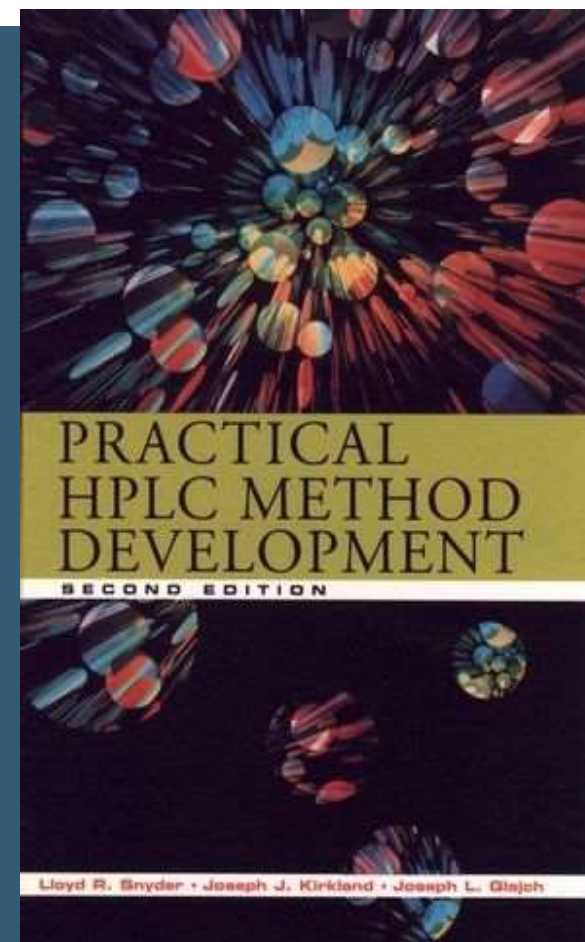
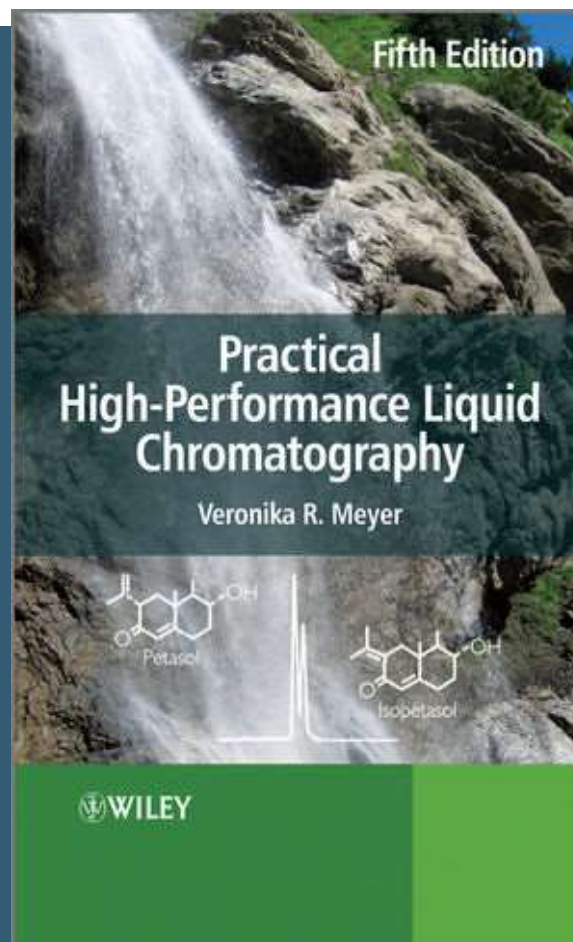
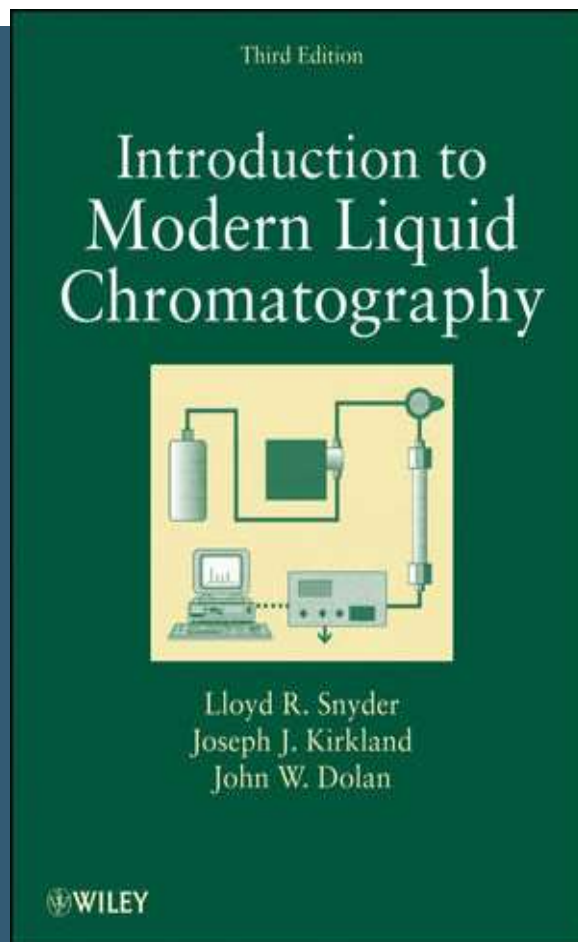
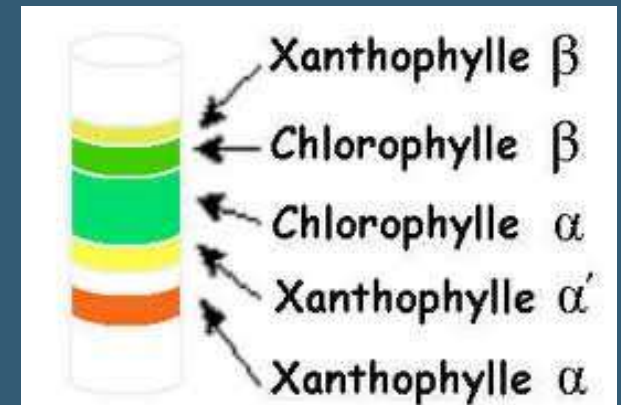
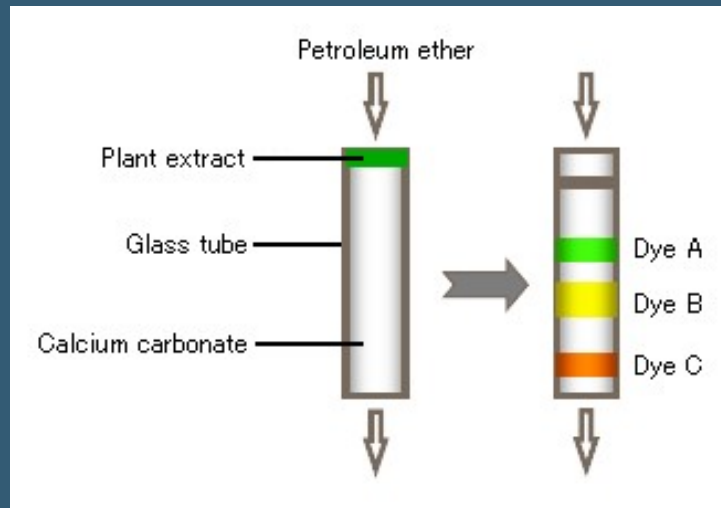
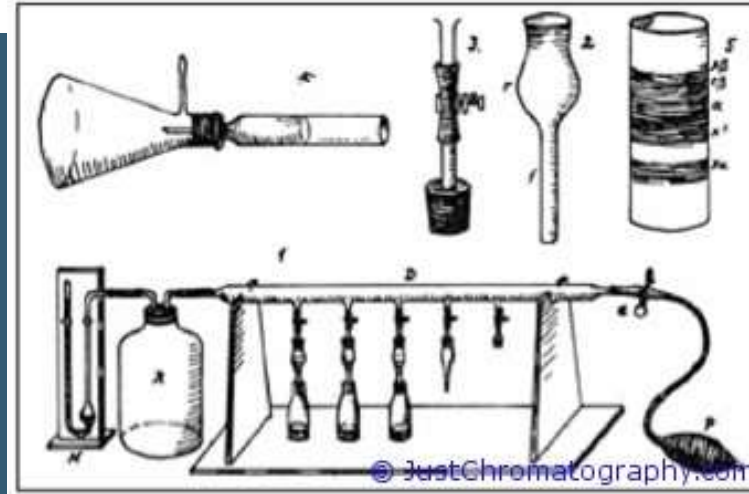


CHROMATOGRAFICKÉ METODY I.

LITERATURA

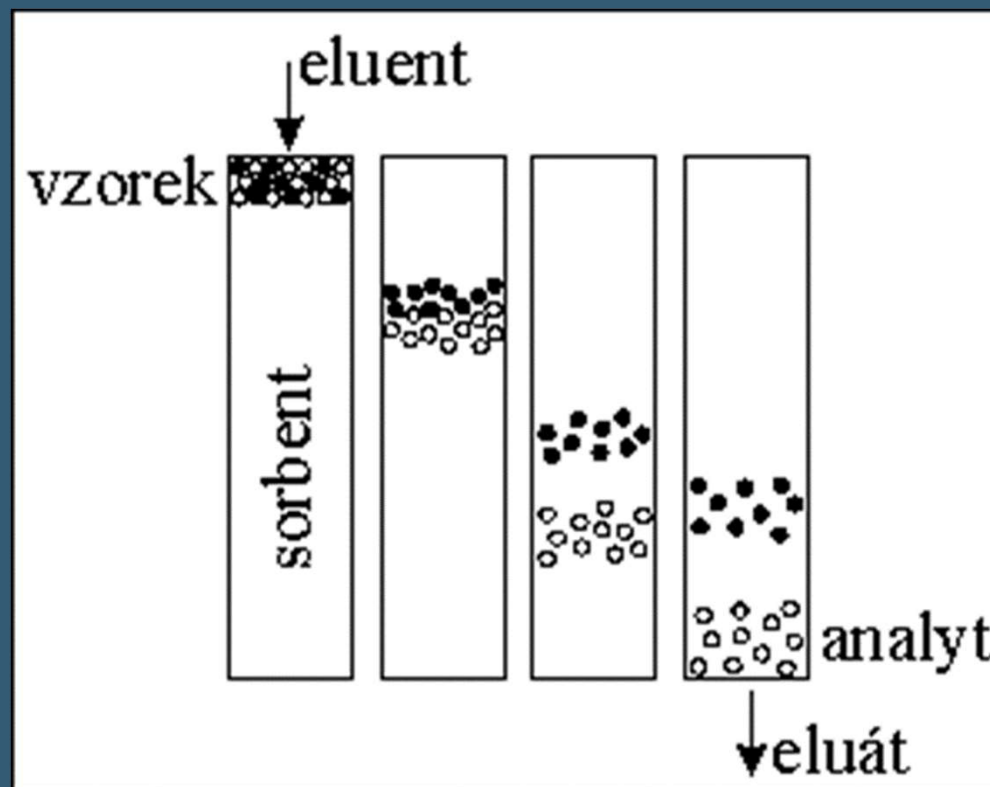


MIKHAIL SEMYONOVICH TSVET CHROMATOGRAPHIA 1906



PODSTATA CHROMATOGRAFIE

„Při chromatografii dochází k neustálému vytváření rovnovážných stavů separované látky mezi dvě fáze – stacionární a mobilní.“



CHROMATOGRRAFIE

- **Mobilní fáze**

- kapalina– LC
- plyn– GC

Stacionární fáze

- pevná fáze
- kapalina

- Eluce - **Izokratická** – stejná eluční síla

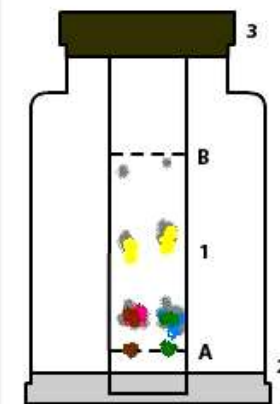
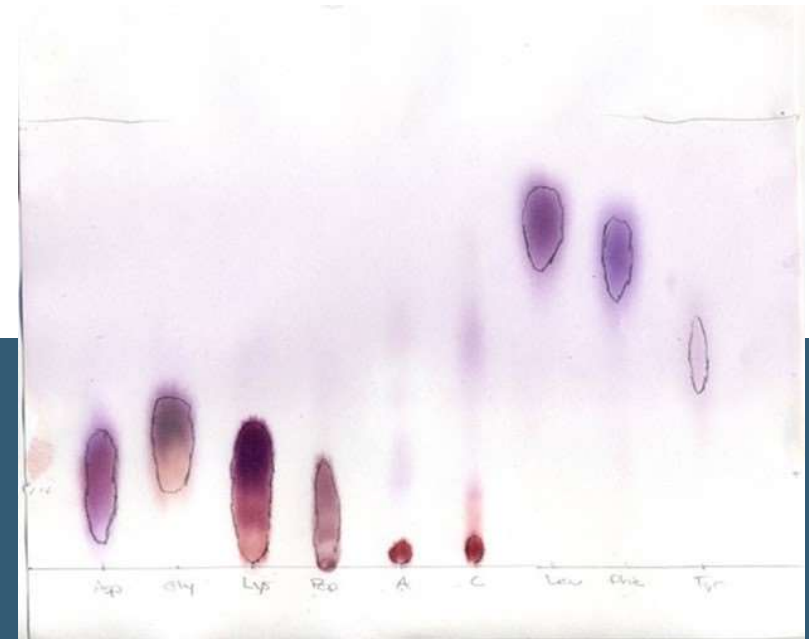
Gradientová – rostoucí eluční síla

KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE LC

- Mobilní fáze - kapalina
- Stacionární fáze - pevná fáze,
kapalina

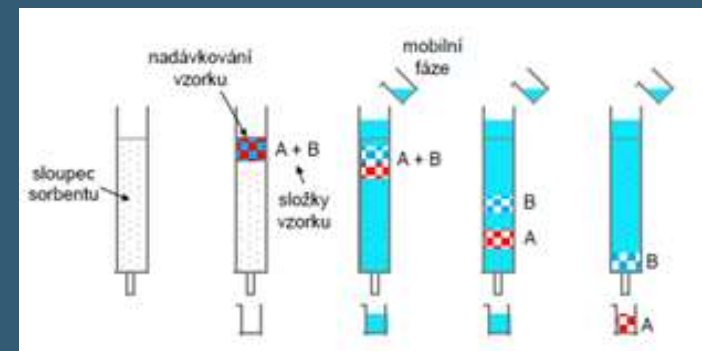
PROVEDENÍ LC

- **Papírová PC** (SF – voda nebo polární rozpouštědlo zakotvené na vláknách papíru)
- **Tenkovrstvá TLC** (silikagel, alumina, celulóza aj.) rozprostřená na inertní podložce
- **Kolonová CC** – SF tvoří náplň kolony, nebo je nanesena n. chemicky vázána na nosné částice, případně přímo na vnitřním povrchu kolony



1. chromatografický papír
2. skleněný válec s ethanolem
3. zátka se zářezem

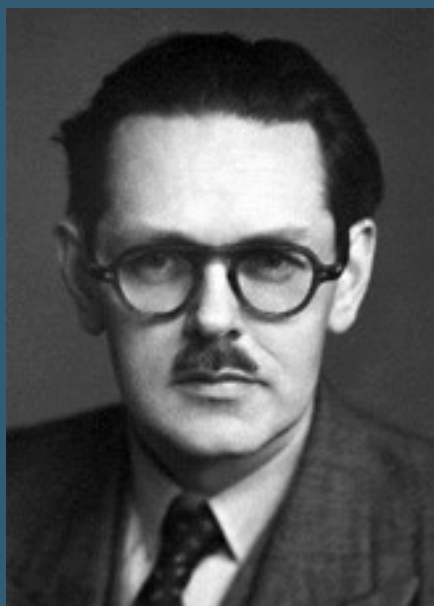
A – čára startu
B – čelo rozpouštědla



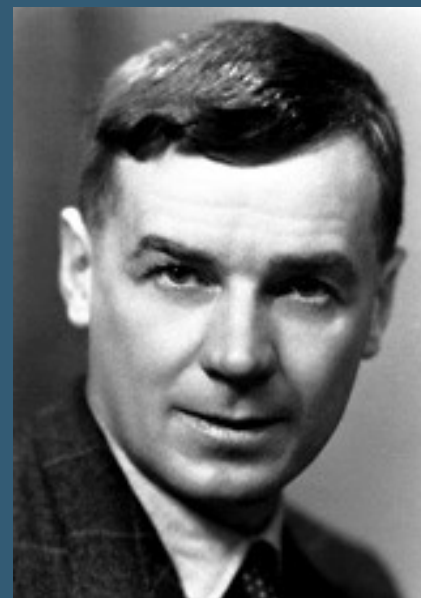
TEORETICKÉ ASPEKTY CHROMATOGRRAFIE

TEORIE „IDEÁLNÍ LINEÁRNÍ CHROMATOGRRAFIE“

MARTIN



SYNGE

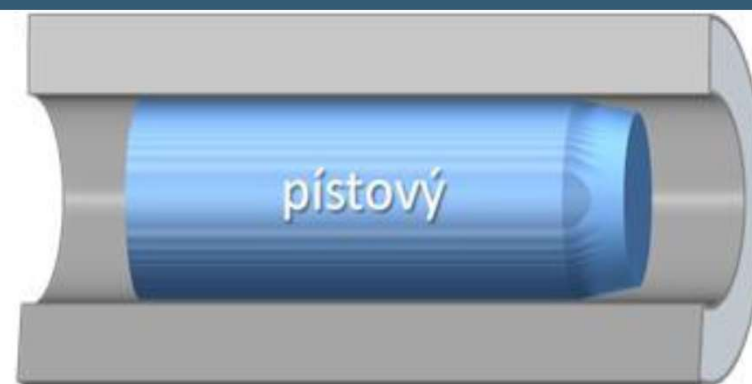
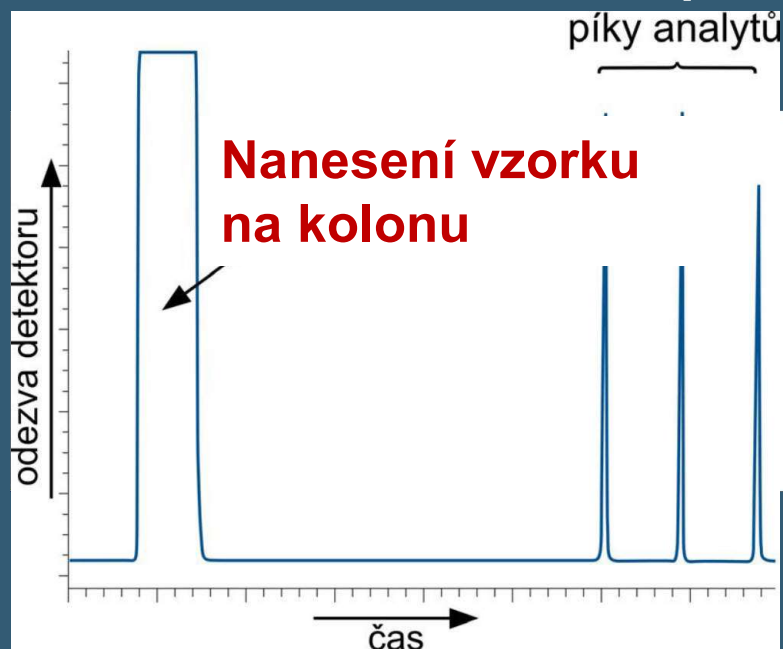


MUNI
SCI

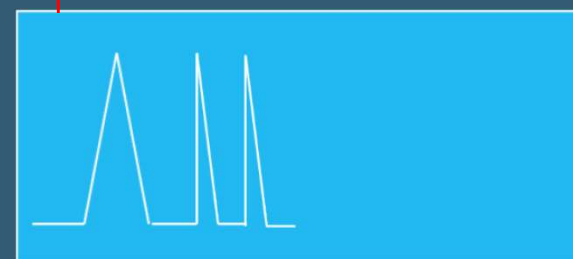
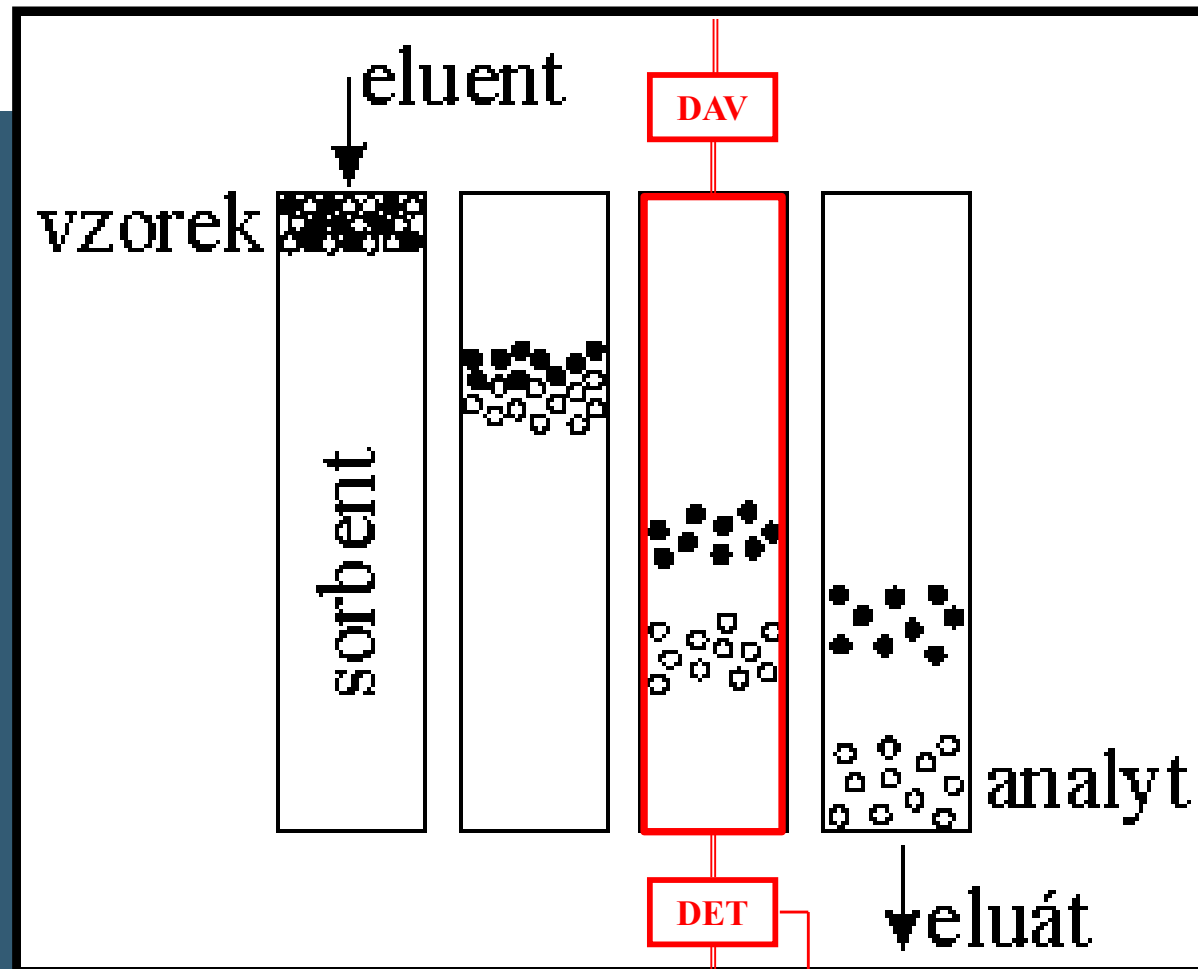
Nobelova cena za chemii 1952

TEORIE „IDEÁLNÍ LINEÁRNÍ CHROMATOGRRAFIE“ GC

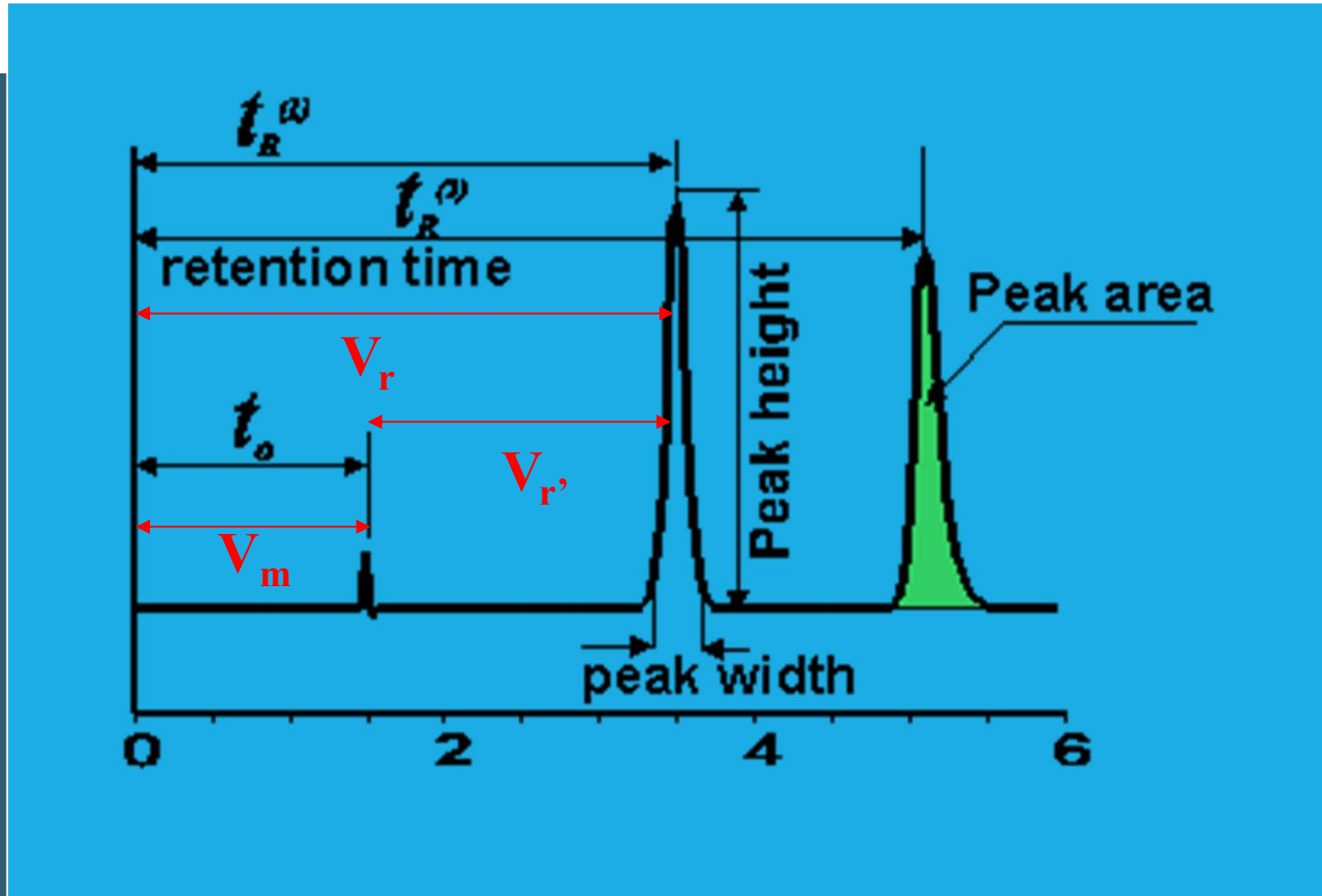
1. Nekonečně rychlé ustavení rovnovah
2. Pístový tok mobilní fáze
3. Nulová difuze
4. Lineární sorpční isoterma



CHROMATOGRRAFIE



CHROMATOGRAM



RETENČNÍ – ELUČNÍ ČAS T_R

- Doba od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky

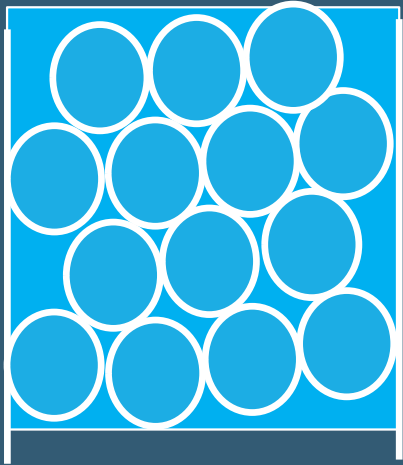
Retenční – eluční objem V_r

- Objem mobilní fáze proteklý od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky

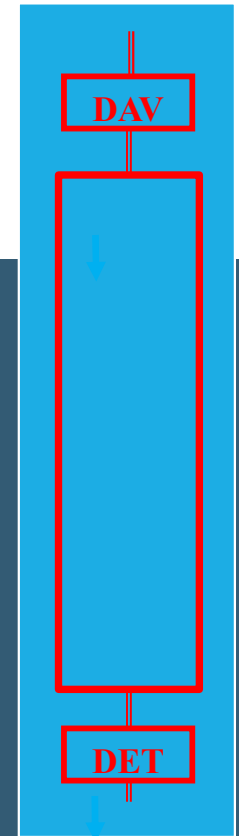
$$V_r = t_r \cdot F_m$$

F_m – objemová rychlost mobilní fáze

MRTVÝ OBJEM



$$V_r = V_m + V_{r'}$$



V_r – zdánlivý retenční objem

$V_{r'}$ - redukovaný (skutečný) retenční objem

V_m - mrtvý objem – mimokolonové příspěvky

+ mimočásticový objem kolony

KAPACITNÍ FAKTOR k'

$$k' = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{V_{r'}}{V_m} = K_D \cdot \frac{V_S}{V_M}$$

$$k' = 1 - 10$$

V_s – objem stacionární fáze

V_M – objem mobilní fáze

Distribuční koeficient

$$K_D = \frac{c_S}{c_M}$$

c_s – rovnovážná koncentrace látky ve stacionární fázi

c_M – rovnovážná koncentrace látky ve mobilní fázi

SELEKTIVITA

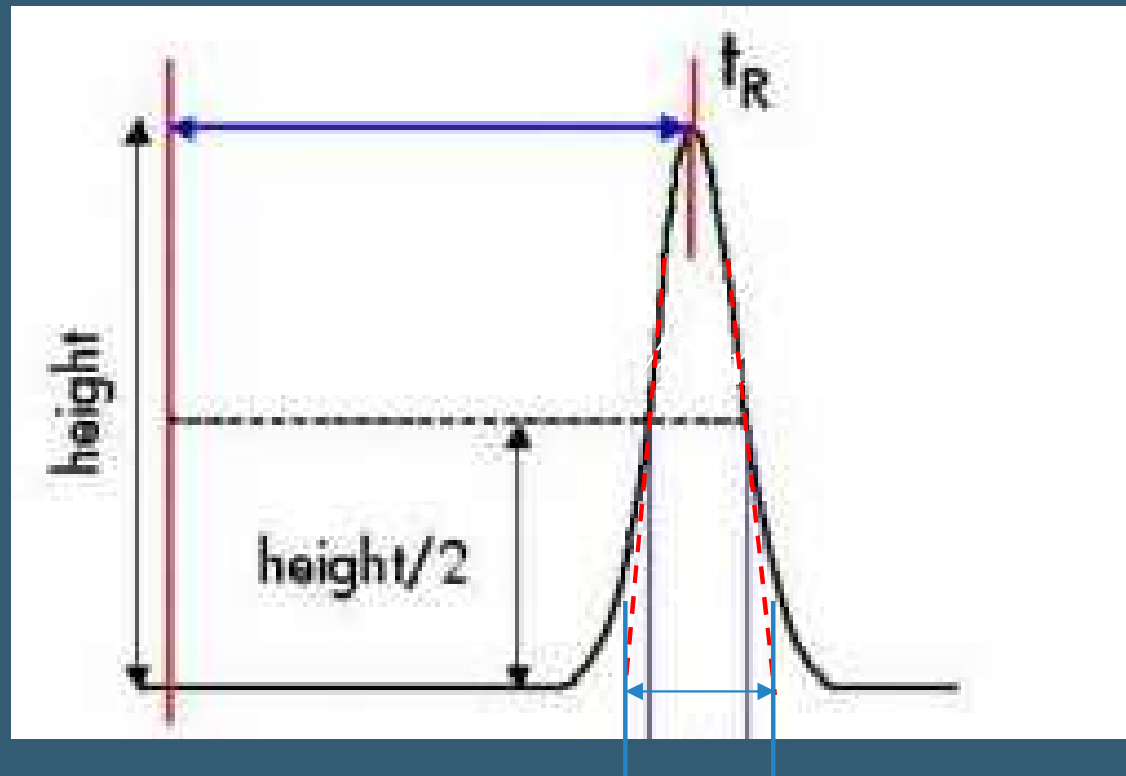
RETENČNÍ FAKTOR α

$$\alpha = \frac{V_{r2}}{V_{r1}} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

ÚČINNOST KOLONY (IZOKRATICKÁ ELUCE) POČET TEORETICKÝCH PATER N

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{Y_r} \right)^2$$

$$N = 5.545 \cdot \left(\frac{t_r}{1/2 Y_r} \right)^2$$

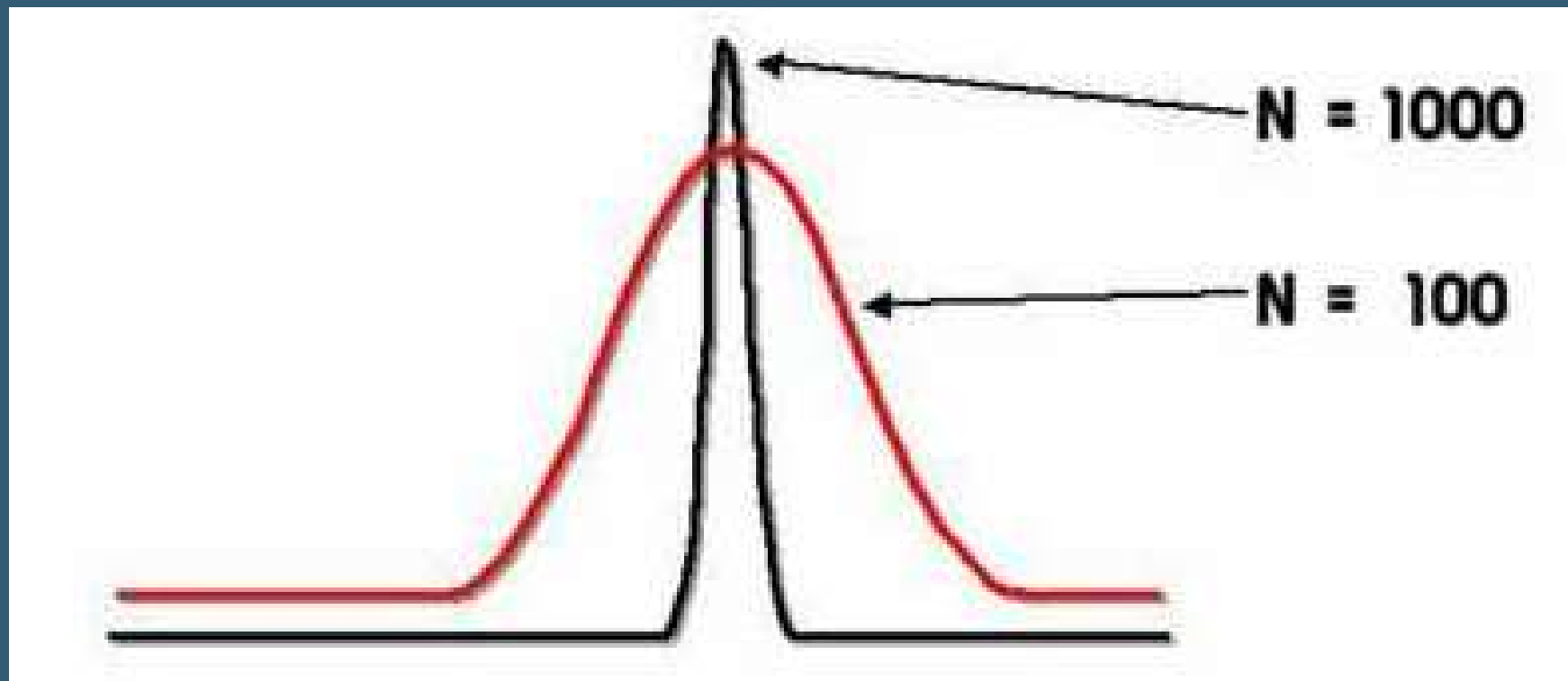


ÚČINNOST KOLONY (IZOKRATICKÁ ELUCE) VÝŠKOVÝ EKVIVALENT TEORETICKÉHO PATRA H

$$H = \frac{l}{N}$$

l – délka kolony

ÚČINNOST KOLONY



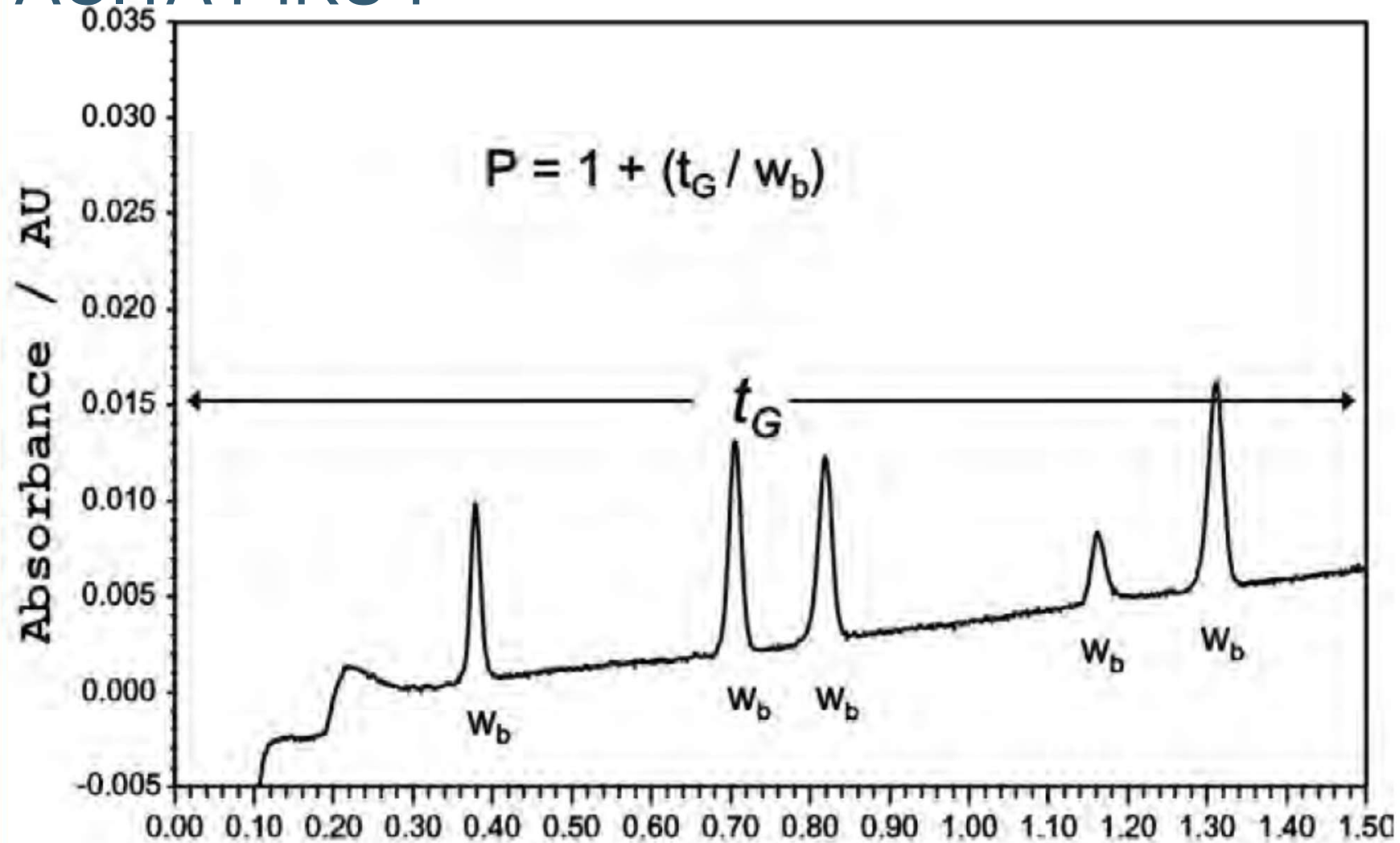
ÚČINNOST KOLONY (GRADIENTOVÁ ELUCE) KAPACITA PÍKU P

$$P = 1 + \frac{t_g}{(1/n) \sum_1^n w_b}$$

t_g – celková doba gradientu

ÚČINNOST KOLONY (GRADIENTOVÁ ELUCE)

KAPACITA PÍKU P

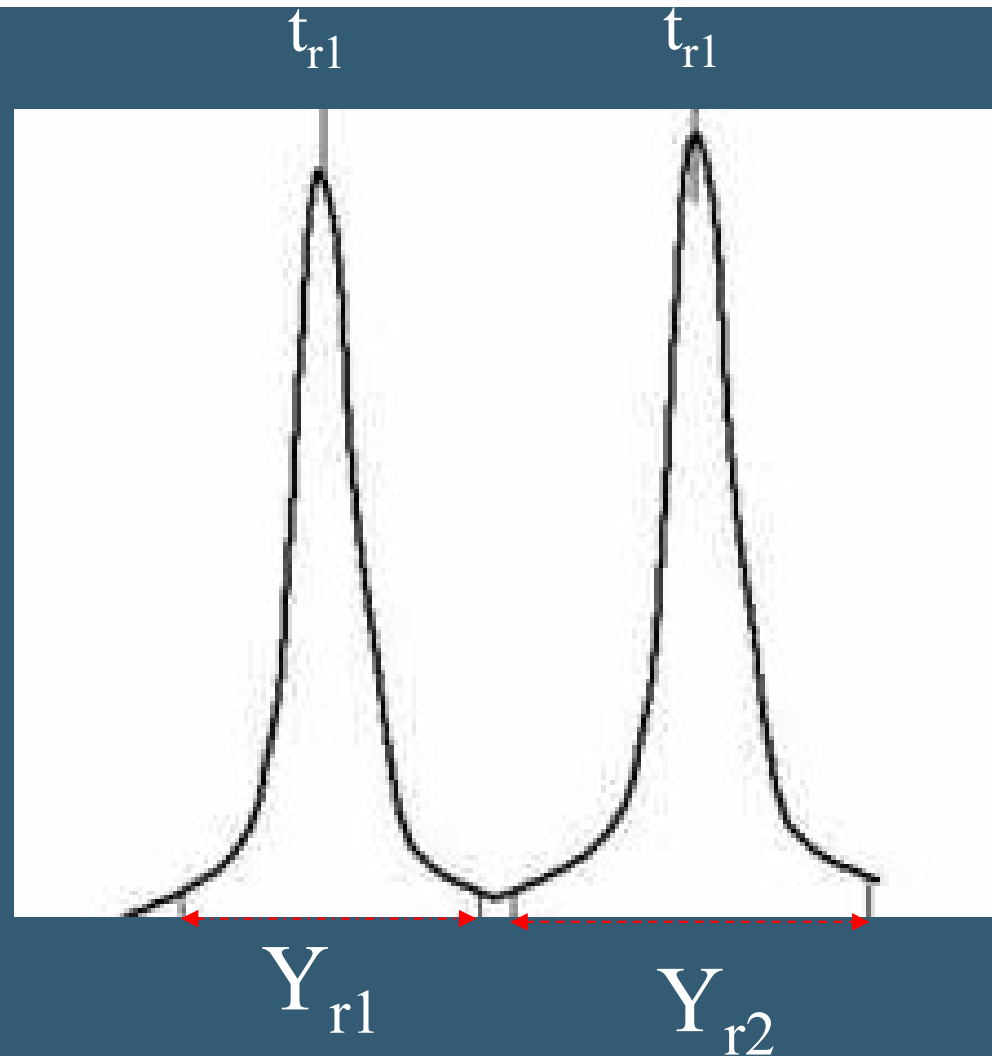


ROZLIŠENÍ

$$R_{12} = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{Y_{r1} + Y_{r2}}$$

$R_{12}=1.5$ – nulové překrytí

$R_{12}=1.0$ – překrytí 2 %



ROZLIŠENÍ

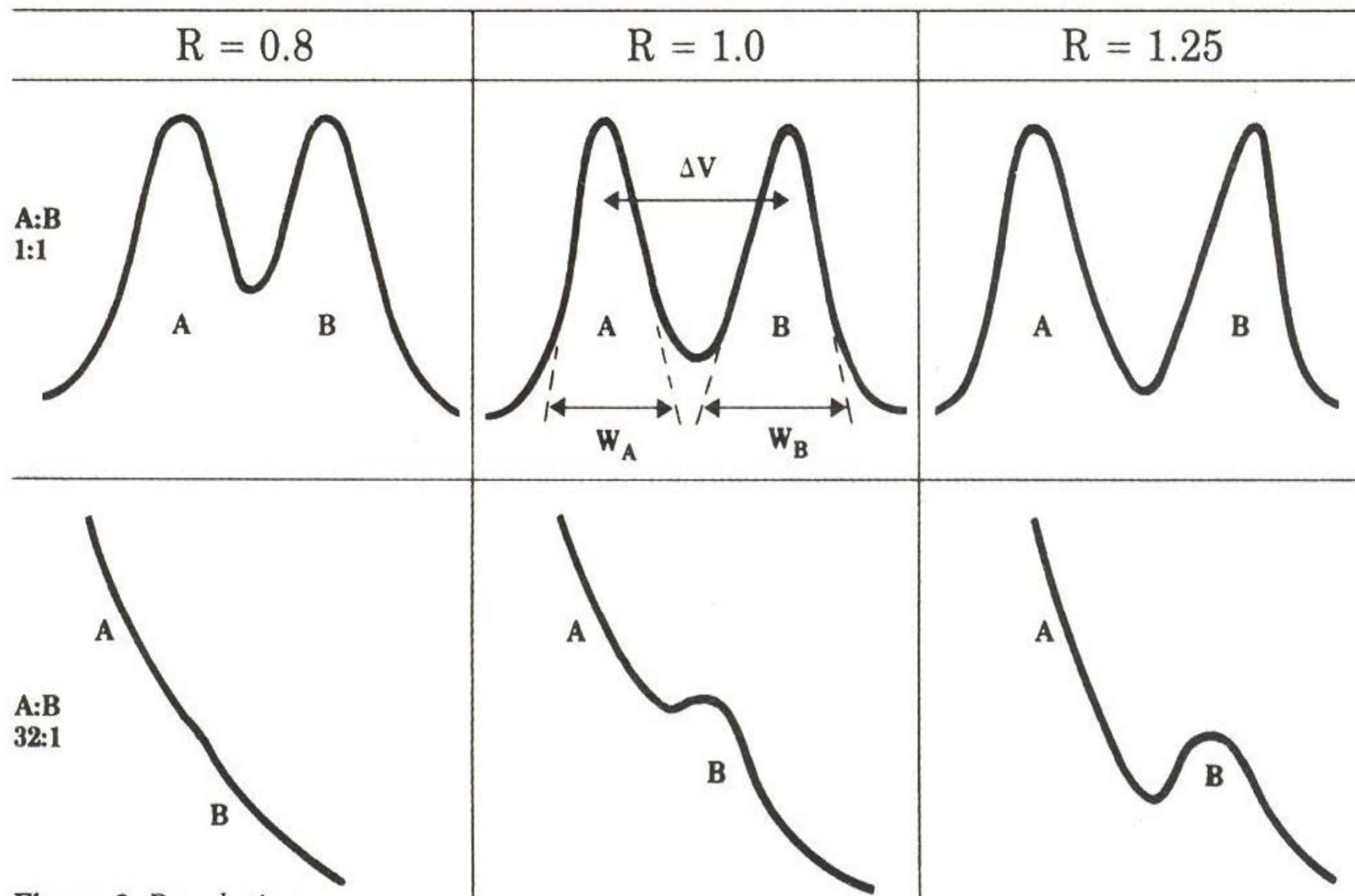
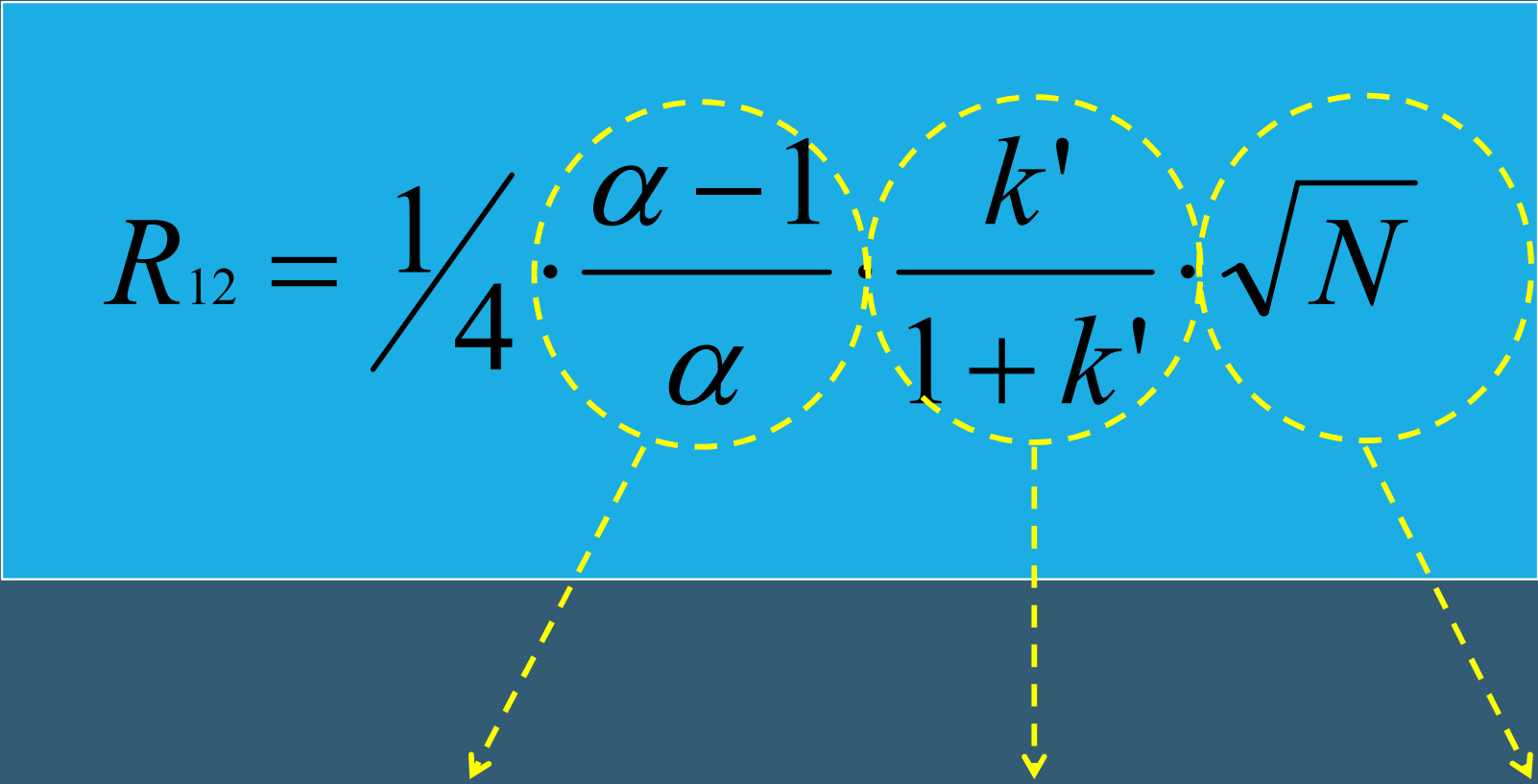


Figure 3. Resolution.

VLIV JEDNOTLIVÝCH FAKTORŮ NA ROZLIŠENÍ

$$R_{12} = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{1 + k'} \cdot \sqrt{N}$$


Selektivita

Kapacita

Účinnost

VLIV JEDNOTLIVÝCH FAKTORŮ NA ROZLIŠENÍ

- faktor **selektivity** lze ovlivnit:
 - změnou stacionární fáze
 - změnou mobilní fáze
 - současnou změnou obou fází
 - změnou rychlosti toku mobilní fáze

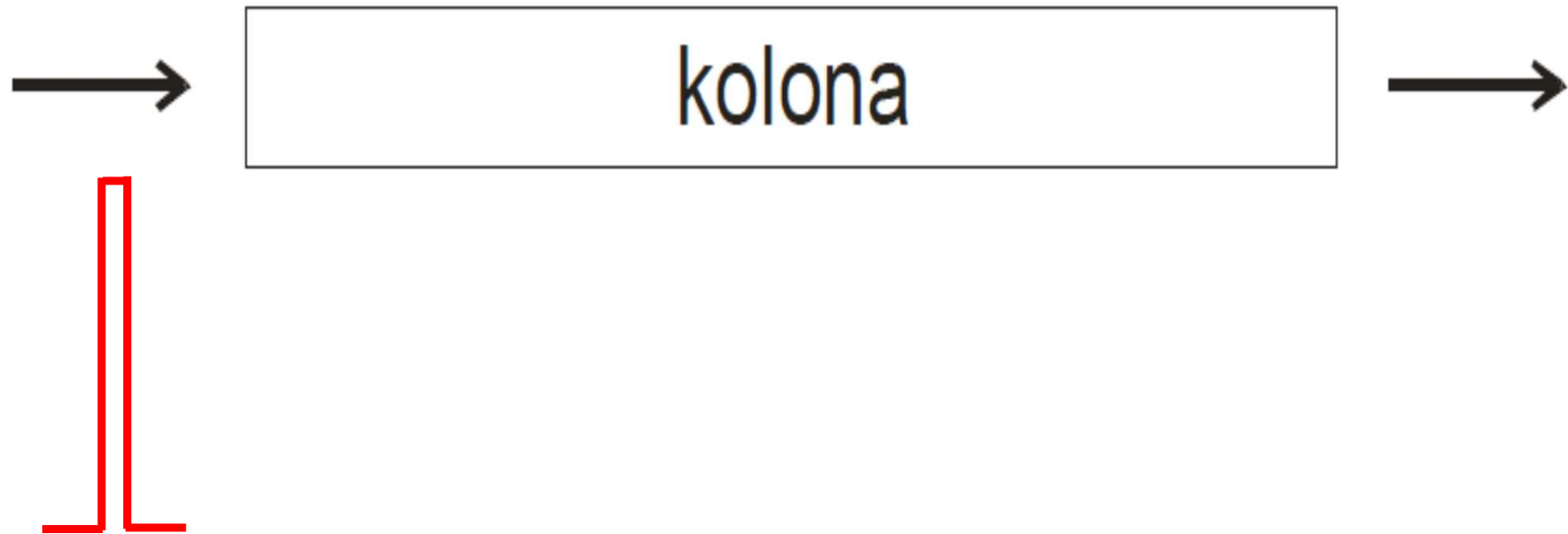
VLIV JEDNOTLIVÝCH FAKTORŮ NA ROZLIŠENÍ

- faktor **kapacity** lze ovlivnit:
 - množstvím stacionární fáze v koloně
 - změnou stacionární nebo mobilní fáze
 - změnou teploty kolony

VLIV JEDNOTLIVÝCH FAKTORŮ NA ROZLIŠENÍ

- **faktor účinnosti** lze ovlivnit:
 - délkou kolony
 - rychlostí průtoku mobilní fáze
 - velikostí částic sorbentu
 - teplotou, viskozitou mobilní i stacionární fáze

VZNIK ELUČNÍ KŘIVKY – PEAKU (PÍKU)



„DYNAMICKÁ DIFUZNÍ TEORIE“

VAN DEEMTER

vliv rychlosti mobilní fáze na rozšiřování zón

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

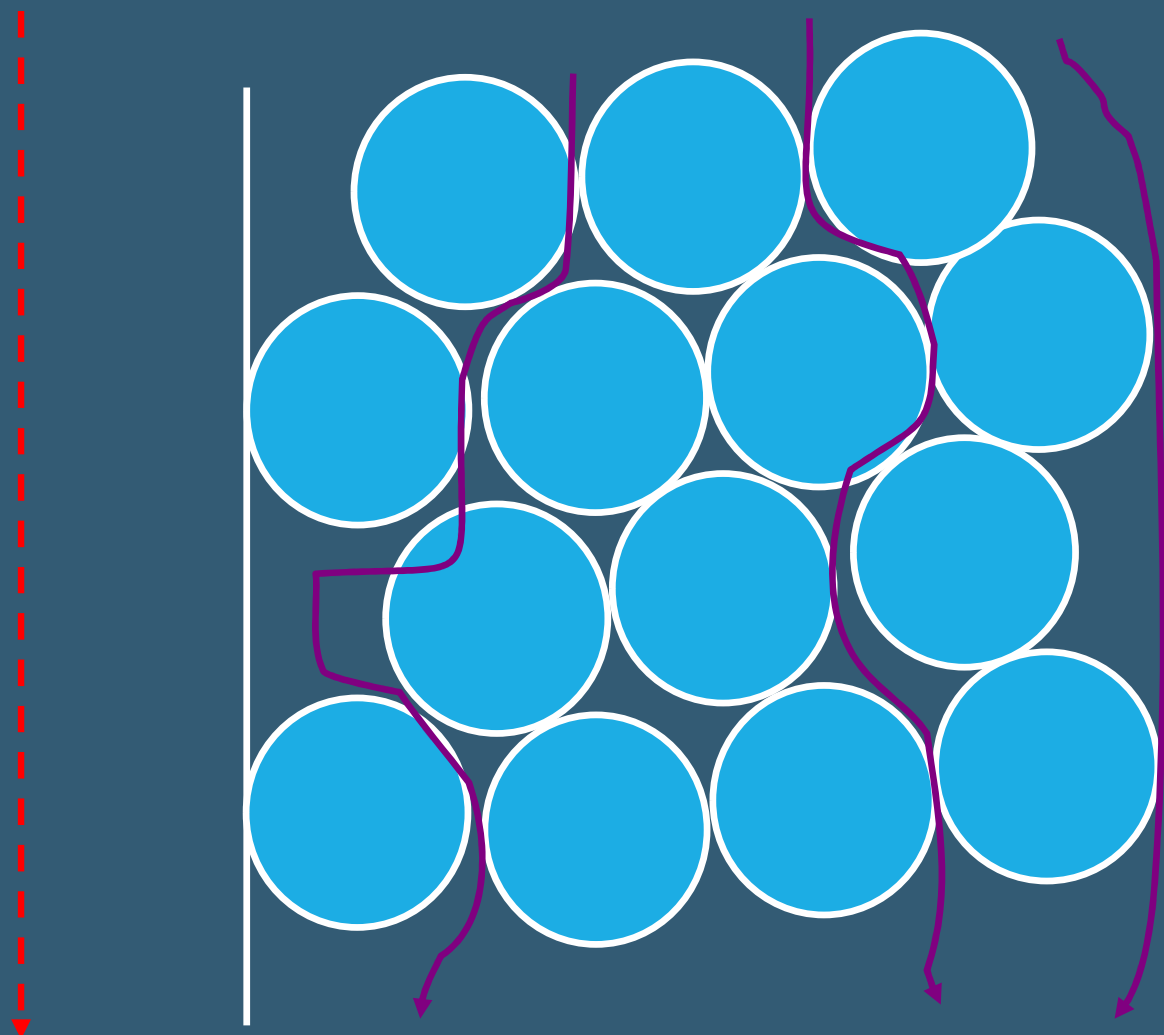
M U N I
S C I

H-výškový ekvivalent teoretického patra,
A-vířivá (turbulentní) difúze, B-podélná molekulární difúze,
C-odpor proti převodu hmoty

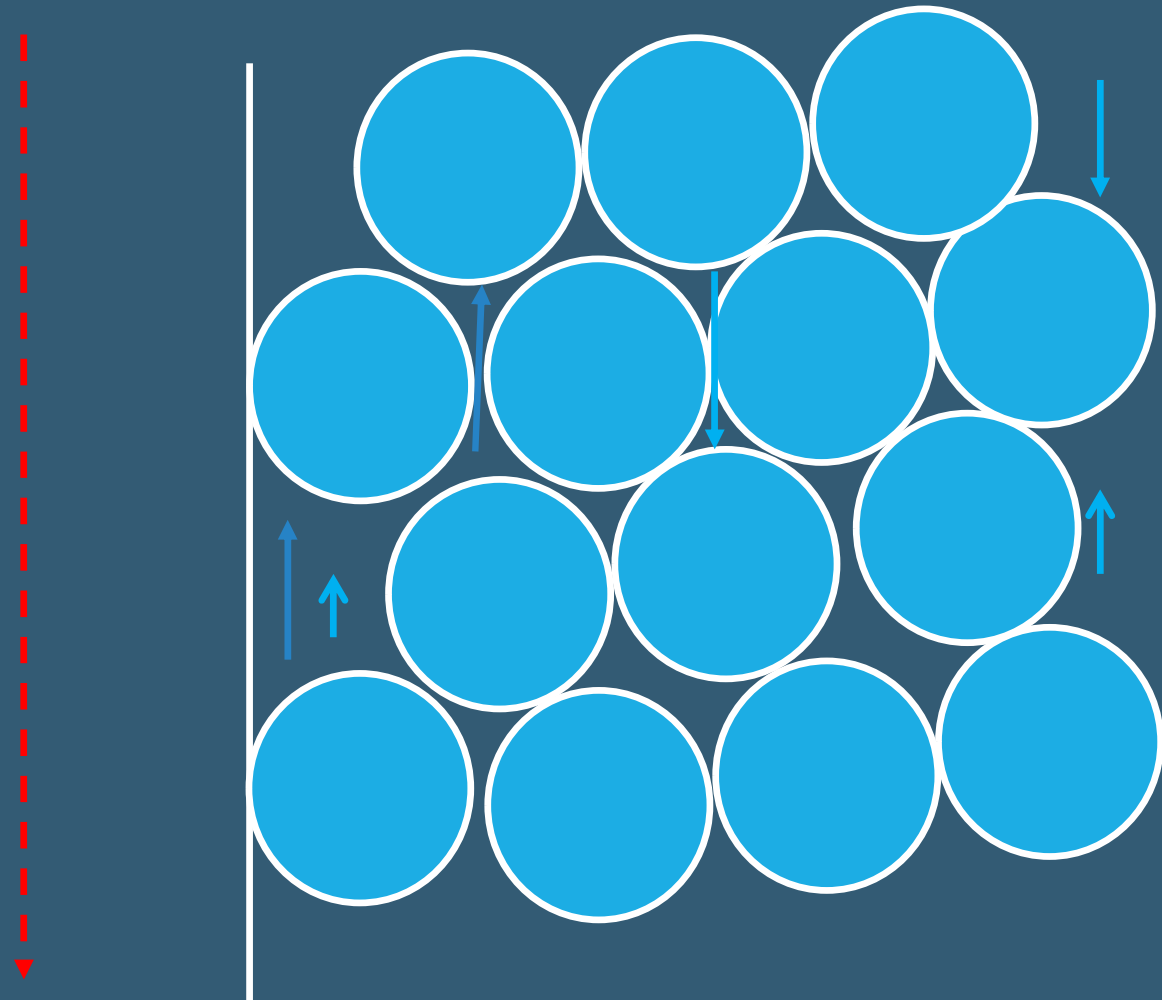
VAN DEEMTEROVA DIFUZNÍ TEORIE

- Difuze turbulentní
- Difuze molekulová
- Odpor proti převodu hmoty

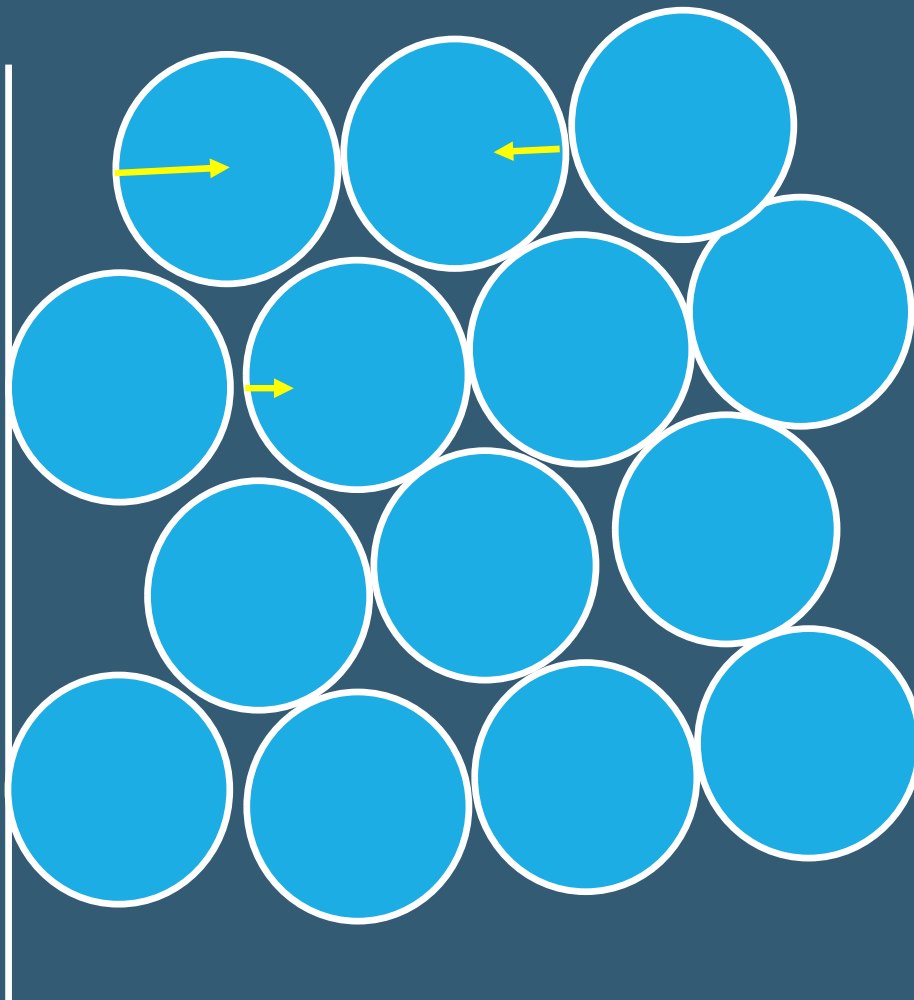
DIFUSE TURBULENTNÍ A



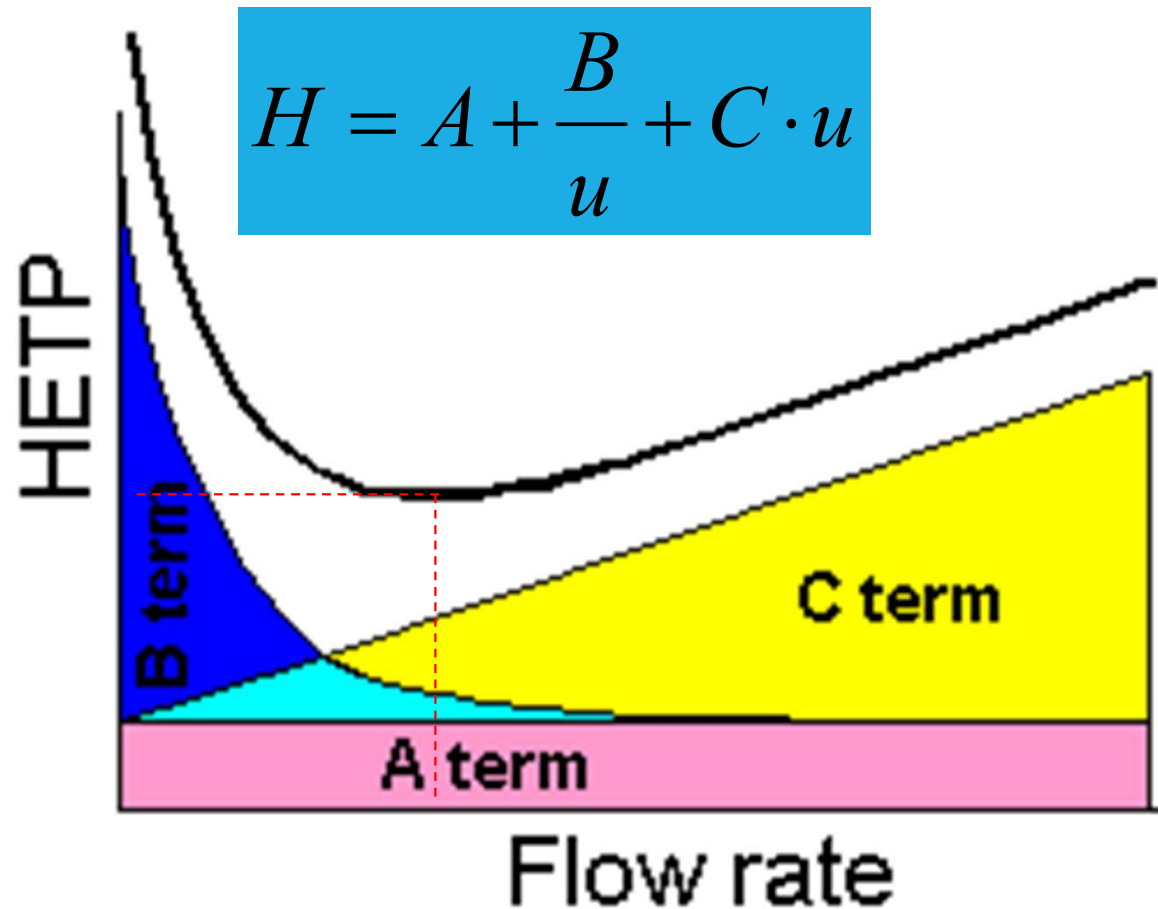
DIFUSE MOLEKULOVÁ B



ODPOR PROTI PŘEVODU HMOTY c



VAN DEEMTEROVA ROVNICE



- ✓ minimum křivky \approx optimální průtoková rychlost
- ✓ daná kolona vykazuje největší účinnost, nejméně rozšiřuje zóny analytů

SÍLY A EFEKTY VYUŽÍVANÉ PŘI SEPARACI

- **Iontové síly**

Silné elektrostatické interakce mezi stacionární a analyzovanou látkou – **ionexová chromatografie**

- **Polární síly**

interakce dipólů a protondonorní, resp. protonakceptorní vlastnosti (tvorba vodíkových můstků) separovaných látek, mobilní a stacionární fáze – **adsorpční chromatografie**

SÍLY A EFEKTY VYUŽÍVANÉ PŘI SEPARACI

- **Nepolární síly** (disperzní, van der Waalsovy)

Nejslabší, tyto interakce se vyskytují u látek, které nejsou permanentní dipóly – **adsorpční, reverzně fázová a hydrofobní chromatografie**

- Efekt **velikosti molekul**

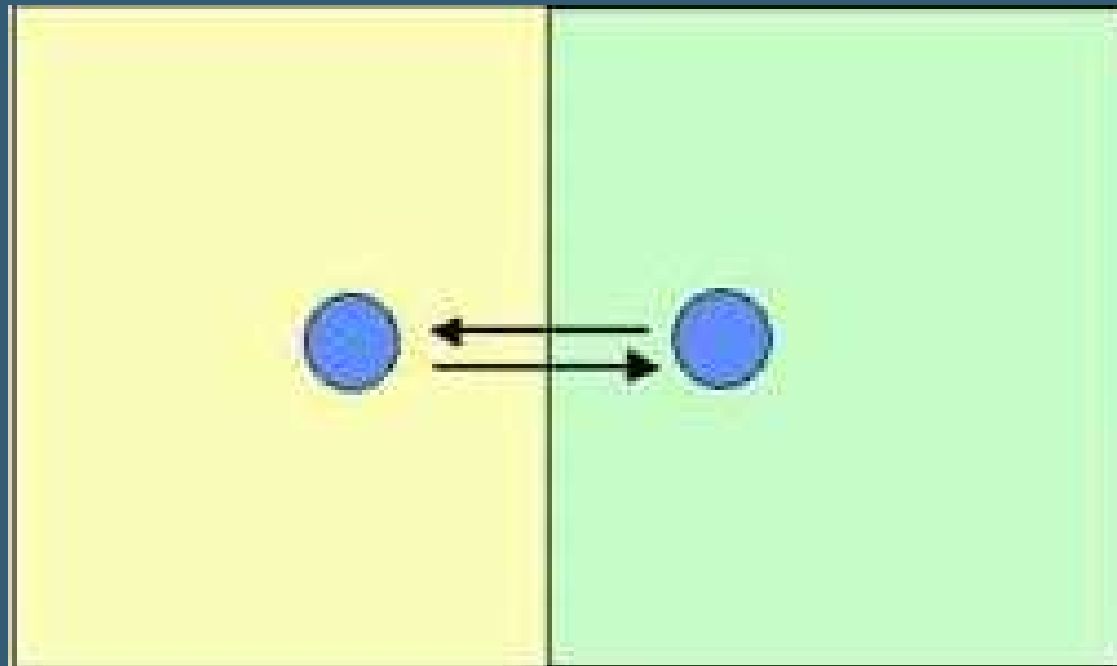
Rozdíly ve velikosti a tvaru molekul – **gelová permeační chromatografie**

SÍLY A EFEKTY VYUŽÍVANÉ PŘI SEPARACI

- **Sterické interakce**

Komplexní specifická interakce ligand biomakromolekula kombinující všechny výše uvedené interakce a efekty – **afinitní chromatografie**

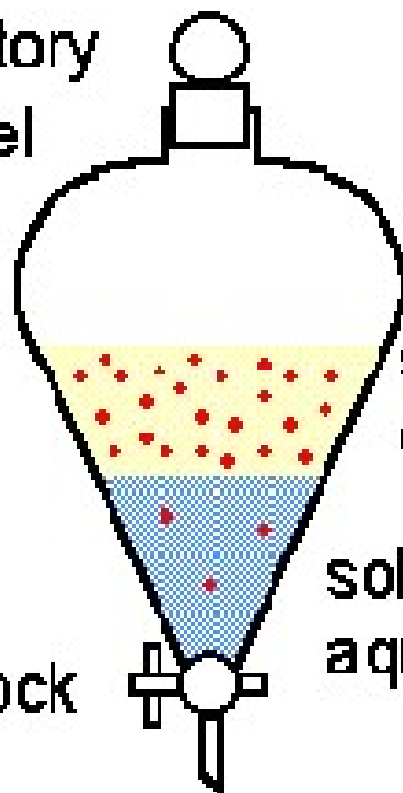
ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE



ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE

separatory
funnel

©1996 B. M. Tissue
www.scimedial.com

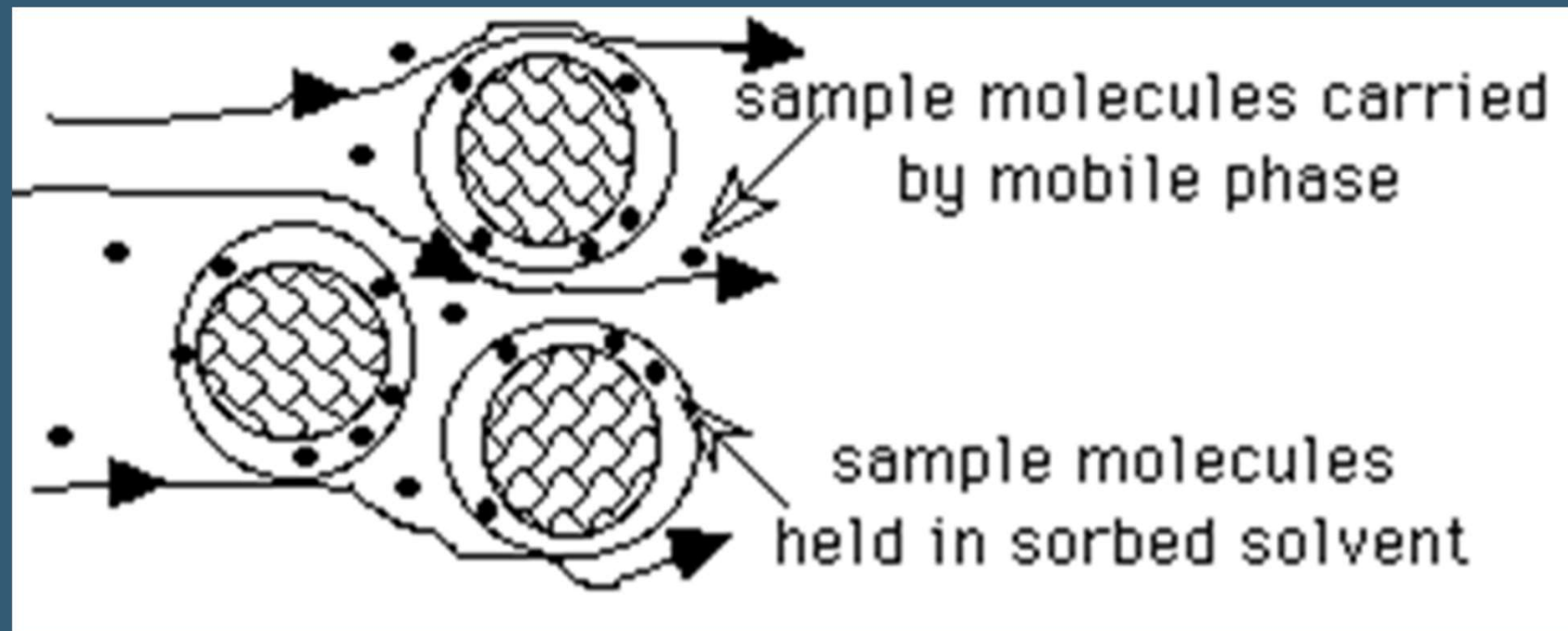


solute in
organic phase

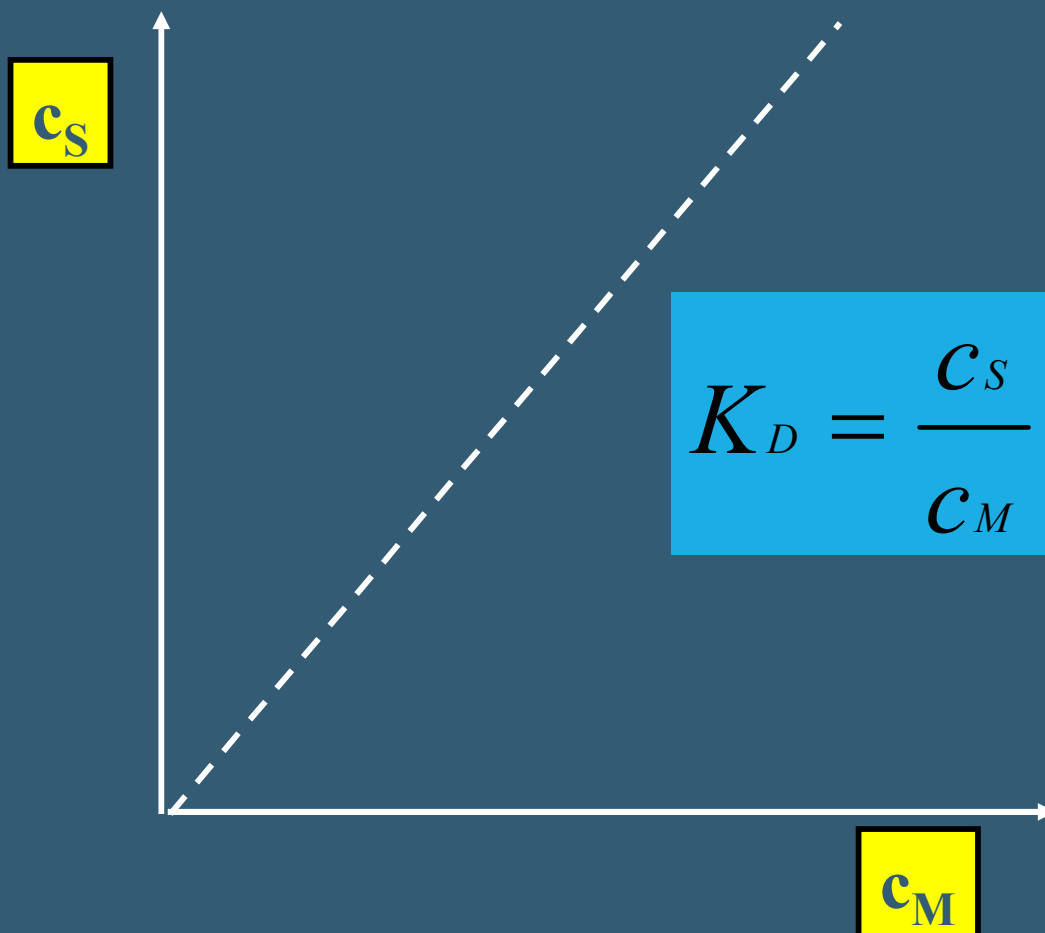
stopcock

solute in
aqueous phase

ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE

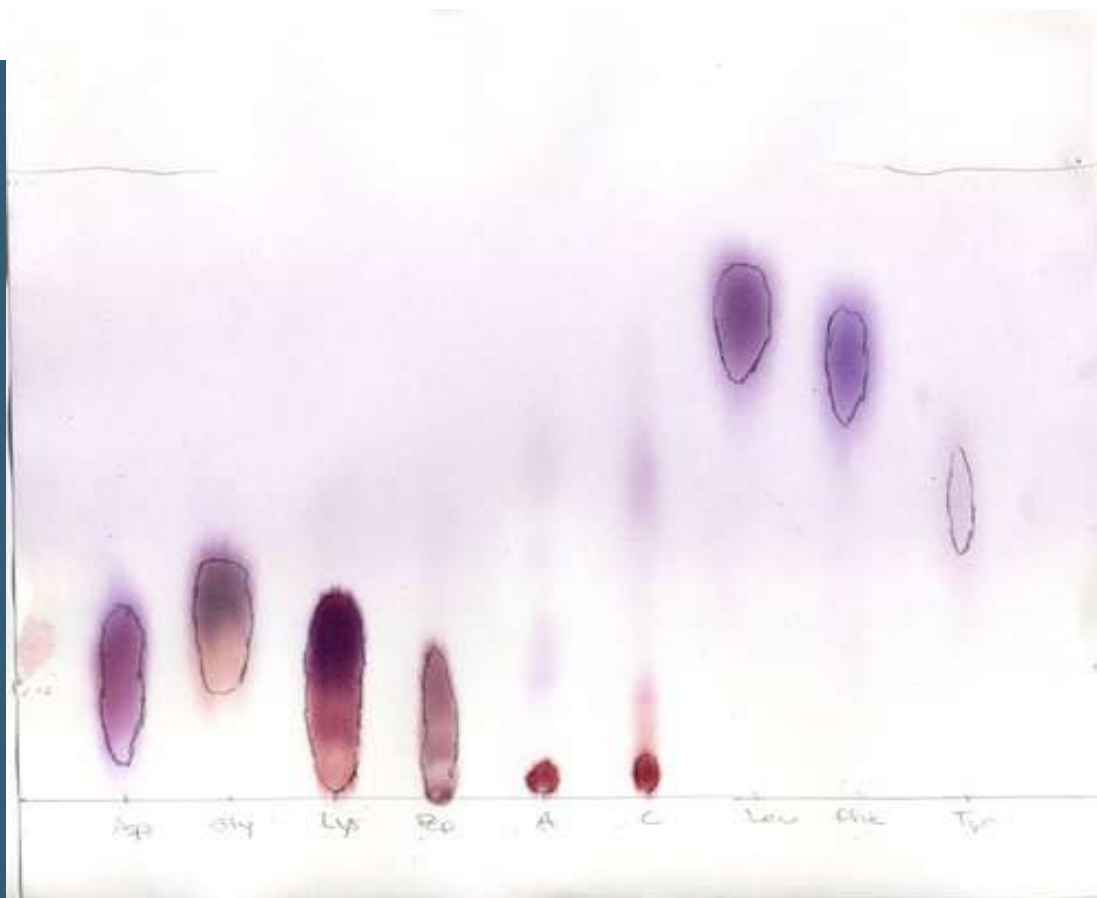


ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE



Použití – analytická PC, TLC

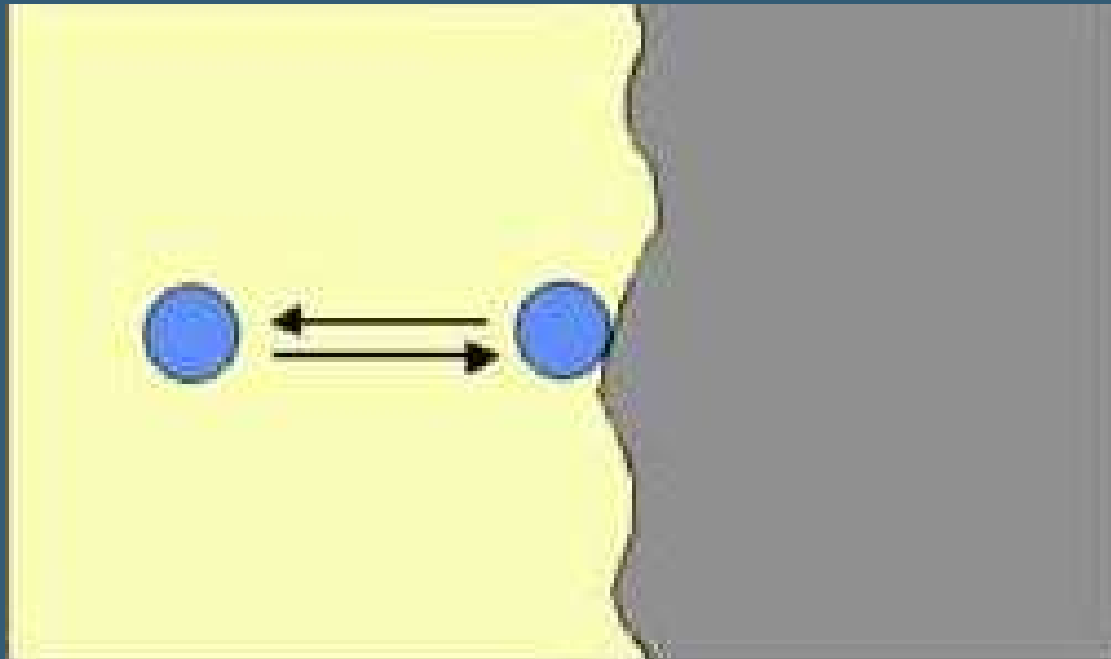
PAPÍROVÁ CHROMATOGRAFIE AMK



- stacionární fáze: voda
- mobilní fáze: butanol-kyselina octová-voda (12:3:5)

ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

CHROMATOGRRAFIE S NORMÁLNÍMI FÁZEMI



ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

- Stacionární fáze – polární

nese aktivní centra, jejich počet, rozložení a schopnost poutat molekuly rozdělované směsi závisí na charakteru adsorbentu, velikosti povrchu a na vlastnostech separovaných látek

ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

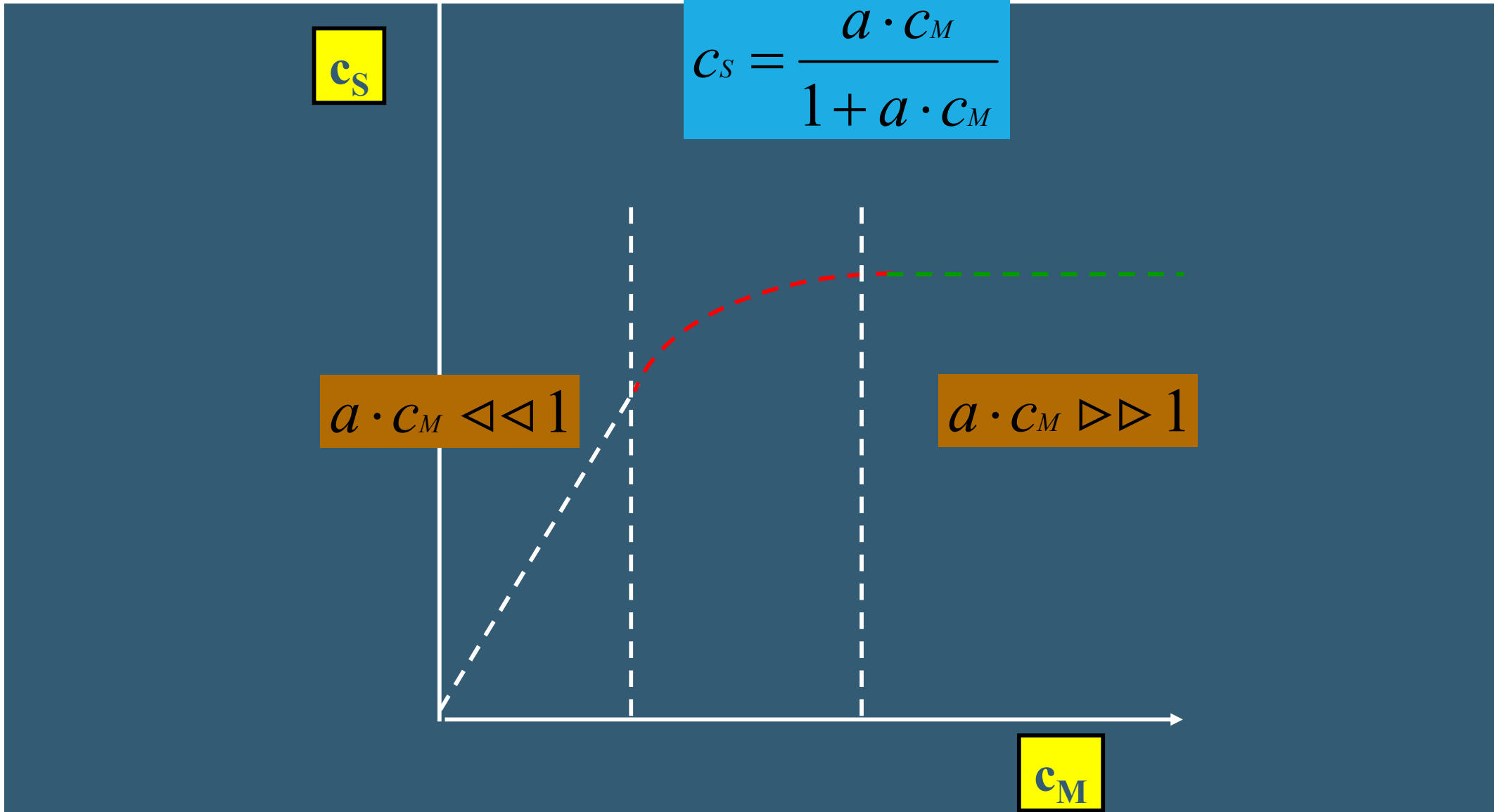
c_s

$$c_s = \frac{a \cdot c_M}{1 + a \cdot c_M}$$

$a \cdot c_M \lll 1$

$a \cdot c_M \ggg 1$

c_M



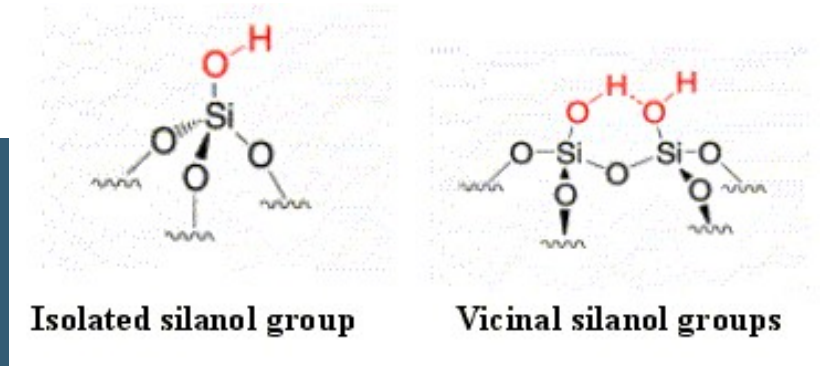
ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

• Stacionární fáze

Silikagel $\text{SiO}_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$

Vysoký specifický povrch a relativně velký objem pórů. Hlavní součástí aktivních center jsou **hydroxylové (silanolové) skupiny**, na něž je vodíkovou vazbou adsorbována voda. Zahřátím na $150\text{ }^\circ\text{C}$ dojde k odstranění vody ® “aktivace silikagelu”. Labilní nad $\text{pH } 8$. $> 200\text{ }^\circ\text{C}$ rozklad.

Adsorpce: interakce se silanolovými skupinami; povrch silikagelu je slabě kyselý (má protondonorní vlastnosti). Lépe jsou zadržovány bazické látky.



ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

- Stacionární fáze

Oxid hlinitý Al_2O_3 ,

Obdobné vlastnosti jako u silikagelu (povrch, póry). Vyskytuje se v řadě modifikací, dle množství vázané vody, krystalické struktury. “Aktivace” vysušením $[\text{Al}(\text{OH})_3 \rightleftharpoons \text{AlO}(\text{OH}) \rightleftharpoons \text{Al}_2\text{O}_3]$.

Při vysokém obsahu vody (15%) se projevují rozdělovací efekty. Vedle protodonorních hydroxylů se na povrchu vyskytují i centra s protonakceptorními vlastnostmi.

ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

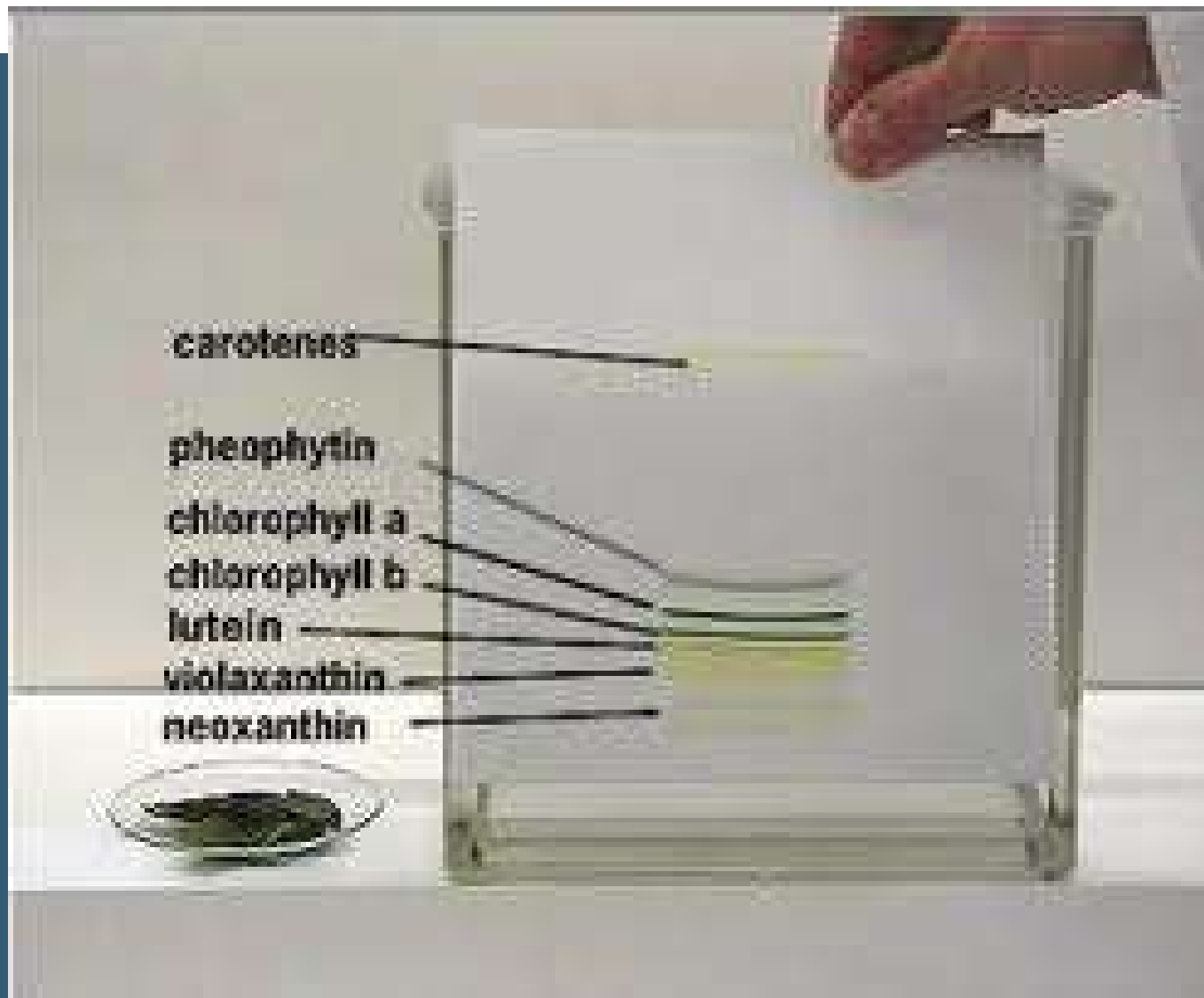
- Mobilní fáze – nepolární
- Eluce - zvyšováním polaritý mobilní fáze

Eluotropická řada:

uhlovodíky < subst. uhlovodíky < ketony <

aldehydy < alkoholy < voda

ADSORPČNÍ CHROMATOGRAFIE CHLOROFLYLŮ



ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

- Stacionární fáze

Hydroxyapatit [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$]

připravuje se z $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.
Jemná sraženina fosfátu vápenatého se vaří s 1% NaOH při 96-98°C.

Při interakci polární až iontové síly. Karboxylové skupiny bílkovin či fosfátové skupiny nukleových kyselin reagují s Ca^{2+} na povrchu adsorbentu. Eluce se provádí gradientem iontové síly - rostoucí koncentrací fosfátu.

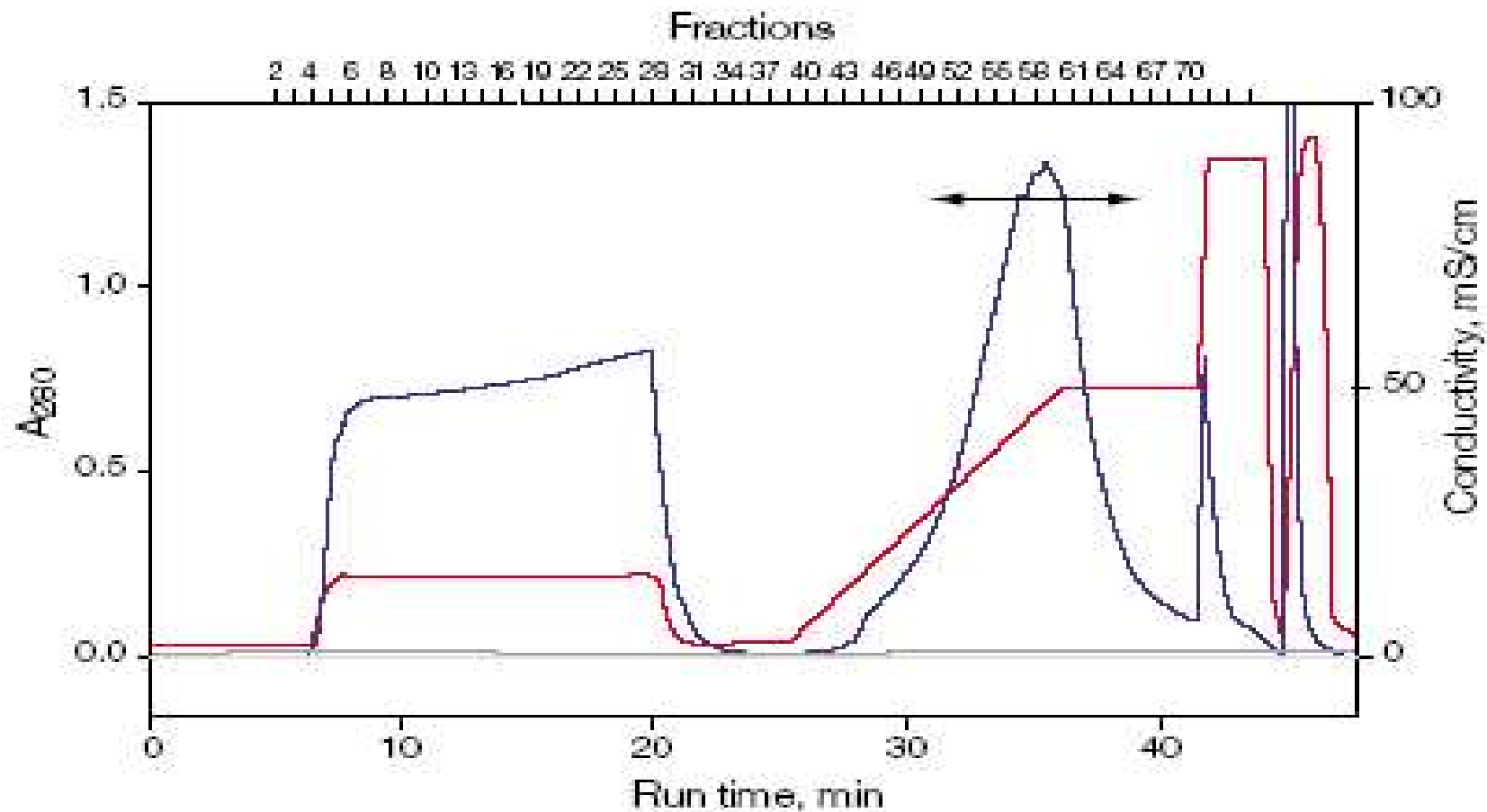


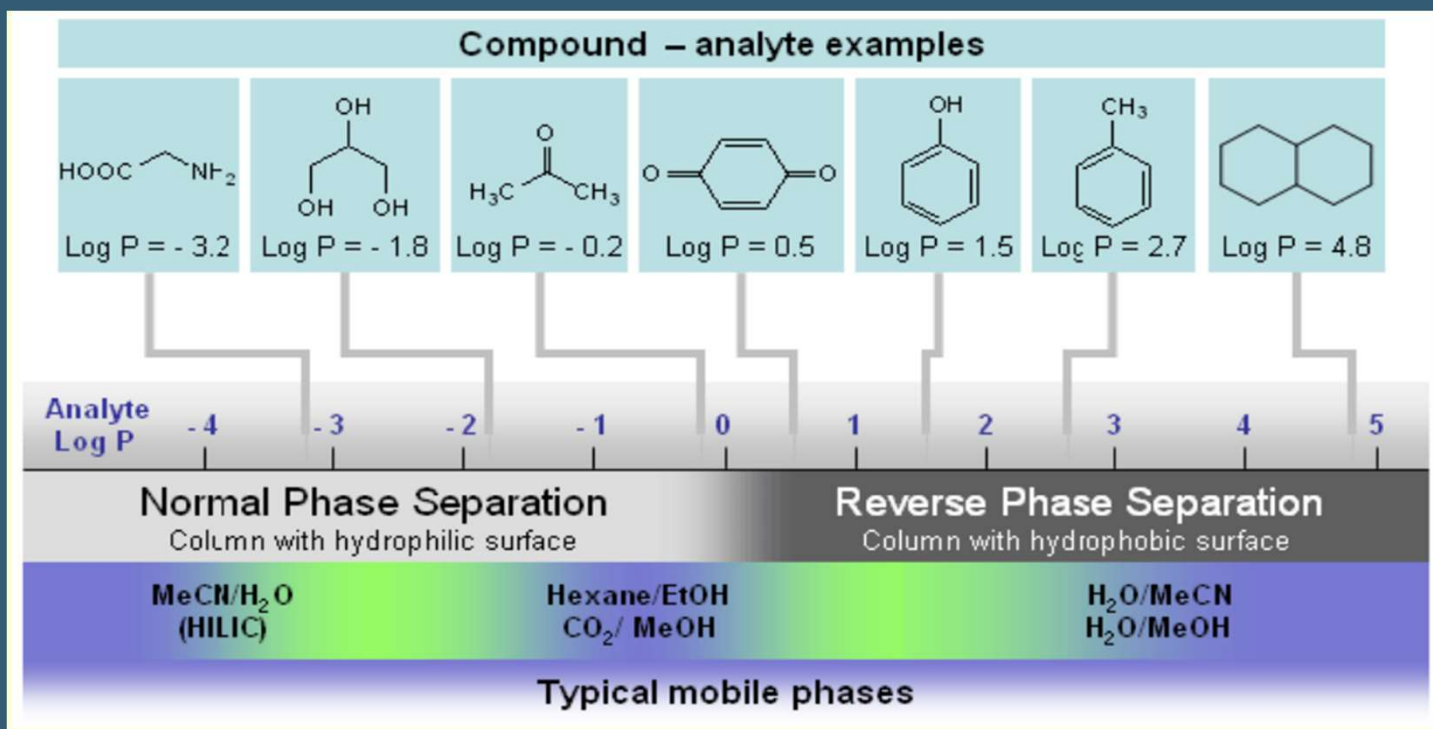
Fig. 1. Chromatogram of murine IgG₁ purification on the UNOsphere S column during small-scale process development. Diluted cell culture (20 ml) was loaded onto an UNOsphere S 0.7 x 5 cm column at a flow rate of 600 cm/hr in 20 mM phosphate-citrate buffer, pH 4.0. The sample was eluted in 10 column volumes (CV) of a 0–0.5 M NaCl gradient, followed by 5 CV of 1 M NaCl in the same buffer. The column was then cleaned in 1 M NaOH. The double-headed arrow indicates the fractions (1 ml each) containing IgG₁ (see Figure 2). Blue trace, A₂₈₀; red trace, conductivity profile.

HILIC CHROMATOGRAFIE

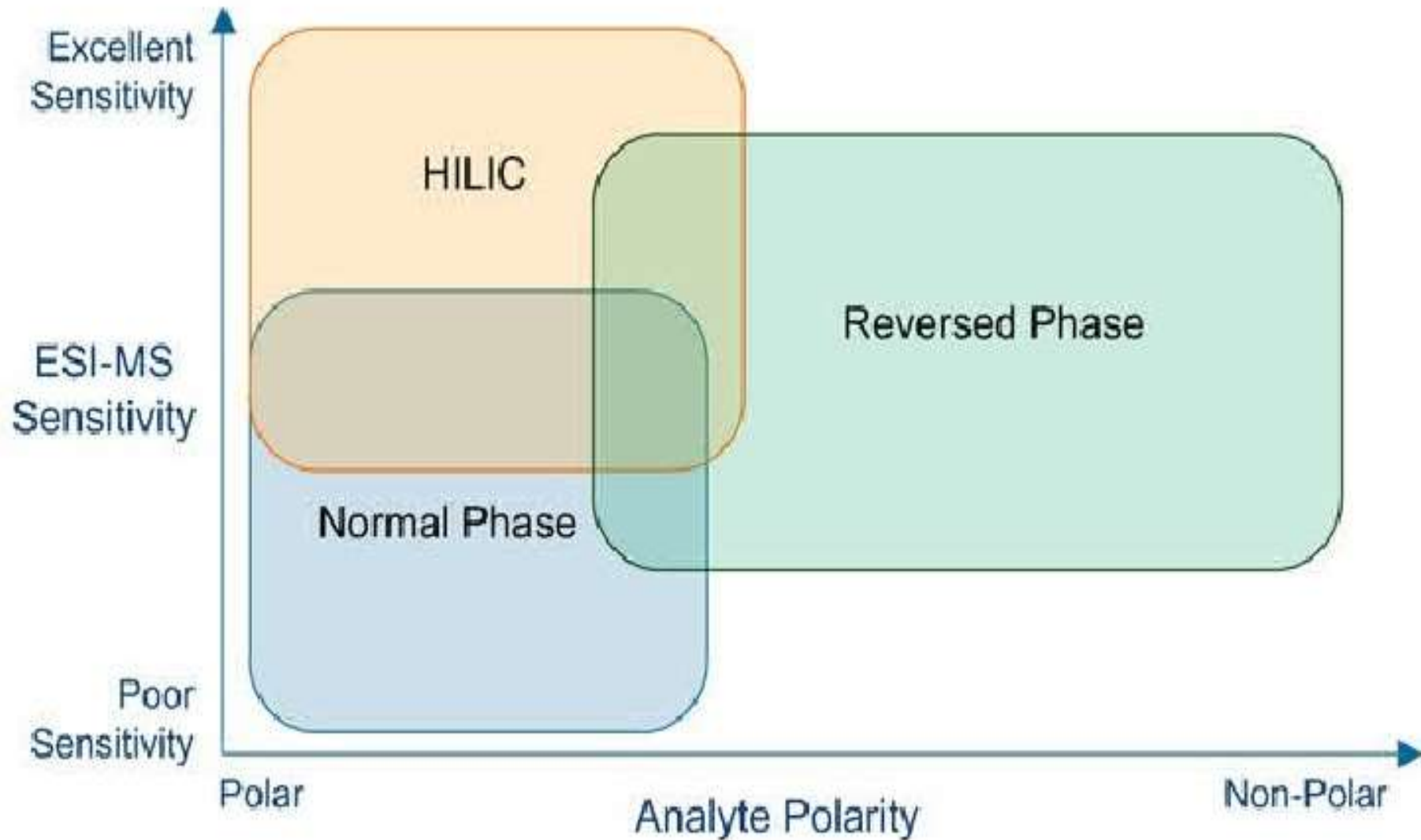
Hydrophilic Interaction Chromatography (1990)

varianta chromatografie s normálními fázemi používající organická rozpouštědla mísitelná s vodou

retence analytu se zvyšuje společně s jeho polaritou a naopak snižuje s rostoucí polaritou (koncentrací vodné složky) mobilní fáze



HILIC CHROMATOGRAFIE



HILIC CHROMATOGRAFIE

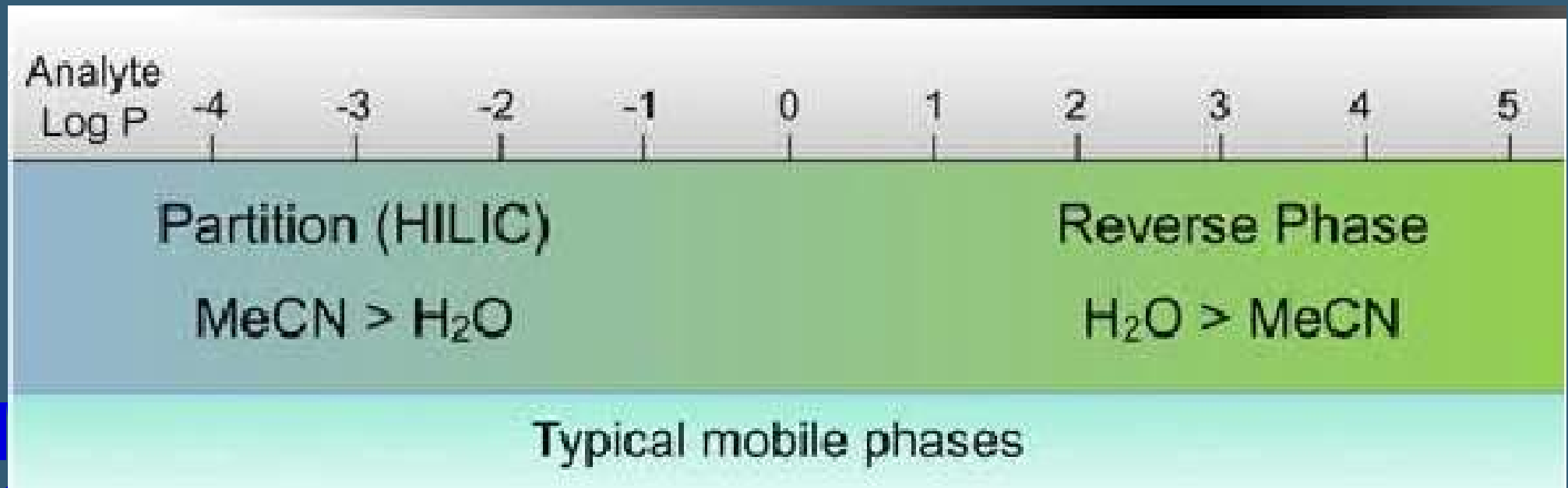
• Stacionární fáze

polární - silikagel,
kyano, amino, diol,
zwitterionty etc.

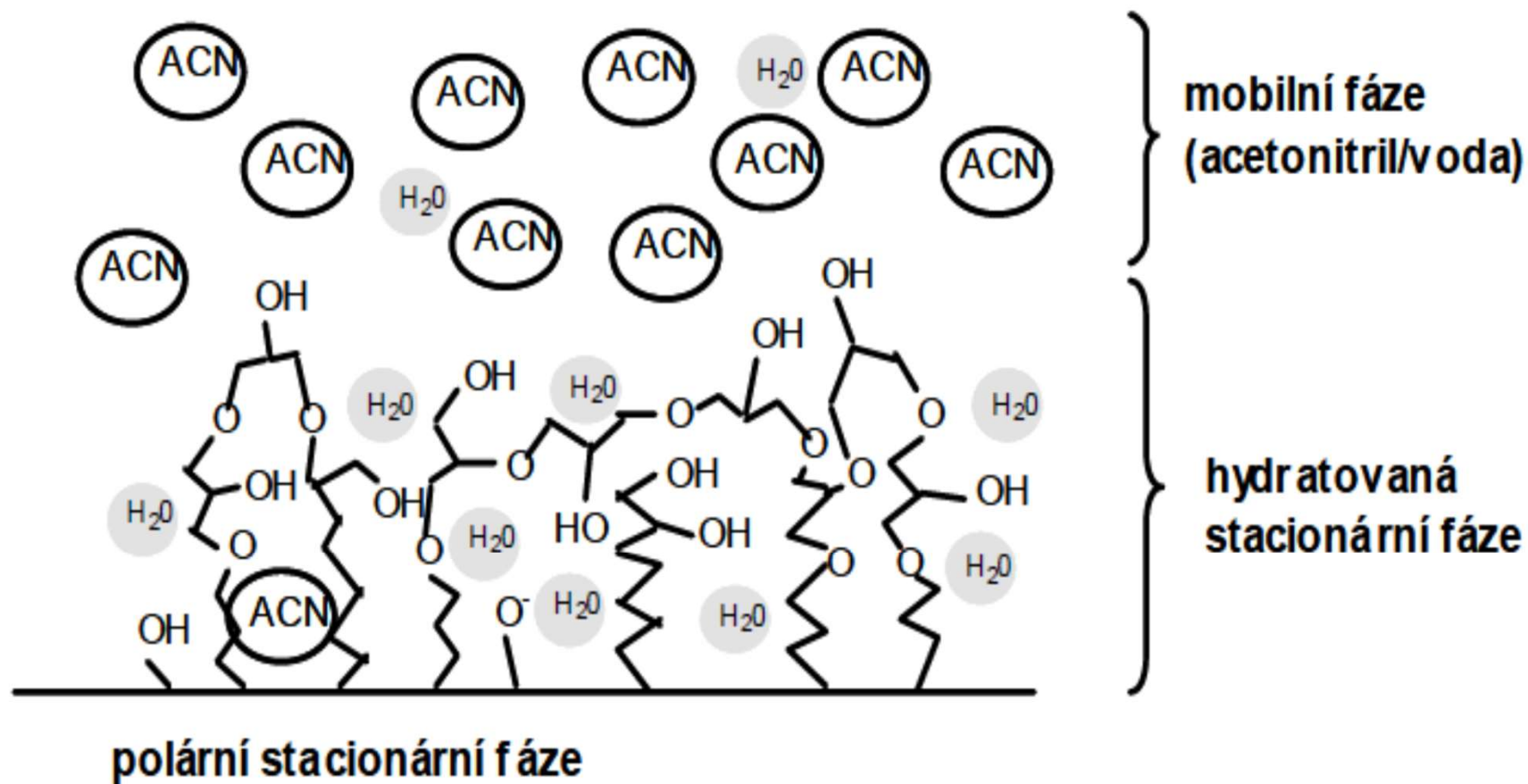
stacionární fáze	chemická struktura
a.	
silikagel	$-\text{OH}$
kyanopropyl	$-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$
aminopropyl	$-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
diol	$-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{OH}$
b.	
PAC	$-(\text{CH}_2-\underset{\text{C}=\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{CH}}})_n$
c.	
ZIC	$-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{N}^{\oplus}}}-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3^{\ominus}$

HILIC CHROMATOGRAFIE

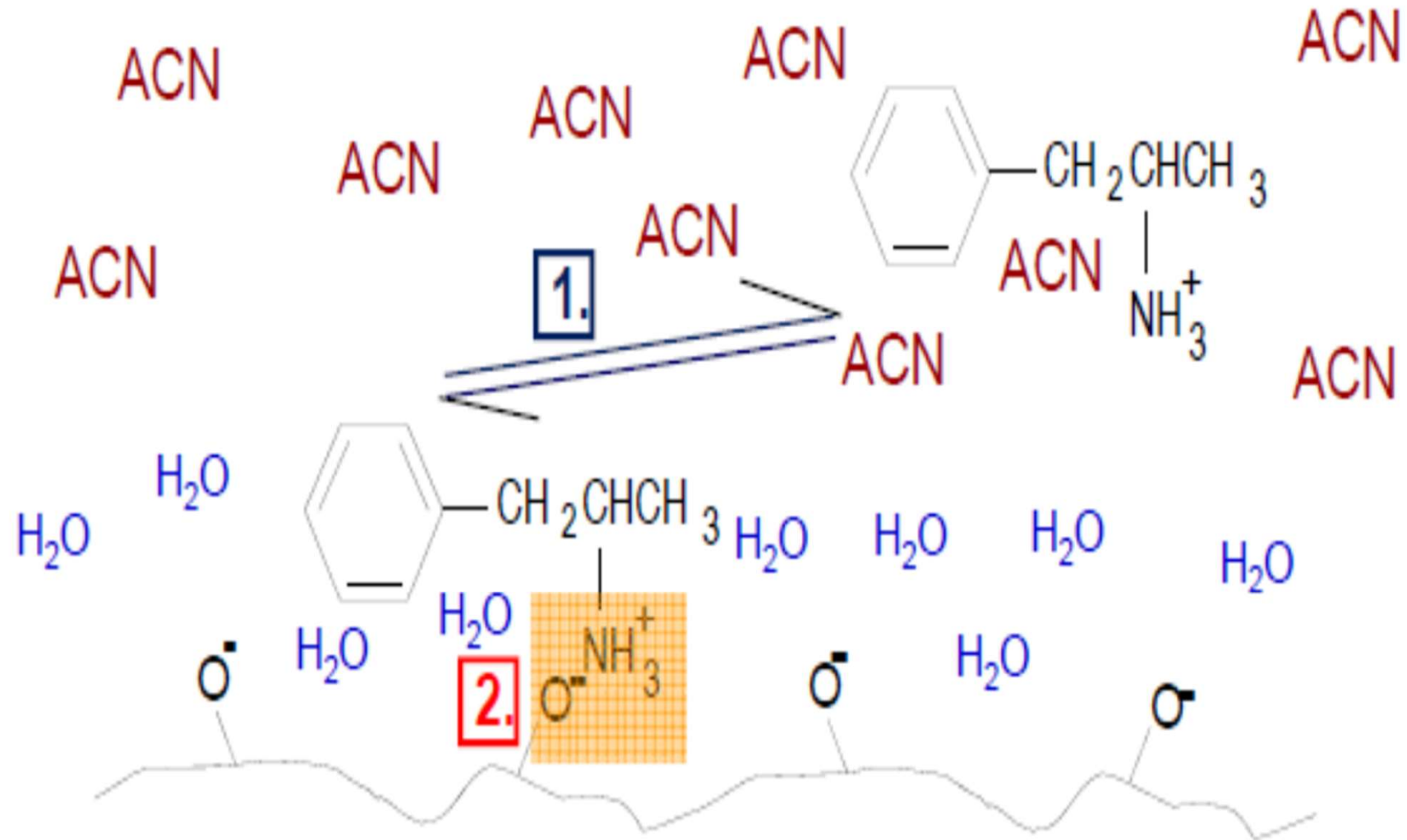
Velký obsah organického rozpouštědla ACN (> 80%) s malým množstvím vody nebo jiného polárního rozpouštědla



HILIC CHROMATOGRAFIE

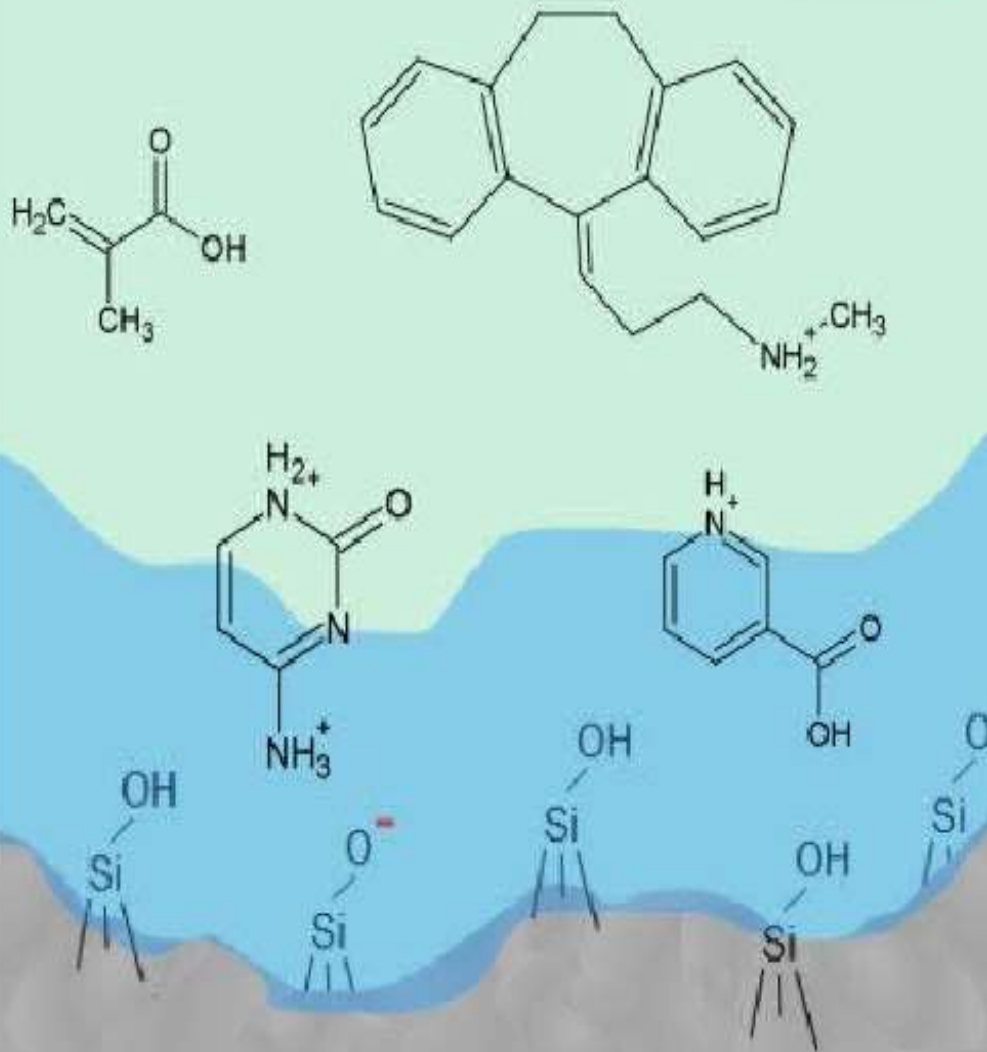


HILIC CHROMATOGRAFIE

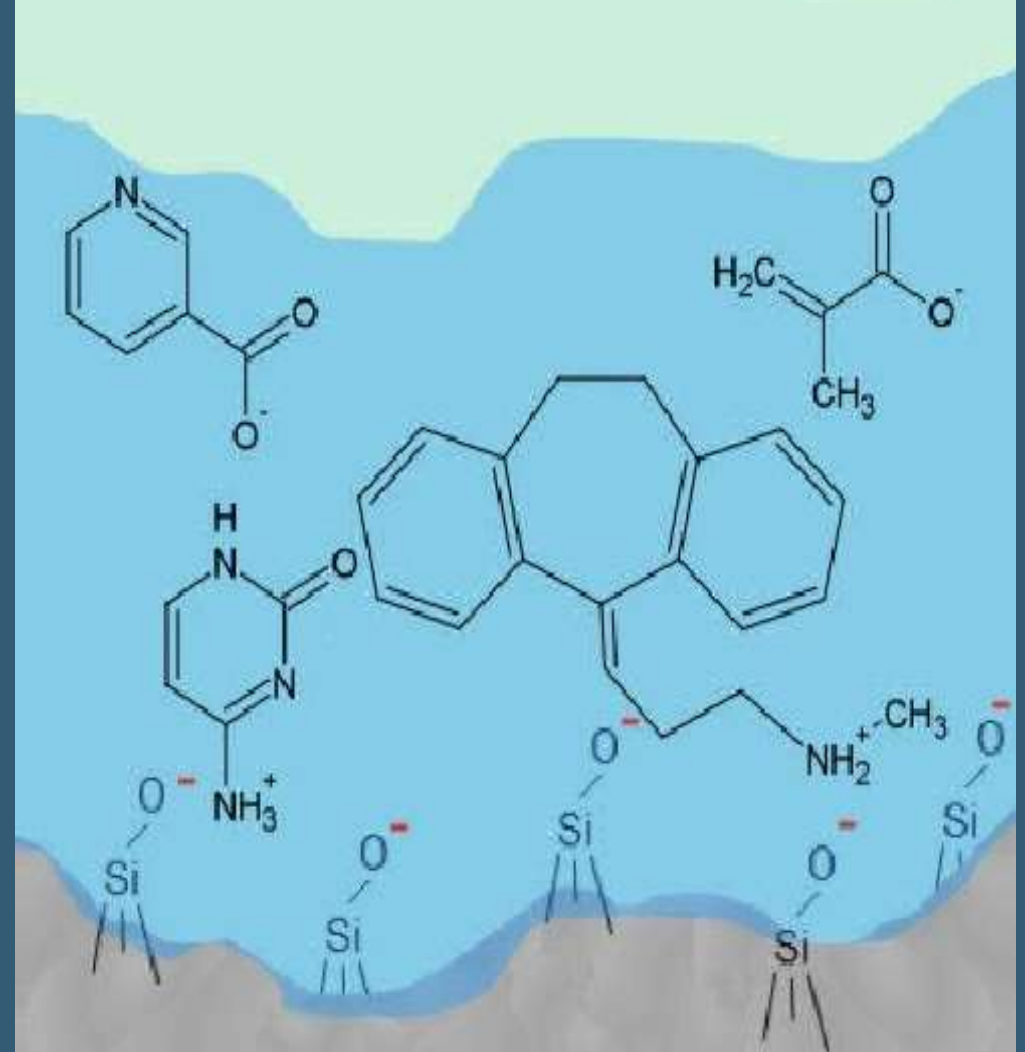


HILIC CHROMATOGRAFIE

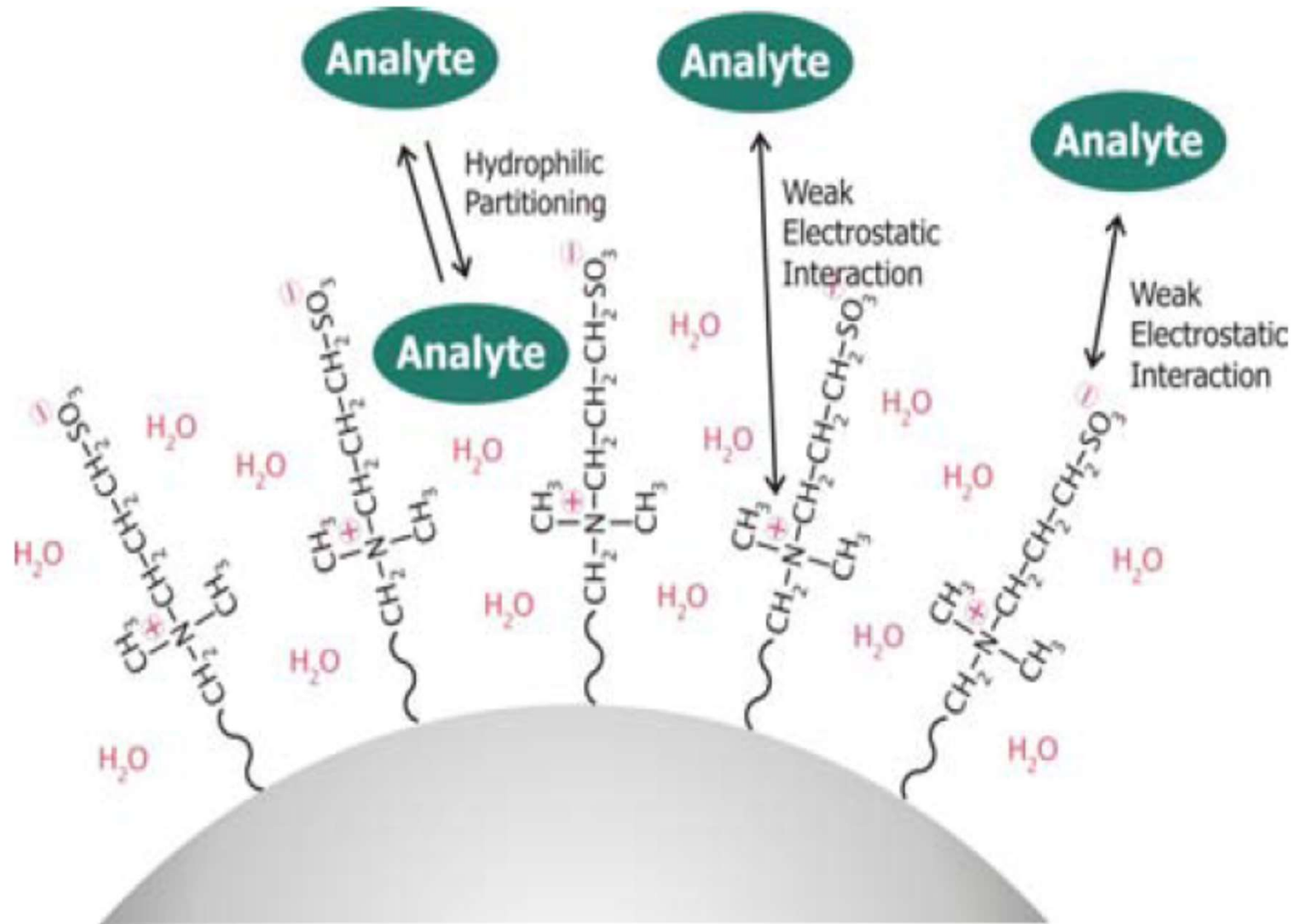
pH -3



pH -9



HILIC CHROMATOGRAFIE



HILIC CHROMATOGRAFIE

- **Nanášení vzorku** – vzorek rozpuštěn v mobilní fázi
- **Eluce** – zvyšováním polarity mobilní fáze

Dioxan>Aceton>ACN>THF>IPOH>EtOH>MetOH>H₂O

Použití : analýza polárních látek

HILIC CHROMATOGRRAFIE

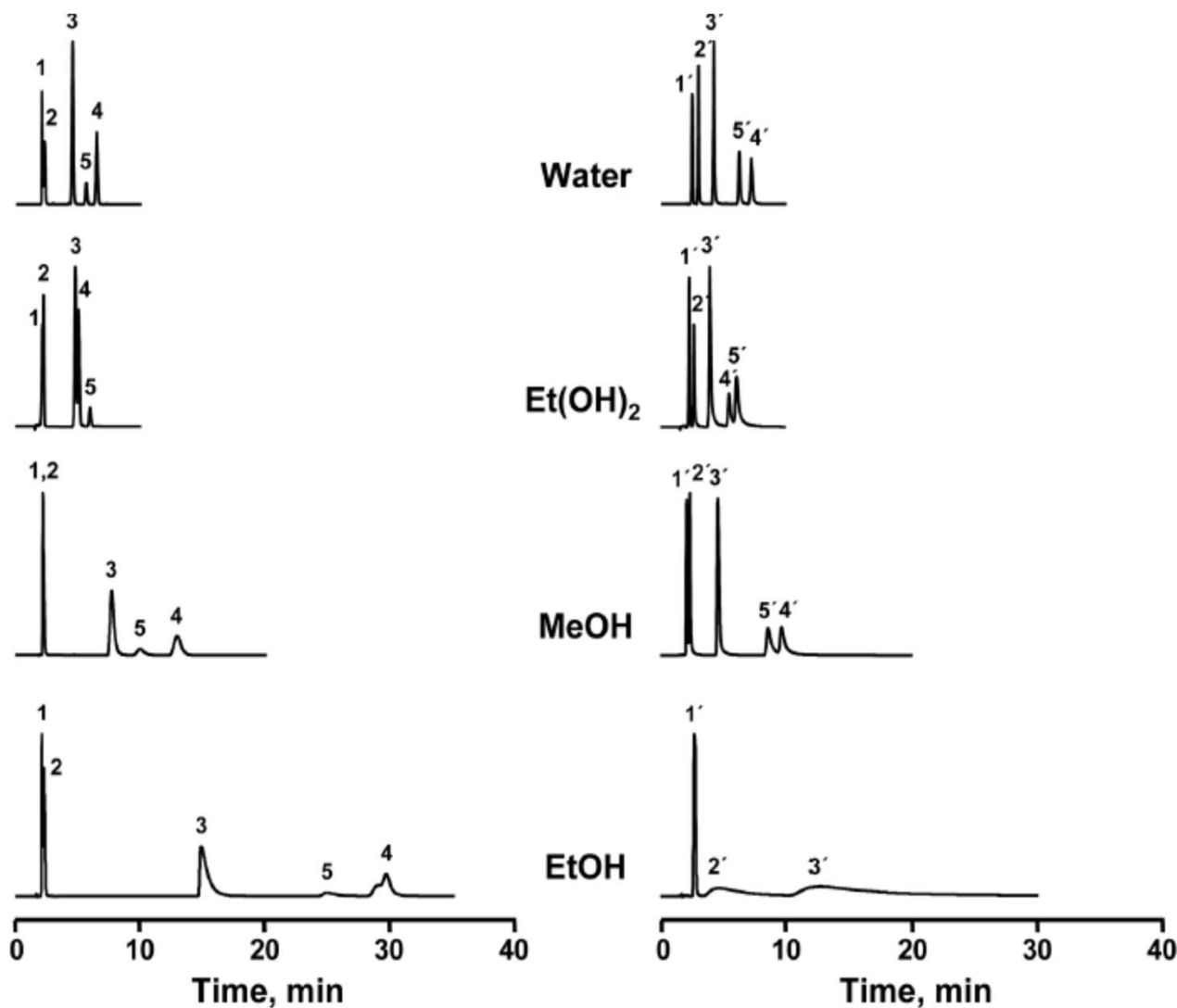
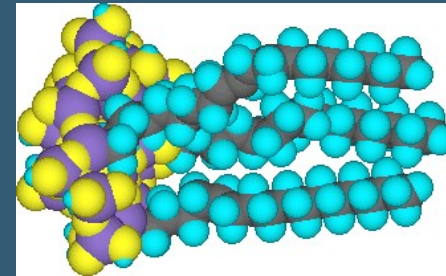


Figure 5. Separation of the sets of nucleobases and nucleosides on (a) the TG, (b) the TGO and (c) the bare silica (Daisogel) packing in AQ-HILIC (water as modifier) and NA-HILIC (Et(OH)₂, MeOH, EtOH as modifiers) elution mode. Mobile phase: 5 mM ammonium acetate in ACN/modifier (90:10 v/v). Further chromatographic details are given in Section 2. Analytes: (1) thymine, (2) uracil, (3) adenine, (4) cytosine, (5) guanine; (1') thymidine, (2') uridine, (3') adenosine, (4') cytidine and (5') guanosine.

REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE

- Stacionární fáze – nepolární

C_8, C_{18}



- Mobilní fáze – polární – vodné roztoky

pH → potlačit disociaci

- Eluce – snižováním polarity mobilní fáze

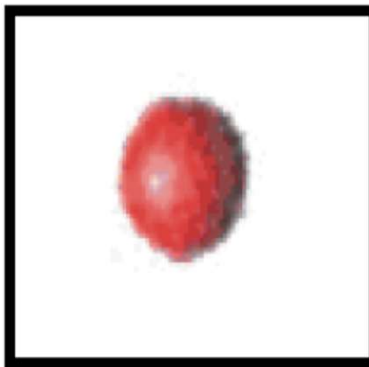
ACN, MetOH,

REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE



Silikagel

- poresní silika gel – zvýšení efektivního povrchu
- inertní materiál
- stabilní v pH 2-7,5



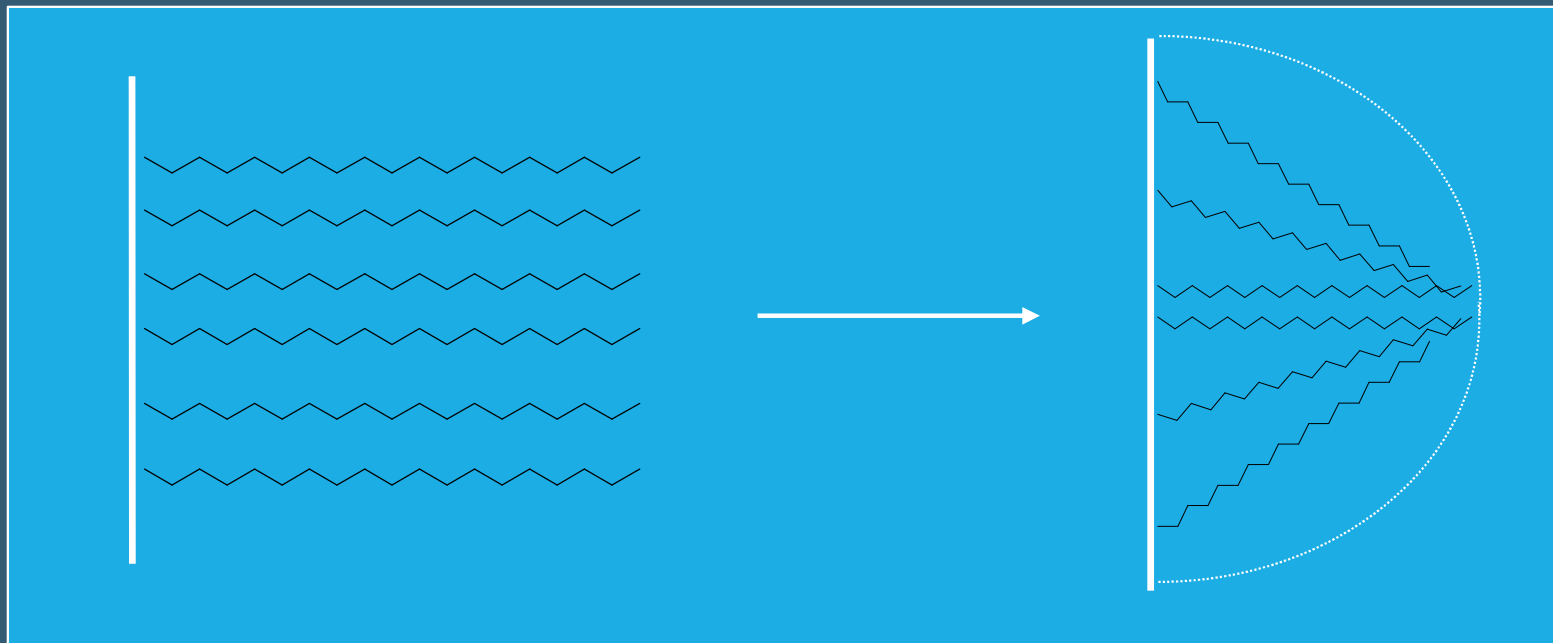
Polymerní nosič

- poresní polymer – zvýšení efektivního povrchu
- nepolární
- stabilní v pH 2-11

REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE

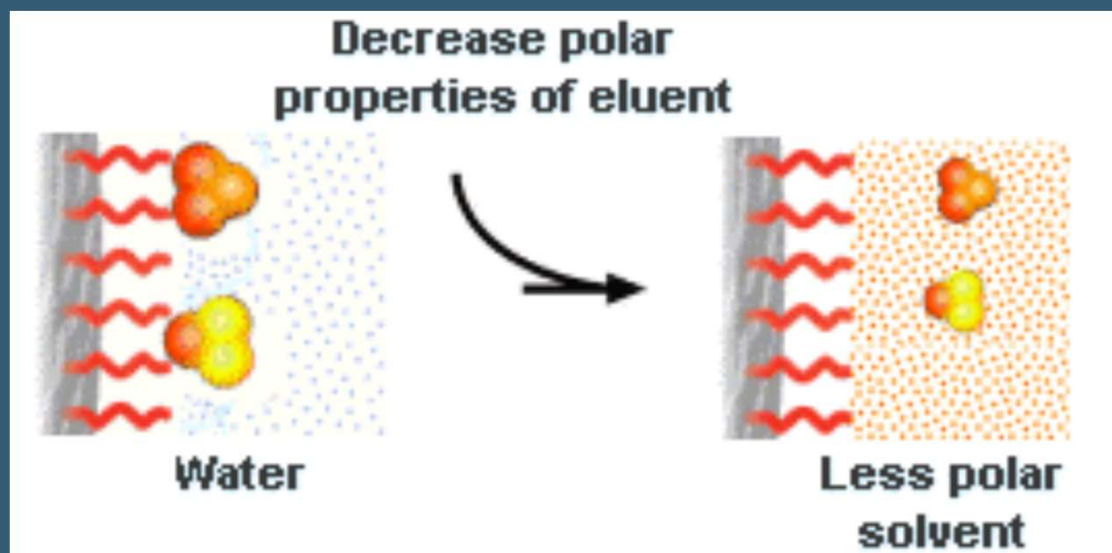
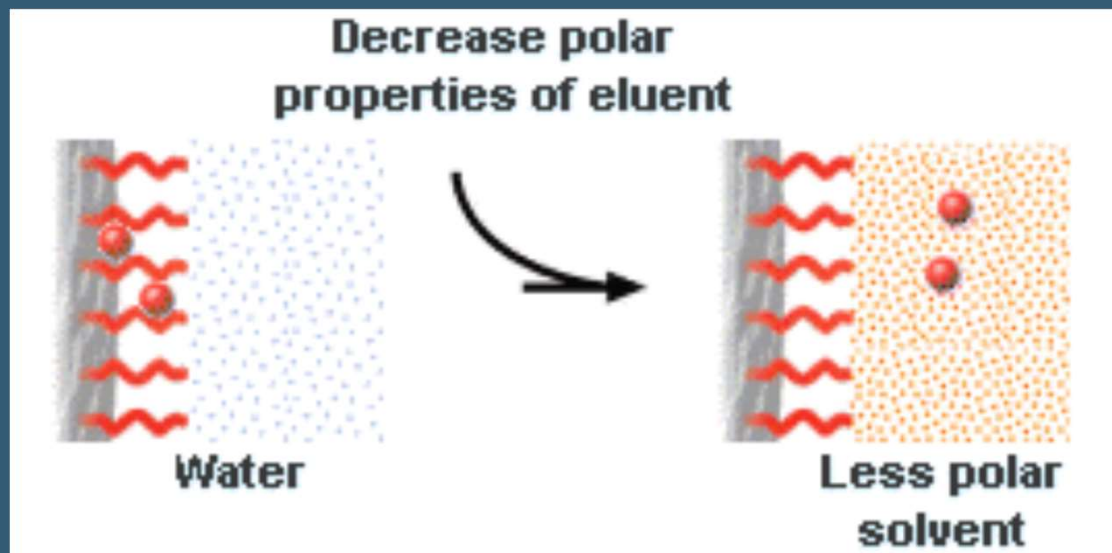
Kartáčový typ stacionární fáze

H₂O



Použití : analytické – až 90 % analýz

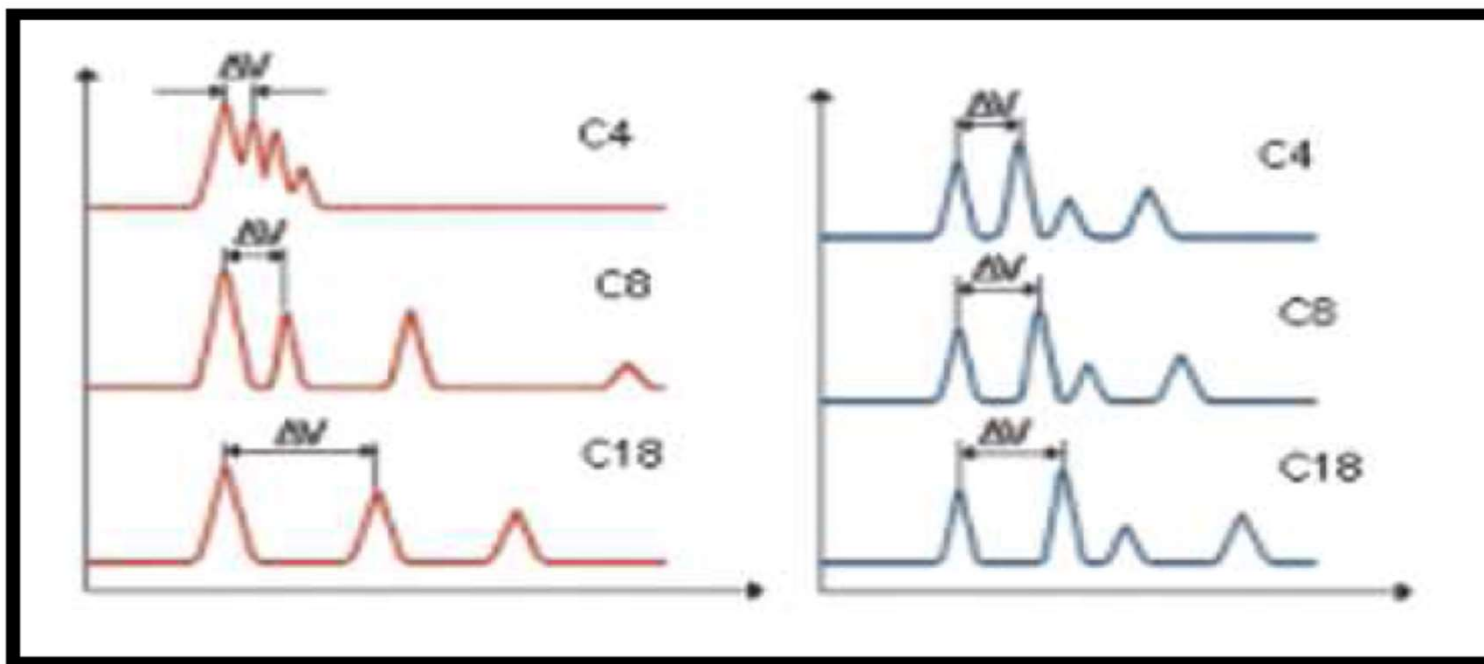
REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE



REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Vliv délky řetězce na rozlišení

hydrofobní
organické látky peptidy, proteiny



REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Organické rozpouštědlo	Vhodné pro:	Viskositata	Poznámka
Methanol	•Org. molekuly	Střední- nízká	možná destabilisa ce struktury
Ethanol	•Org. molekuly	Střední- nízká	možná destabilisa ce struktury
Isopropanol	•Proteiny •Peptidy	Vysoká	nejmenší efekt na strukturu
Acetonitril (ACN)	•Org. molekuly •Proteiny •Peptidy	Nízká	nízký efekt na strukturu

REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE

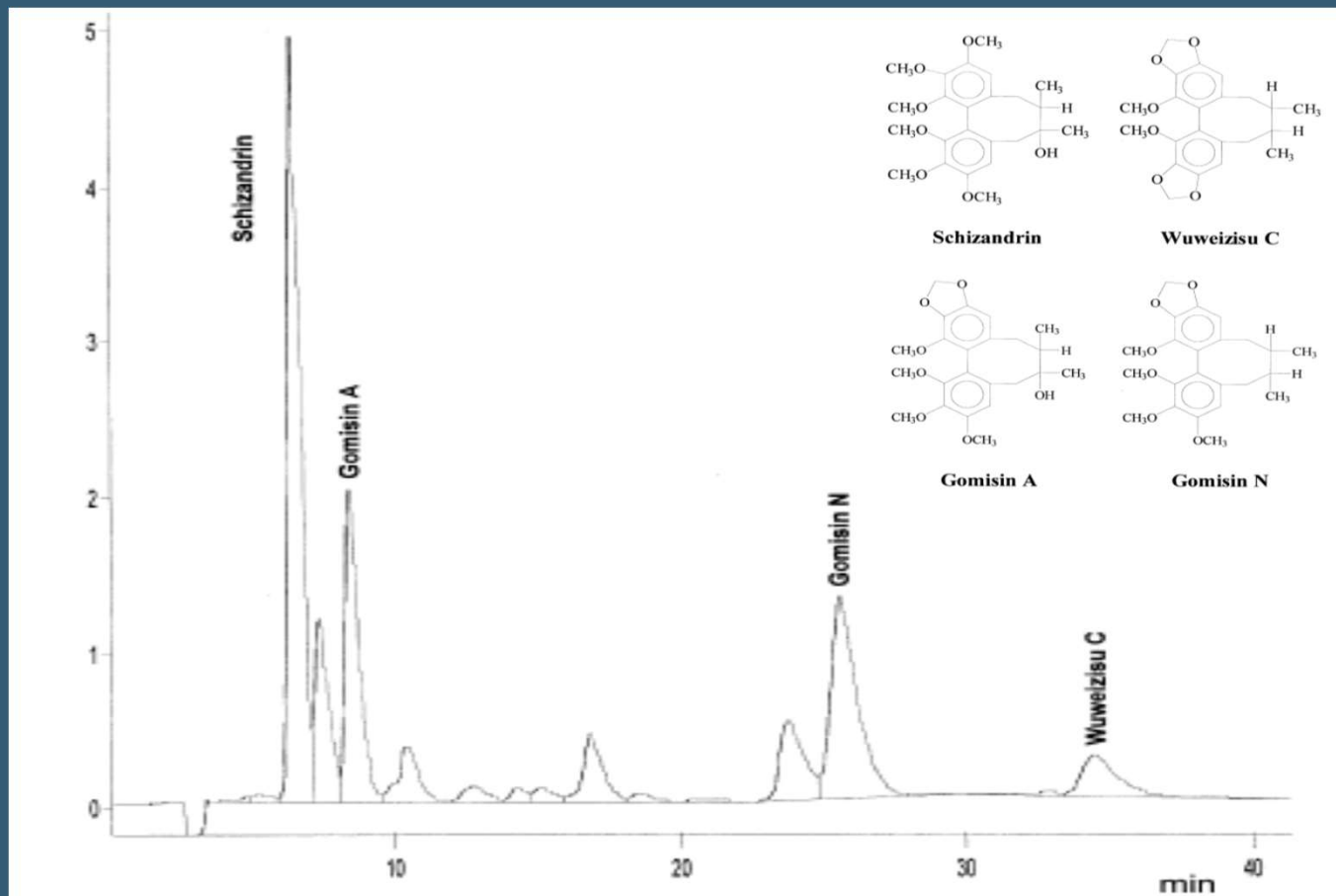


Fig. 5. HPLC analysis of *Schisandra* extract. Experimental conditions: column, Separon SGX C₁₈ 5 μm, 150×3 mm I.D.; mobile phase, methanol–deionised water (75:25); flow-rate, 0.3 ml/min; detection at 254 nm. Twenty μl of *Schisandra* extract were loaded on the column.

IONTOVĚ PÁROVÁ CHROMATOGRRAFIE

iontově párující činidlo

analyt



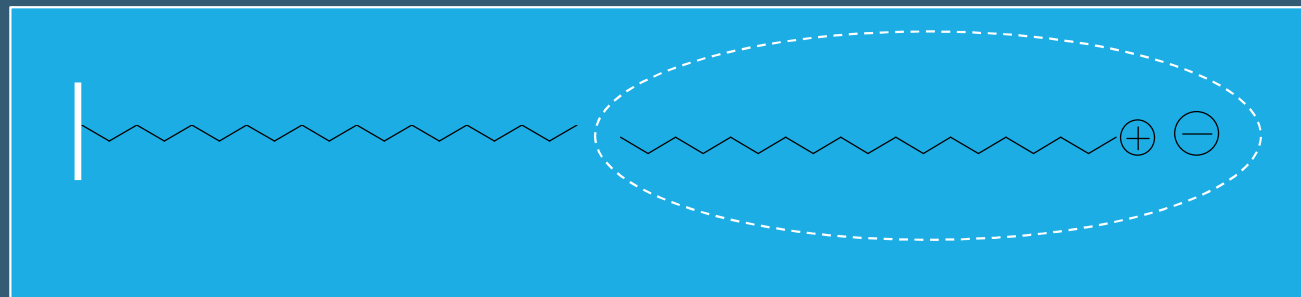
+ - SDS, HClO_4

- - tetrabutylamonium

IONTOVĚ PÁROVÁ CHROMATOGRRAFIE

sorbent C₁₈

iontový pár



Stacionární, mobilní faze, eluce – RPC

pH → plná ionizace analytu

IONTOVĚ PÁROVÁ CHROMATOGRAFIE

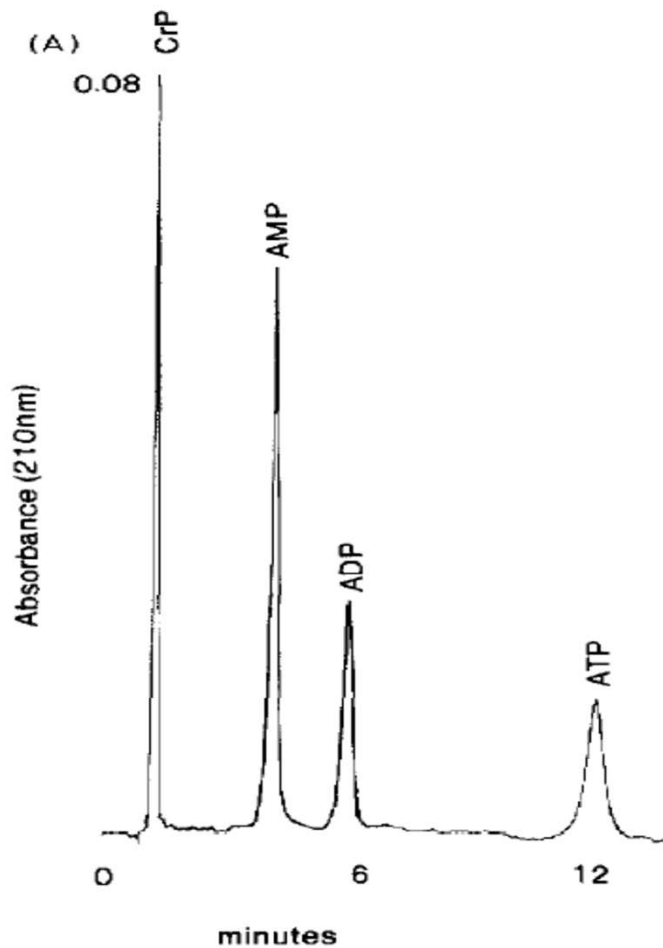


Fig. 1. Chromatogram of standards. Separation of standard containing $76.4 \mu\text{M}$ CrP, $72 \mu\text{M}$ AMP, $58.53 \mu\text{M}$ ADP and $45.35 \mu\text{M}$ ATP. Injection volume: $10 \mu\text{l}$. Flow-rate: 2 ml/min . Buffer: $0.52 \mu\text{M}$ potassium dihydrogen phosphate, 0.04% TBAP and 1.25% methanol, pH 4.0. Column: Supelcosil LC-18, $5 \mu\text{m}$ ($25 \text{ cm} \times 0.46 \text{ cm}$). Detection: UV 210 nm.

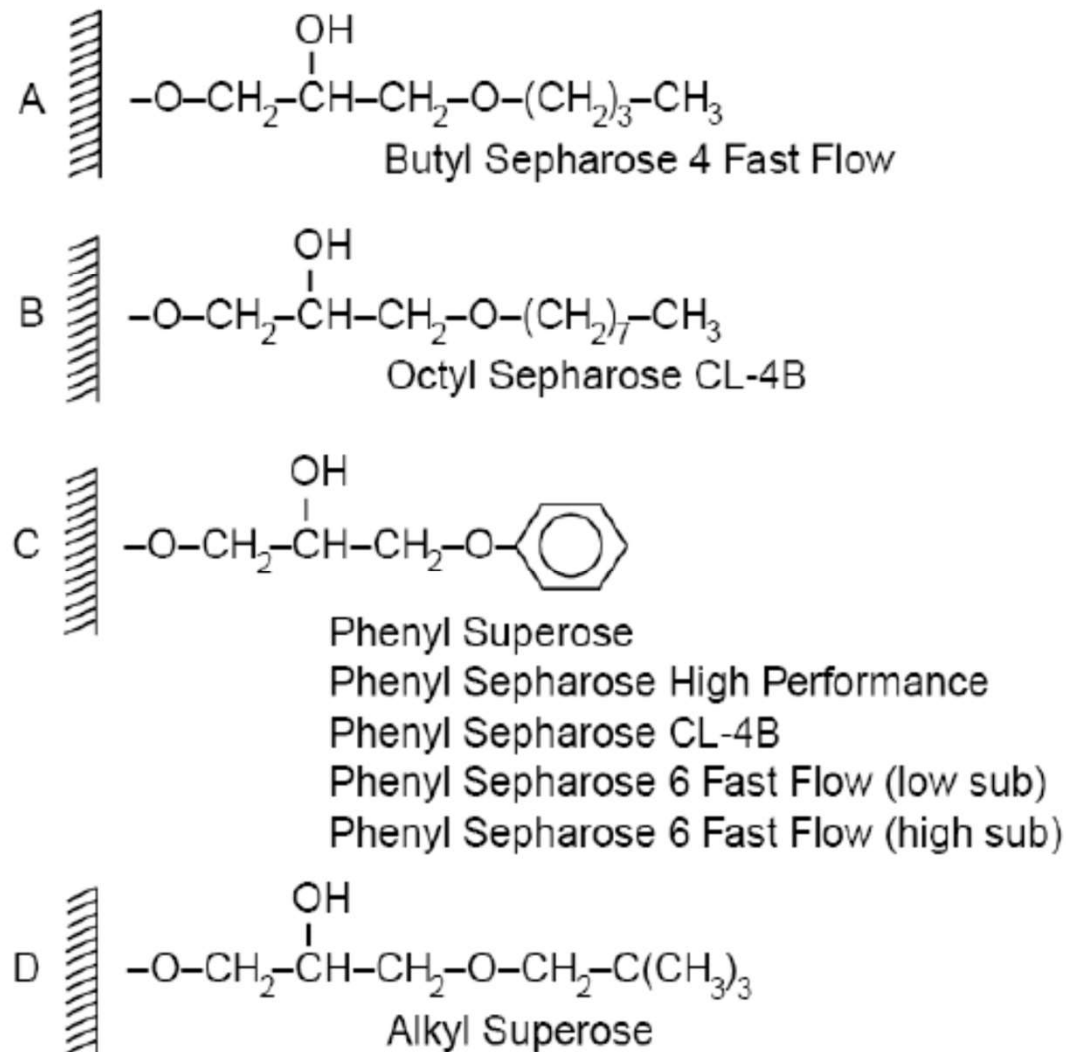
HYDROFOBNI CHROMATOGRRAFIE

- Stacionární fáze – $-C_{4'}$, $-C_{8'}$, -fenyl
- Mobilní fáze – vodné roztoky (pufry)
 $1.7 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Eluce – snižováním iontové síly

Použití : purifikace bílkovin

HYDROFOBNÍ CHROMATOGRRAFIE

▪ Stacionární fáze –



MUNI

Isopropyl < Butyl < Octyl < Phenyl

HYDROFOBNÍ CHROMATOGRAFIE

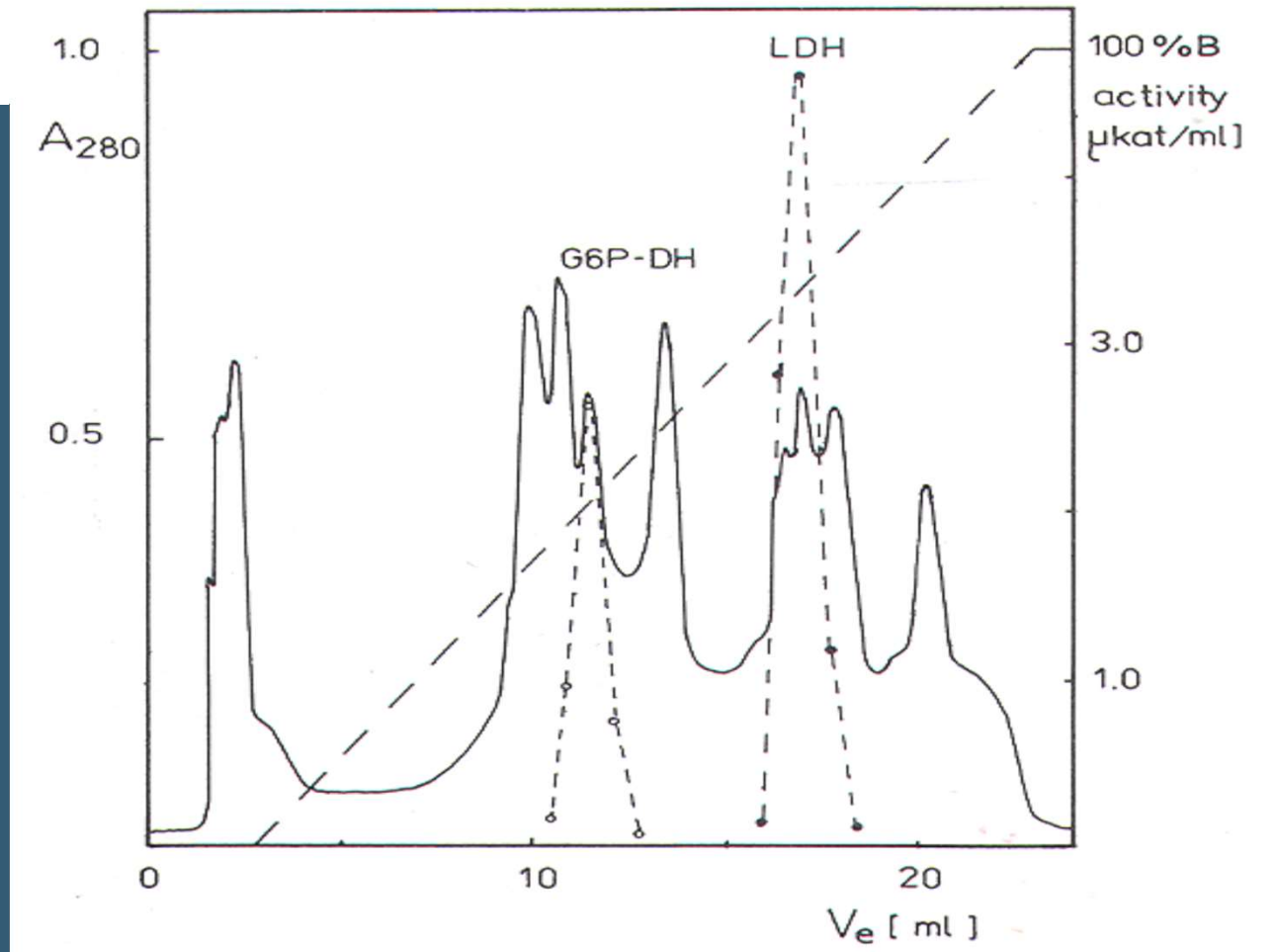


Fig. 1. Chromatography of crude enzyme preparation on a Phenyl-Superose column. Buffers: (A) 0.05 *M* sodium phosphate (pH 7.4) with 1.7 *M* sodium sulphate and 1 *mM* EDTA; (B) 0.05 *M* sodium phosphate (pH 7.4); flow-rate, 0.5 ml/min. V_e , elution volume; solid line, absorbance at 280 nm (A_{280}); dashed lines, gradient; (○) G6P-DH activity; (●) LDH activity. Approximately 10 mg of protein were applied to the column.

HYDROFOBNI CHROMATOGRRAFIE

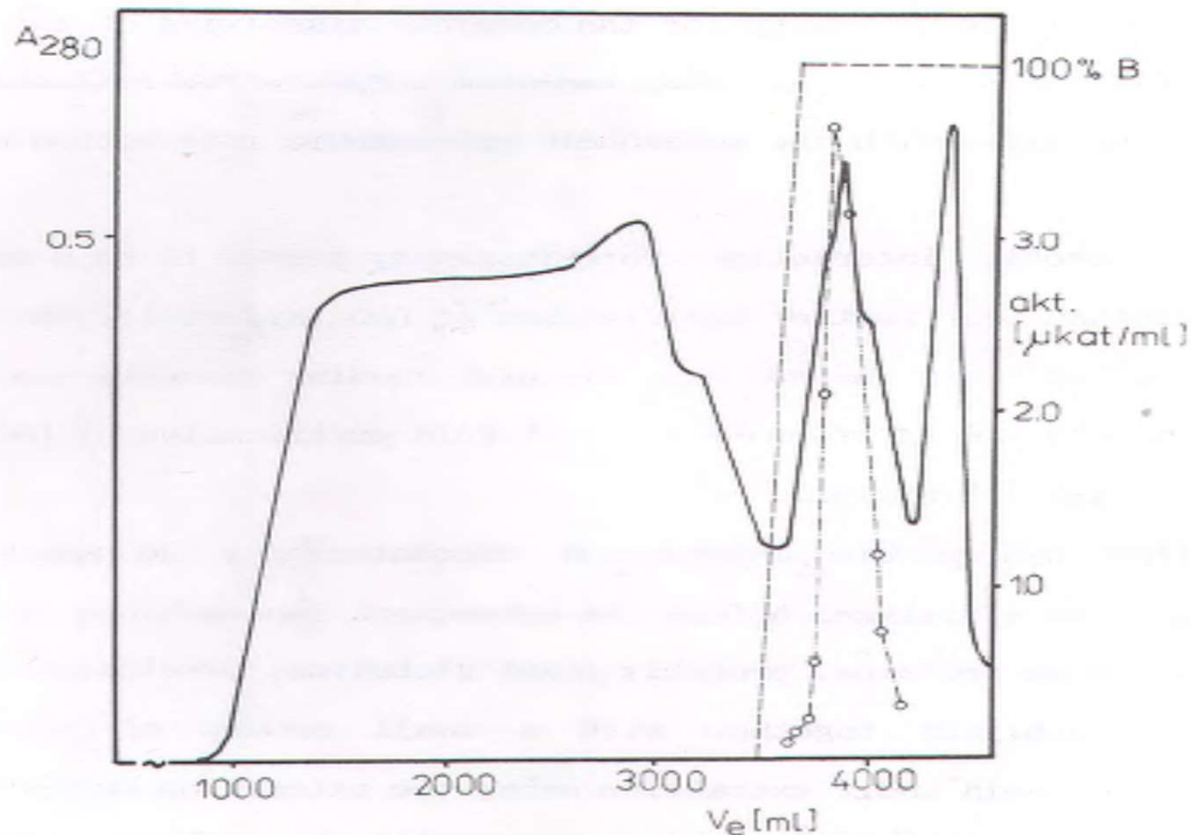
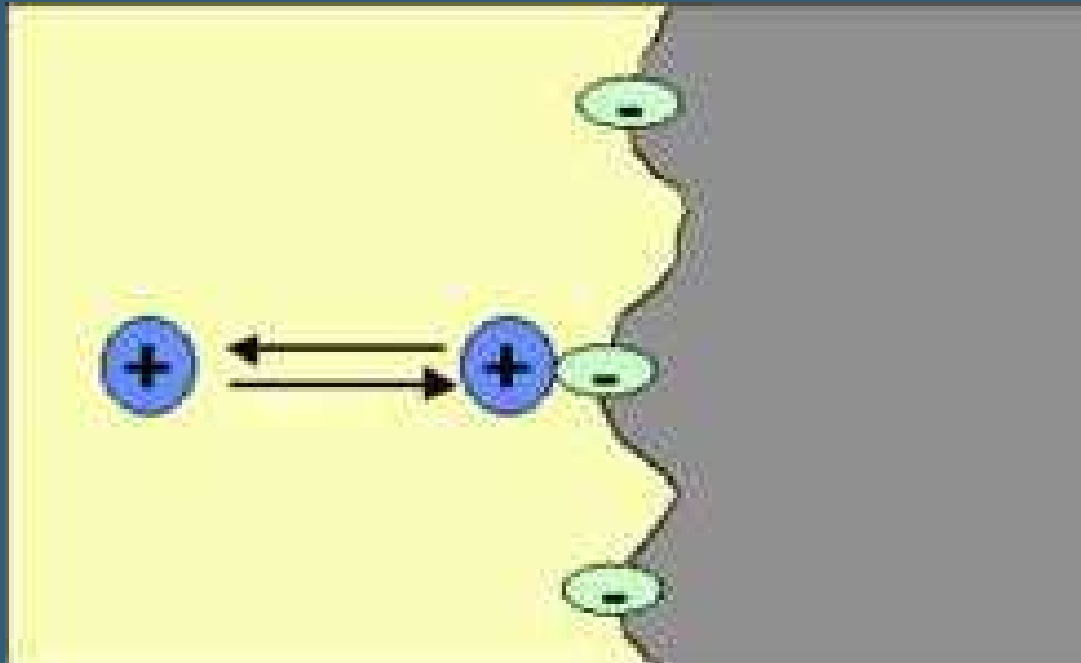


Figure 1

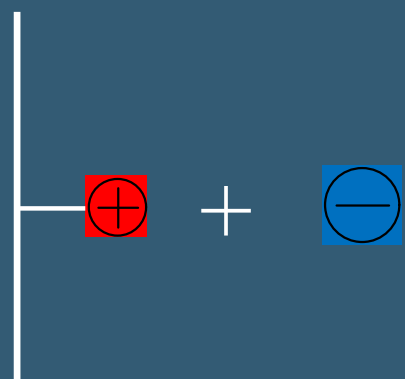
Chromatography of the crude enzyme preparation on a Spheron 1000 column. Buffers : A, 0.05 M potassium phosphate (pH 6.0) with 1.3 M ammonium sulphate and 1 μM CuSO_4 ; B, 0.05 M potassium phosphate (pH 6.0) with 1 μM CuSO_4 ; flow-rate 4.5 ml/min; V_e - elution volume; ——— absorbance at 280 nm (A_{280}); - - - - gradient; - - - \circ - - - DAO activity ($\mu\text{kat}\cdot\text{ml}^{-1}$). Approximately 30 g of protein were applied to the column.

IONEXOVÁ CHROMATOGRRAFIE



IONEXOVÁ CHROMATOGRRAFIE

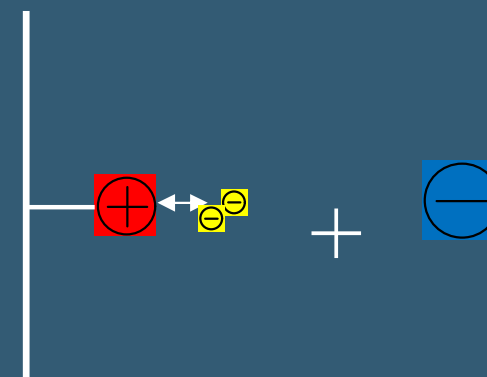
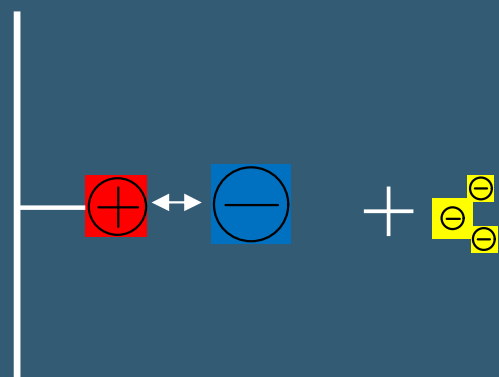
Vazba



elektrostatická interakce



Eluce



IONEXY

• Katexy - \ominus vazba kationtů

silné - sulfo(S), sulfopropyl(SP) OSO_3^-

slabé - karboxy(C), karboxymetyl(CM) $-\text{CH}_2\text{COO}^-$
 COO^-

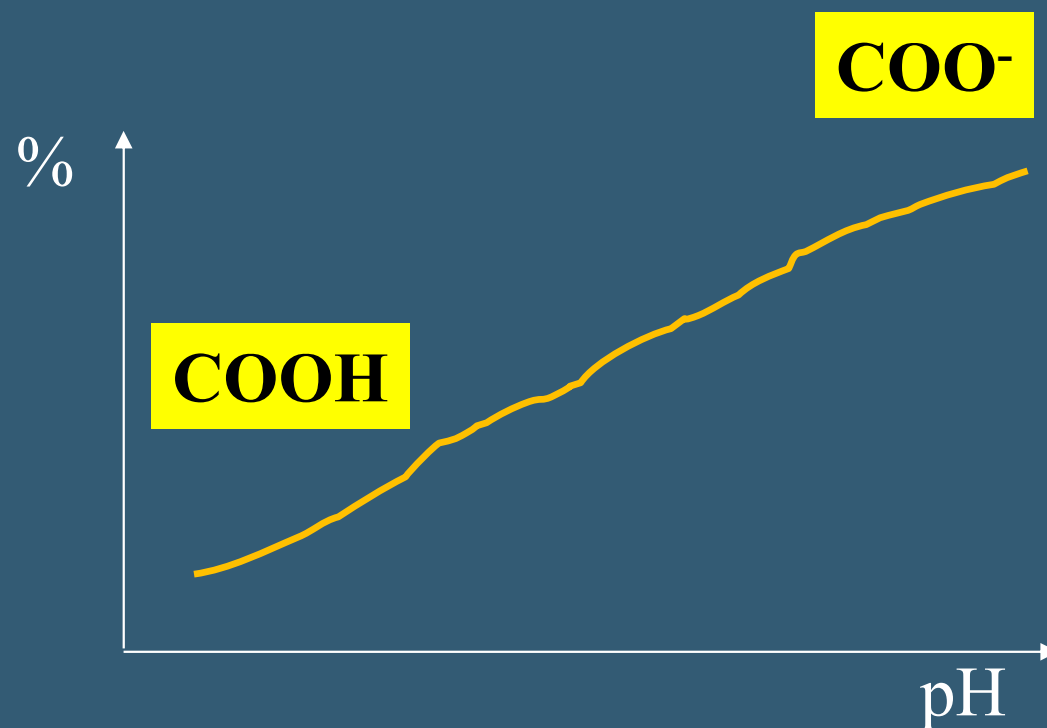
• Anexy - \oplus vazba aniontů

slabé – diethylaminoetyl (DEAE) $-(\text{CH}_2)_2\text{-NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$

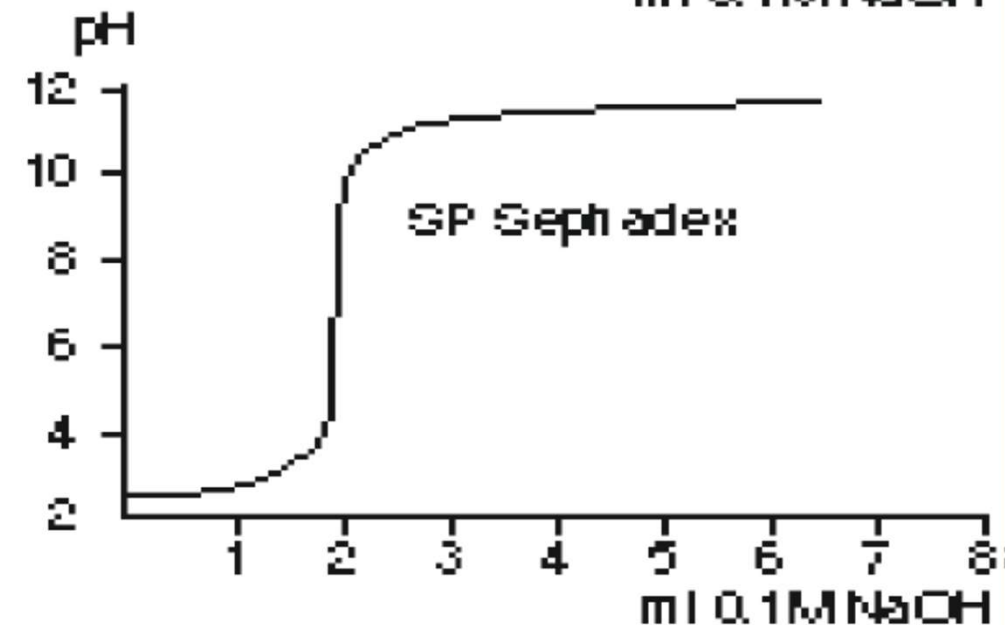
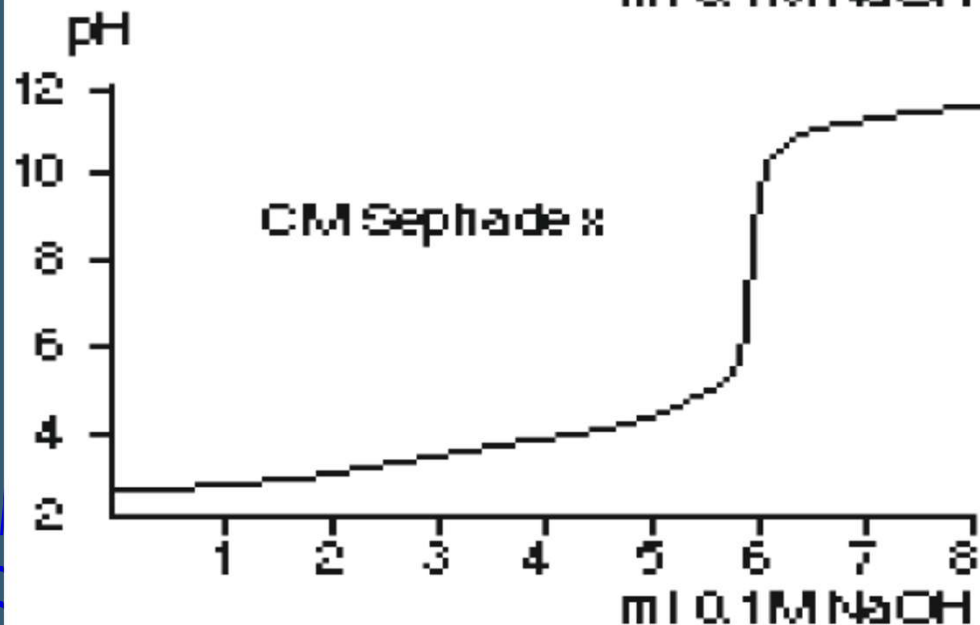
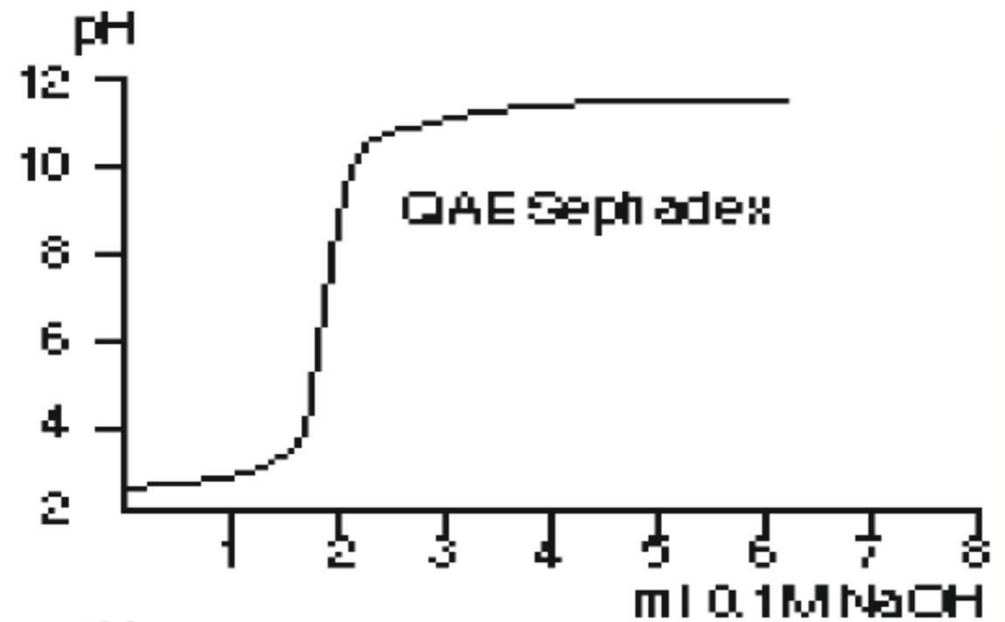
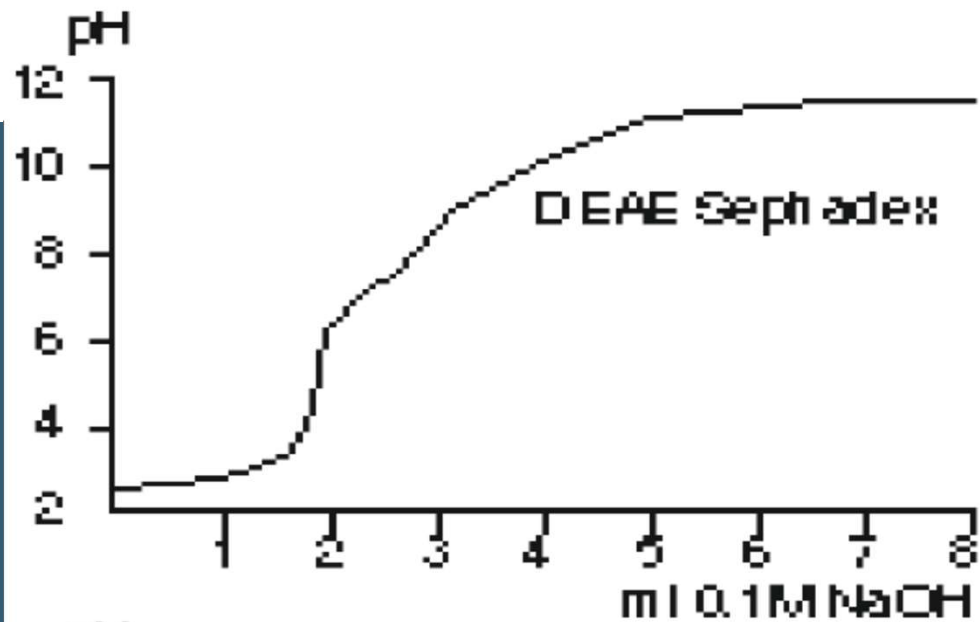
silné - triethylaminoetyl (TEAE)

SLABÝ IONEX

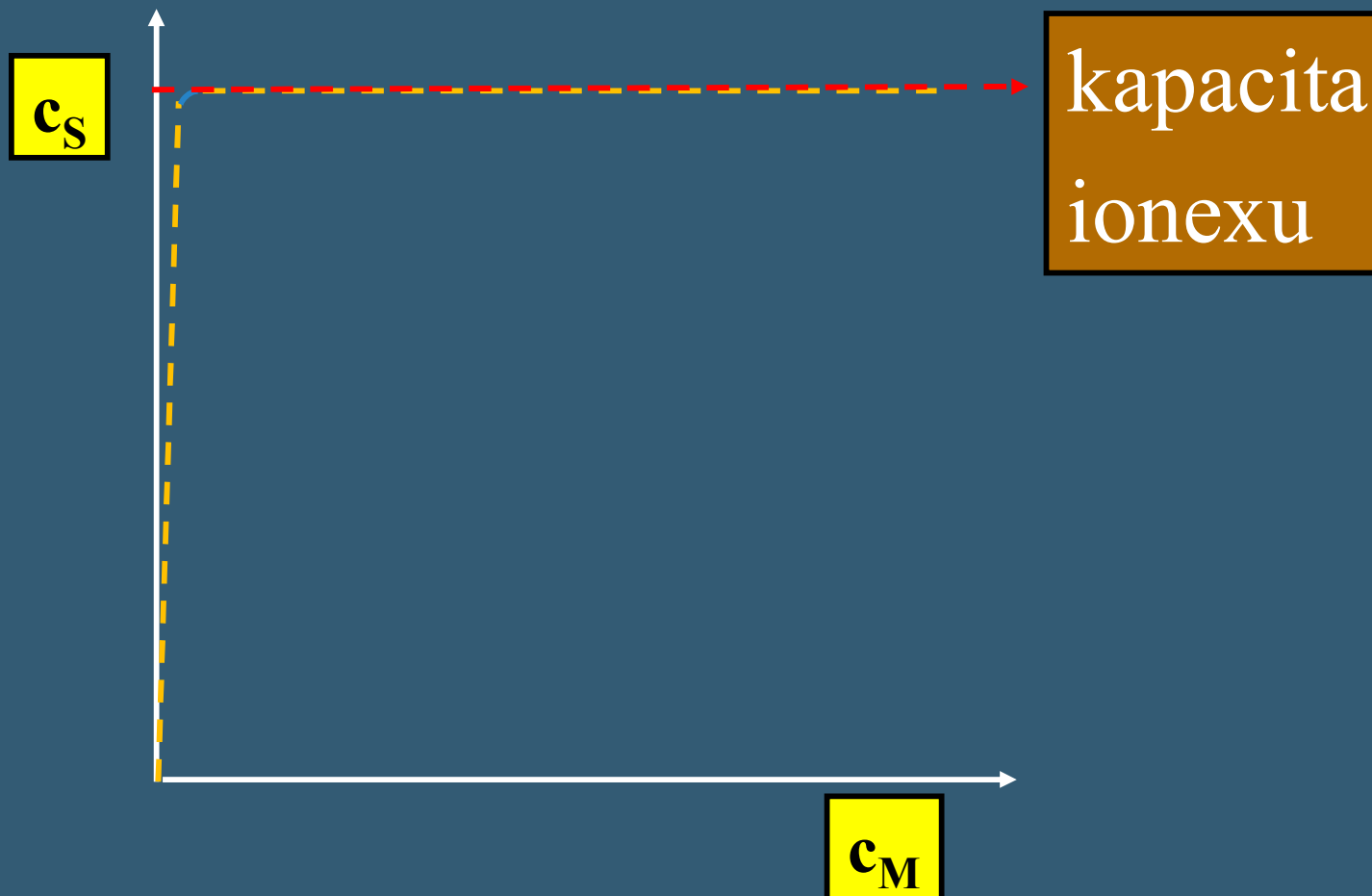
- Vykazuje změny vazebné kapacity v závislosti na pH
- Má pufrální kapacitu



SLABÝ VERSUS SILNÝ IONEX



IONEXOVÁ CHROMATOGRAFIE

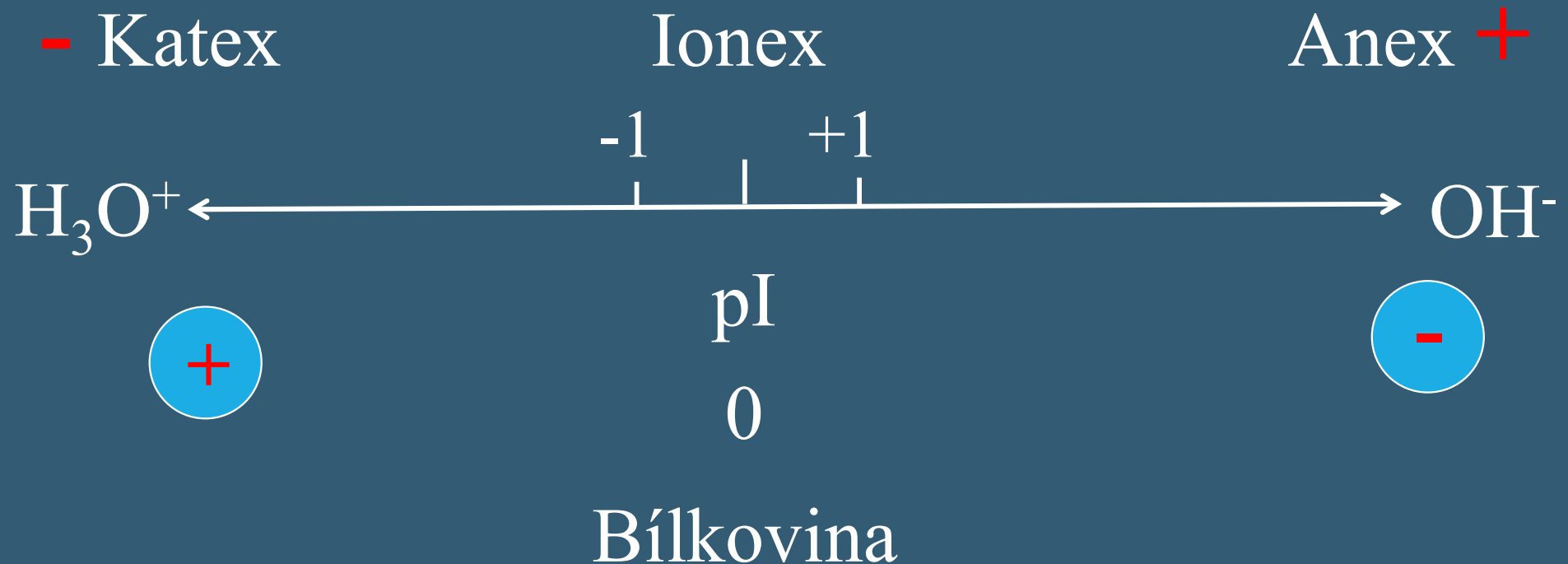


Forma adsorpční chromatografie

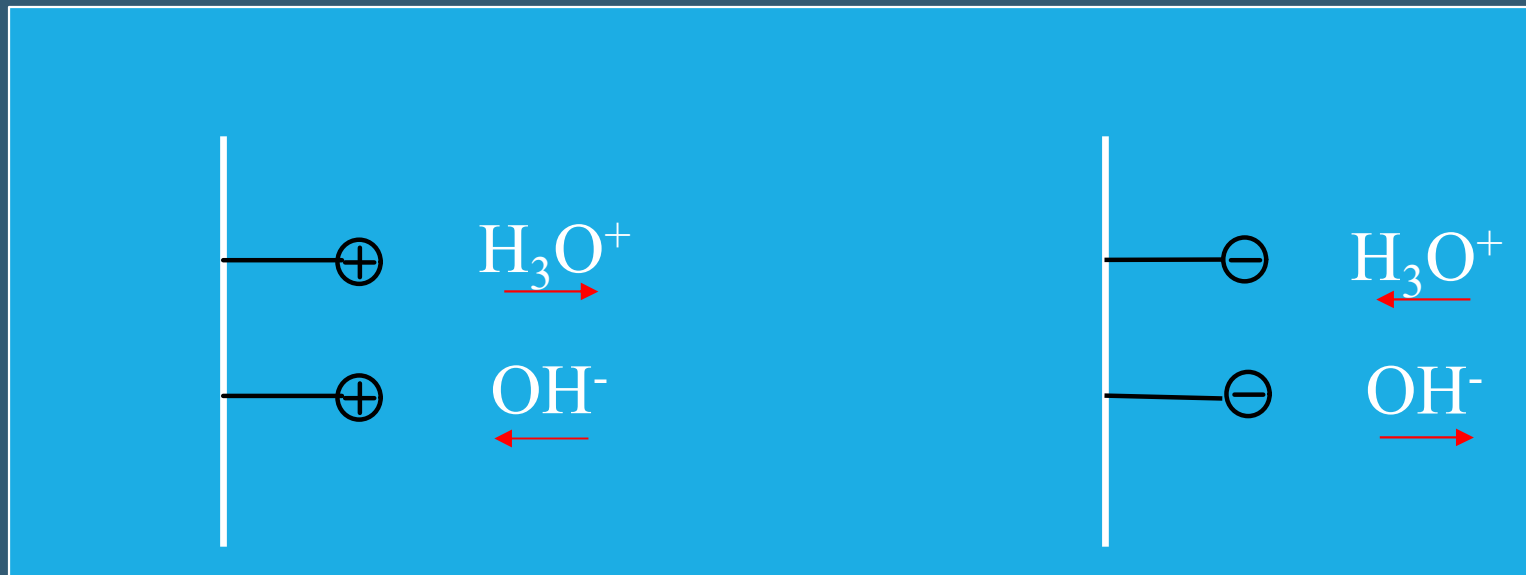
Ionová výměna je proces závislý na velikosti, tvaru a jiných fyzikálních vlastnostech separované molekuly

VOLBA PODMÍNEK – pH + TYP IONEXU

pl bílkoviny je znám



DONANŮV EFEKT



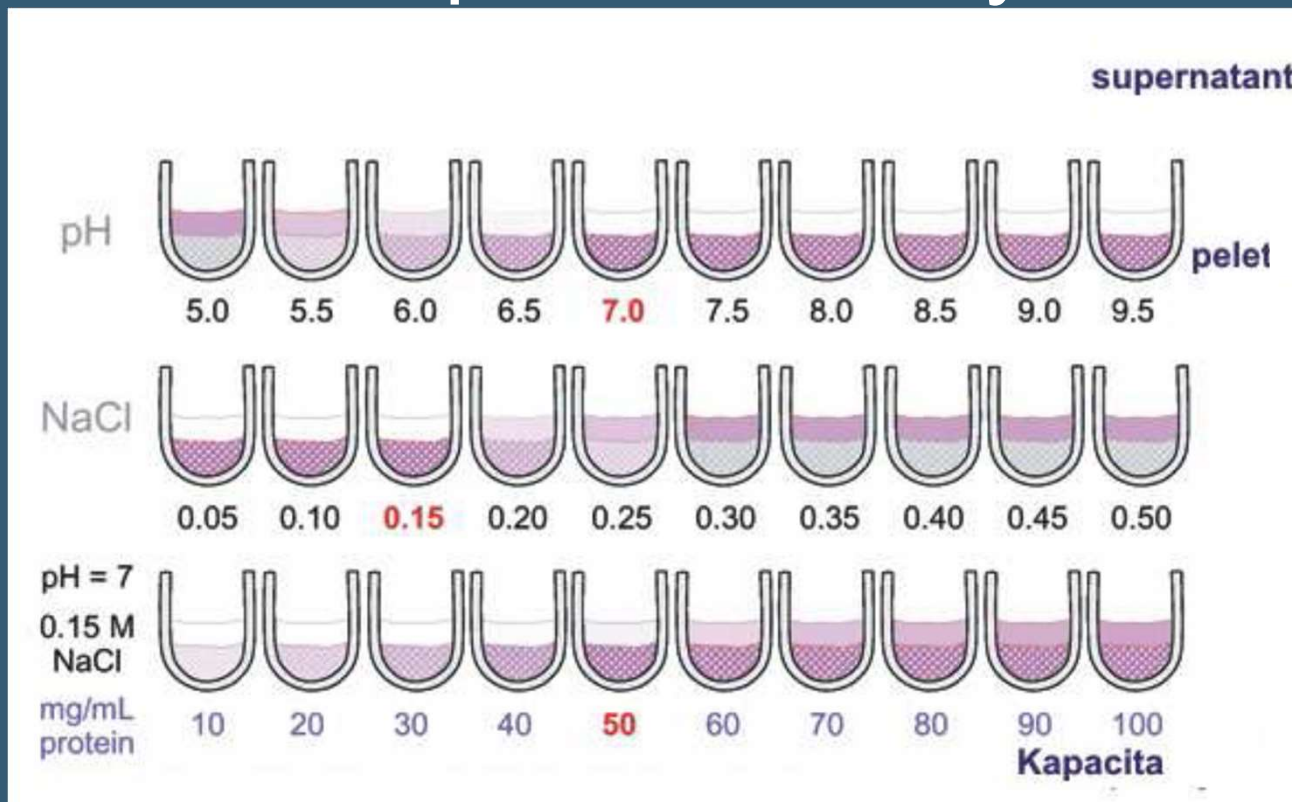
zvyšování pH

snižování pH

VOLBA PODMÍNEK – pH + TYP IONEXU

pI bílkoviny není znám

- Metoda pokusů a omylů



- Metoda titračních křivek

IONEXOVÁ CHROMATOGRRAFIE

- Nanášení vzorku – nízká iontová síla
- Eluce – gradientová
 - Zvyšováním iontové síly
 - Změnou pH
 - Afinity eluce

Použití – purifikace, zakoncentrování,

výměna pufru,

peptidy, proteiny, nukleotidy, oligonukleotidy,

nukleové kyseliny

IONEXOVÁ CHROMATOGRAFIE

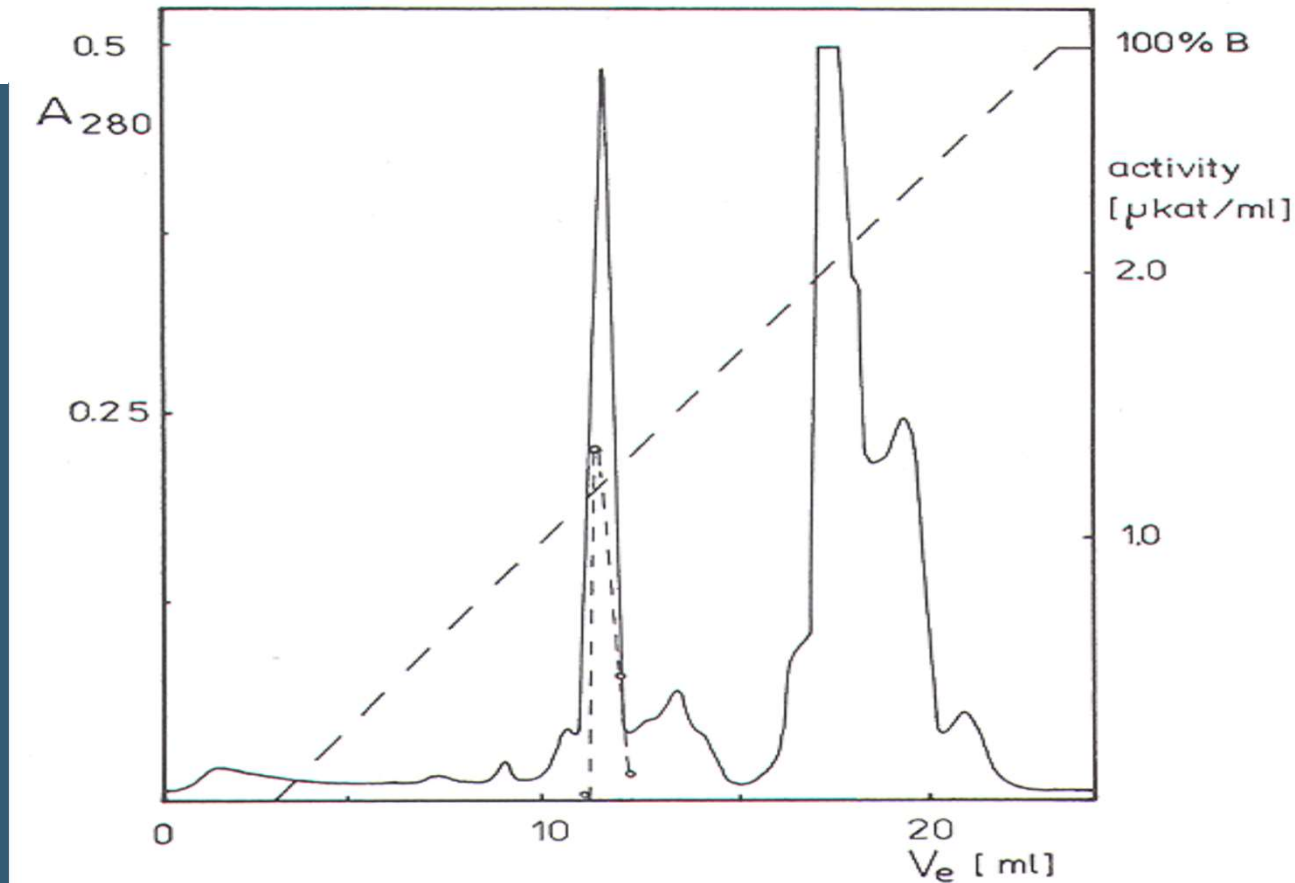


Fig. 2. Chromatography of partially purified G6P-DH on a Mono Q column. Buffers: (A) 0.05 M sodium phosphate (pH 7.4); (B) same as A but with 1 M sodium chloride; flow-rate, 1 ml/min. Lines symbol as in Fig. 1. Approximately 10 mg of protein were applied to the column.

IONEXOVÁ CHROMATOGRAFIE

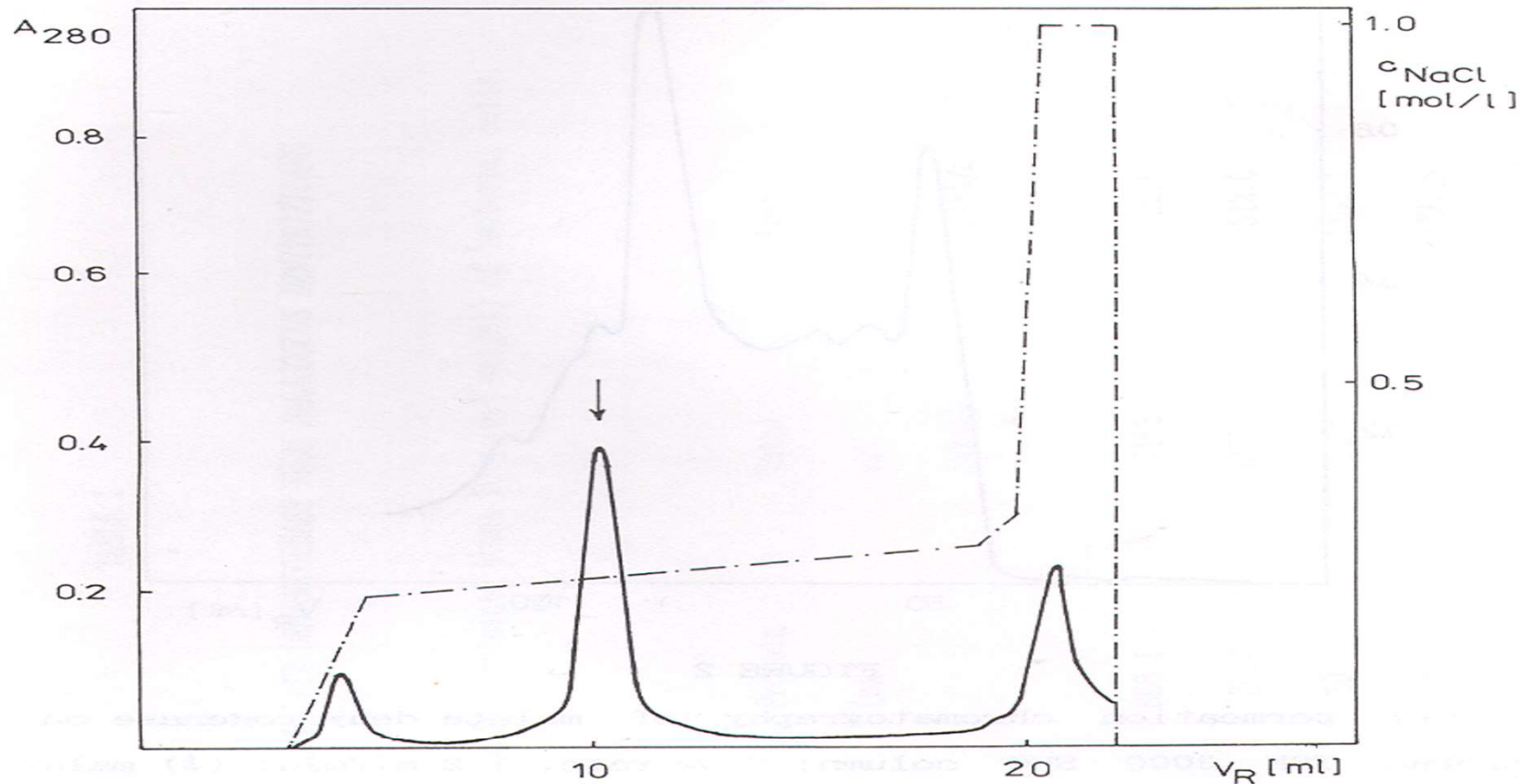


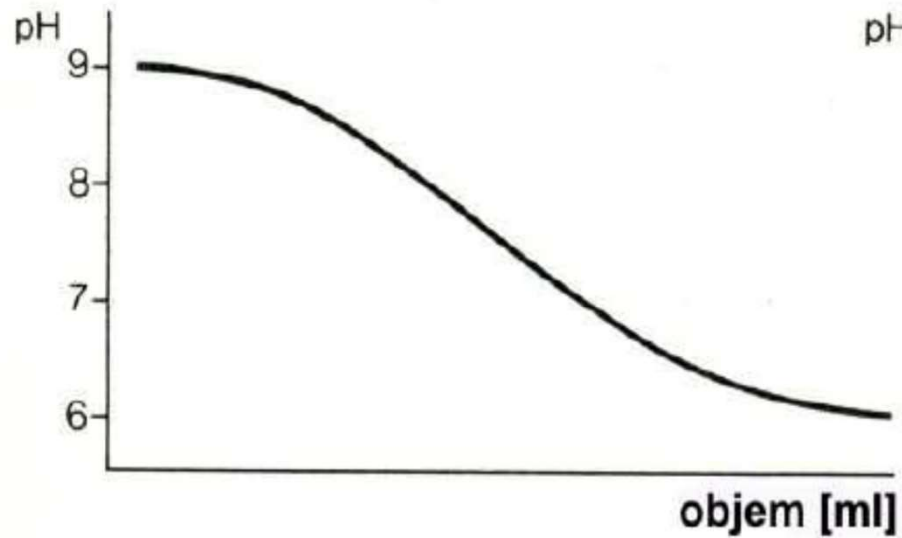
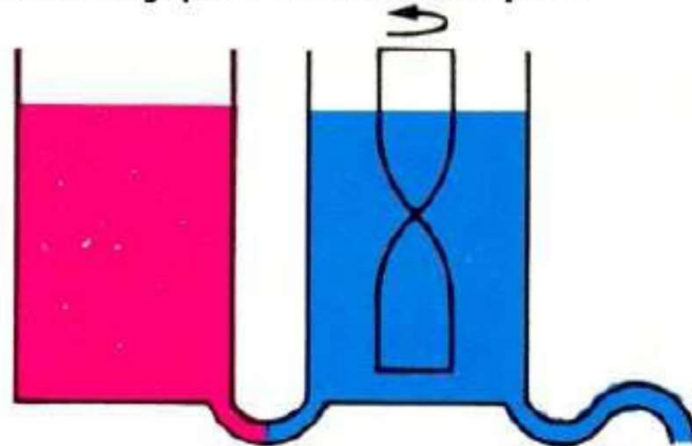
FIGURE 3

Ionex chromatography of malate dehydrogenase on a Mono Q column. V_e , elution volume; —, absorbance at 280 nm (A_{280}); (\downarrow) malate dehydrogenase activity; ----, NaCl gradient (buffer A, 0.02 mol/l sodium phosphate (pH 6.0); buffer B, the same as buffer A but with 1.0 mol/l NaCl); flow rate, approx. 1.2 ml/min.

CHROMATOFOKUSACE

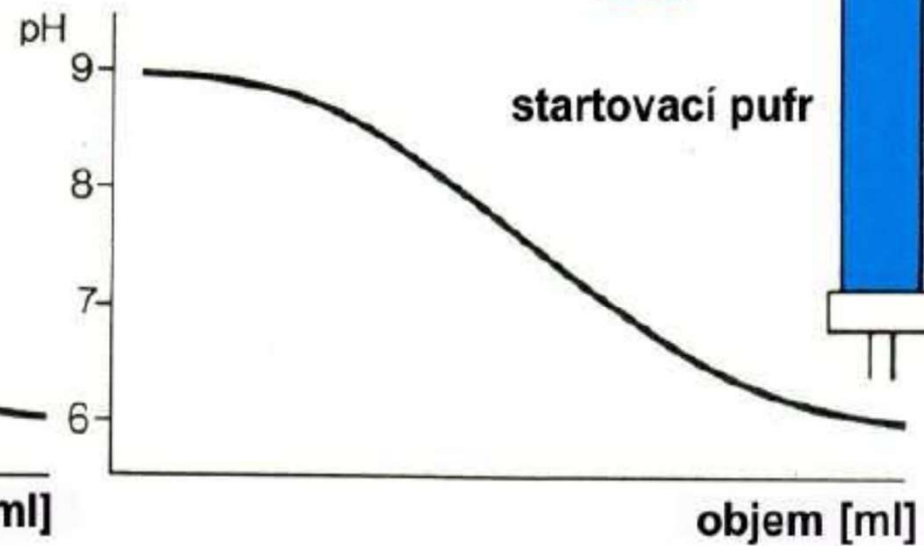
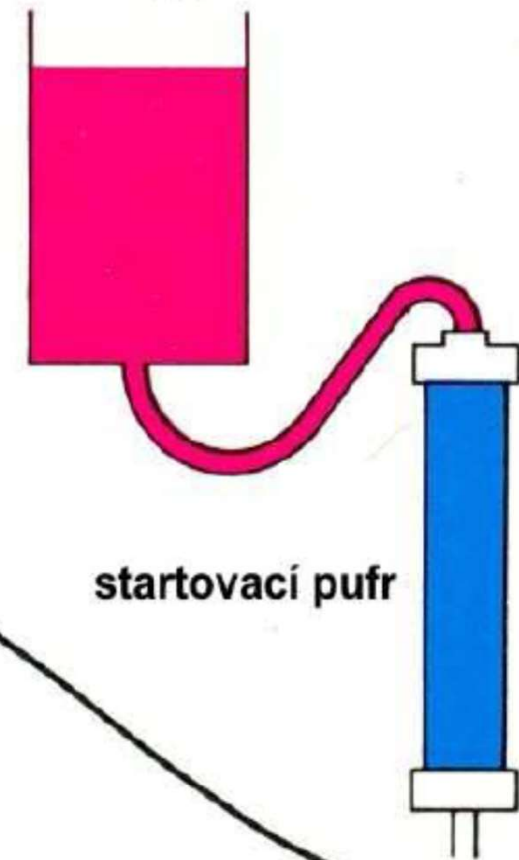
A

konečný pufr startovací pufr



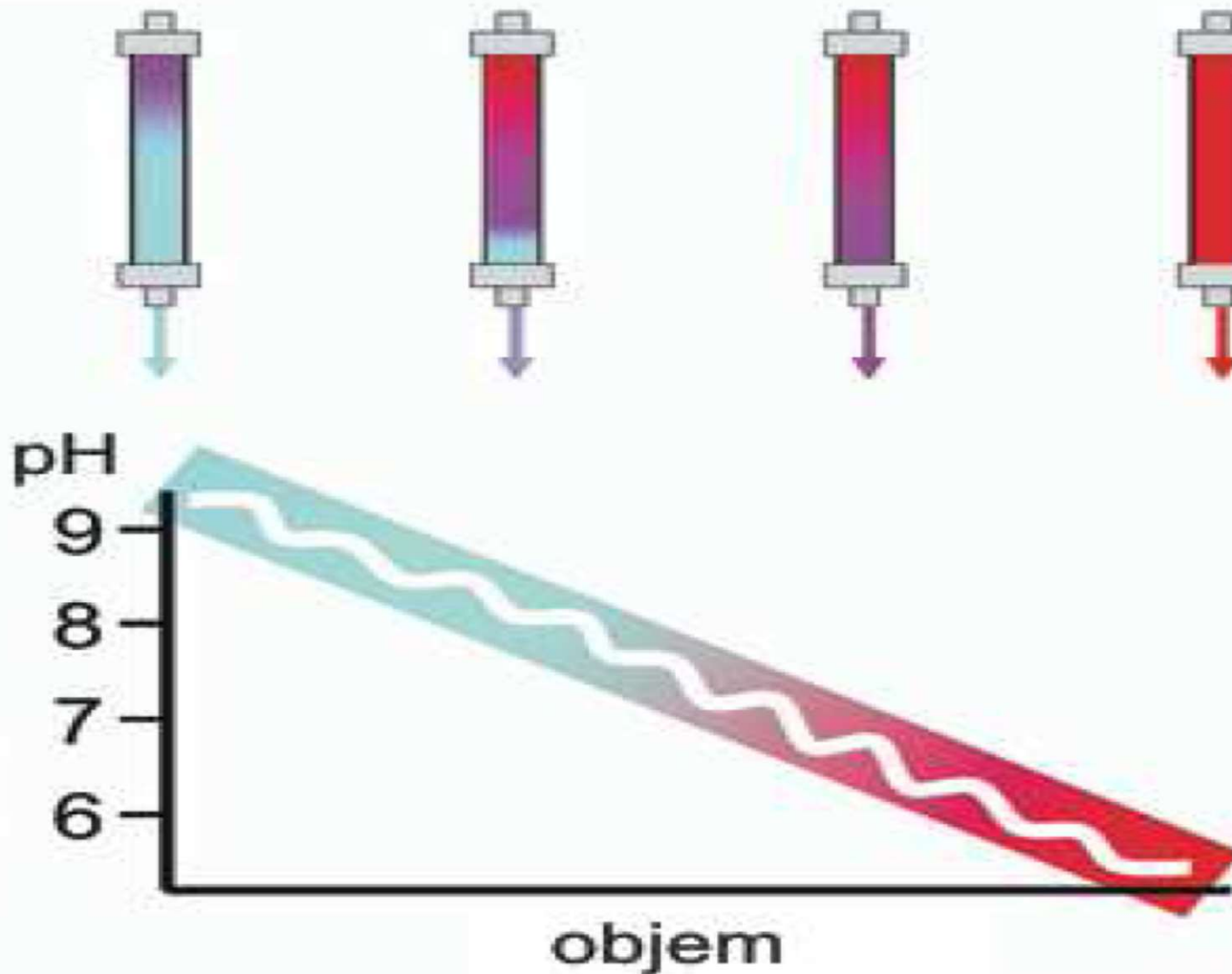
B

konečný pufr

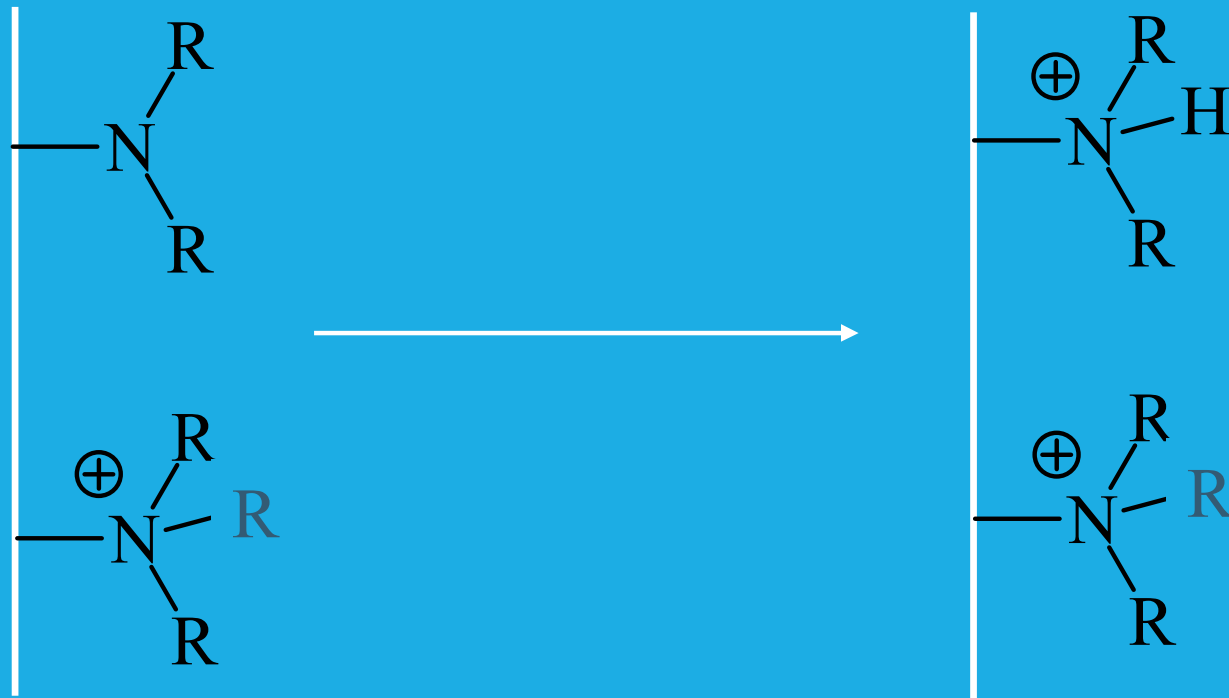


CHROMATOFOKUSACE

- Polybuffer (pulypufr) obsahuje ampholyty - směs látek majících různé pKa



CHROMATOFOKUSACE DĚJ NA KOLONĚ

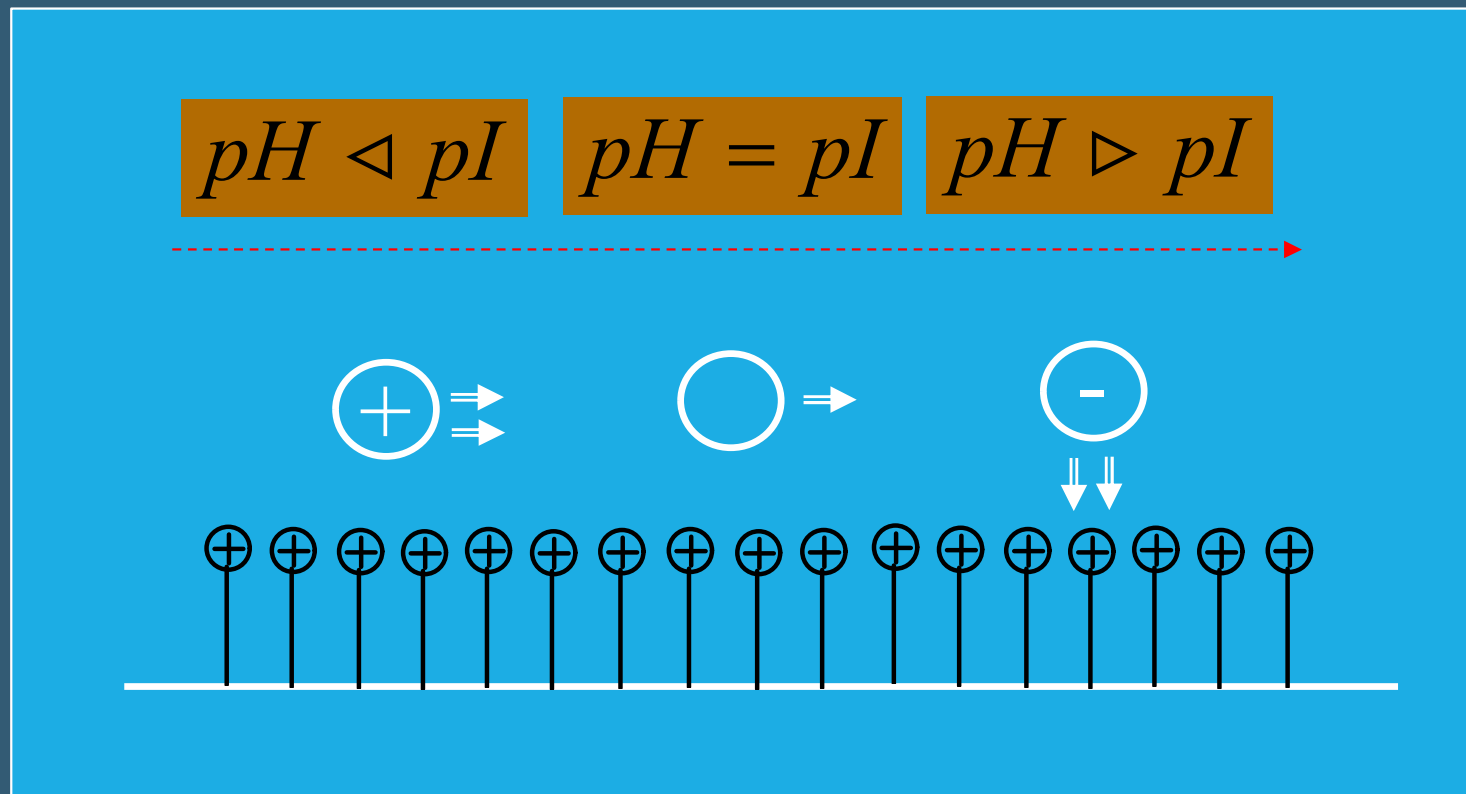


pH = 9

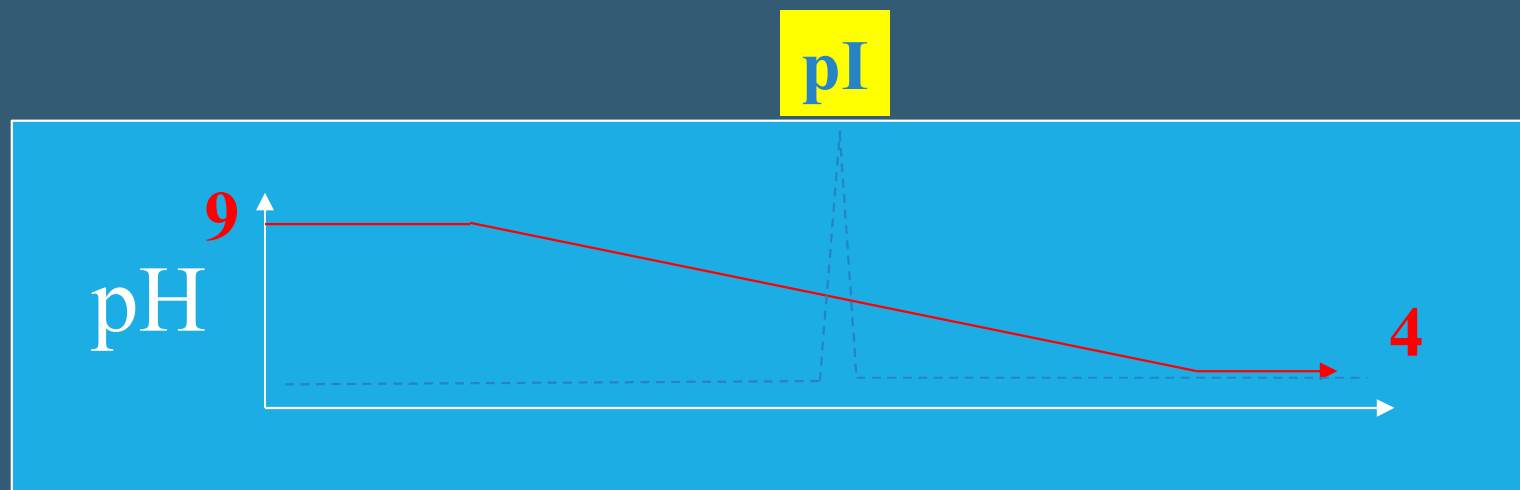
pH = 4

CHROMATOFOKUSACE

CHOVÁNÍ VZORKU

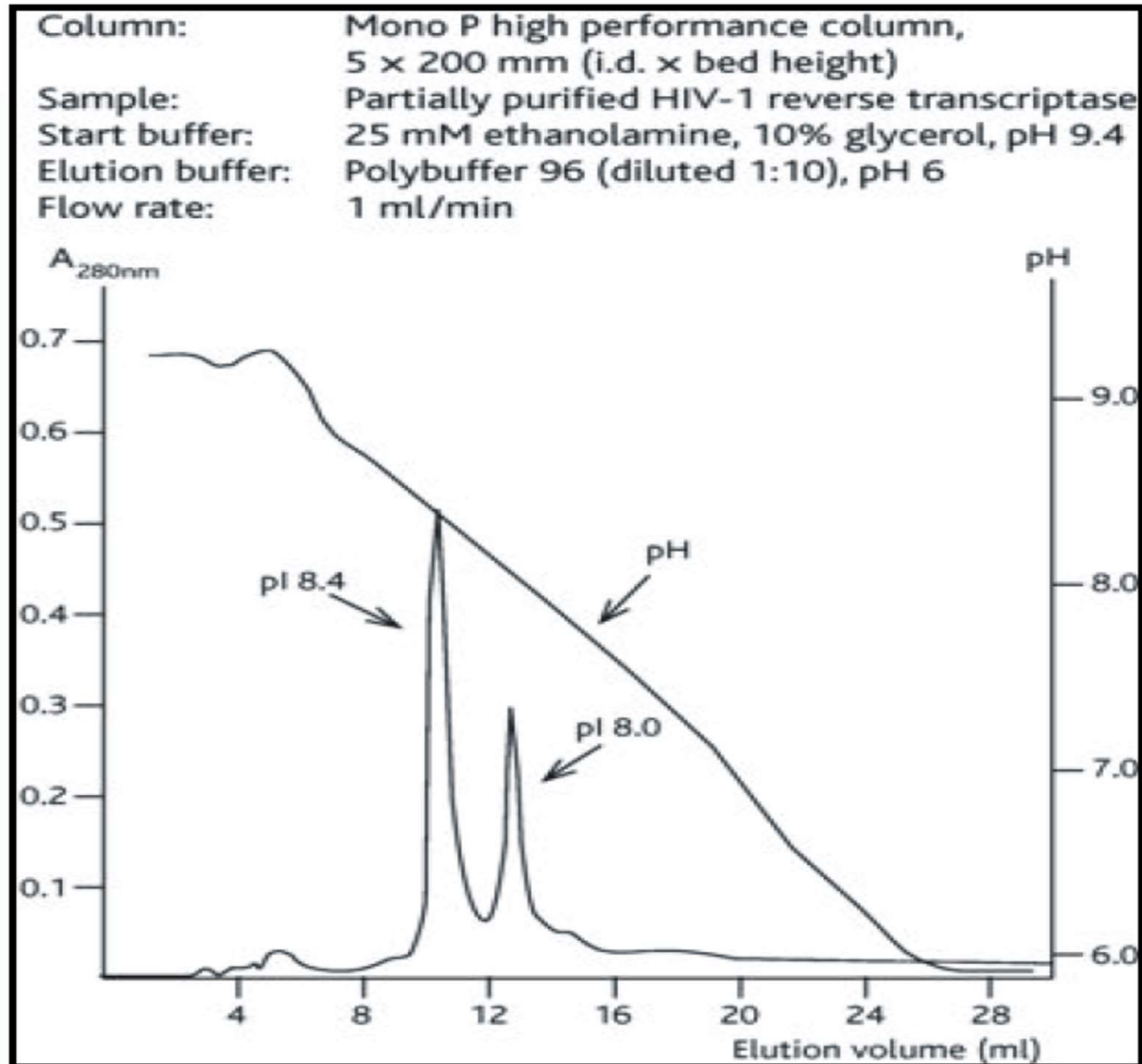


CHROMATOFOKUSACE CHOVÁNÍ VZORKU



Použití : analytické – stanovení pI
preparativní – purifikace bílkovin

CHROMATOFOKUSACE



CHROMATOFOKUSACE

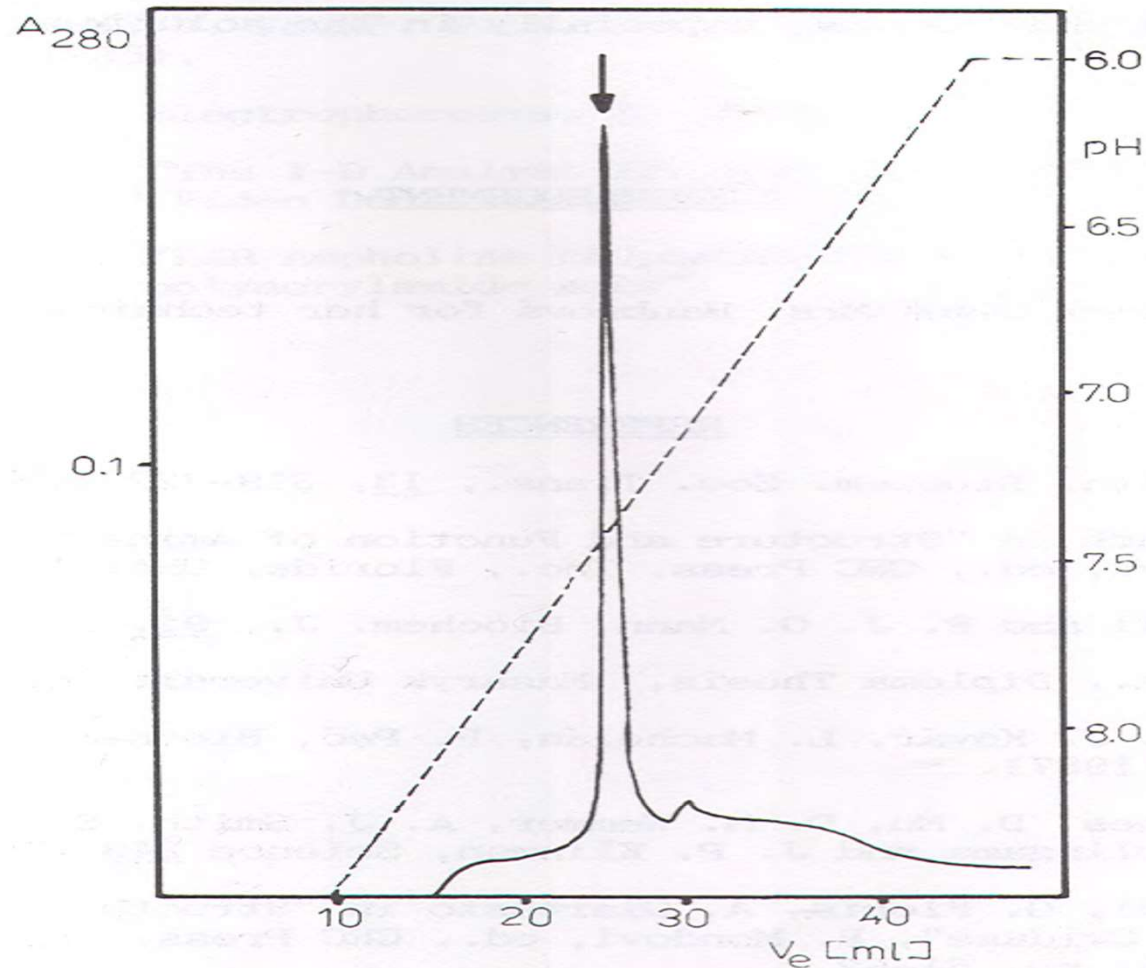
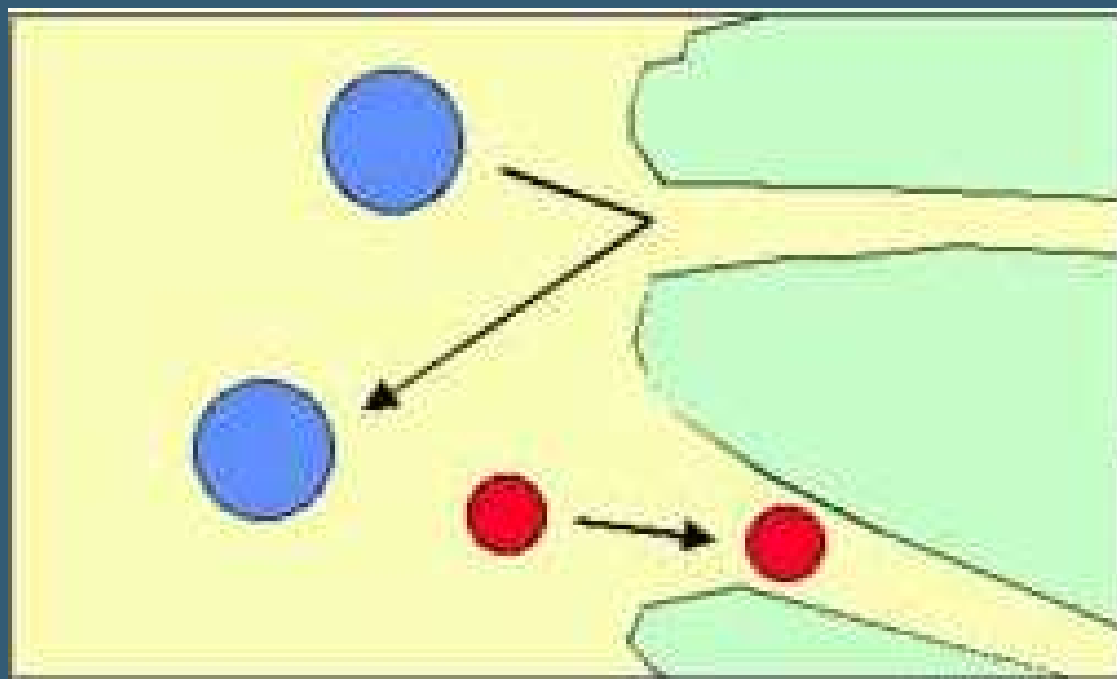


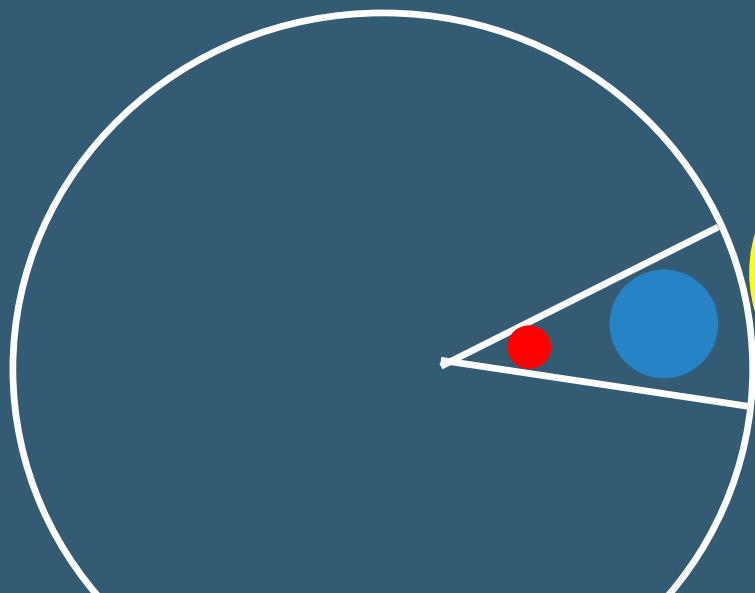
Figure 6

Chromatofocusing of the homogeneous DAO on Mono P column; ---- pH value of the eluate, flow-rate 0.7 ml/min, the other symbols as in Fig. 1. DAO activity is indicated by an arrow.

GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE

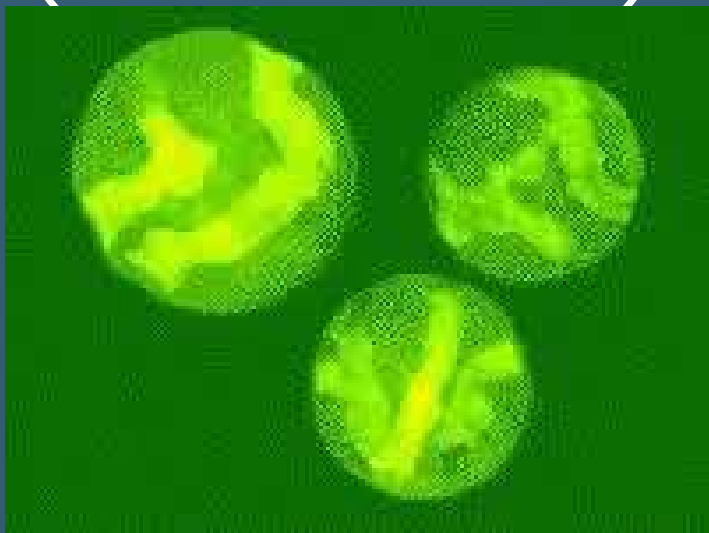


GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

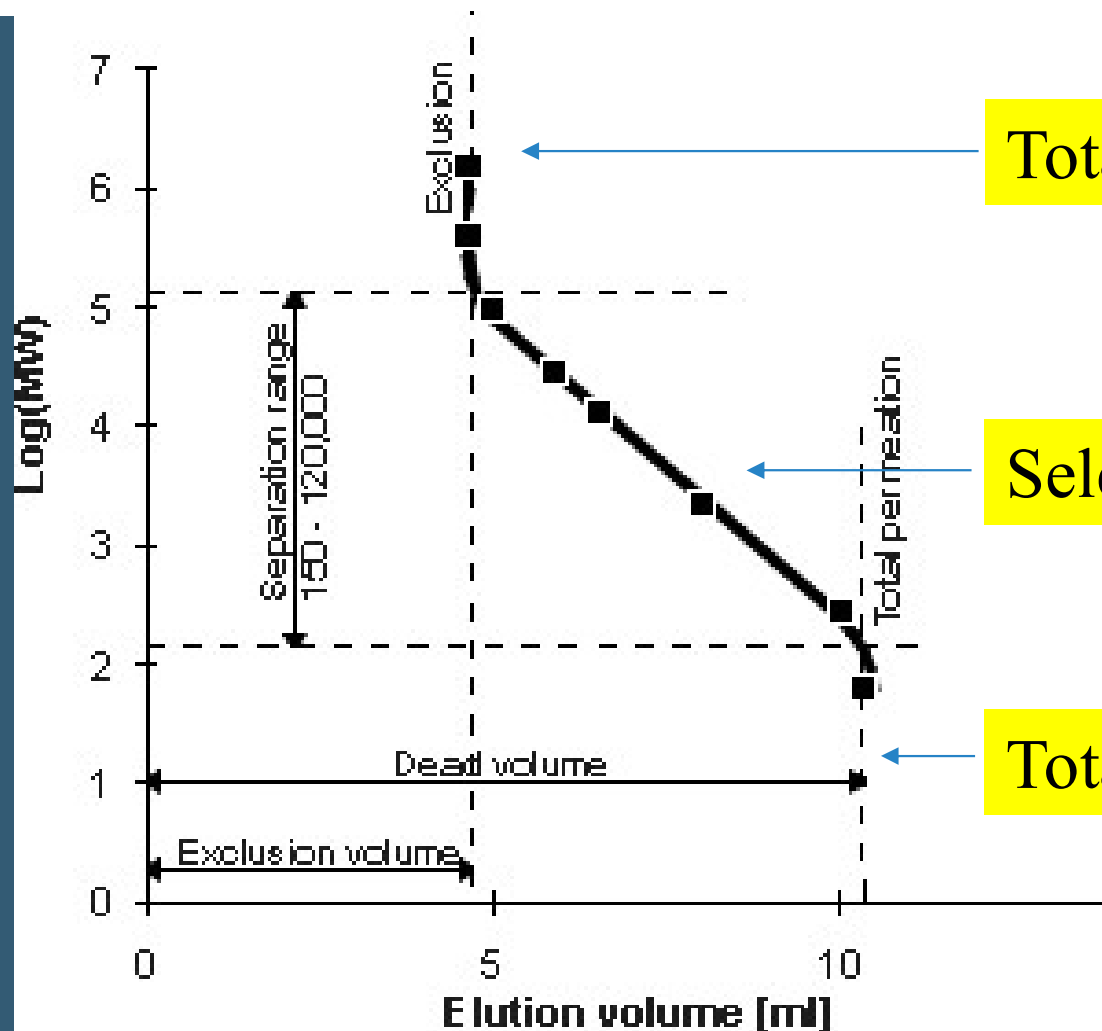


Princip - stérická exkluze
- omezená difuze

Pořadí eluce :
 $MrA > MrB > MrC$



GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE



Totální exkluze

Selektivní permeace

Totální permeace

GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

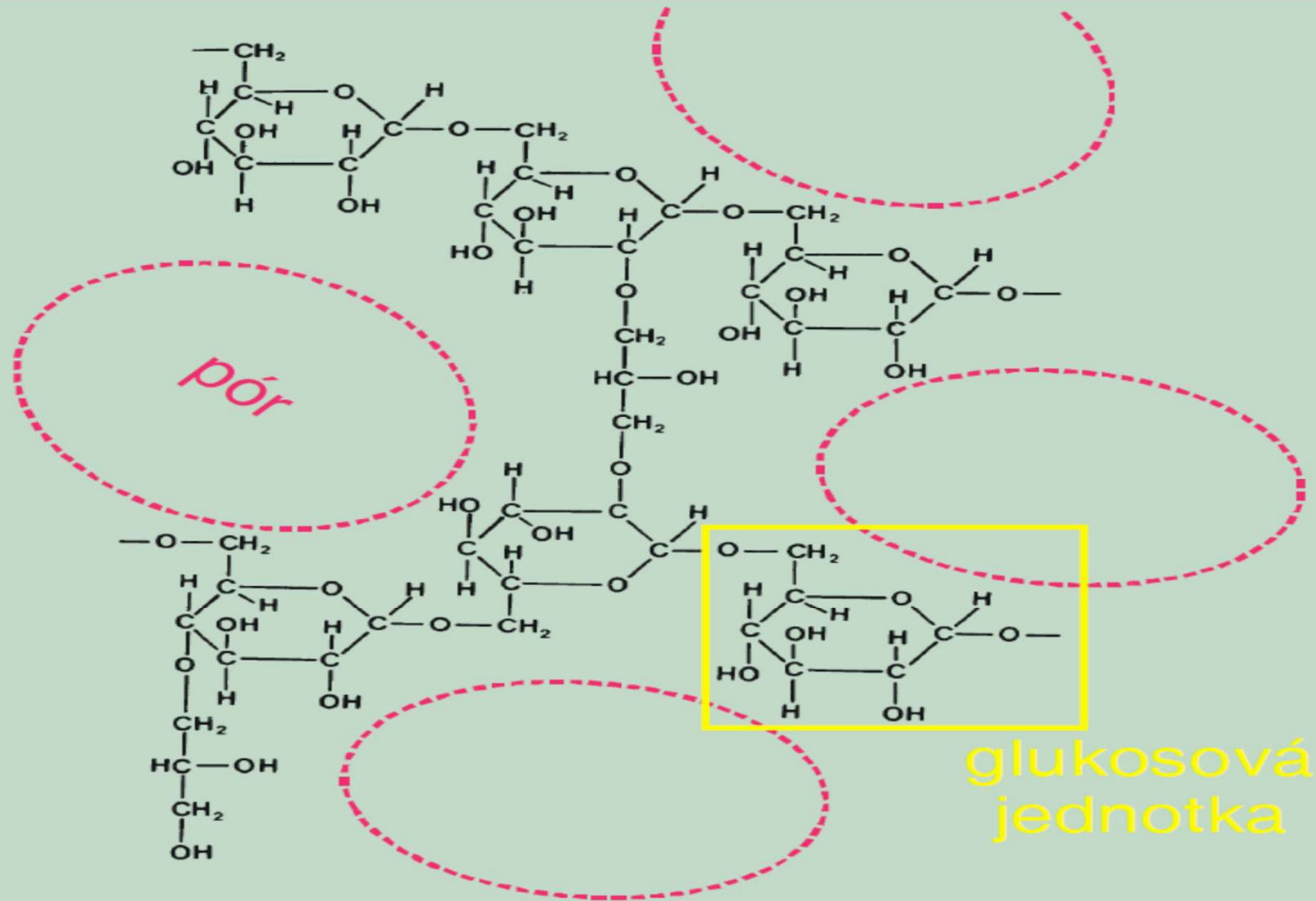
Pharmacia LPC

- Sephadex dextran
- Sepharose agarosa
- Sephacryl glukosa + akryamid
- Sephacel cellulosa

Pharmacia FPLC

- Superose agarosa
- Superdex síťovaná agarosa a dextran

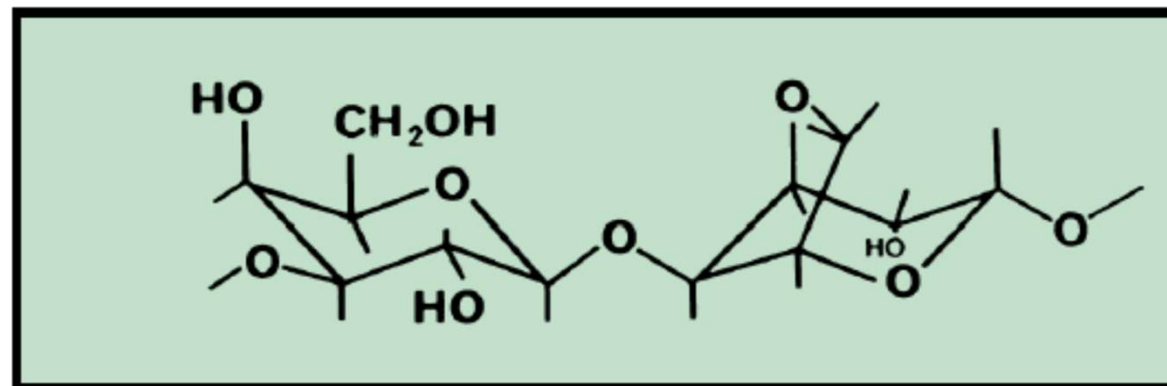
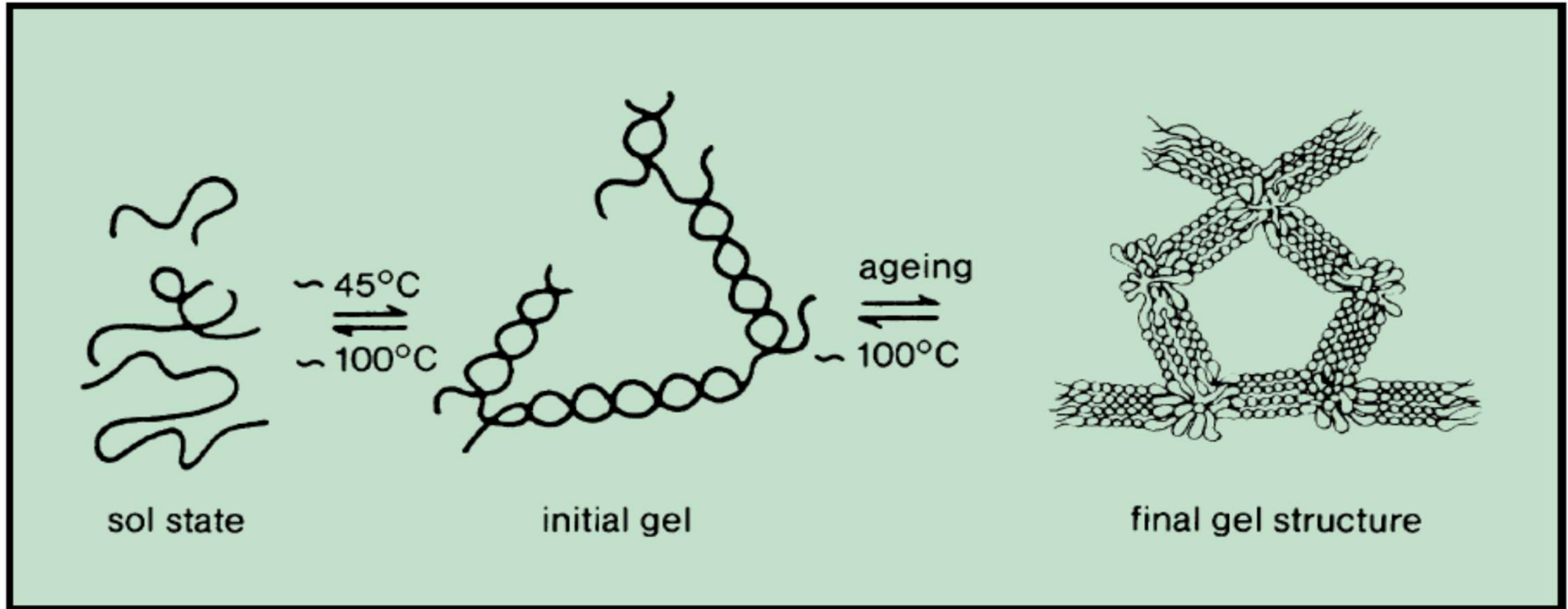
SEPHADEX



SEPHADEX

Gel type	Dry bead size µm	Fractionation range		Fractionation range		Swelling factor ml/g
		Globular proteins		Dextrans		
Sephadex G-10	40 – 120	–	700	–	700	2 – 3
Sephadex G-15	40 – 120	–	1 500	–	1 500	2.5 – 3.5
Sephadex G-25 Coarse	100 – 300	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Medium	50 – 150	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Fine	20 – 80	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Superfine	10 – 40	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-50 Coarse	100 – 300	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Medium	50 – 150	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Fine	20 – 80	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Superfine	10 – 40	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-75	40 – 120	3 000 –	80 000	1 000 –	50 000	12 – 15
Sephadex G-75 Superfine	10 – 40	3 000 –	70 000	1 000 –	50 000	12 – 15
Sephadex G-100	40 – 120	4 000 –	150 000	1 000 –	100 000	15 – 20
Sephadex G-100 Superfine	10 – 40	4 000 –	100 000	1 000 –	100 000	15 – 20
Sephadex G-150	40 – 120	5 000 –	300 000	1 000 –	150 000	20 – 30
Sephadex G-150 Superfine	10 – 40	5 000 –	150 000	1 000 –	150 000	18 – 22
Sephadex G-200	40 – 120	5 000 –	600 000	1 000 –	200 000	30 – 40
Sephadex G-200 Superfine	10 – 40	5 000 –	250 000	1 000 –	150 000	20 – 25

SEPHAROSA



SEPHAROSA

Gel type	Approx. % agarose	Bead size μm	Fractionation range Globular proteins.	Fractionation range Dextrans
Sepharose 6B	6	45 – 165	10 000 – 4 000 000	10 000 – 1 000 000
Sepharose 4B	4	45 – 165	60 000 – 20 000 000	30 000 – 5 000 000
Sepharose 2B	2	60 – 200	70 000 – 40 000 000	100 000 – 20 000 000

Gel type	Bead size μm	Fractionation range Globular proteins	Fractionation range Dextrans
Superose 12 prep grade	20 – 40	1 000 – 300 000	ND
Superose 12	8 – 12	1 000 – 300 000	ND
Superose 6 prep grade	20 – 40	5 000 – 5 000 000	ND
Superose 6	11 – 15	5 000 – 5 000 000	ND

GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Bio-Rad

- BioGel P akrylamid
- BioGel A agarosa

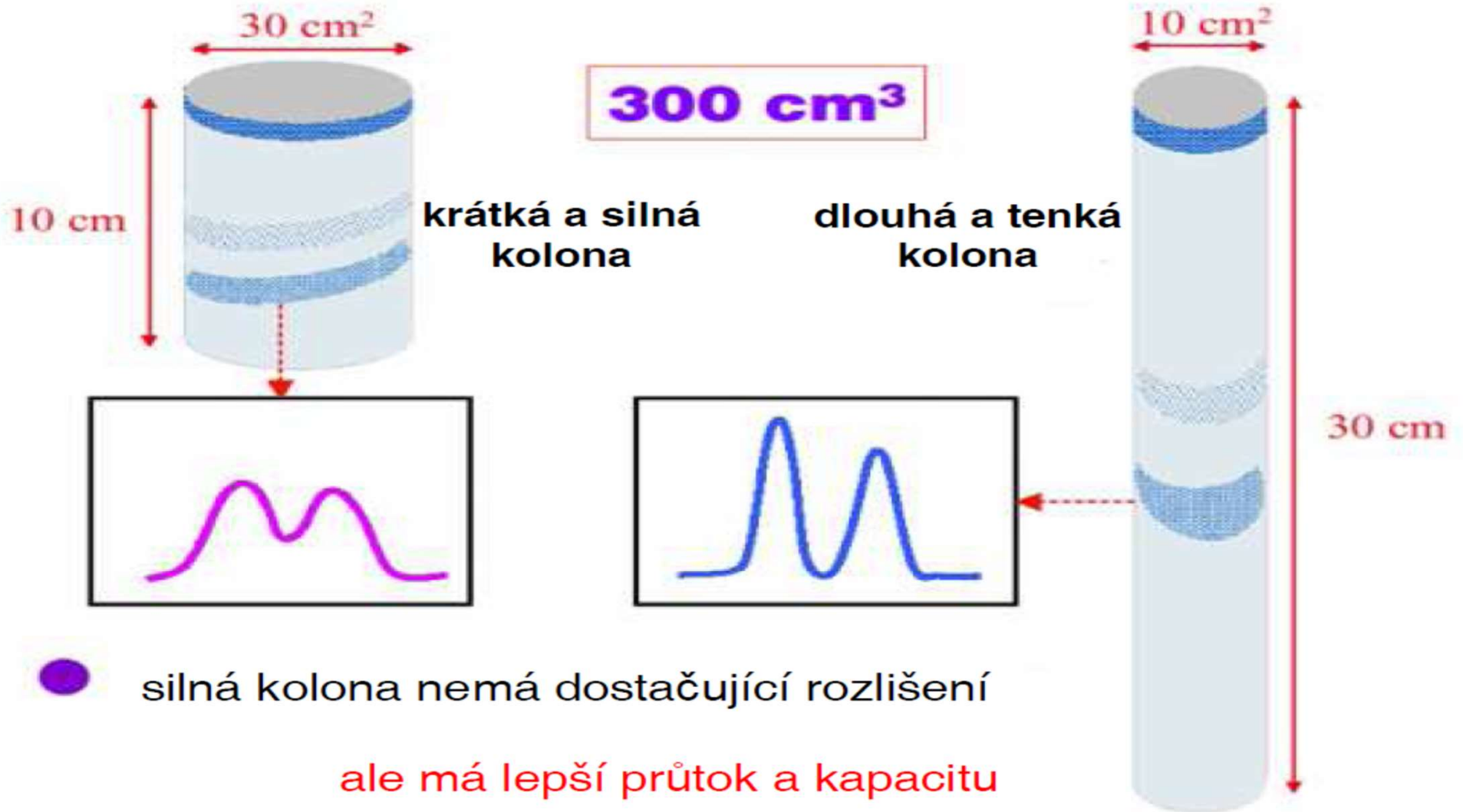
Tosoh Bioscience

- Toyopearl a TSKgel hydroxylovaný methacrylát

BIOGEL P

Gel	Particle Size Range, Hydrated Beads (μM)	Typical Hydrated Bed Volume, ml/g of Dry Gel	Typical Flow Rates (cm/hr)*	Typical Fractionation Range/Nominal Exclusion Limit (Daltons)**, †
Bio-Gel P-2 Gel, Fine	45-90	3	5.0-10	100-1,800
Bio-Gel P-2 Gel, Extra Fine	< 45		<10	100-1,800
Bio-Gel P-4 Gel, Medium	90-180	4	15-20	800-4,000
Bio-Gel P-4 Gel, Fine	45-90		10.0-15	800-4,000
Bio-Gel P-4 Gel, Extra Fine	< 45		<10	800-4,000
Bio-Gel P-6 Gel, Medium	90-180	6.5	15-20	1,000-6,000
Bio-Gel P-6 Gel, Fine	45-90		10.0-15	1,000-6,000
Bio-Gel P-6 Gel, Extra Fine	< 45		<10	1,000-6,000
Bio-Gel P-6DG Gel	90-180	6.5	15-20	1,000-6,000
Bio-Gel P-10 Gel, Medium	90-180	7.5	15-20	1,500-20,000
Bio-Gel P-10 Gel, Fine	45-90		10.0-15	1,500-20,000
Bio-Gel P-30 Gel, Medium	90-180	9	7.0-13	2,500-40,000
Bio-Gel P-30 Gel, Fine	45-90		6.0-11	2,500-40,000
Bio-Gel P-60 Gel, Medium	90-180	11	4.0-6	3,000-60,000
Bio-Gel P-60 Gel, Fine	45-90		3.0-5	3,000-60,000
Bio-Gel P-100 Gel, Medium	90-180	12	4.0-6	5,000-100,000
Bio-Gel P-100 Gel, Fine	45-90		3.0-5	5,000-100,000

GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE



GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

- Nanášení vzorku
objem vzorku $< 2\%$ objemu kolony
- Eluce – izokratická

Použití : stanovení Mr, odsolování,
“ purifikace

GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAPHIE

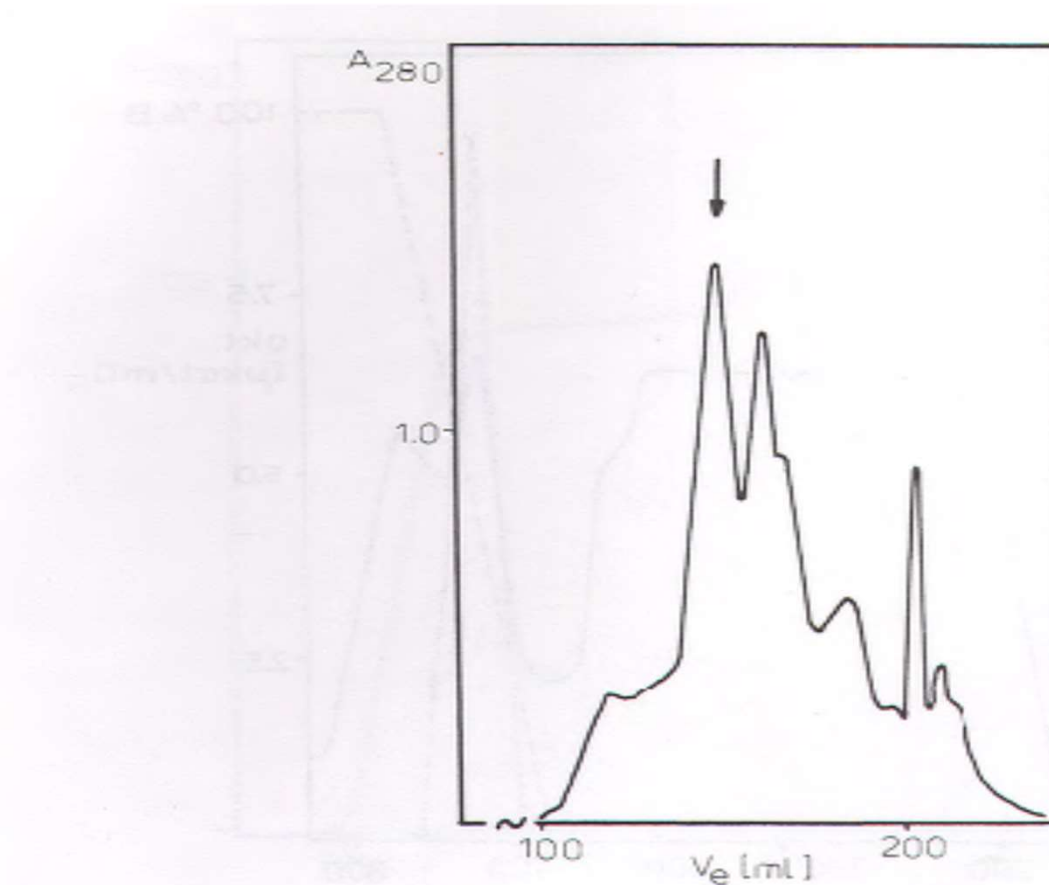


Figure 3

Chromatography of partially purified DAO on TSK 3000 SWG column. Buffer: 0.05 M potassium phosphate (pH 6.5) with 0.15 M sodium chloride; flow rate 5 ml/min. The symbols are as in Fig. 1. DAO activity is indicated by an arrow. Approximately 100 mg of protein were applied to the column.

GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE

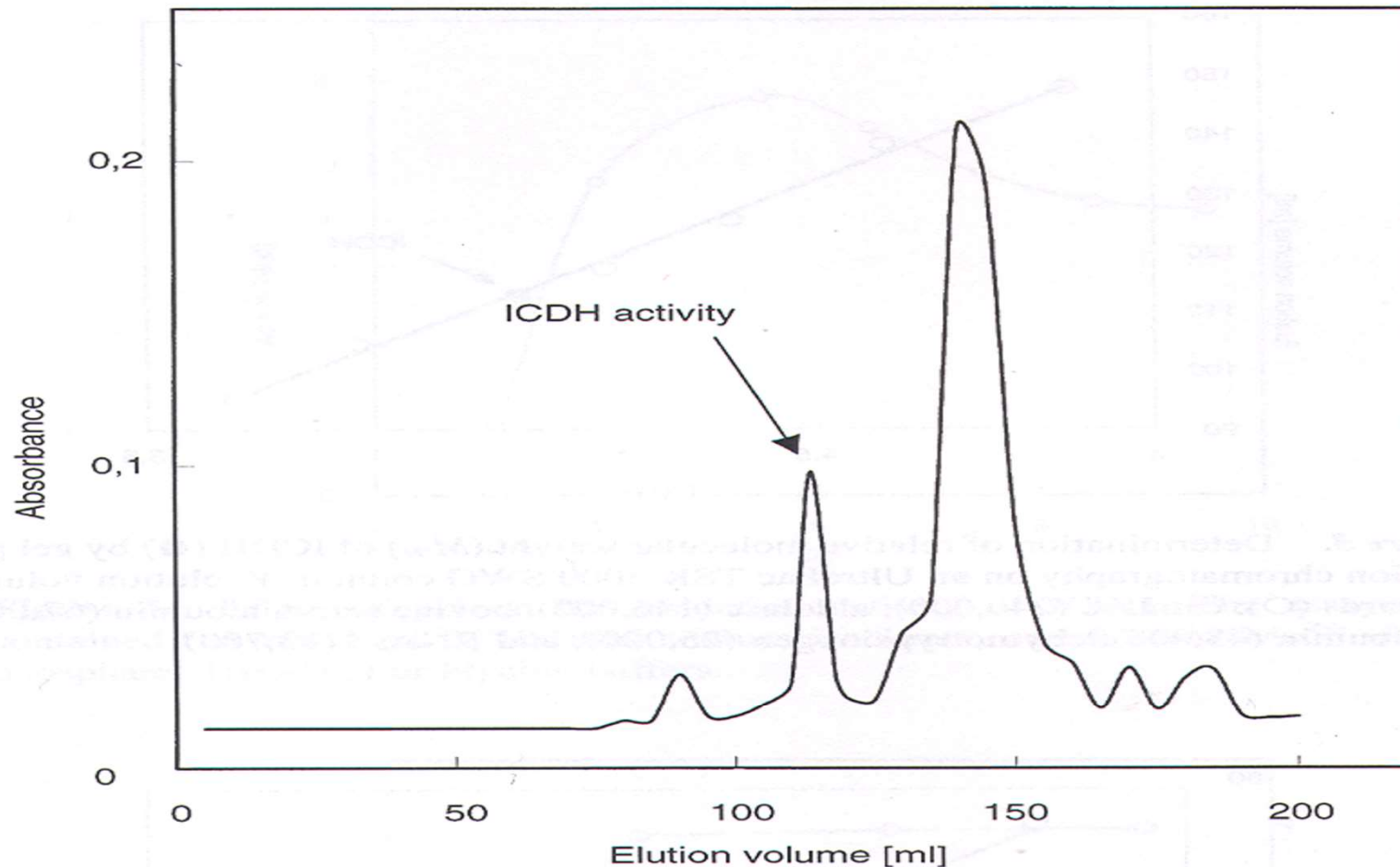


Figure 2. Chromatography of partially purified ICDH (after ammonium sulphate fractionation and ion exchange chromatography) on an UltraPac TSK G3000 SWG column. Buffer—20 mM sodium phosphate, pH 6.8; flow-rate 5 mL/min. (V_e) elution volume; (—) A_{280} ; (---) ICDH activity. Approximately 10 mg of protein was loaded onto the column.

GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE

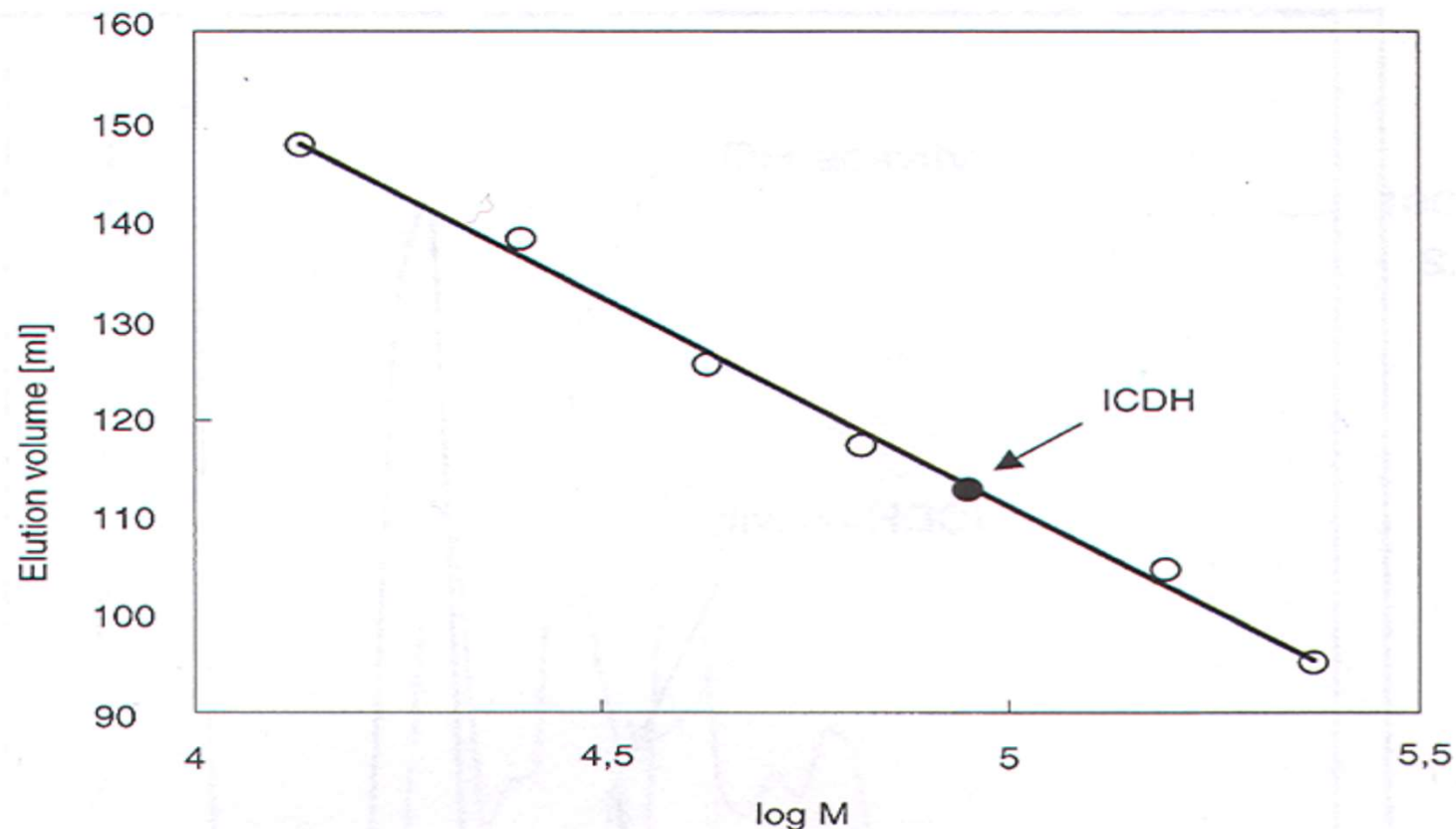
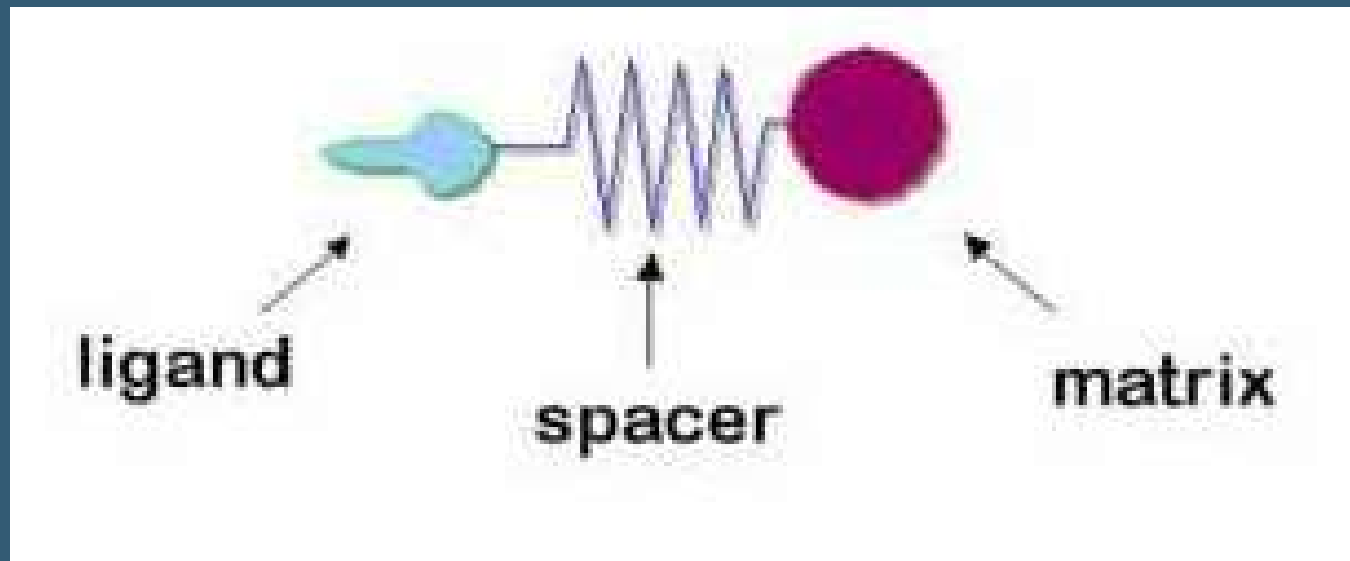
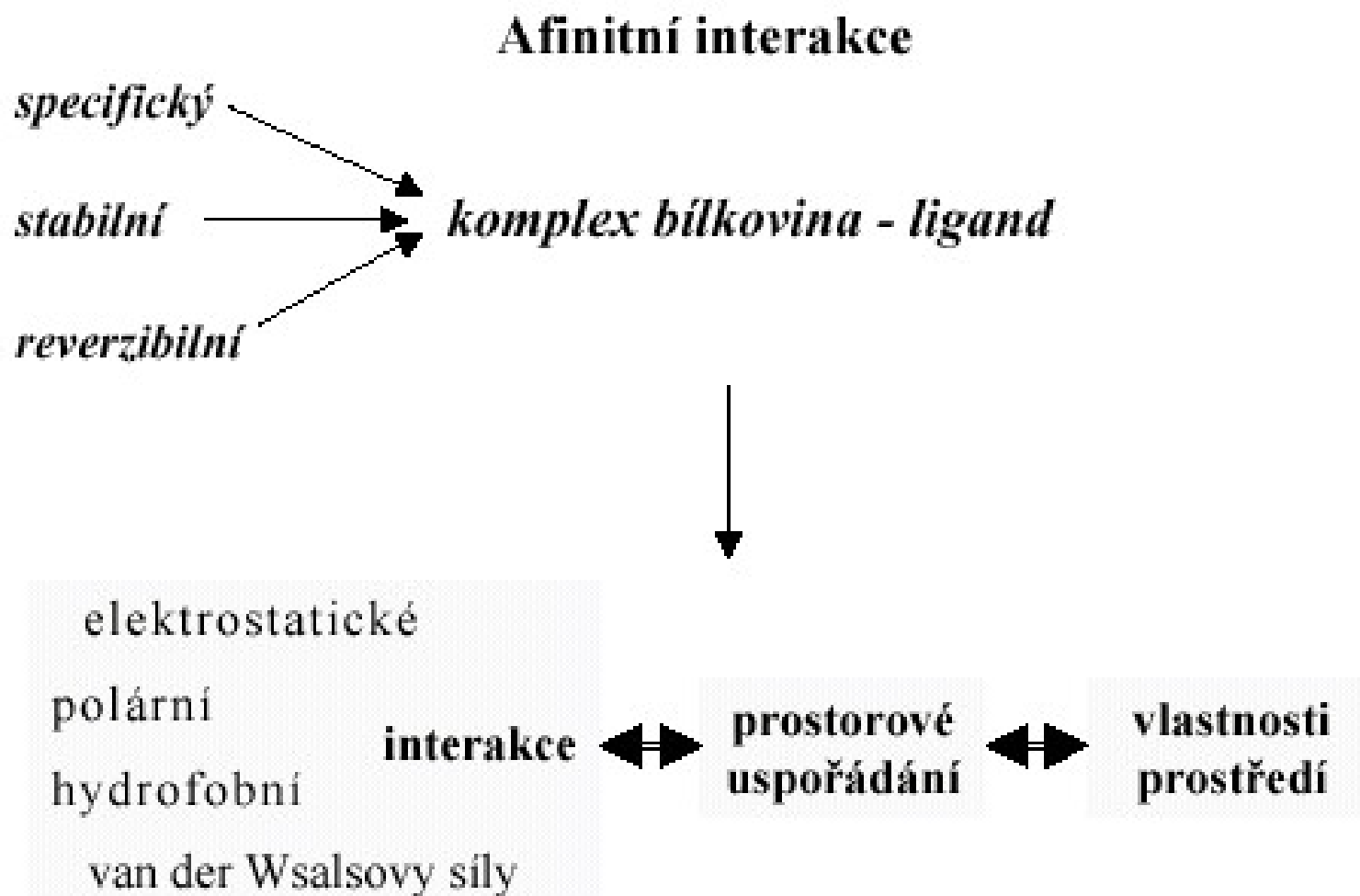


Figure 3. Determination of relative molecular weight (M_w) of ICDH (●) by gel permeation chromatography on an UltroPac TSK 3000 SWG column. V_e elution volume; standards (○): catalase (240,000), aldolase (146,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), chymotrypsinogen (25,000), and RNase (13,700).

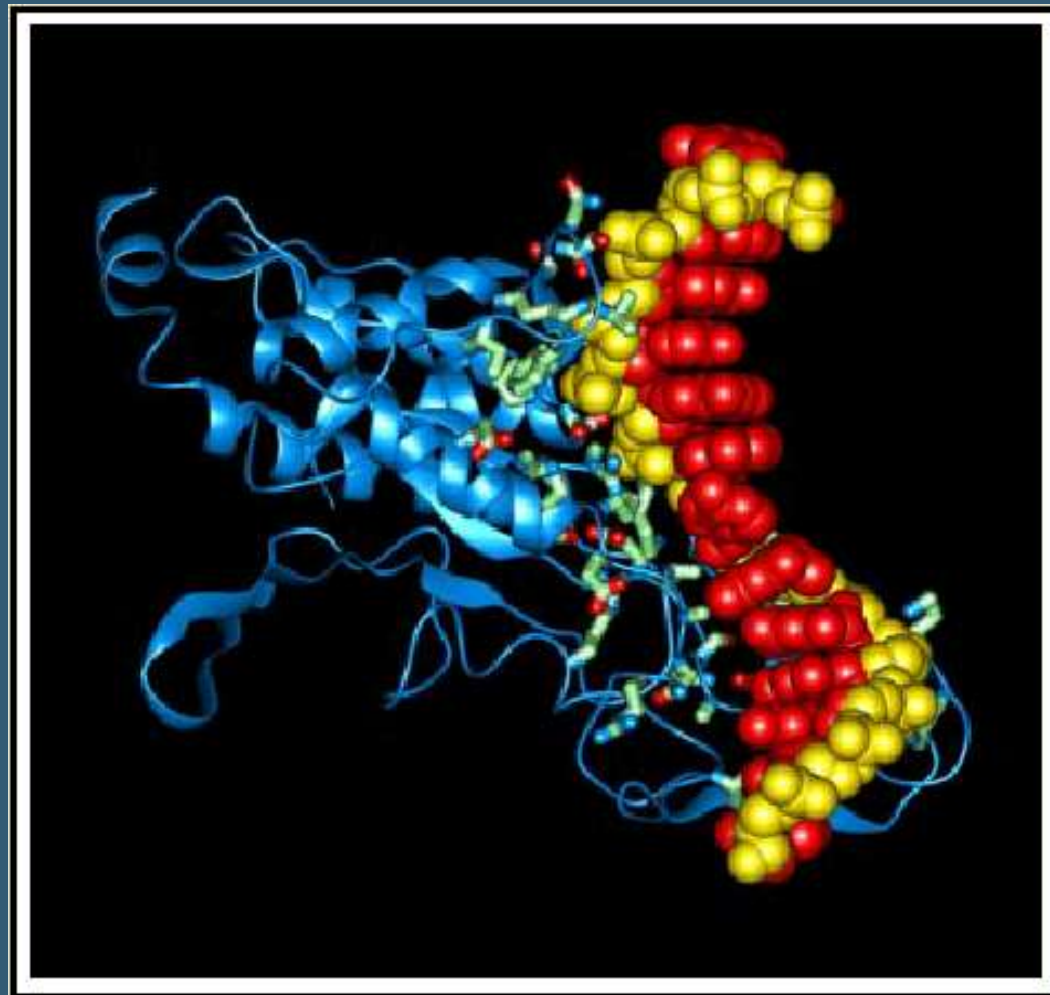
AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE



AFINITNÍ INTERAKCE



INTERAKCE MEZI DNA A ENDONUUKLEASOU



AFINITNÍ PÁRY

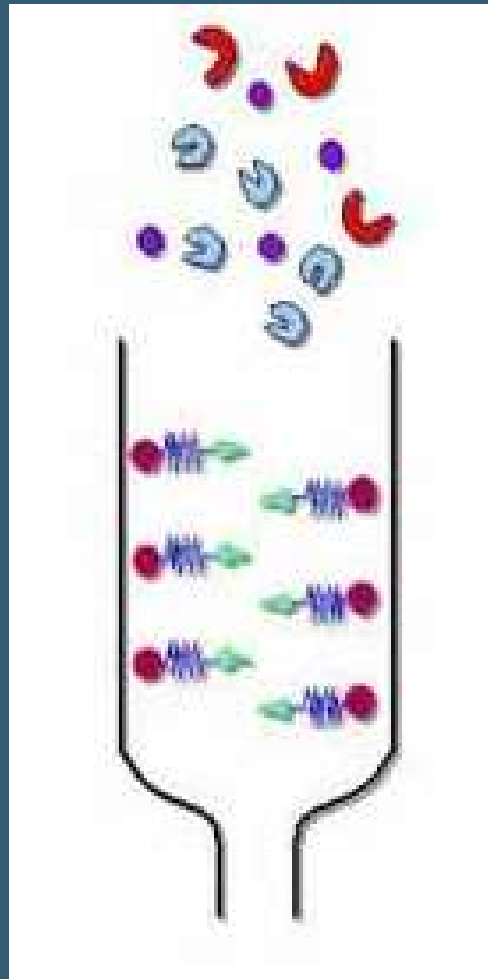


$$K_D = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

Ligand	Bílkovina	K_D (M)
antigen	polyklonální protilátka	$10^{-8} - 10^{-6}$
antigen	monoklonální protilátka	$10^{-12} - 10^{-8}$
biotin	avidin	10^{-15}
sacharid	lektin	$10^{-6} - 10^{-3}$
hormon, toxin	vazebný protein	$10^{-9} - 10^{-12}$
substrát	enzym	$10^{-7} - 10^{-3}$
inhibitor	enzym	$10^{-14} - 10^{-6}$

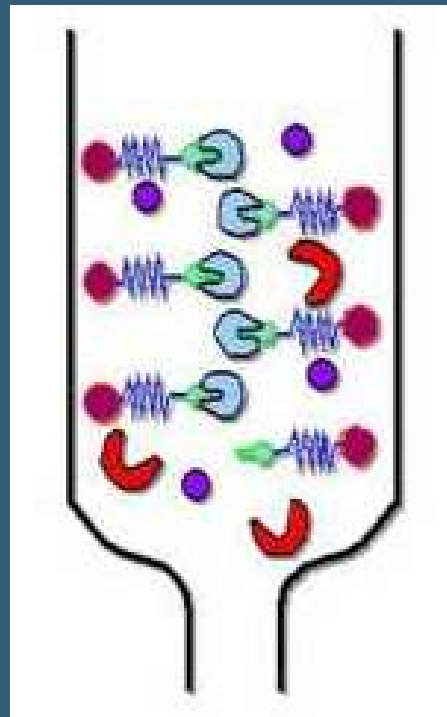
AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

NANESENÍ VZORKU



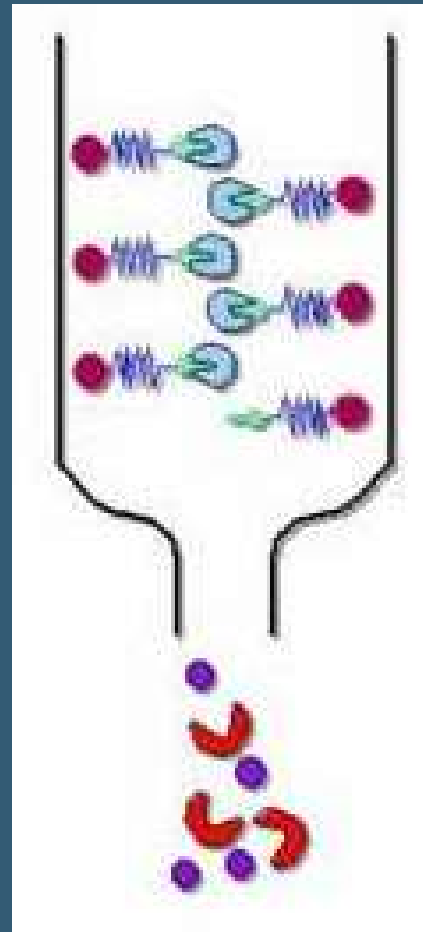
AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

VZNIK INTERAKCE



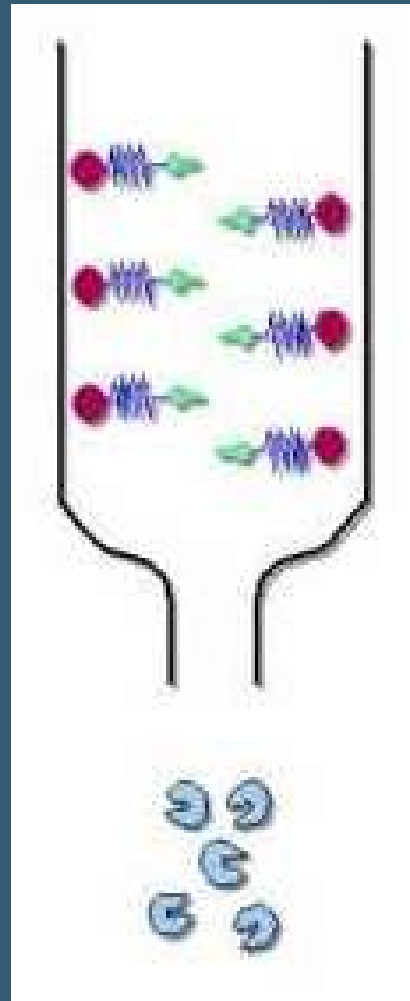
AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

VYMYTÍ BALASTŮ



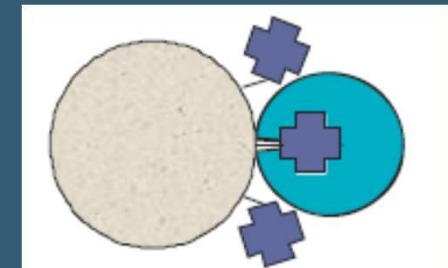
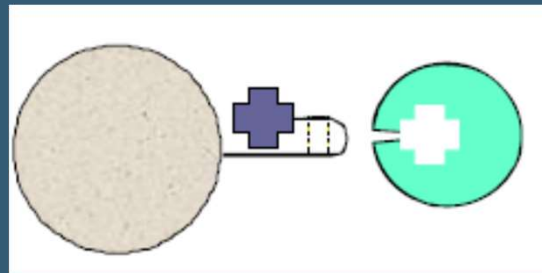
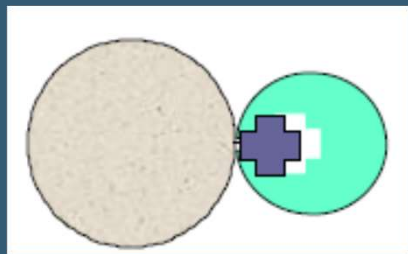
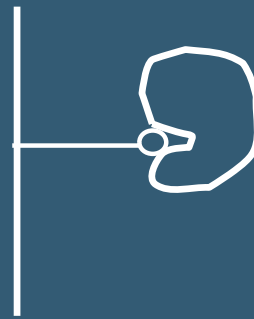
AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

ELUCE



PŘEDPOKLADY PRO VZNIK KOMPLEXU

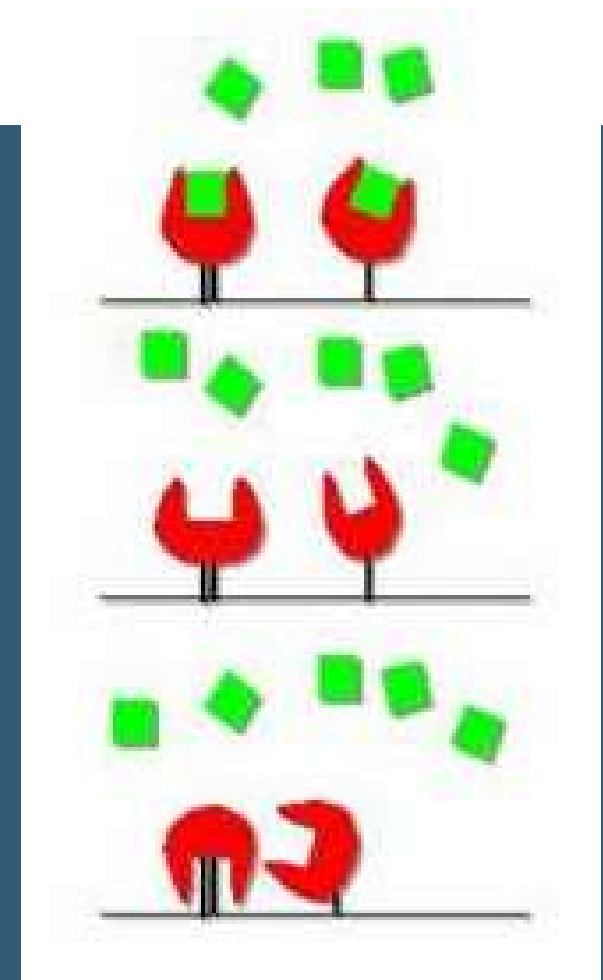
- Sterické – použití raménka (spacer)



PŘEDPOKLADY PRO VZNIK KOMPLEXU

• Konformační

• Vazebné



• Optimální pH, iontová síla

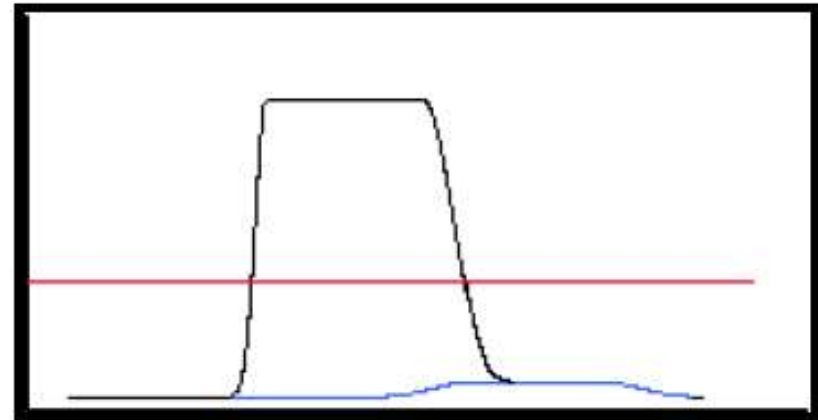
STACIONÁRNÍ FÁZE

- velké póry umožňující průnik velkých molekul
- co nejnižší nespecifické adsorpce
- nejčastěji agarosa (Sepharosa)
- ligand kovalentně navázaný přes –OH skupinu cukerné jednotky nosiče

PROVEDENÍ

Nanesení vzorku – nízká iontová síla

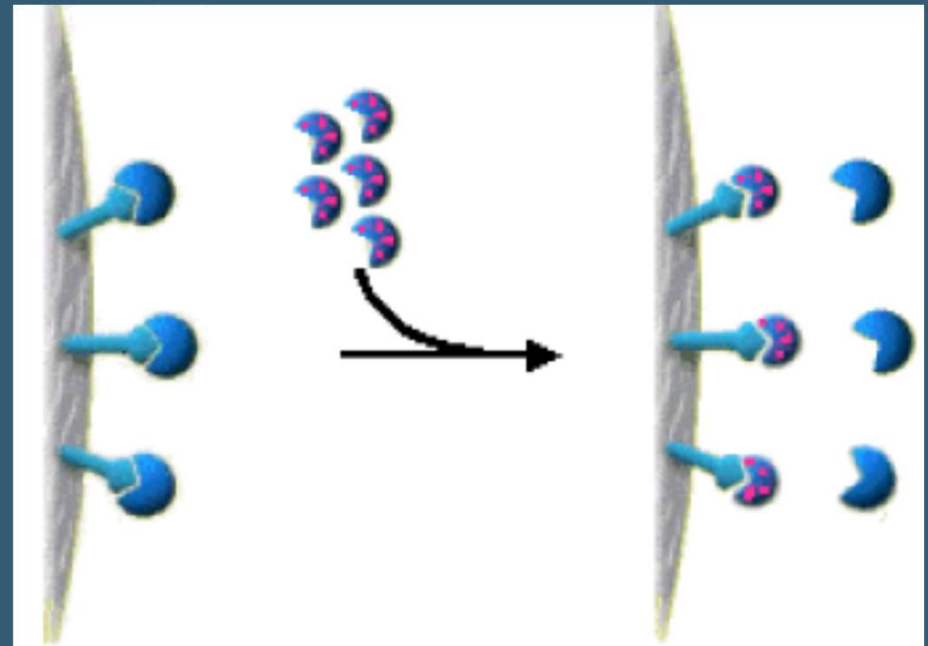
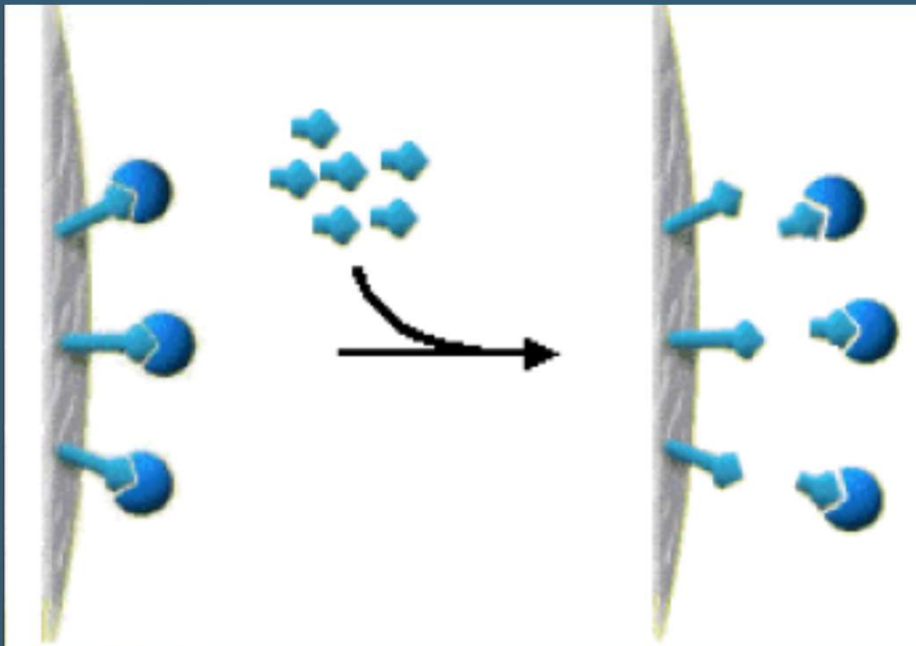
$K_D > 10^{-4}$ ~ slabá interakce



$K_D < 10^{-6}$ ~ silná interakce → obtížná eluce

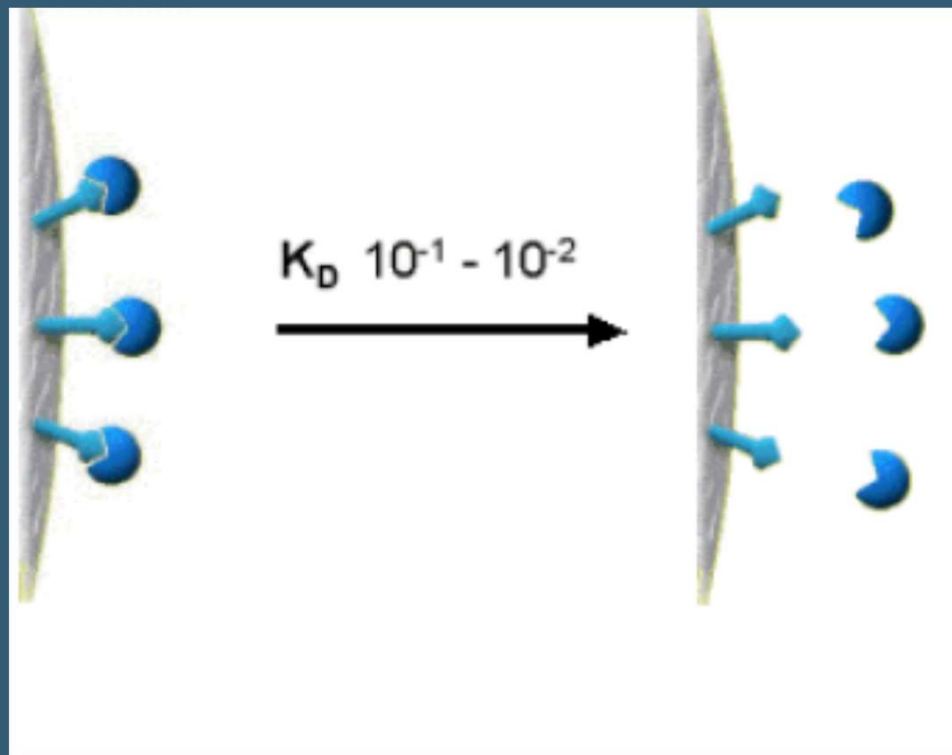
ELUCE

- Eluce – selektivní - volným ligandem
nebo kompetičním činidlem



ELUCE

- Eluce – neselektivní - změna pH,
iontové síly,
polarity

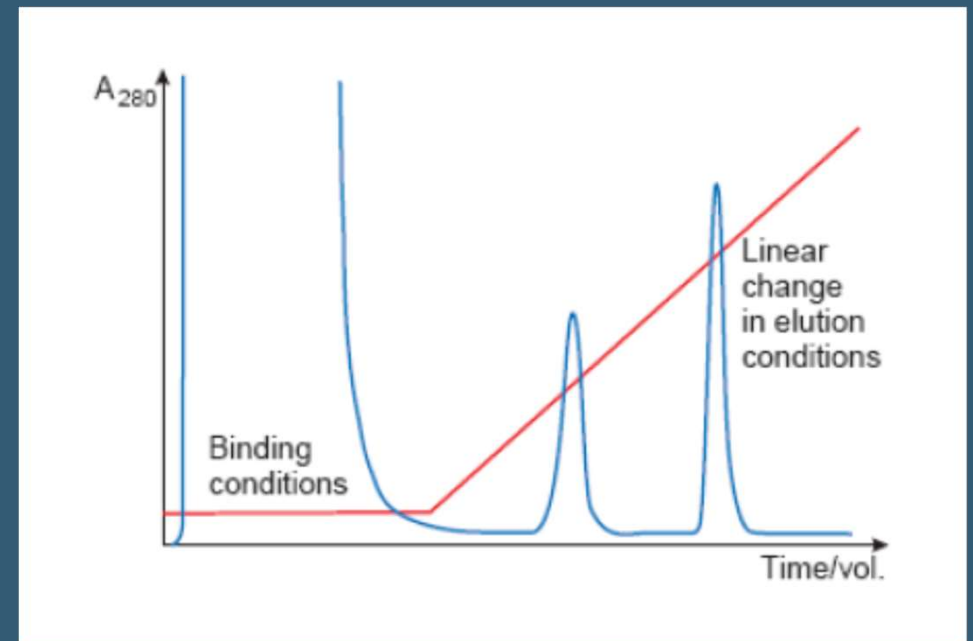
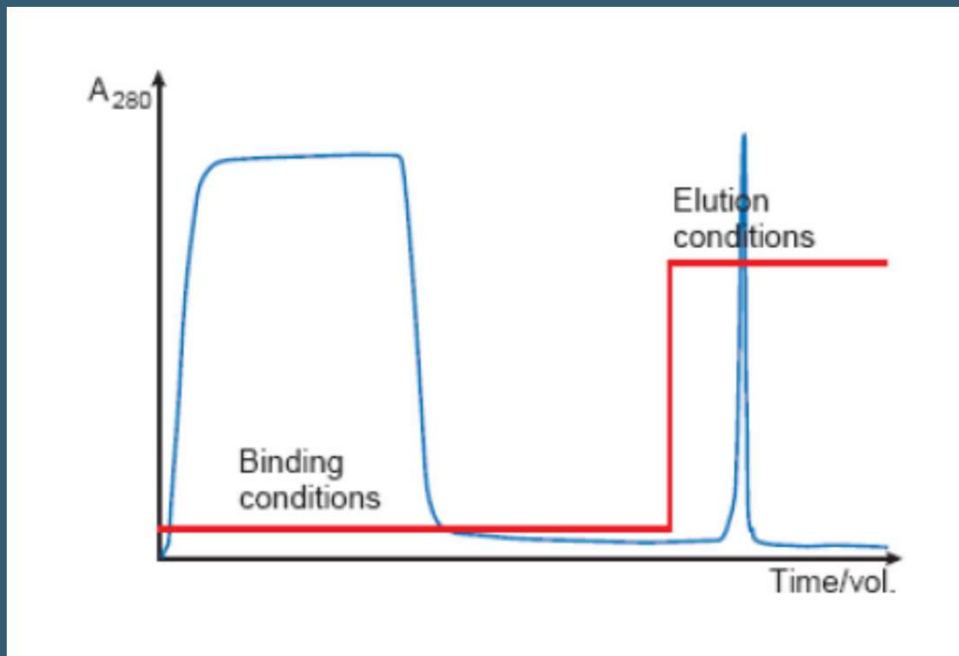


ELUCE

pulsní

x

gradientová



LIGANDY

Monospecifické

- váží pouze jedinou biomakromolekulu
- nutné si připravovat individuálně

Skupinově specifické

- váží biomakromolekuly s podobnými vlastnostmi
- komerčně dostupné

IMOBILIZACE LIGANDŮ

N-hydroxysukcinimid
(NHS)

-NH₂

CNBr

-NH₂

Karbodiimid

-NH₂, -COOH

Epoxid

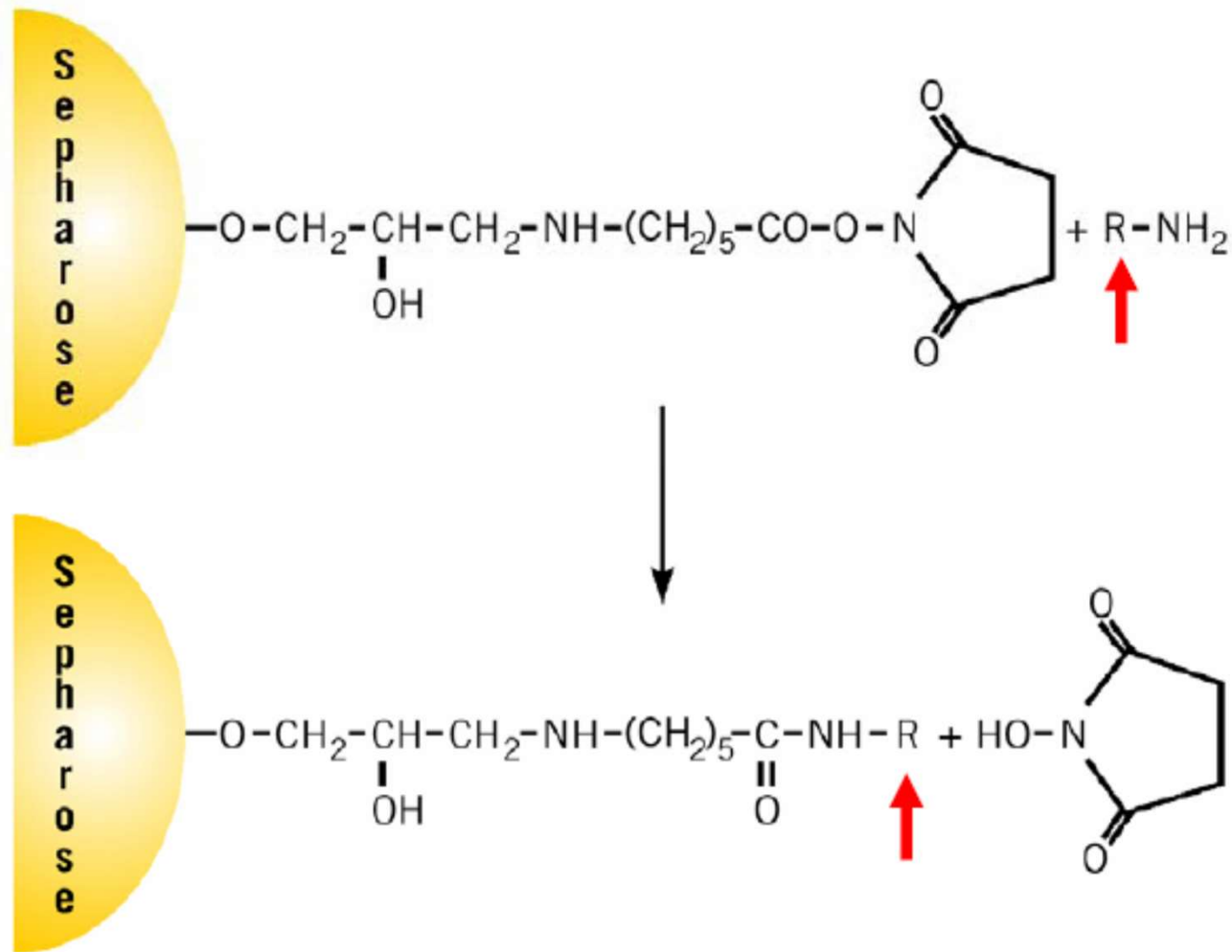
-SH, -NH₂, -OH

Copyrighted Material
Immobilized Affinity
Ligand Techniques

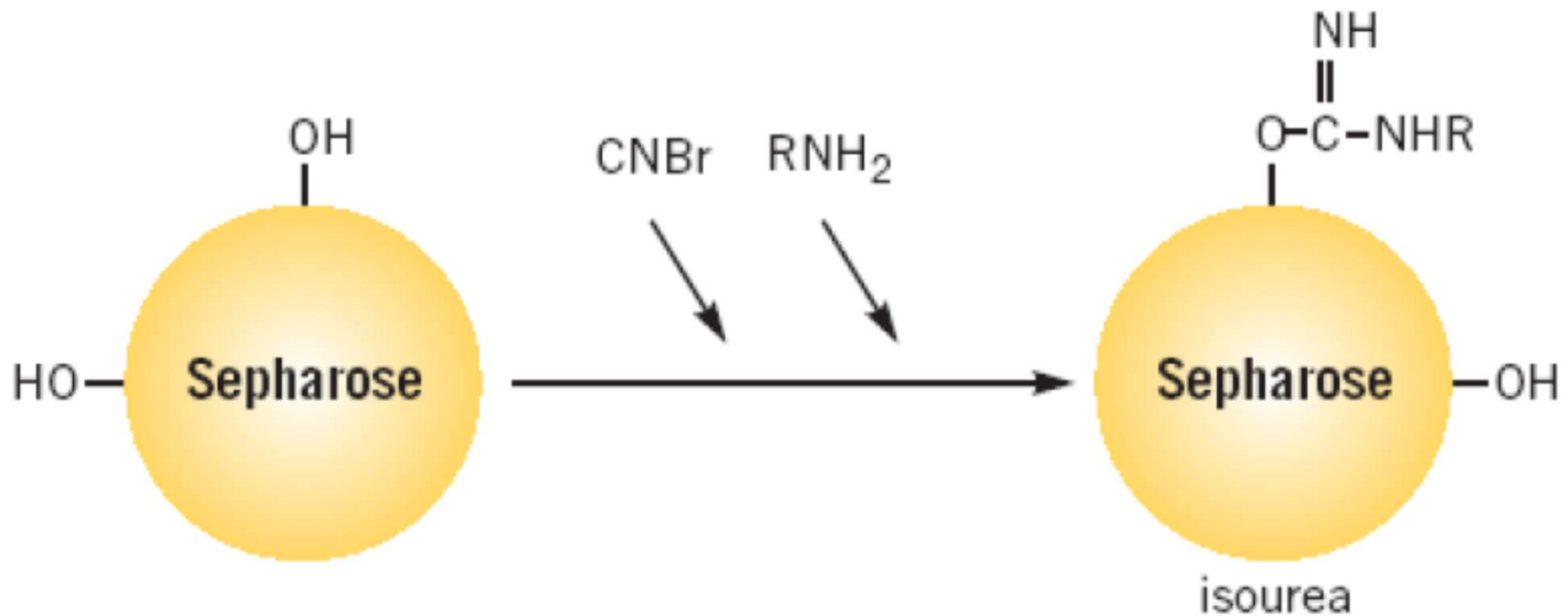


Greg T. Hermanson
A. Krishna Mallia
Paul K. Smith

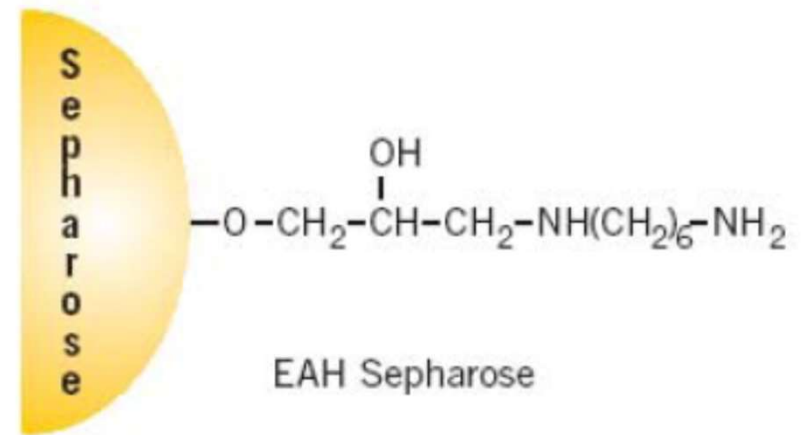
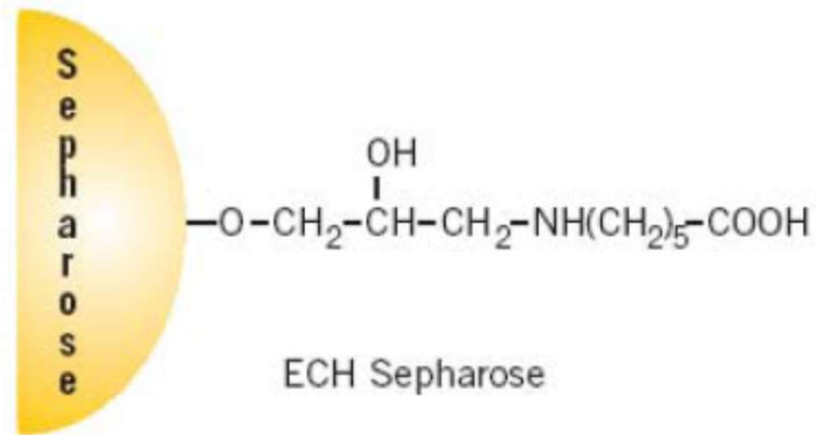
N-HYDROXYSUKCINIMID (NHS-SEPHAROSA)



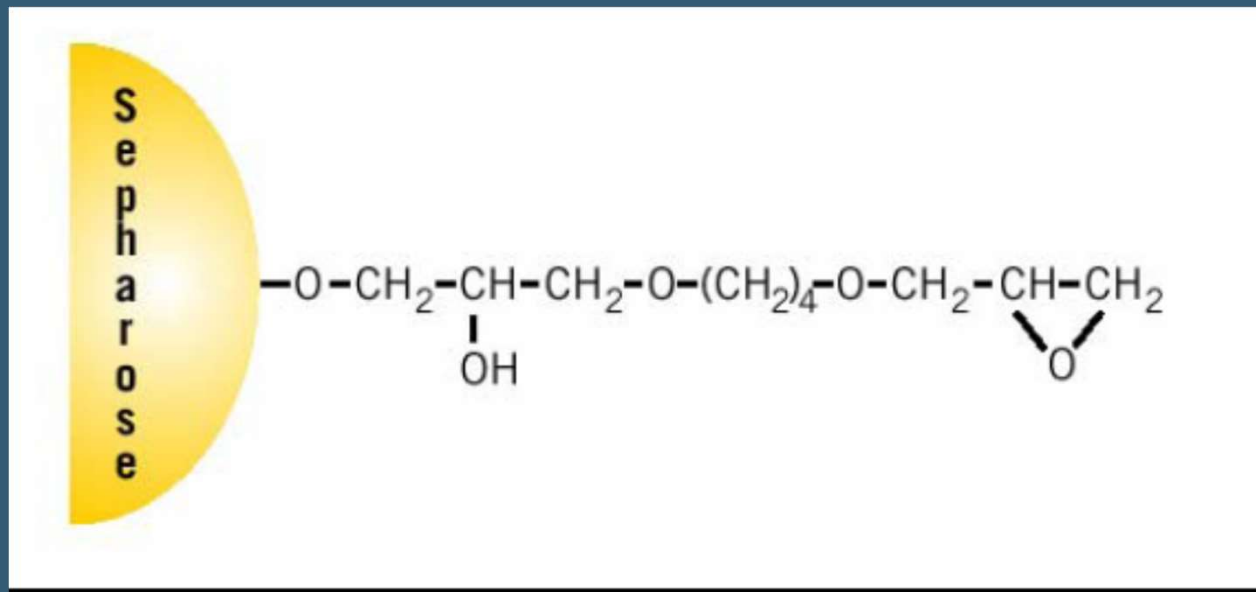
CNBR (CNBR AKTIVOVANÁ SEPHAROSA)



N, N'-DISUBSTITUOVANÝ KARBODIIMID



EPOXID (EPOXY-AKTIVOVANÁ SEPHAROSA 6B)



SKUPINOVĚ SPECIFICKÉ LIGANDY

skupinově specifický ligand	specifita
Protein A	Fc region IgG
Protein G	Fc region IgG
Lektiny	glukopyranosylové a mannopyranosylové skupiny
Cibacron Blue	široká skupina enzymů, NAD ⁺ dependentní enzymy, sérový albumin
Procion Red	NADP ⁺
Lysin	plasminogen, rRNA
Arginin	serinové proteasy
Benzamidin	serinové proteasy
Kalmodulin	proteiny regulované kalmodulinem
Heparin	kolagulační faktory, lipoproteiny, lipasy, hormony, steroidní receptory, nukleové kyseliny vázající enzymy
Streptavidin	Biotin a biotinylované látky
Oligo (dT, dA, ...)	mRNA, nukleasy
Kovové ionty	proteiny a peptidy obsahující dostupný His

SKUPINOVĚ SPECIFICKÉ LIGANDY PROTEIN A A PROTEIN G

protein A – *Staphylococcus aureus*

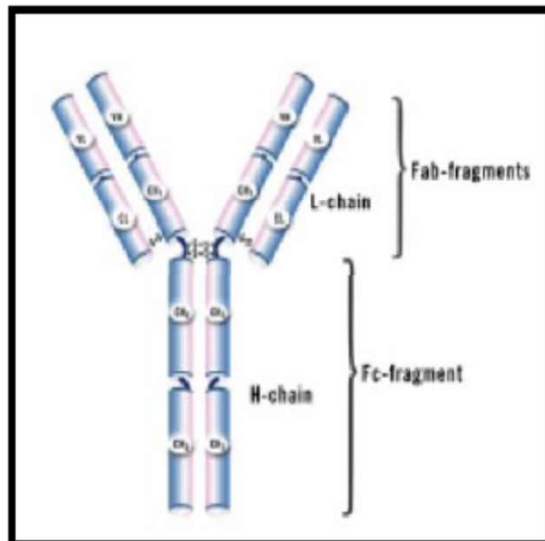
protein G – *Streptococcus*

purifikace:

monoklonální protilátky IgG

polyklonální protilátky IgG

imunokomplexy



Species	Subclass	Protein A binding	Protein G binding
Human	IgA	variable	-
	IgD	-	-
	IgE	-	-
	IgG ₁	++++	++++
	IgG ₂	++++	++++
	IgG ₃	-	++++
Chicken	IgG ₄	++++	++++
	IgM ^A	variable	-
Chicken	IgY	-	-
Avian egg yolk	IgY ^B	-	-
Cow		++	++++
Dog		++	+
Goat		-	++
Guinea pig	IgG ₁	++++	++
	IgG ₂	++++	++
Hamster		+	++
Horse		++	++++
Koala		-	+
Llama		-	+
Monkey (rhesus)		++++	++++
Mouse	IgG ₁	+	++++
	IgG _{2a}	++++	++++
	IgG _{2b}	+++	+++
	IgG ₃	++	+++
	IgM ^A	variable	-
Pig		+++	+++
Rabbit	no distinction	++++	+++
Rat	IgG ₁	-	+
	IgG _{2a}	-	++++
	IgG _{2b}	-	++
	IgG ₃	+	++
Sheep		+/-	++

SKUPINOVĚ SPECIFICKÉ LIGANDY PROTEIN A A PROTEIN G

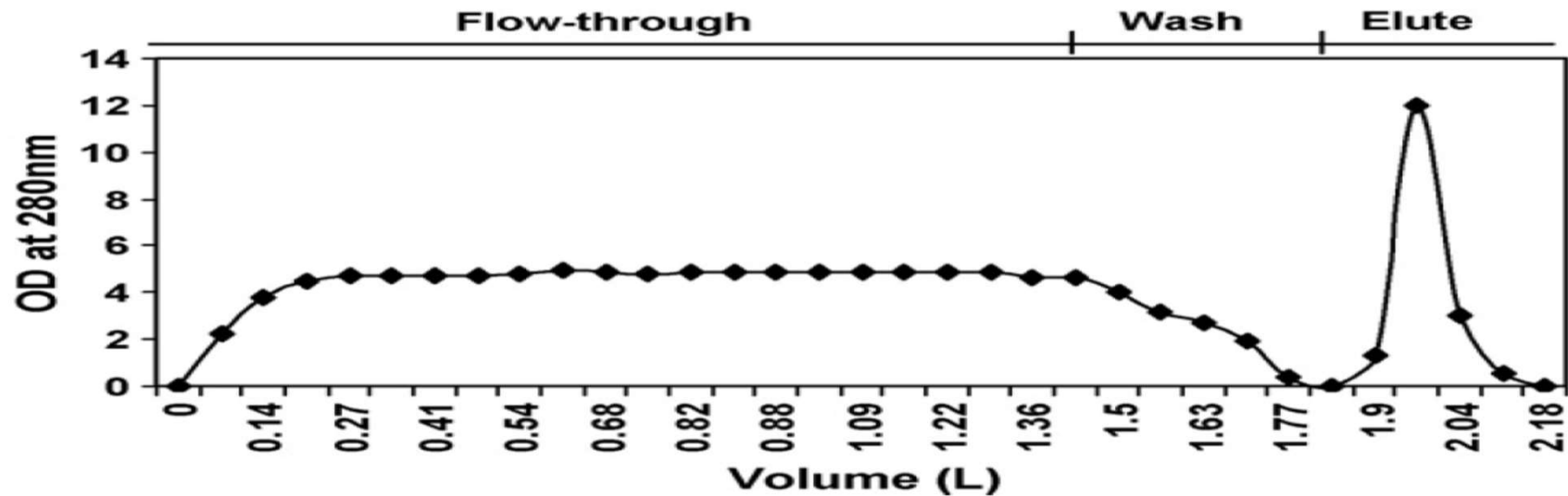


Fig. 3. Chromatogram of affinity chromatography using ProSep-vA Ultra. Antibody fragment [F(ab)₂] did not bind to ProSep-vA Ultra (fraction 0–1.4 l) and majority of the contaminants [Fc fragment] that bound to the affinity matrix eluted at pH 3.0 (fraction 1.84–2.18 l).

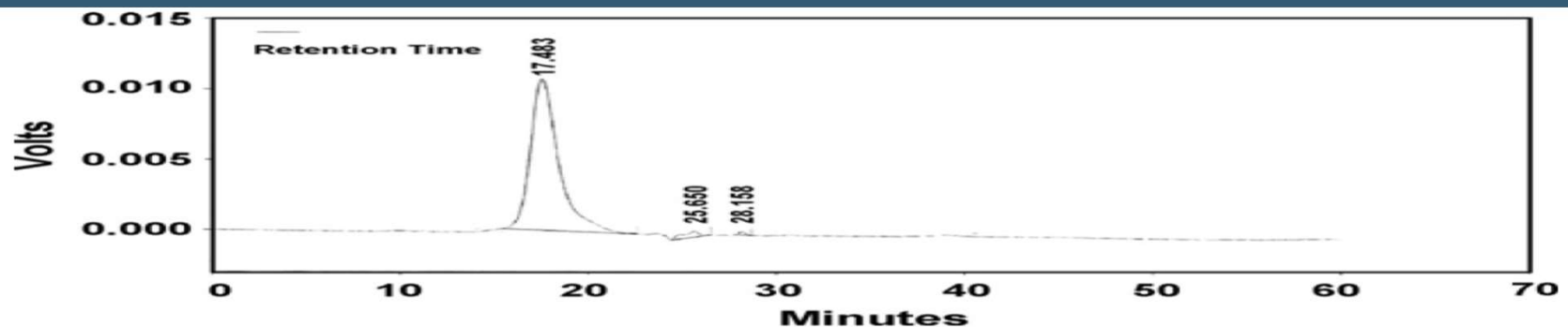
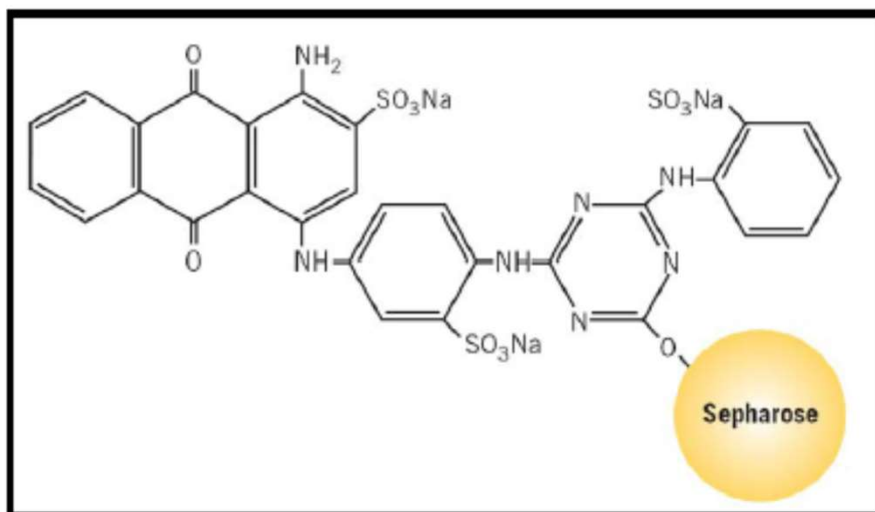


Fig. 5. HPLC analysis of purified F(ab)₂. Elution profile of F(ab)₂ as single homogeneous peak represents >99% purity of the product. Column: SEC, TSK Gel-3000 SWXL (TosoHass). Sample: 20 μ l of purified F(ab)₂; eluent: 20 mM phosphate buffer in 150 mM sodium chloride solution, pH 7.2, Detection at 280 nm; flow-rate: 1 ml min⁻¹.

SKUPINOVĚ SPECIFICKÉ LIGANDY „DYE LIGAND“

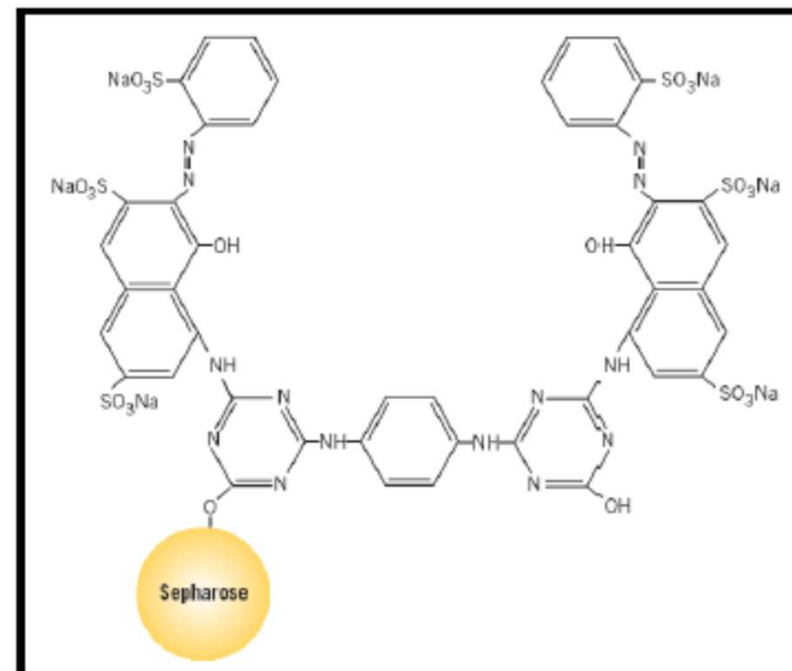
Cibacron™ Blue F3G-A
(Blue Sepharosa)



NAD^+

Dependentní dehydrogenasy

Procion™ Red
(Red Sepharosa)



NADP^+

Skupinově specifické ligandy

Cibacron Blue F4G-A

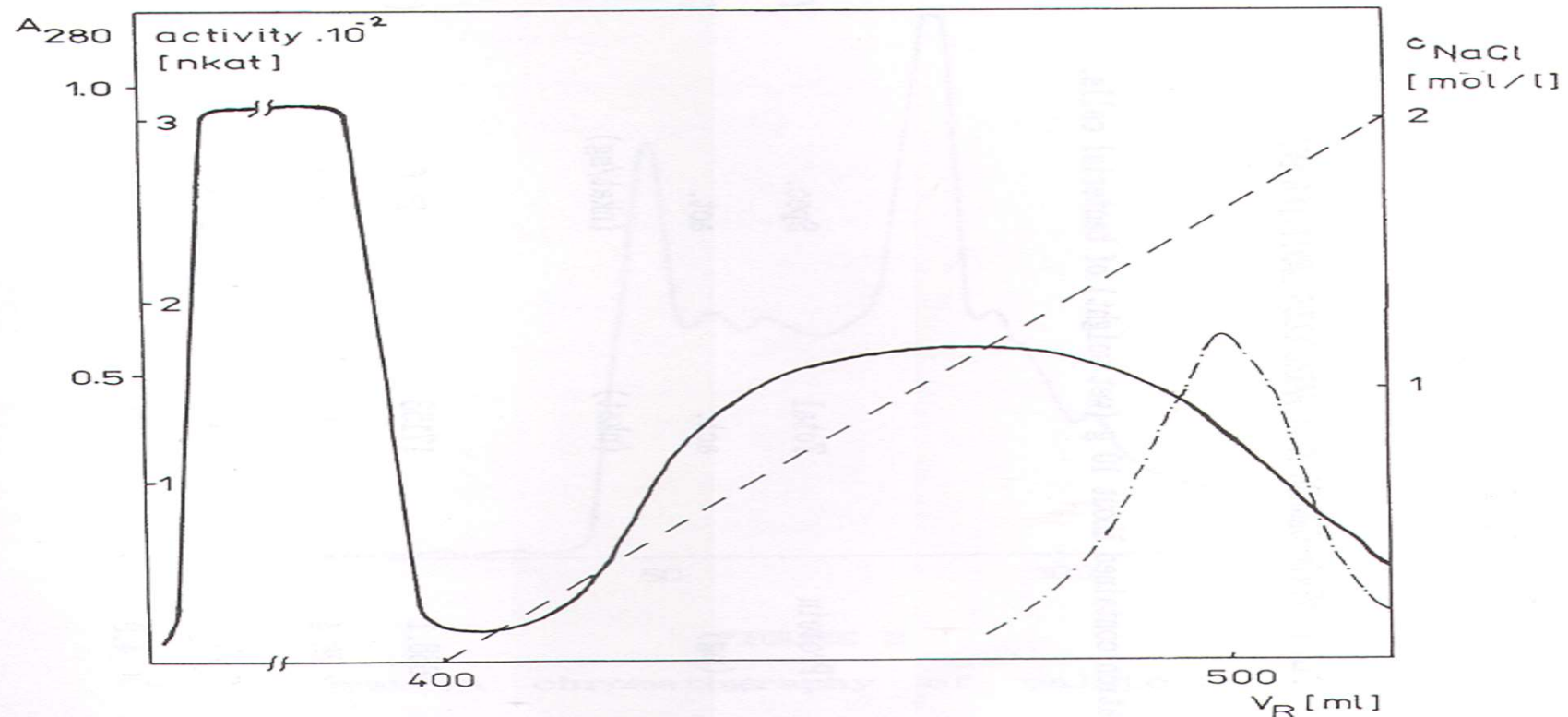


FIGURE 1

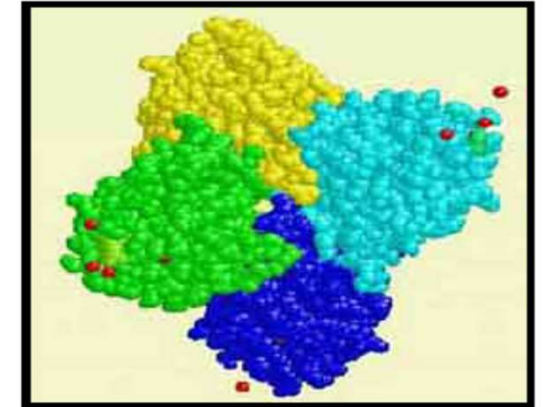
Affinity chromatography of malate dehydrogenase from *P.denitrificans* on Matrex Gel Blue A (step 2). V_e , elution volume; —, absorbance at 280 nm (A_{280}); -•-, enzyme activity; -----, NaCl gradient (buffer A, 0.02 mol/l sodium phosphate (pH 8.0); buffer B, the same as buffer A but with 1.8 mol/l NaCl and 5% ethylene glycol); flow rate, approx. 0.7 ml/min.

SKUPINOVĚ SPECIFICKÉ LIGANDY

LEKTINY

Konkavalin A

- lektin z *Canavalia ensiformis* (jack bean)
- tetramerní metalloprotein
- větvené mannosidy, cukry s terminální mannosou nebo glukosou ($\alpha\text{Man} > \alpha\text{Glc} > \text{GlcNAc}$)



- purifikace glycoproteinů, polysacharidů a glykolipidů
- detekce změn ve složení látek obsahujících cukry
- izolace povrchových buněčných glykoproteinů

„Lentil“ lektin

- lektin z *Lens culinaris* (čočka)
- větvené mannosidy obsahující fukosu α -1,6 vázanou na N-acetylglukosamin ($\alpha\text{Man} > \alpha\text{Glc} > \text{GlcNAc}$)
- membranové glykoproteiny, povrchové buněčné antigeny, virální glykoproteiny

SKUPINOVĚ SPECIFICKÉ LIGANDY CON A

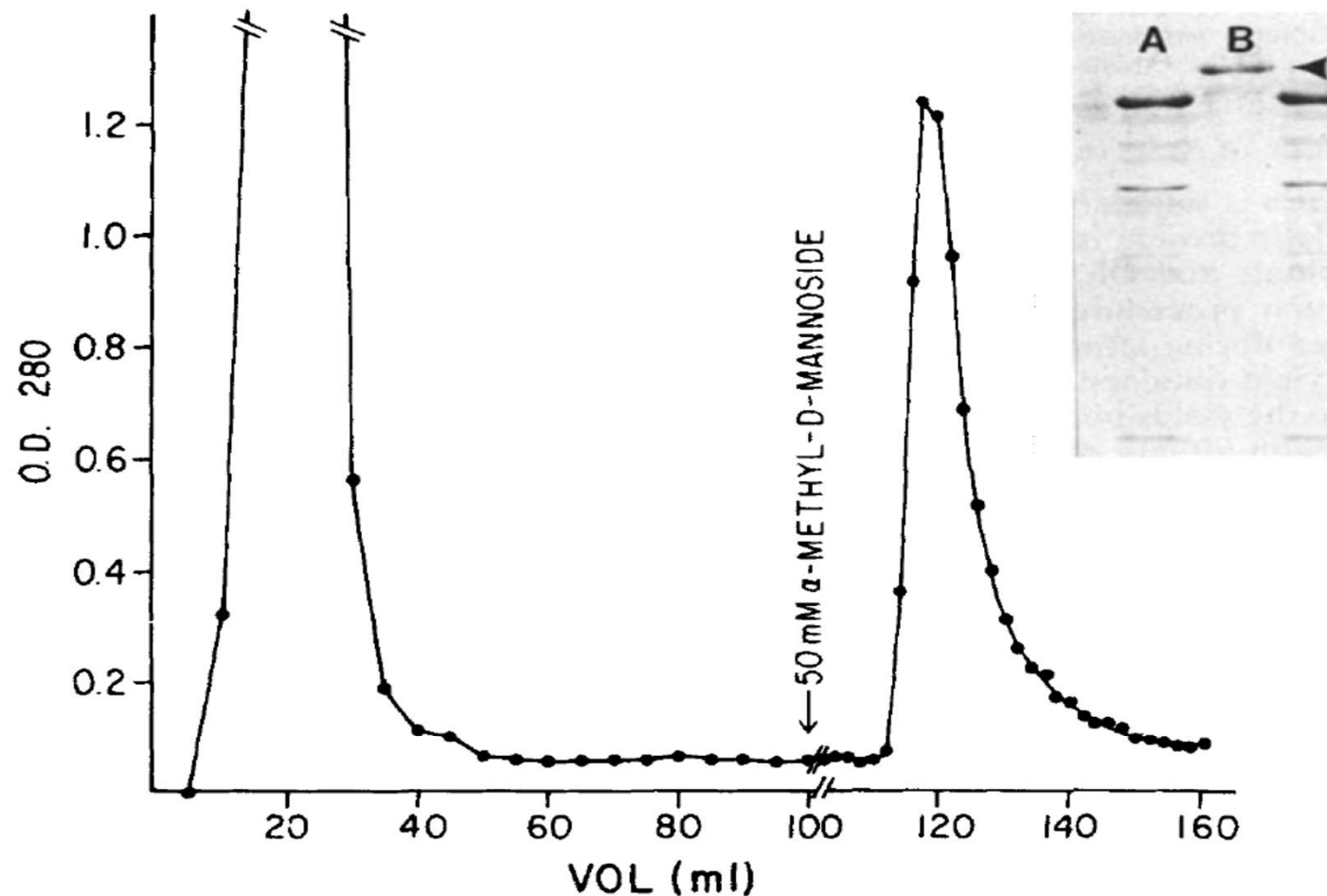


FIG. 2. Step-elution profile of sciatic nerve protein from concanavalin A-agarose. Sciatic nerve protein was applied to a 0.9×20 cm column of concanavalin A-agarose and eluted with Con A buffer at a flow rate of 10 ml/h. When the A_{280} of the effluent fell below 0.05, bound glycoproteins were desorbed with 50 mM- α -methylmannoside in Con A buffer. (*Inset*) Lane A: SDS electrophoretic profile of proteins eluted in the wash peak (21 μ g protein); lane B: SDS electrophoretic profile of glycoproteins eluted by 50 mM- α -methylmannoside (12 μ g protein). Arrowhead marks position of the sciatin band. Note the absence of this band in the wash peak (lane A).

SKUPINOVĚ SPECIFICKÉ LIGANDY CON A

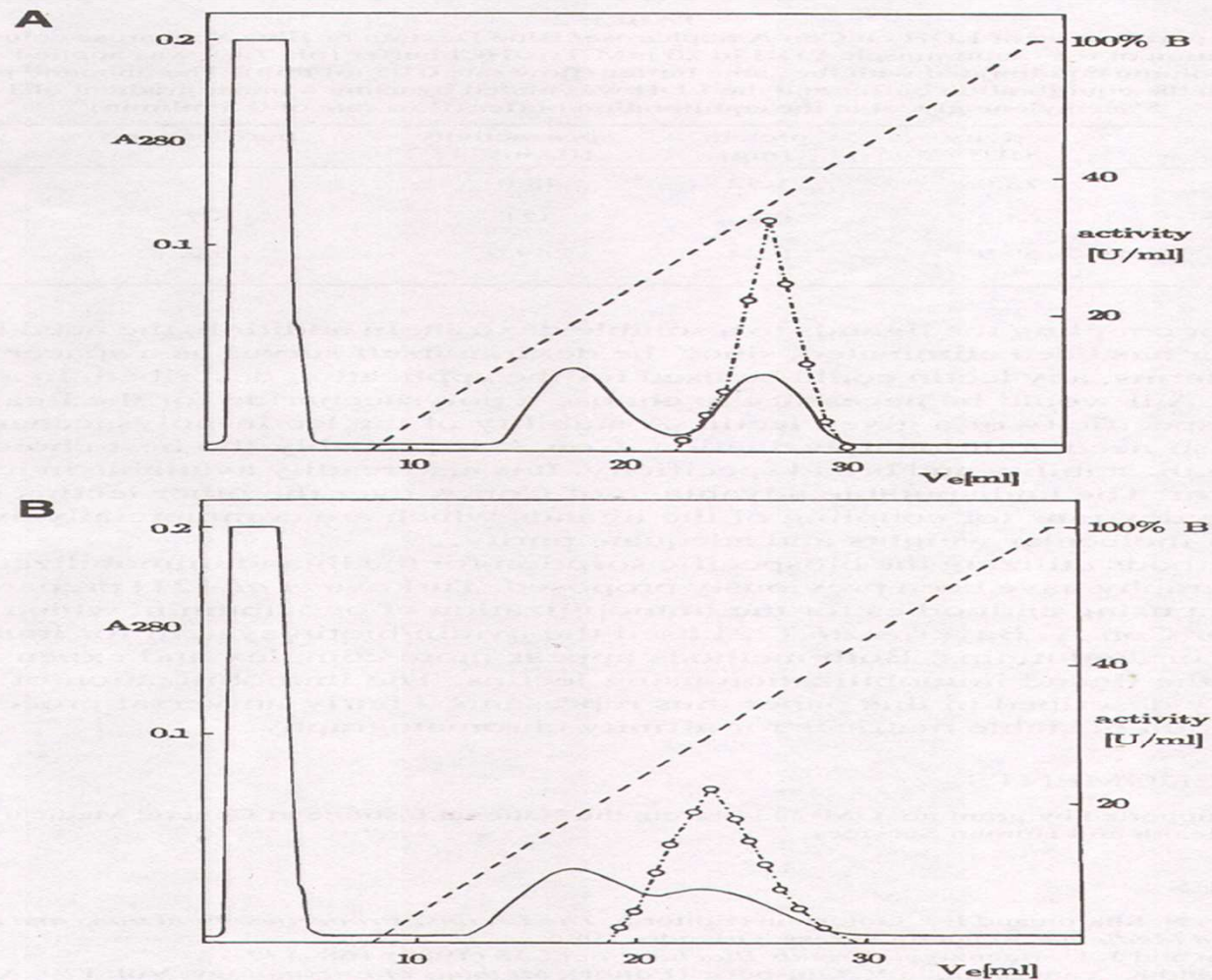
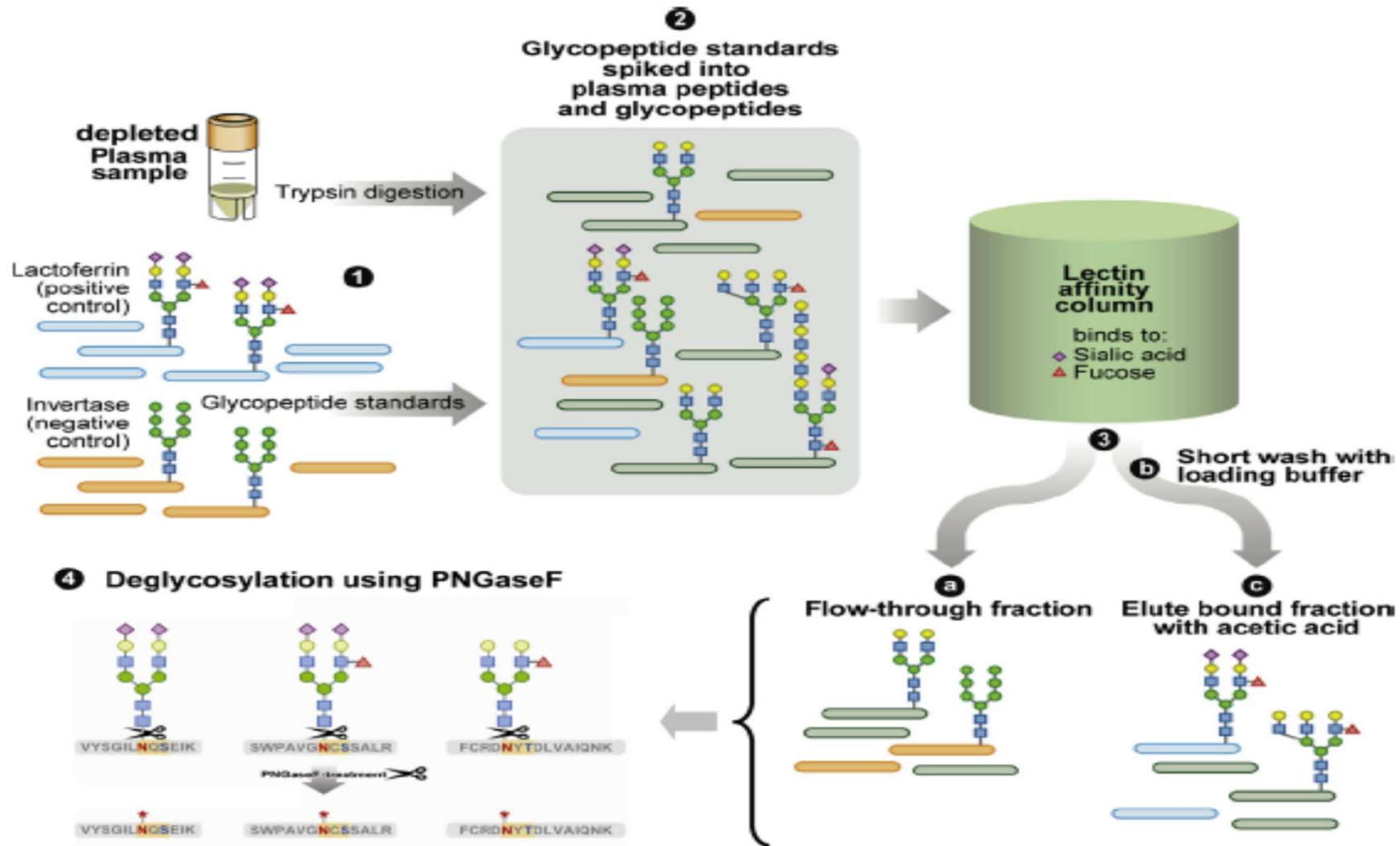
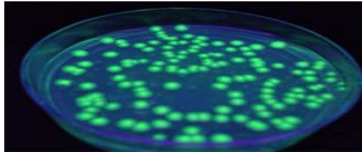


FIGURE 1 Partial purification of the crude preparation of the rabbit muscle LDH on Con A Sepharose/Blue Dextran (Figure 1.A) or Blue Sepharose (Figure 1.B) columns. Approximately 1.5 mg of protein were applied on the column. Buffers: A = 20 mM Tris HCl (pH 7.4) B = 20 mM Tris HCl (pH 7.4) with 1 M NaCl and 5% ethylene glycol flow rate = 0.05 ml/min during the loading of sample 0.5 ml/min during the elution V_e - elution volume; ----- absorbance at 280 nm; ——— gradient B; --o-- activity of LDH.

SKUPINOVĚ SPECIFICKÉ LIGANDY LEKTINY



VYUŽITÍ AC PRO PURIFIKACI REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

fúzní kotva	imobilizovaný ligand	podmínky vazby	podmínky eluce
Glutathion S-transferasa GST	redukovaný glutathion	Neutrální pH, nedenaturující prostředí, glutathion musí být redukovaný a GST musí být aktivní	volný redukovaný glutathion
Histidinová kotva His-tag	Chelatovaný nikl nebo kobalt	Neutrální pH bez redukčních a oxidačních látek	>200 mM Imidazol, nízké pH, silné chelatační činidlo
Maltose Binding Protein MBP	Amylosa	Neutrální pH, nedenaturující prostředí; přídavek NaCl k snížení nespecifické sorbce	maltosa
Protein A	IgG	Neutrální pH, nedenaturující prostředí	změna pH, iontové síly
Green Fluorescent Protein GFP	Anti-GFP antibody 	Neutrální pH, nedenaturující prostředí	nízké pH, iontová síla

Analytická afinitní chromatografie

Analýza vazby ligandu na biopolymer

Určení disociační konstanty komplexu biopolymer – zakotvený ligand (K') má význam zejména pro posouzení vhodnosti nosiče se zakotveným afinantem z hlediska praktické použitelnosti. Hodnota K' se musí nacházet v intervalu (10^{-6} - $5 \cdot 10^{-3}$) v jednotkách mol.l^{-1} . Vazba na imobilizovaný ligand bývá zpravidla slabší než na ligand volný.

$$1 / (V_R - V_0) = K' / (V_0 - V_M)^* c_L$$

V_M - mrtvý objem kolony

V_0 - el. objem nezadržovaného analog. biopolymeru (M_r)

V_R - eluční objem studovaného biopolymeru

c_L - koncentrace vázaného ligandu

Analytická afinitní chromatografie

Analýza vazby ligandu na biopolymer

Určení disociační konstanty komplexu biopolymer - volný ligand (K) vychází z předpokladu, že oba ligandy (volný i zakotvený) se vážou na biopolymer kompetitivně (metoda kompetitivní eluce). Na kolonu obsahující nosič s vhodným afinantem nanese biopolymer, k eluci použijeme určitou koncentraci kompetitivního ligandu (c_L') a změříme eluční objem biopolymeru V_R . Provedeme sérii pokusů s různými koncentracemi ligandu, získáme různé eluční objemy.

$$1 / (V_R - V_0) = K' / (V_0 - V_M)^* c_L' + [K'^* c_L] / [(V_0 - V_M)^* c_L'^* K]$$

AFINITNÍ ULTRAFILTRACE



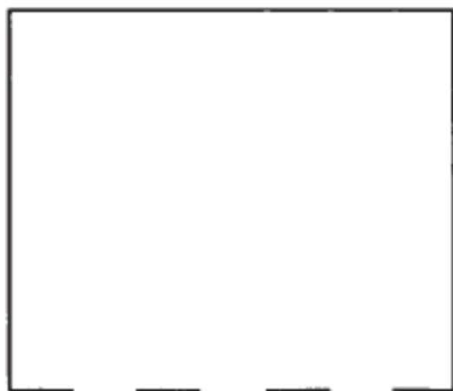
makromolekulární afinitní ligand



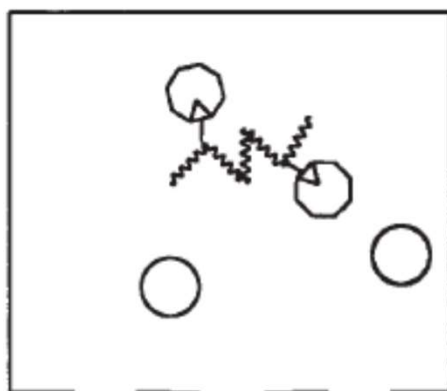
purifikovaná bílkovina



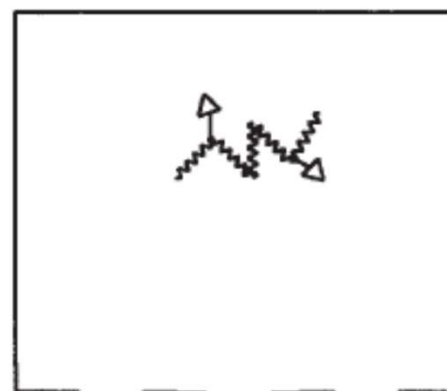
balastní bílkovina



inkubace

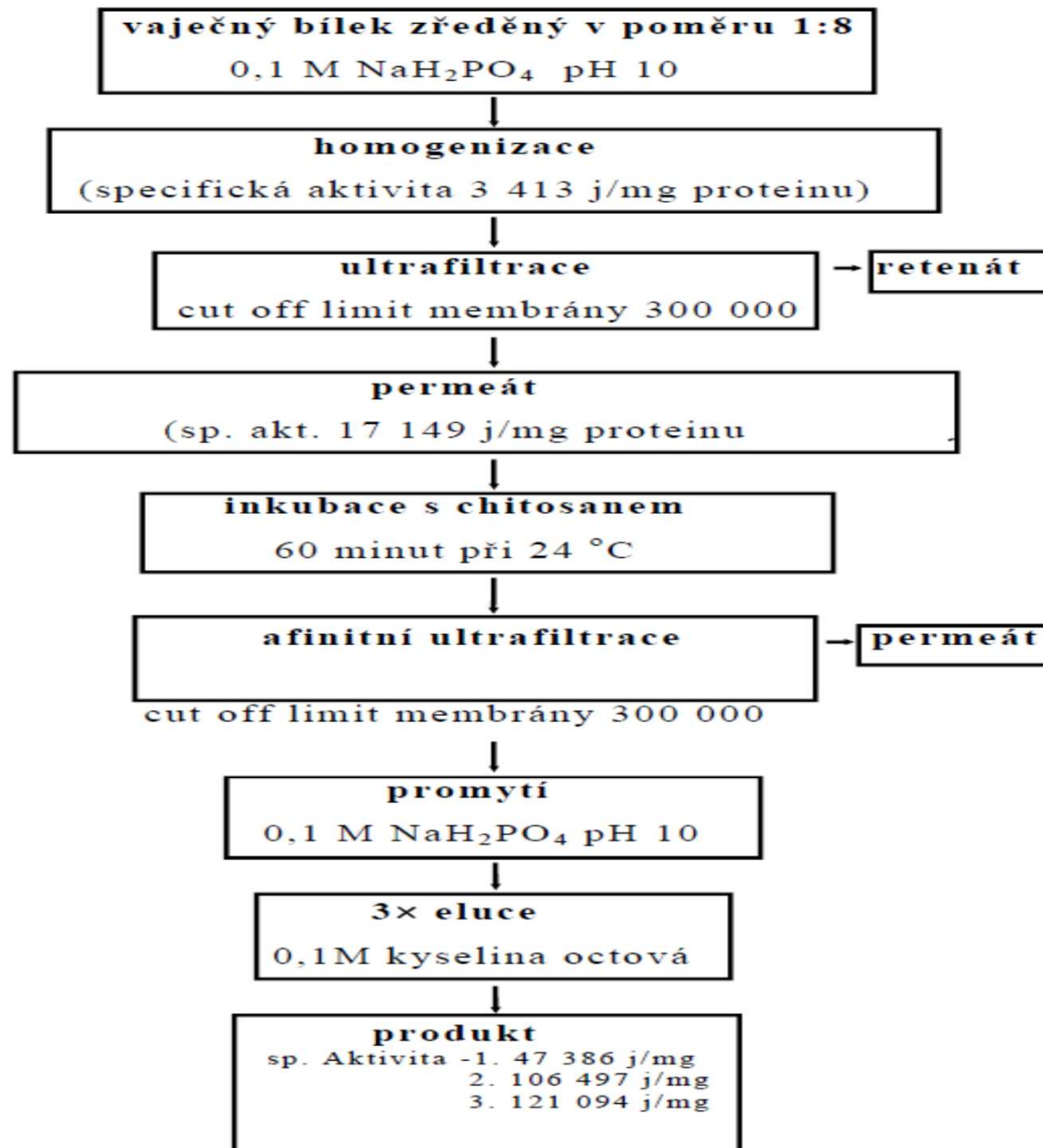


promývání



eluce

AFINITNÍ ULTRAFILTRACE



AFINITNÍ PRECIPITACE

separovaná bílkovina

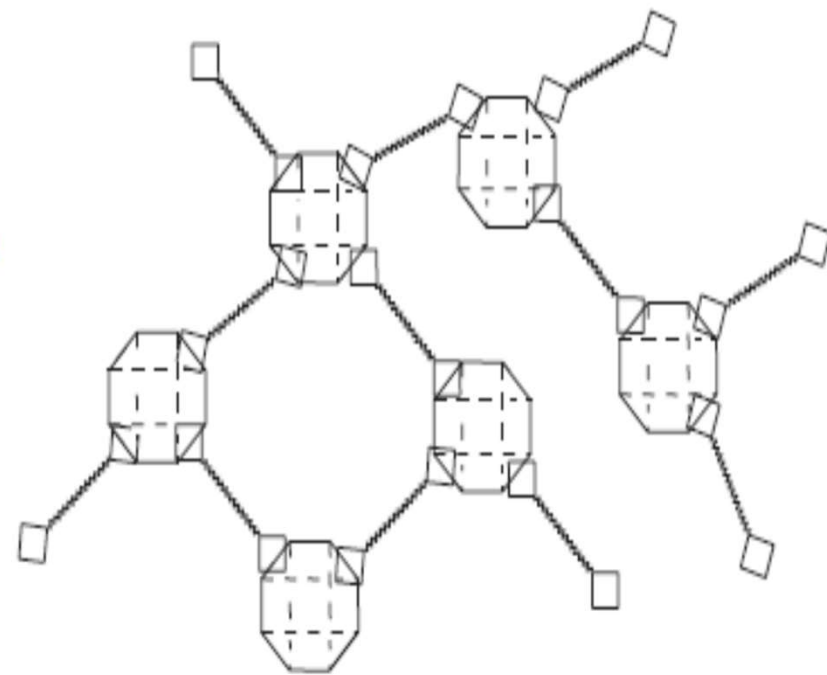


+



bis-ligand

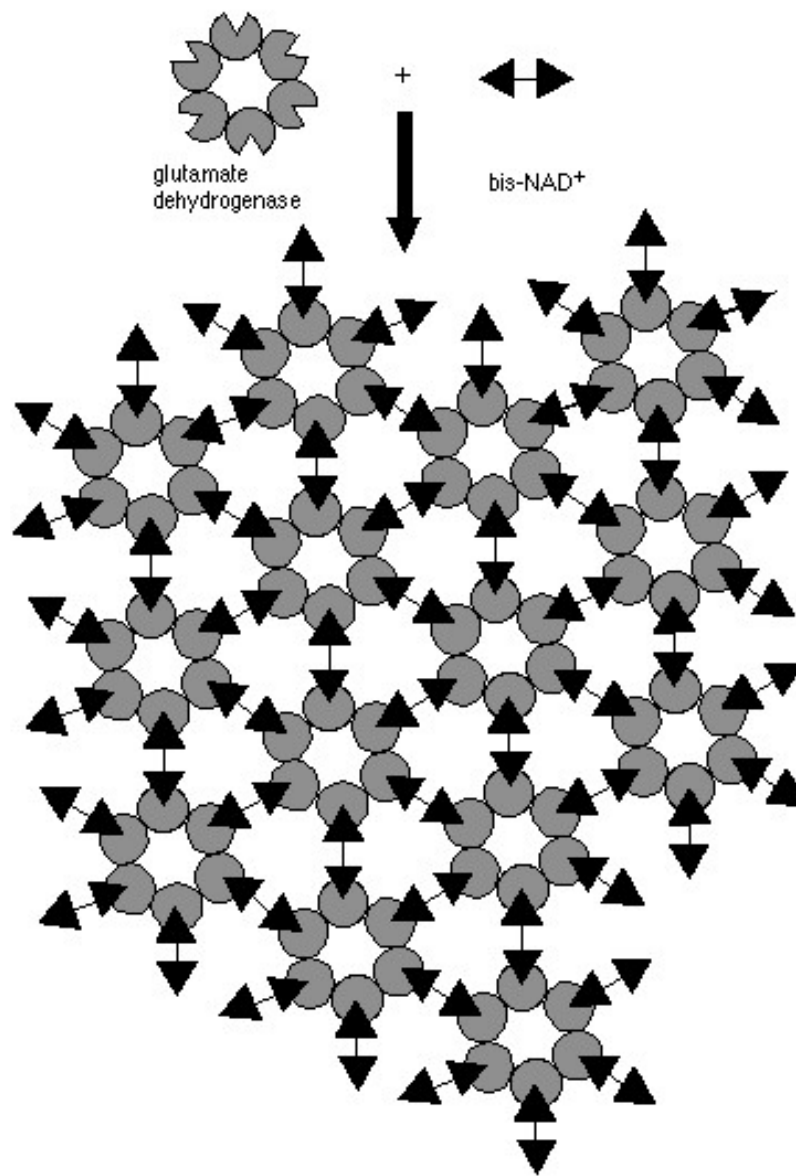
vazba
+
precipitace



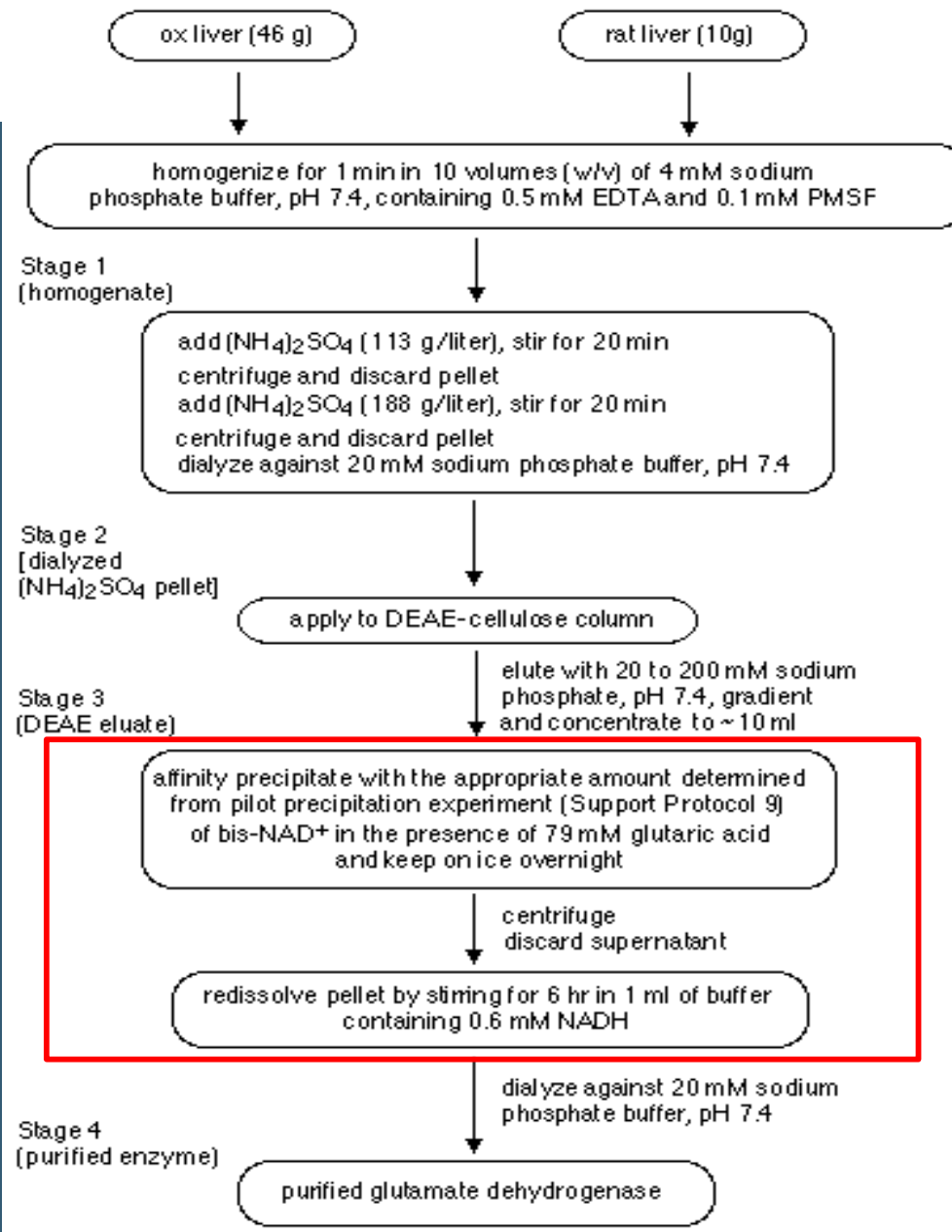
komplex (bílkovina - bis-ligand)_n

nerozpustný

AFINITNÍ PRECIPITACE



AFINITNÍ PRECIPITACE



AFINITNÍ PRECIPITACE

Table 1.4.7 Purification of Glutamate Dehydrogenase From Ox Liver According to Alternate Protocol 1

Stage (see Fig. 1.4.4)	Volume (ml)	Total protein (mg) ^a	Total activity (μmol/min)	Specific activity (μmol/min/mg)	Purification (x-fold)	Yield (%)
1	370	8580	1920	0.2	1	100
2	75	2010	1640	0.3	4	86
3	8.4	139	408	2.9	13	21
4	1.2	9.4	376	40	180	20

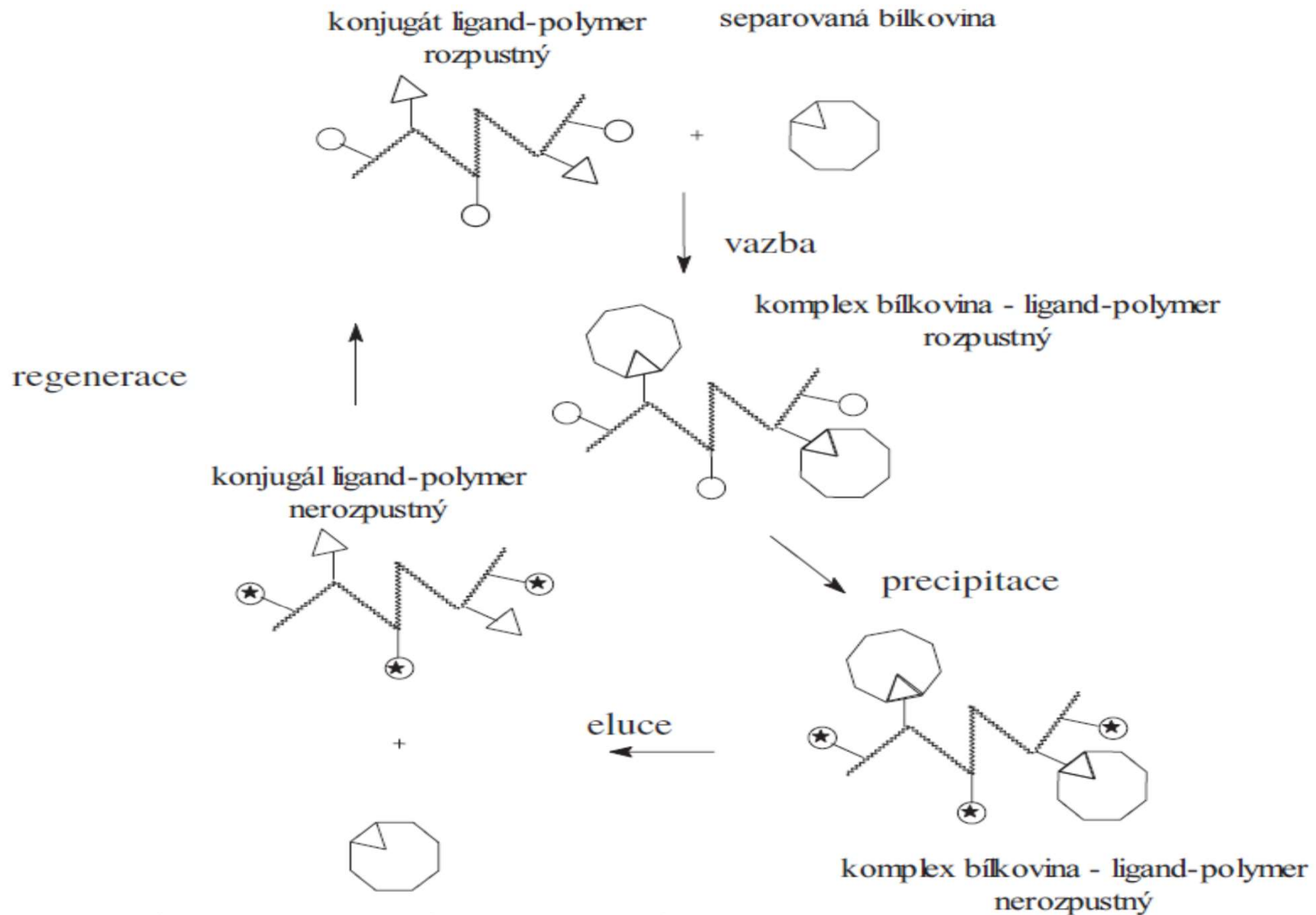
^aProtein concentration determined by the Lowry method.

Table 1.4.8 Purification of Glutamate Dehydrogenase From Rat Liver According to Alternate Protocol 1

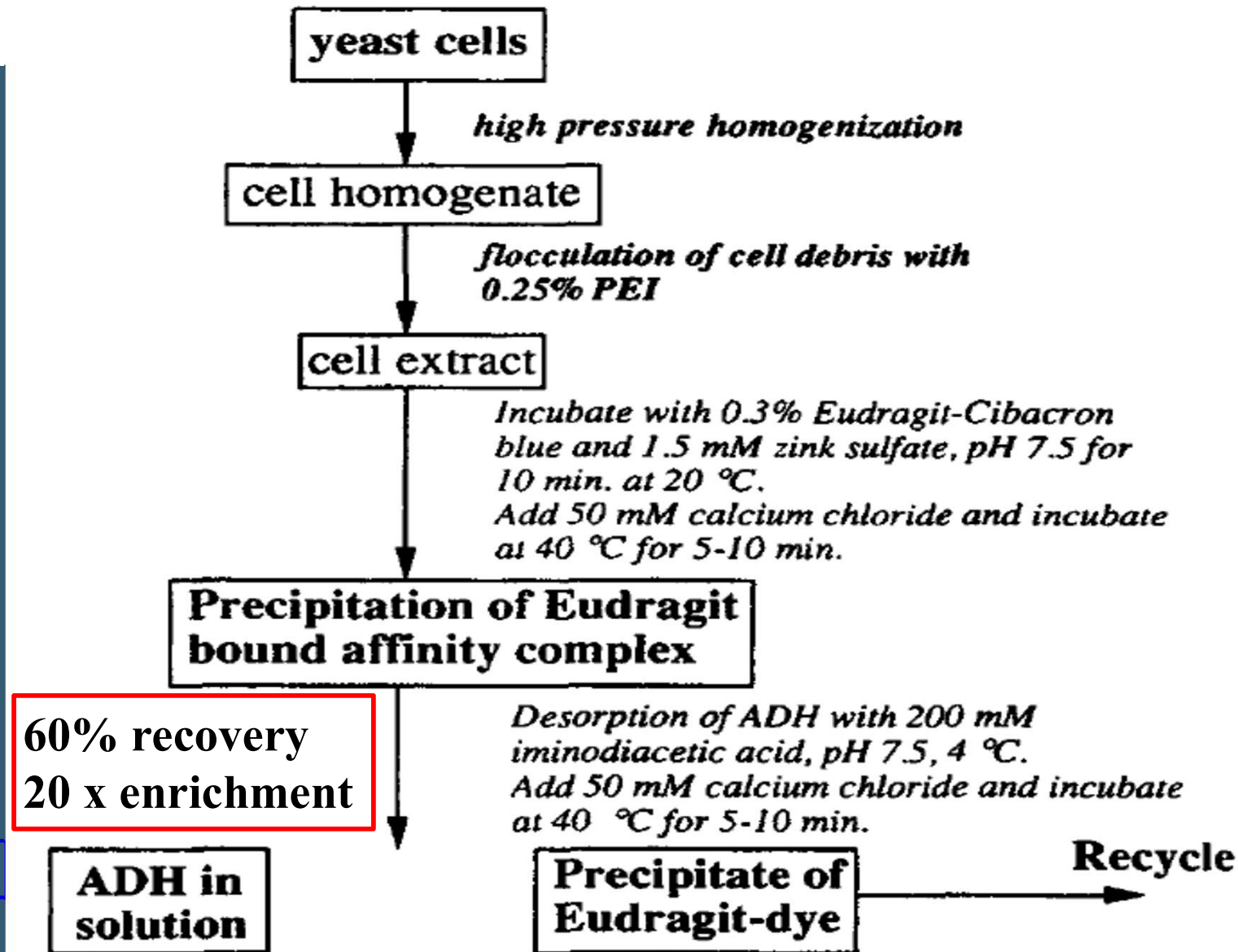
Stage (see Fig. 1.4.4)	Volume (ml)	Total protein (mg) ^a	Total activity (μmol/min)	Specific activity (μmol/min/mg)	Purification (x-fold)	Yield (%)
1	90	2720	760	0.3	1	100
2	35	980	505	0.5	2	67
3	9.8	130	195	1.5	5	26
4	1.0	9.4	190	37	140	25

^aProtein concentration determined by the Lowry method.

AFINITNÍ PRECIPITACE



AFINITNÍ PRECIPITACE



HISTORIE CHROMATOGRAFIE

- 1906 Tswett (Cvět)

Poprvé použit pojem chromatografie, chromatogram z řeckých slov **chroma** (barva) a **grafein** (psáti).

- 1931 Kuhn a Lederer

znovu objevení chromatografie

- 1940-49 Martin Synge

Papírová a tenkovrstvá chromatografie

- 1950-1960 Sober, Peterson a Gutter

zavedli používání médií na bázi celulosy (iontoměniče).

HISTORIE CHROMATOGRAFIE

- 1950 Aminokyselinový analyzátor
- 1959 Porath a Flodin
poprvé použili média na bázi dextranu pro gelovou filtraci.
- 1962 Hjerten
popsal použití separačních médií na bázi agarosy.
- 1970-79 Halasz, Horvath, Kirkland
HPLC (“High Performance Liquid Chromatography”)

HISTORIE CHROMATOGRAFIE

- 1980-1989 Pharmacia

Nová média s vyšší mechanickou odolností (CL-agarosa, “cross-linked”) umožňují použití vyšších tlaků pro separaci;
nový střednětlaký systém “Fast Protein Liquid Chromatography” (FPLC)

- 2004 Waters

UPLC (“Ultra Performance Liquid Chromatography”)