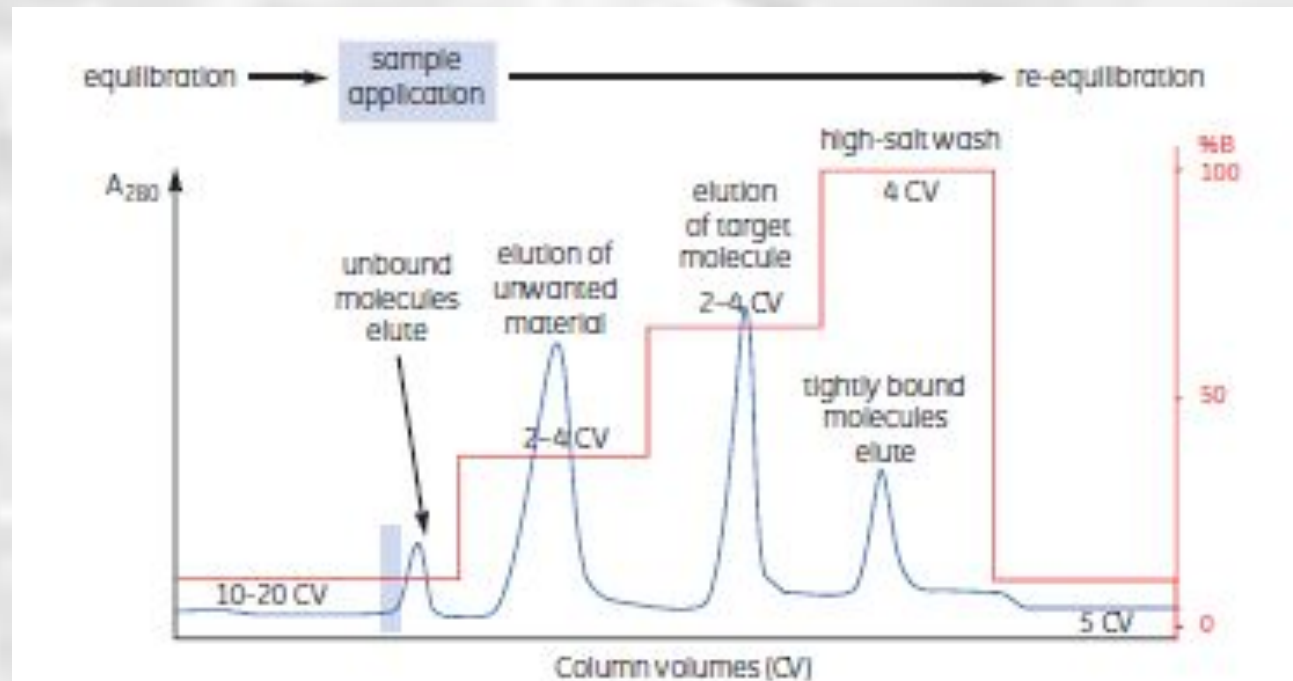
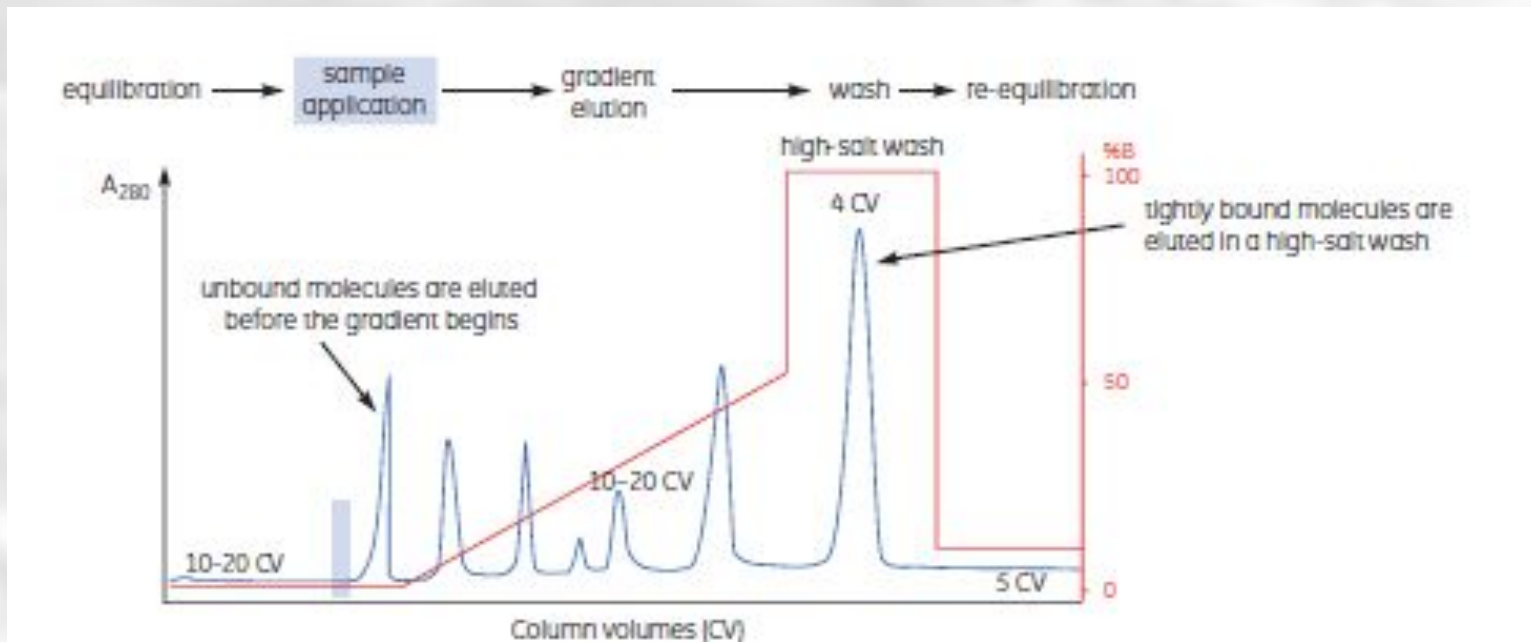
# Методы хроматографии

## Ионообменная хроматография



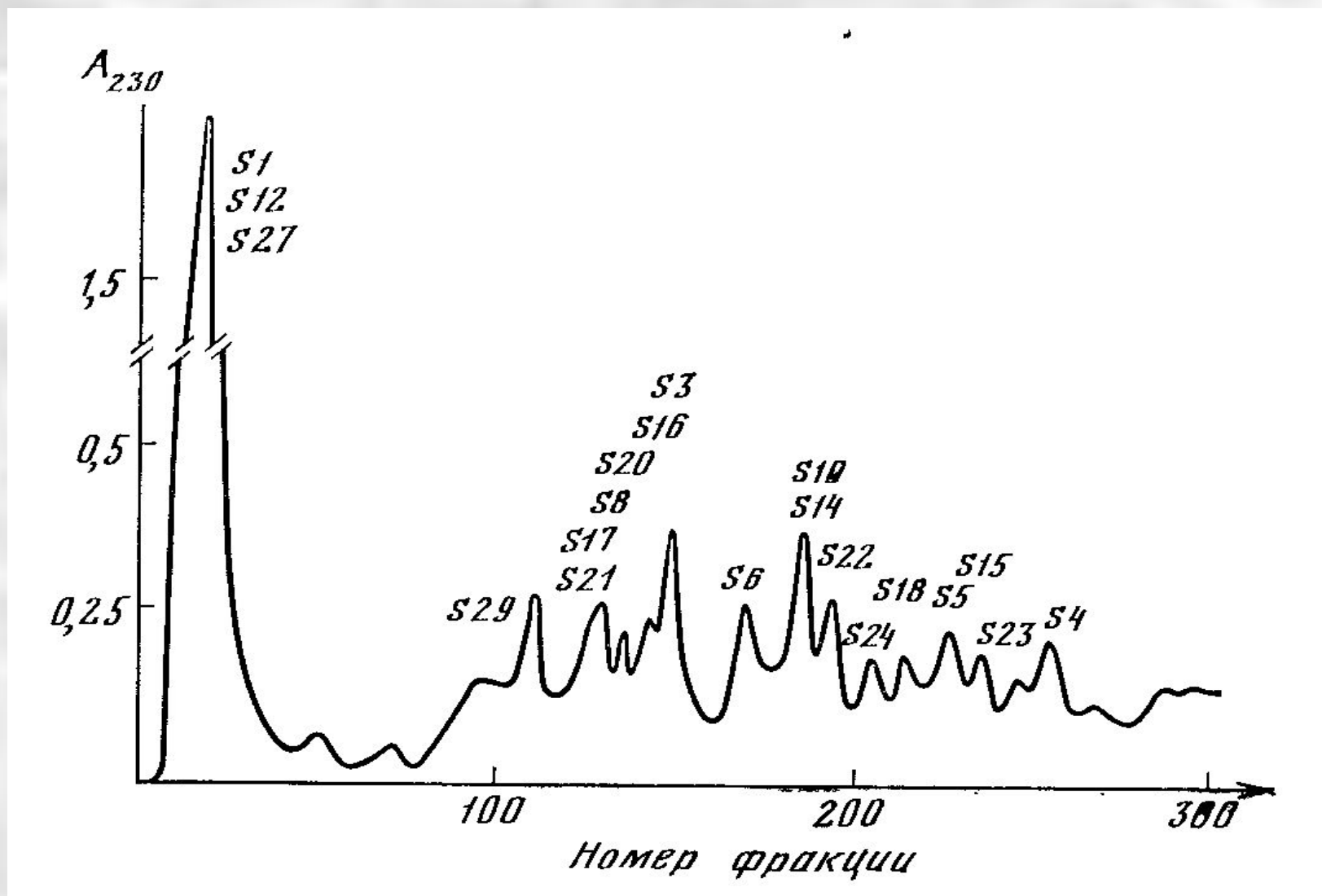
# Методы хроматографии

# Ионообменная хроматография



# Методы хроматографии

## Ионообменная хроматография





# Методы хроматографии

## Ионообменная хроматография

Формула	Название	Обозначение
<i>Сильные катиониты</i>		
$-\text{SO}_3^-$	Сульфо-	S-
$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Сульфометил-	SM- ●
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{SO}_3^-$	Сульфоэтил-	SE-
$-\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$	Сульфопропил-	SP-
$-\text{PO}_3^- \text{H}$	Фосфо-	P-
<i>Слабые катиониты</i>		
$-\text{COO}^-$	Карбокси-	C-
$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	Карбоксиметил-	CM-
<i>Сильные аниониты</i>		
$-\text{CH}_2\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$	Триметиламинометил-	TAM- ●
$-\text{C}_2\text{H}_4\overset{+}{\text{N}}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	Триэтиламиноэтил-	TEAE-
$-\text{C}_2\text{H}_4\overset{+}{\text{N}}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	Диэтил-2-оксипропил- аминоэтил-	QAE-
<i>Слабые аниониты</i>		
$-\text{C}_2\text{H}_4\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	Аминоэтил-	AE-
$-\text{C}_2\text{H}_4\overset{+}{\text{N}}\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Диэтиламиноэтил-	DEAE-
$-(\text{C}_2\text{H}_4\overset{+}{\text{N}}\text{H}_2)_n\text{C}_2\text{H}_4\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	Полиэтиленимин-	PEI-
$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	Парааминобензил-	PAB-

# Методы хроматографии

## Ионообменная хроматография

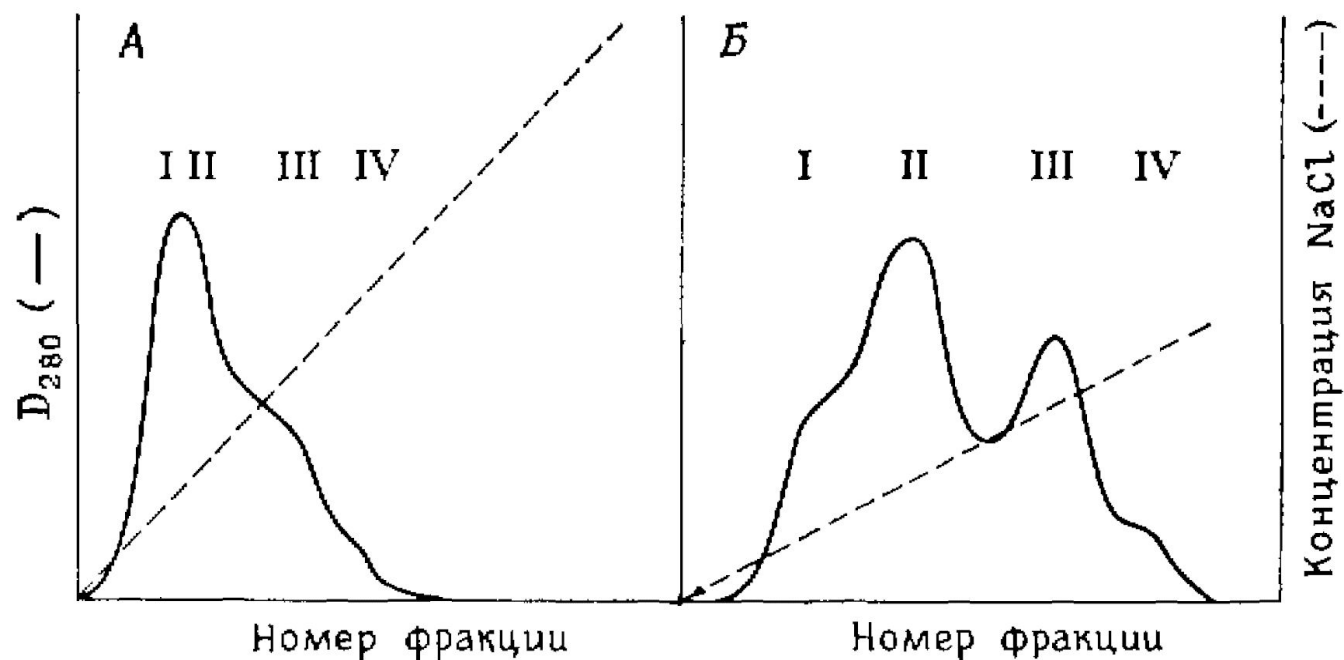


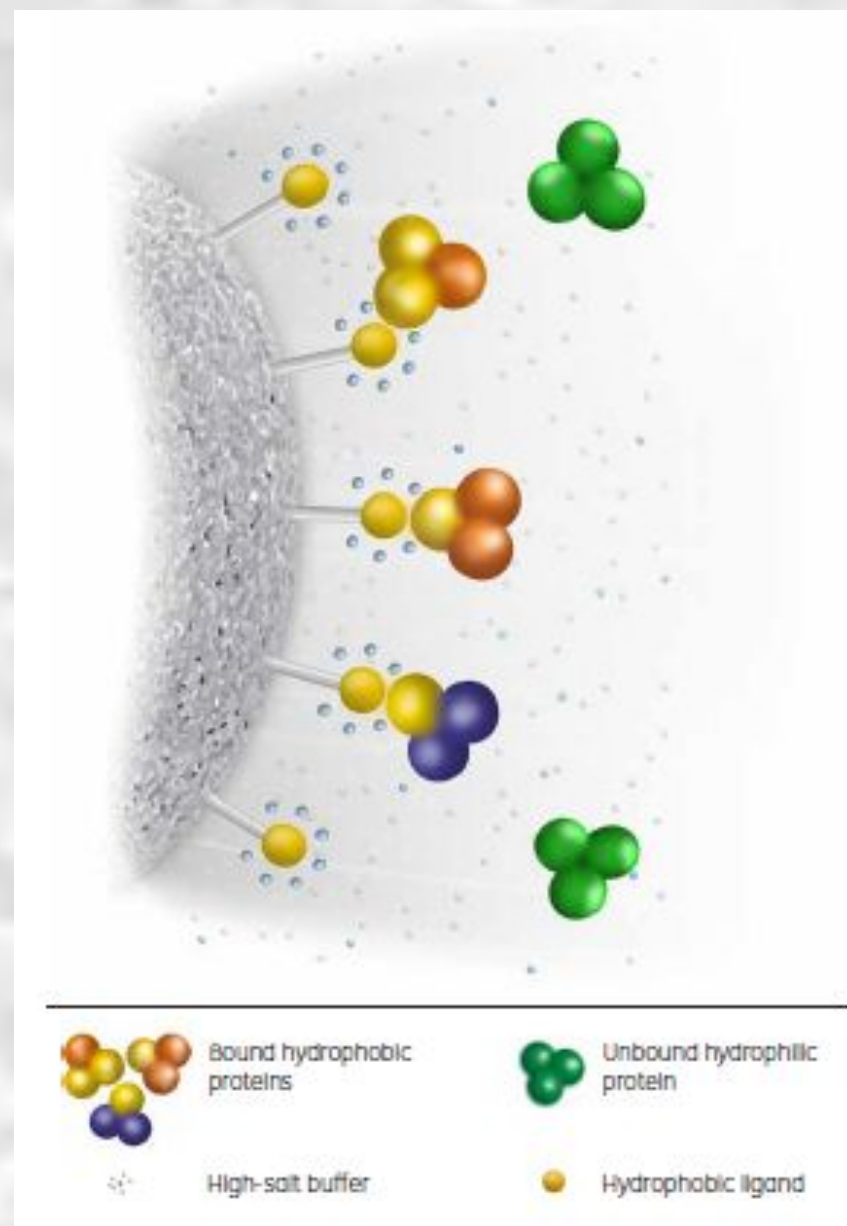
РИС. 8-23.

Разделение четырех белков при помощи ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе.

Обратите внимание на сильную зависимость от вида градиента NaCl. На графике А более крутой градиент позволяет достигнуть только частичного разделения на две фракции. При более пологом градиенте на графике Б белки II и III явно разделяются, а присутствие белков I и IV становится очевидным.

# Методы хроматографии

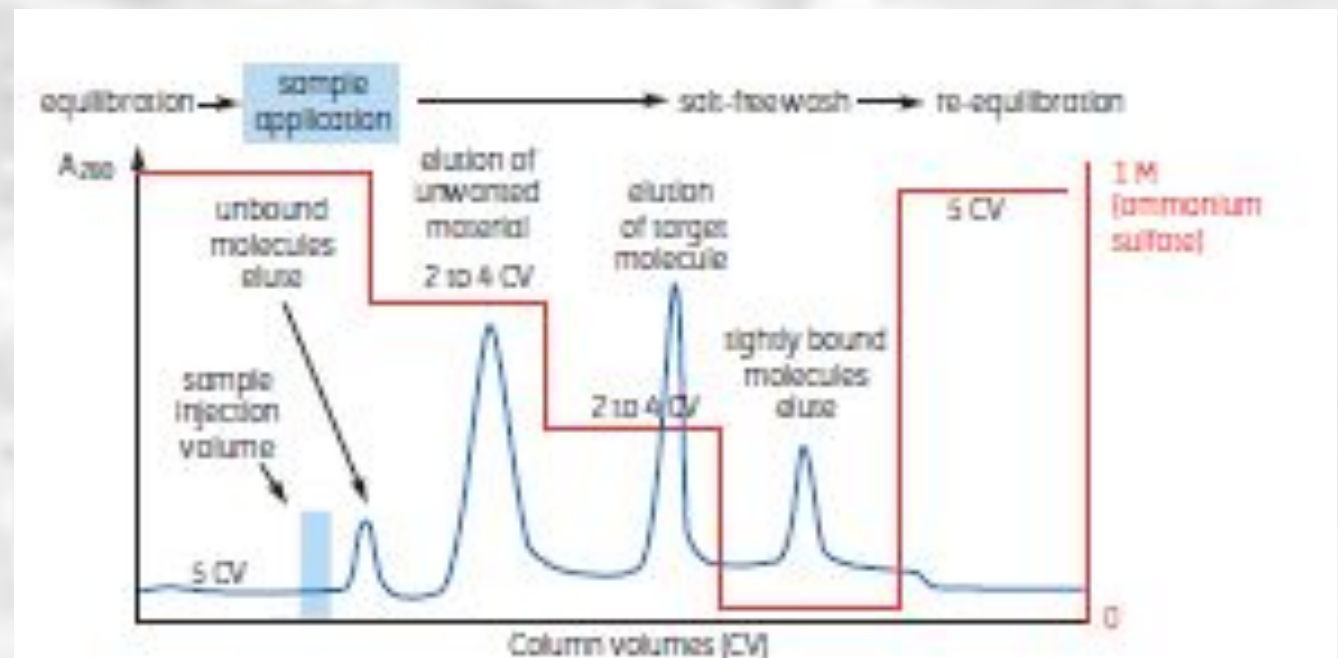
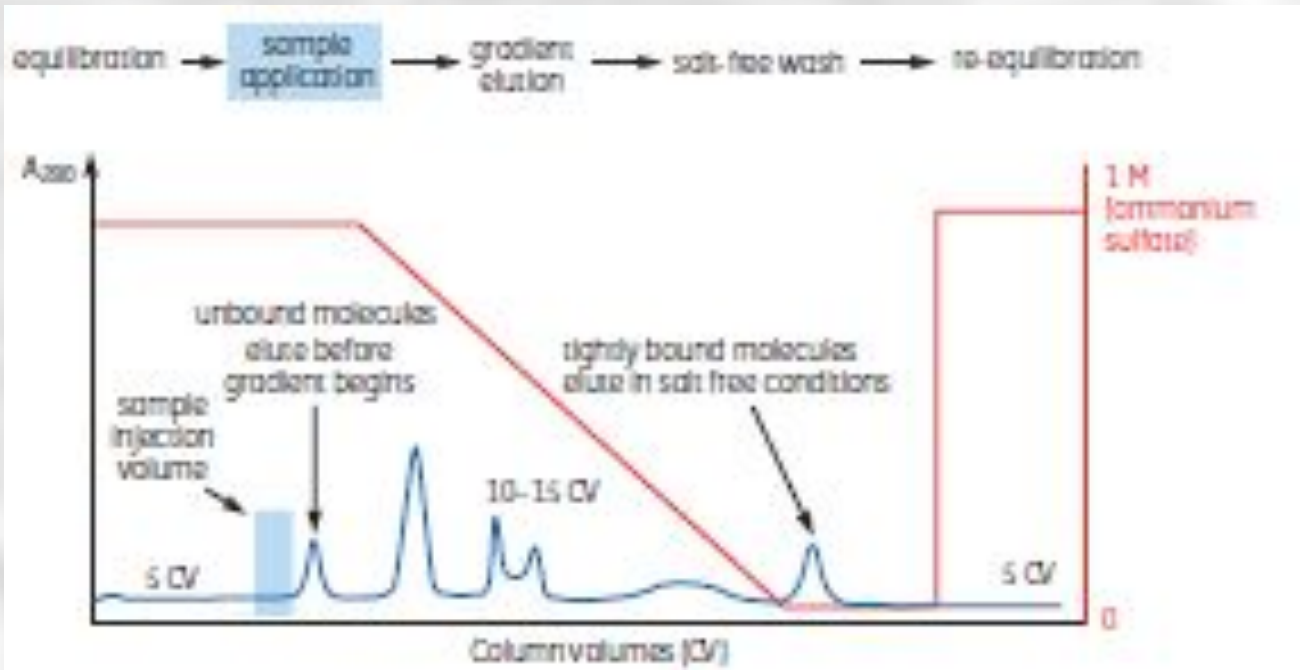
## Гидрофобная хроматография





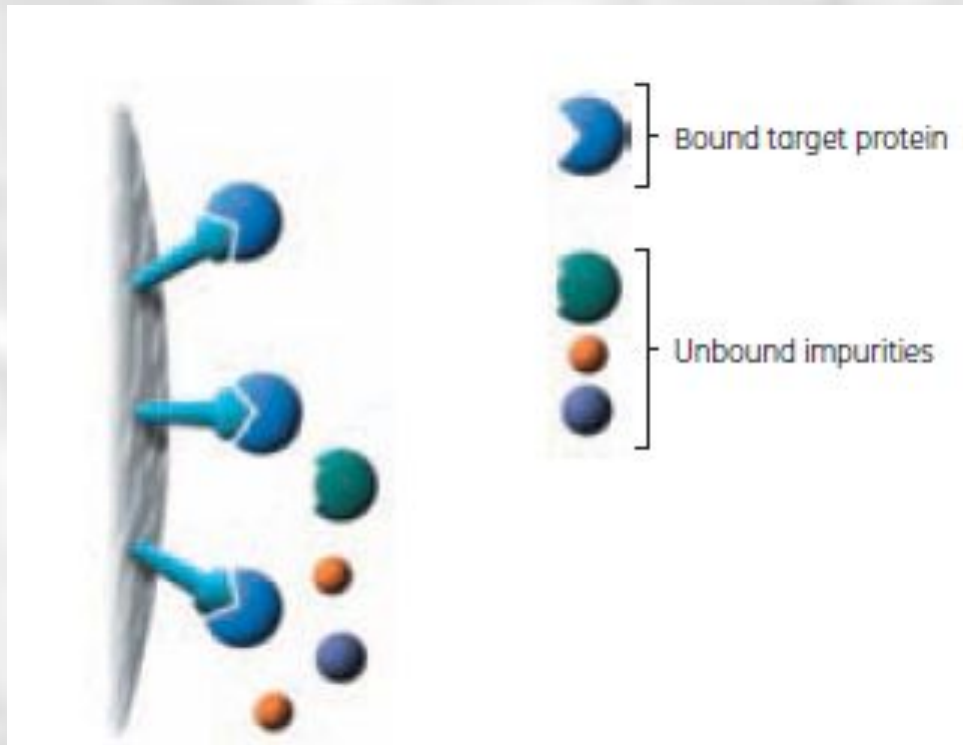
# Методы хроматографии

# Гидрофобная хроматография



# Методы хроматографии

## Аффинная хроматография



**Биоспецифическое комплементарное взаимодействие**

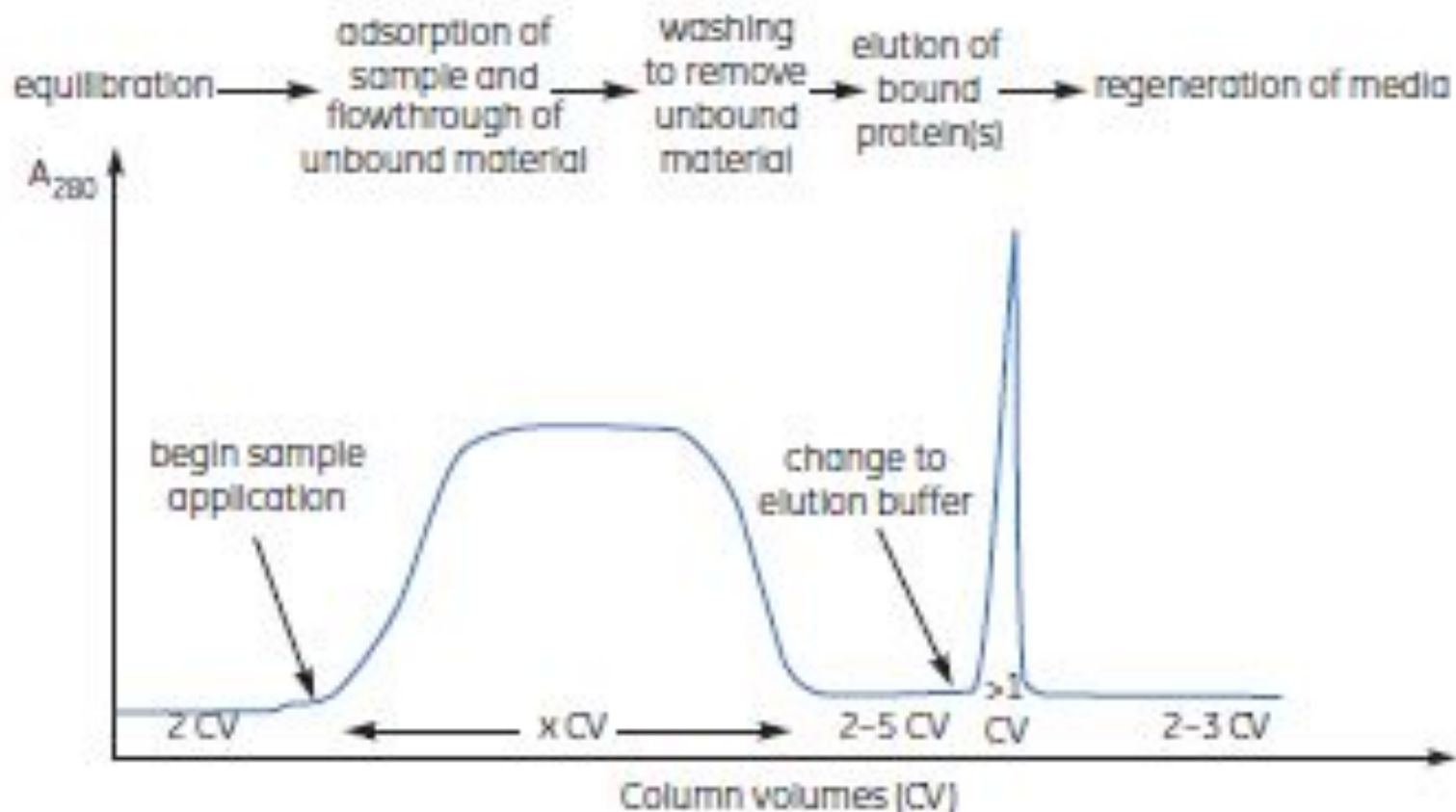
фермент – субстрат  
фермент – ингибитор  
фермент – кофактор

рецептор – гормон  
антитело – антиген

одноцеп. ДНК – компл. одноцеп. ДНК  
одноцеп. ДНК – мРНК

# Методы хроматографии

## Аффинная хроматография





# Методы хроматографии

## Аффинная хроматография

В качестве сорбентов для аффинной хроматографии применяются гели на основе агарозы: сефароза 4В, сефароза CL, аффи-гель.

Внутренняя поверхность гранул геля *сефарозы 4В*, благодаря крупным порам, доступна как для молекул лигандов, так и для молекул целевых веществ. Матрица имеет незначительную неспецифическую сорбцию. Частицы сефарозы мало сжимаемы, вследствие чего обеспечиваются хорошие гидродинамические свойства колонки.

*Сефароза CL* представляет собой ковалентно сшитые молекулы агарозы, устойчивые в органических растворителях (что существенно, например, при последующей иммобилизации лиганда). Сорбент устойчив при повышенной температуре и в присутствии денатурирующих агентов (мочевина, гуанидин-гидрохлорид). По сравнению с сефарозой 4В сшитая агароза обладает меньшей емкостью.

*Аффи-гель* – агарозный и полиакриламидный гель, модифицированный разнообразными функциональными группами. По сравнению с агарозными гелями сорбенты на основе полиакриламида имеют следующие преимущества: крайне незначительную неспецифическую сорбцию; биологическую инертность (устойчивы к действию ферментов); повышенную термическую и химическую устойчивость.

# Методы хроматографии

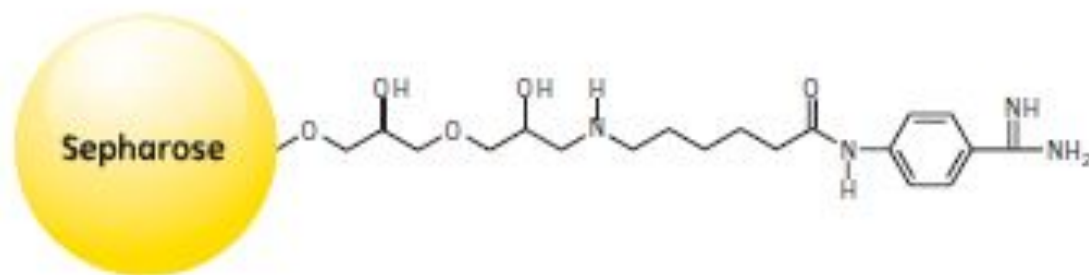
## Аффинная хроматография

Ligand	Specificity
Protein A or Protein G	Fc region of IgG
Concanavalin A	Gluconpyranosyl and mannapyranosyl groups
Cibacron™ Blue	Broad range of enzymes, serum albumin
Lysine	Plasminogen, ribosomal RNA
Benzamidine	Serine proteases
Calmodulin	Proteins regulated by calmodulin
Heparin	Coagulation factors, lipoproteins, lipases, nucleic acid-binding enzymes
Metal ions (e.g., Ni <sup>2+</sup> )	Protein and peptides containing histidine



# Методы хроматографии

## Аффинная хроматография



### Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow

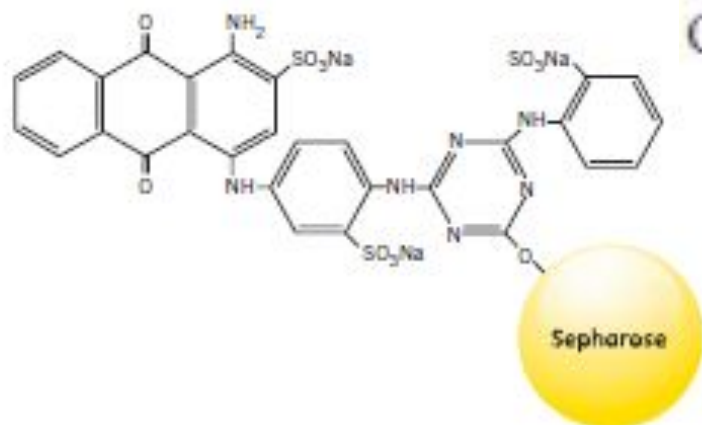
## serine proteases

	Source	M <sub>r</sub>	pI
Thrombin	Bovine pancreas	23 345	10.5
Trypsin	Human plasma chain A	5 700	7.1
	Human plasma chain B	31 000	
Urokinase	Human urine	54 000	8.9
Enterokinase	Porcine intestine heavy chain	134 000	4.2
	Porcine intestine light chain	62 000	
Plasminogen	Human plasma	90 000	6.4–8.5
Prekallikrein	Human plasma	nd	nd
Kallikrein	Human plasma	86 000	nd (plasma)
	Human saliva	nd	4.0 (saliva)



# Методы хроматографии

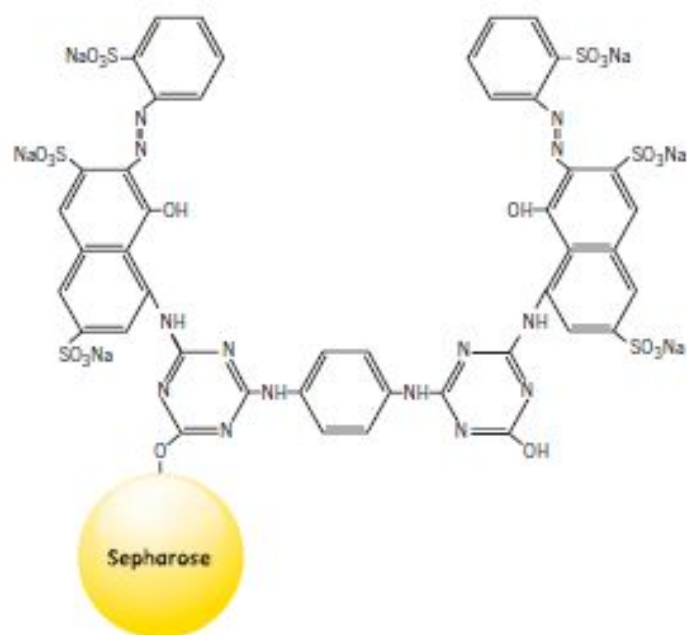
## Аффинная хроматография



Cibacron™ Blue F3G-A

**Blue Sepharose**

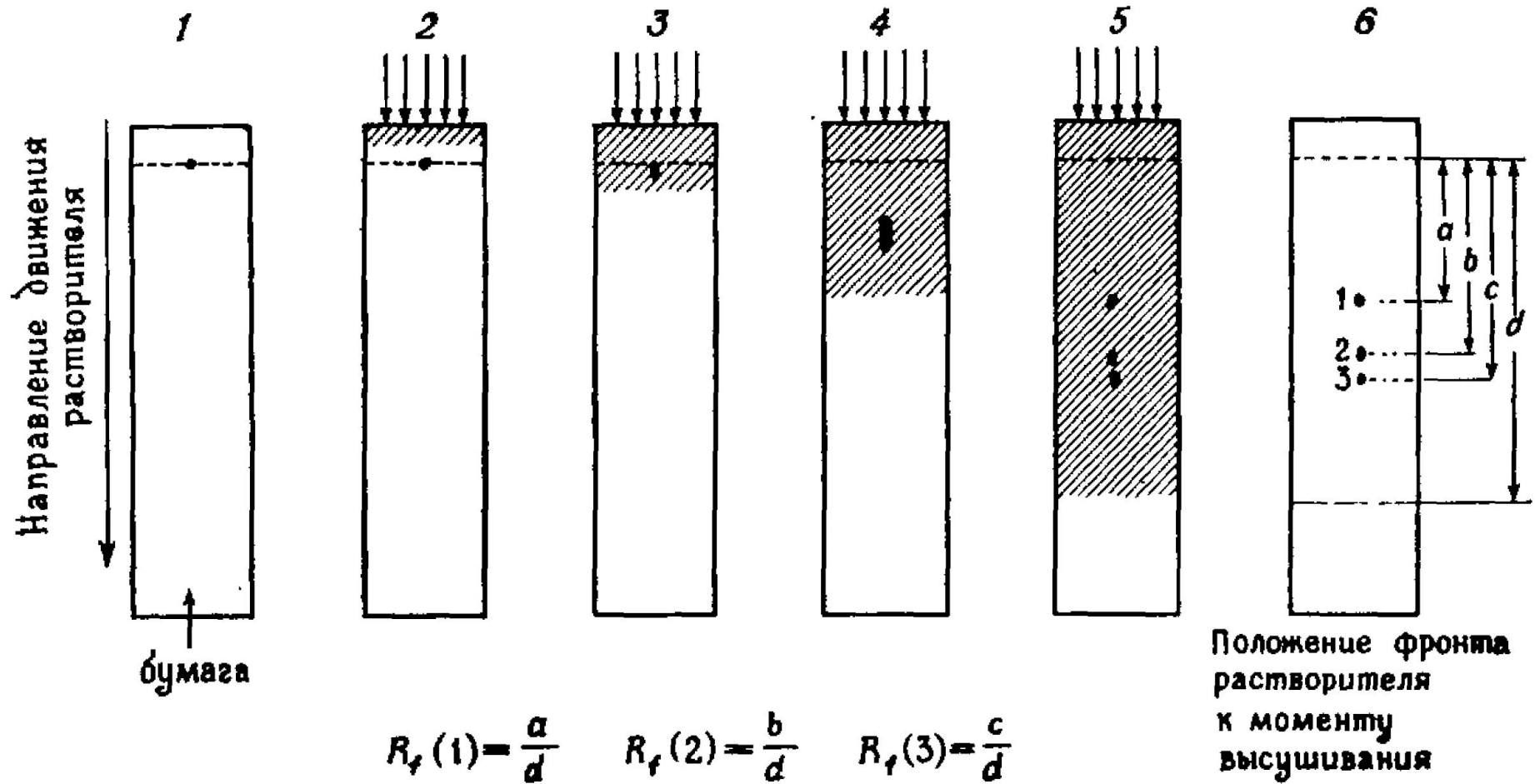
Procion Red HE-3B



**Red Sepharose CL-6B**

# Методы хроматографии

## Хроматография на бумаге



# Методы хроматографии

## Хроматография на бумаге

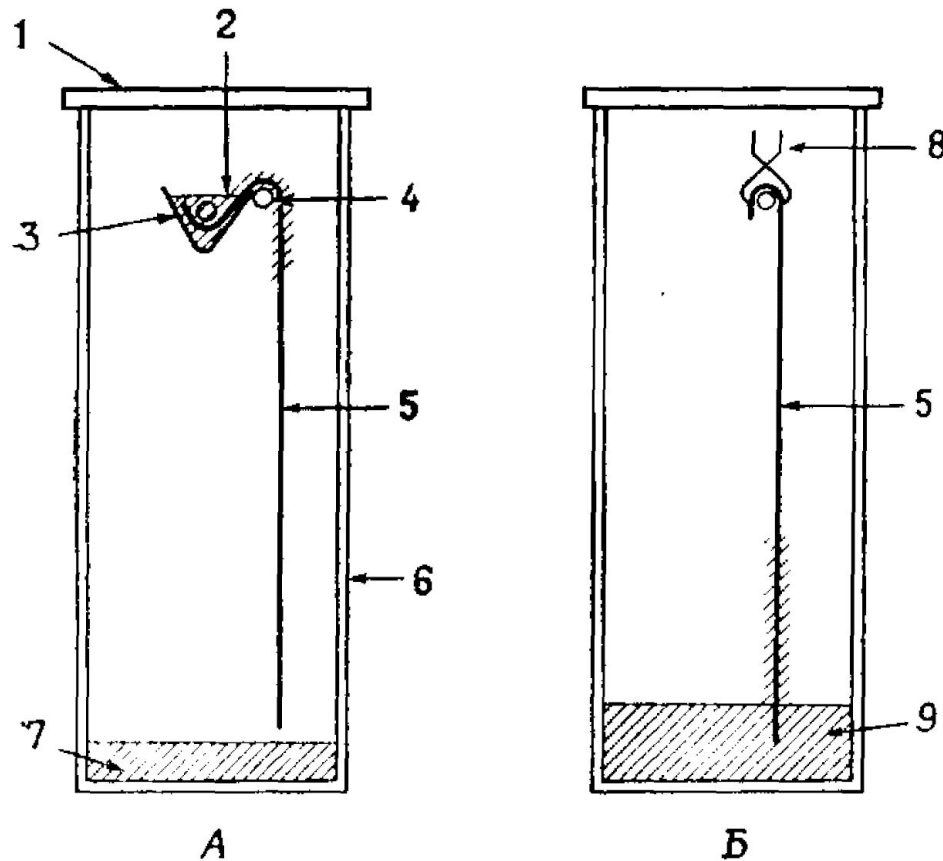


РИС. 8-7.

Устройства для нисходящей и восходящей хроматографии.

А — нисходящая; Б — восходящая. 1 — крышка; 2 — растворитель; 3 — лодочка с растворителем; 4 — поддерживающий стержень; 5 — бумага; 6 — стеклянная камера; 7 — избыток растворителя для поддержания влажности; 8 — зажим для удерживания бумаги; 9 — проявляющий растворитель.



# Методы хроматографии

# Тонкослойная хроматография

1) движение элюента за счет капиллярных сил (простота хроматографического эксперимента, простота и низкая стоимость оборудования);

2) использование дешевого универсального адсорбента – силикагеля (однократное использование пластинки, отсутствие требований к чистоте пробы); в качестве адсорбента можно применять целлюлозу;

3) открытый слой адсорбента (одновременный анализ большого числа проб, отсутствие требований к УФ-прозрачности элюента, простота наблюдения, отсутствие необходимости в оптическом детектировании, большие возможности селективного детектирования, в том числе радиоактивных изотопов, детектирование всех компонентов пробы, легкость осуществления градиентной ТСХ, малое время анализа);

4) обеспечивается возможность одновременного элюирования различными растворителями (до шести растворителей при элюировании по соседним дорожкам) и регулируемого воздействия газовой фазы на разделение, можно изменить селективность за считанные секунды или минуты;

5) за счет подбора условий элюирования (хроматографического разделения) может быть оптимизирована разрешающая способность только по интересующим исследователя веществам; благодаря этому экономится время, затрачиваемое на анализ;

6) возможность хранить пластинку с разделенными образцами и детектировать вещества позже (независимо от процедуры разделения), тонкослойная пластинка может обследоваться так долго, сколько потребуется, или столь быстро, насколько это позволяет детектор (и соответствующие электронные схемы). Обеспечивается возможность выполнять спектральную идентификацию какое-то время спустя после разделения (в любом диапазоне волн, включая инфракрасную область спектра);

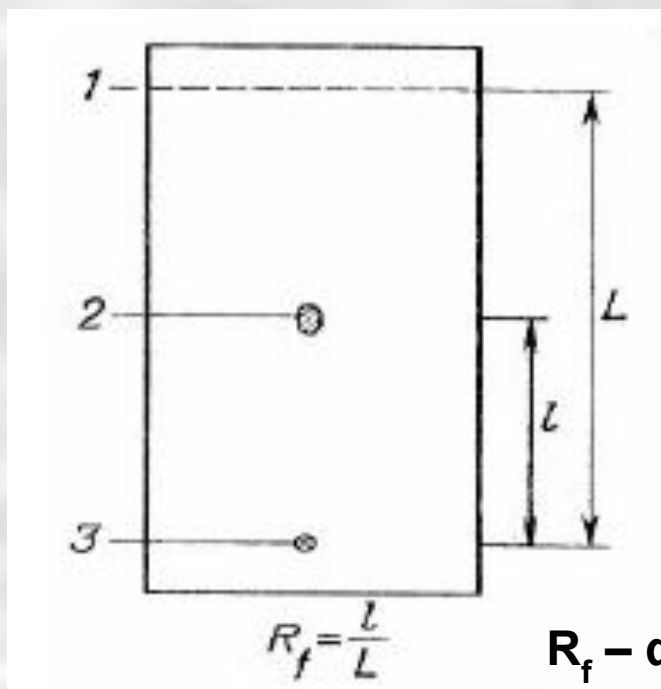
7) затраты средств на количественный анализ составляют 1/3 от затрат на колоночную жидкостную хроматографию. При хорошей организации хроматографического процесса количественная оценка результатов оказывается более точной, чем в случае колоночной жидкостной хроматографии.





# Методы хроматографии

## Тонкослойная хроматография



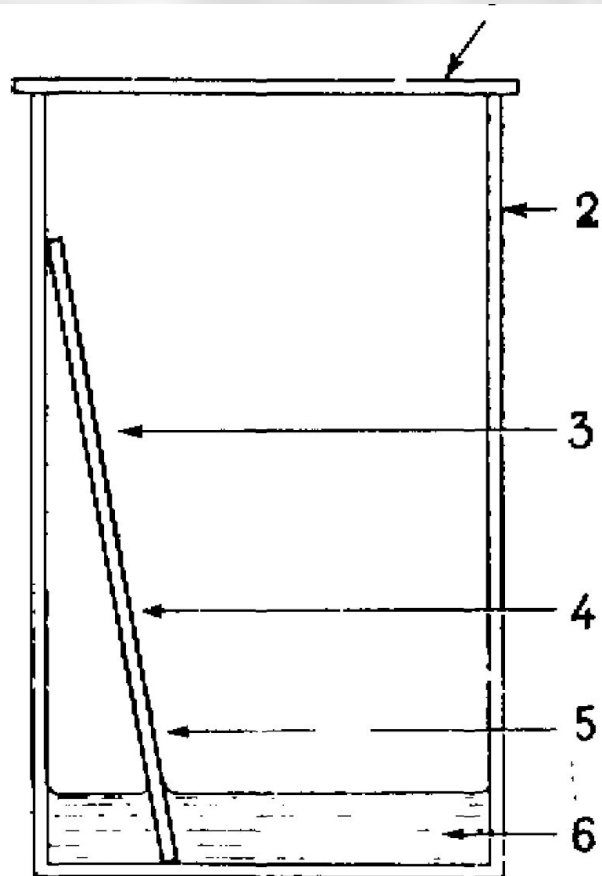
$R_f$  – фактор удерживания



1 – фронт растворителя;  
2 – пятно целевого вещества;  
3 – стартовая точка;  $L$  –  
расстояние старт – фронт;  
 $l$  – расстояние старт – пятно  
целевого вещества

# Методы хроматографии

## Тонкослойная хроматография



Типичная камера для проявления хроматографической пластинки с тонким слоем.

1 — крышка; 2 — стеклянная камера; 3 — пластинка ТСХ; 4 — сорбент; 5 — место нанесения пробы; 6 — растворитель.



Сорбент	Область применения	Примечания
Силикагель	Разделение неполярных веществ; выделение веществ, обладающих основными свойствами; рекомендуется использовать элюенты с основными свойствами	Поверхность сорбента сильнополярная; неполярные вещества разделяют методом распределительной хроматографии
Оксид алюминия	Разделение слабополярных основных веществ	Поверхность сорбента сильнополярная
Модифицированный силикагель	Разделение полярных веществ в условиях ОФХ	Поверхность покрыта химически связанными углеводородными группами
Полиамид	Разделение веществ, образующих с амидными группами сорбента водородные связи	Элюирующие свойства растворителей возрастают в следующем ряду: вода < метанол < ацетон < формамид < диметилформамид
Ацетилованная целлюлоза	Разделение липофильных веществ (полициклических ароматических углеводов, антрахиноновых красителей)	Распределительная хроматография в условиях ОФХ; сорбент частично растворим в обычных растворителях (диоксане, ацетоне, эфире)
СМ-целлюлоза	Слабый катионит	Содержит карбоксиметильную группу: $\text{---H}_2\text{C---C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}^- \end{matrix}$
DEAE-целлюлоза	Слабый анионит	Содержит диэтиламиноэтильную (DEAE) – группу: $\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---NH}^+(\text{CH}_2\text{---CH}_3)_2$
PEI-целлюлоза	Анионит, применяется для разделения ферментов и нуклеотидов	Содержит функциональную группу – фрагмент полиэтиленimina (PEI): $\text{---(---CH}_2\text{---CH}_2\text{---NH---)}^+$



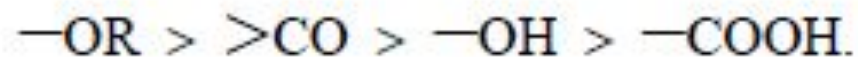
# Методы хроматографии

## Сорбенты для ТСХ

ЕСТЕОЛА-целлюлоза	Анионит	Более слабый анионит по сравнению с DEAE-целлюлоза
IONEX-смешанный ионит	Смесь кислого и основного ионообменника на основе силикагеля	—

## *Выбор элюирующих систем*

- вещество характеризуется большим значением  $R_f$  в более полярных растворителях;
- менее полярное вещество характеризуется большим значением  $R_f$ ; для веществ со сходными свойствами или соединений одного гомологического ряда  $R_f$  возрастает с увеличением числа полярных групп ( $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$ );  $R_f$  уменьшается при увеличении числа полярных групп по мере увеличения полярности функциональных групп:





# Методы хроматографии

## Тонкослойная хроматография

Элюотропный ряд растворителей\*

Растворитель	Элюирующая способность растворителей («полярность»)	Вязкость $\eta$ , мПа·с	Показатель преломления $n_D$	Наименьшая длина волны, нм
<i>n</i> -Пентан	0.00	0.24	1.358	200
<i>n</i> -Гексан	0.01	0.33	1.375	200
<i>n</i> -Гептан	0.01	0.42	1.388	200
Изооктан	0.01	0.50	1.391	200
Циклогексан	0.04	0.98	1.426	210
Четыреххлористый углерод	0.18	0.97	1.466	265
Диизопропиловый эфир	0.28	0.37	1.368	220
Толуол	0.29	0.59	1.496	290
<i>n</i> -Пропилхлорид	0.30	0.35	1.389	225
Бензол	0.32	0.65	1.501	290
Этилбромид	0.37	0.39	1.421	230
Диэтиловый эфир	0.38	0.23	1.353	220
Хлороформ	0.40	0.57	1.443	250
Дихлорметан	0.42	0.44	1.424	250
Тetraгидрофуран	0.45	0.46	1.407	220
Этиленхлорид	0.49	0.79	1.445	230
Ацетон	0.56	0.32	1.359	330
Диоксан	0.56	1.54	1.422	220
Этилацетат	0.58	0.45	1.370	260
Метилацетат	0.60	0.37	1.362	260
Нитрометан	0.64	0.65	1.382	380
Ацетонитрил	0.65	0.37	1.344	210
Пиридин	0.71	0.94	1.510	310
<i>n</i> -Пропанол	0.82	2.30	1.380	200
Этанол	0.88	1.20	1.361	200
Метанол	0.95	1.20	1.361	200
Гликоль	1.11	19.90	1.427	200
Вода	большая	1.00	1.33	–
Формаид	большая	3.76	1.448	–
Уксусная кислота	большая	1.26	1.372	–

\* Все значения измерены при 20 °С; полярность растворителей указана для оксида алюминия

*Флуоресценция.* Многие ароматические вещества имеют собственную флуоресценцию при 360 нм; при этой длине волны они обнаруживаются в виде желтых флуоресцирующих пятен на темном фоне.

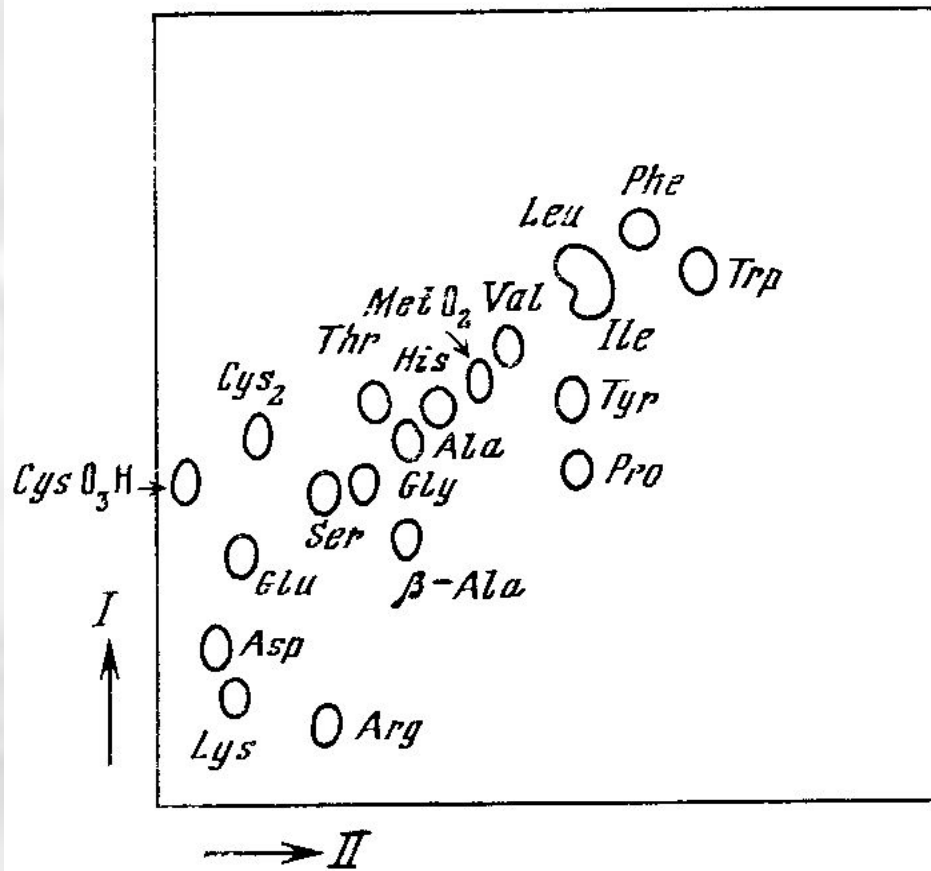
*Абсорбция.* Большинство готовых ТСХ-пластин содержит люминофоры (такие пластинки помечены индексом  $\Phi_{254}$ ); при облучении УФ-светом с длиной волны 254 нм они светятся равномерным желто-зеленым фоном. Вещества, поглощающие в УФ-области, обнаруживаются в виде темных пятен на светлом фоне.

*Химические реакции.* Функциональные группы веществ способны вступать в реакции со специфическими реагентами с образованием хромофоров (аминогруппы белков и пептидов проявляются с помощью нингидрина).

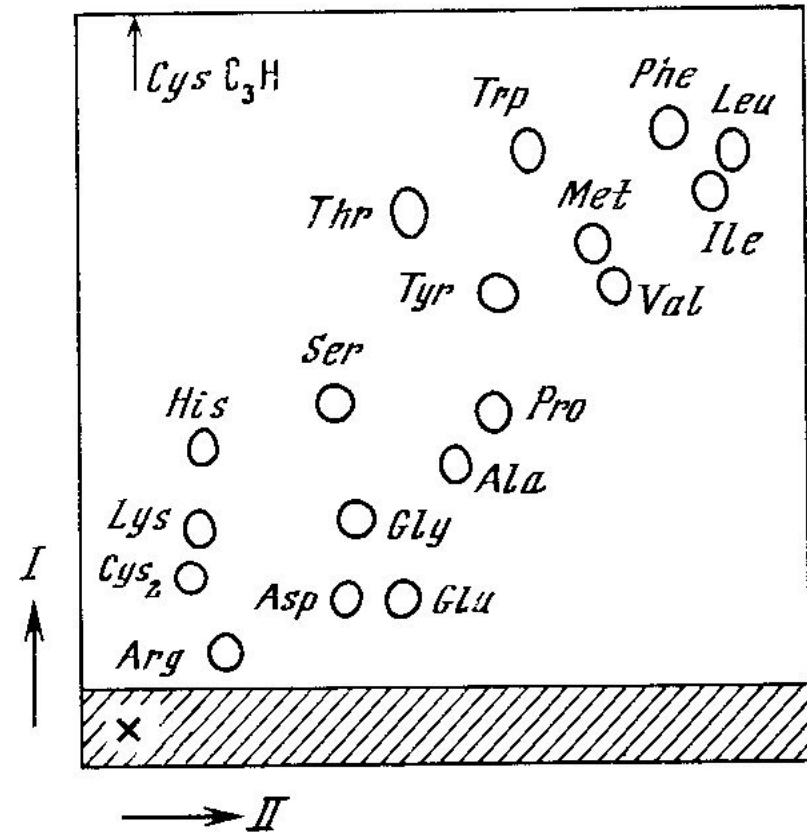


# Методы хроматографии

## Тонкослойная хроматография



силикагель



целлюлоза