

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

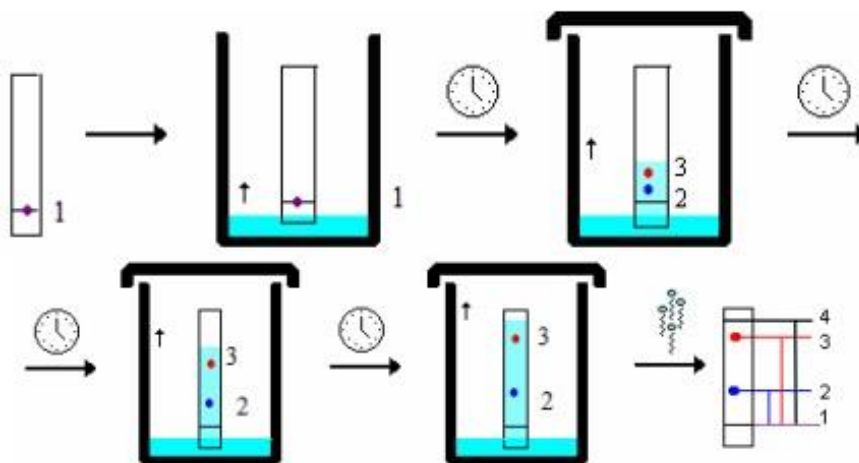
Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології

Кафедра біотехнології та біоінженерії

МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. Хроматографічні методи аналізу

Методичні рекомендації

для самостійного вивчення теми
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
ОПП «Біотехнології та біоінженерія»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми здобуття вищої освіти



МИКОЛАЇВ

2025

УДК 60-047.37
М54

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від 15. 10. 2025 р., протокол № 2.

Укладач:

Є. В. Баркаръ — канд. с.-г наук, доцент, доцент кафедри біотехнології та біоінженерії, Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти:

Т. М. Манушкіна — канд. с.-г наук, доцент, доцент кафедри землеробства, геодезії та землеустрою, Миколаївський національний аграрний університет;

О. І. Каратєєва — канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри біотехнології та біоінженерії, Миколаївський національний аграрний університет.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
1. МЕТА І ЗАВДАННЯ ВИВЧЕННЯ ТЕМИ	6
2. ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ	7
2.1. Загальні відомості про хроматографічні методи аналізу	7
2.2. Принципи хроматографічного розділення	9
2.3. Класифікація хроматографічних методів	11
2.4. Основні види хроматографії	14
2.5. Детектування та обробка результатів хроматографії	22
2.6. Застосування хроматографічних методів у біотехнології	24
3. МЕТОДИЧНІ ПОРАДИ ДО ВИКОНАННЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ	26
4. ПРАКТИЧНІ ЗАВДАННЯ	29
5. КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ	31
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	32

ВСТУП

Методичні рекомендації підготовлено для поглибленого та самостійного опрацювання теми «**Хроматографічні методи аналізу**», яка є складовою дисципліни «*Методи біотехнологічних досліджень*». Цей розділ займає важливе місце у підготовці фахівців біотехнологічного профілю, оскільки забезпечує формування знань і навичок роботи з сучасними методами аналітичного контролю біотехнологічних процесів і продуктів.

Хроматографічні методи посідають провідне місце серед фізико-хімічних способів розділення, ідентифікації та кількісного визначення компонентів складних біологічних сумішей. Їх застосування є невід'ємною частиною досліджень у галузях мікробіології, біохімії, фармації, харчової промисловості та молекулярної біотехнології, а їх універсальність, висока чутливість і точність забезпечують можливість якісного й кількісного визначення компонентів складних біологічних сумішей.

У біотехнологічних дослідженнях хроматографія використовується для аналізу амінокислот, білків, жирних кислот, вуглеводів, вітамінів, ферментів, антибіотиків та інших біологічно активних сполук. Ці методи дають змогу відділяти навіть структурно подібні речовини й проводити ідентифікацію мікрокомпонентів.

Сучасні аналітичні системи дозволяють проводити автоматизований контроль технологічних процесів, визначення ступеня чистоти субстанцій і виявлення домішок на рівні ppm (частин на мільйон).

Вивчення даної теми сприятиме засвоєнню теоретичних основ хроматографічного розділення, розумінню механізмів взаємодії речовин із сорбентами, набуттю практичних умінь аналізу складних біологічних об'єктів із використанням різних типів хроматографії (тонкошарової, газової, рідинної, іонообмінної тощо).

Методичні рекомендації розроблено з метою допомогти студентам у самостійному засвоєнні навчального матеріалу, закріпленні теоретичних знань,

формуванні практичних навичок планування, проведення та інтерпретації хроматографічного аналізу.

1. МЕТА І ЗАВДАННЯ ВИВЧЕННЯ ТЕМИ

Мета: ознайомити здобувачів вищої освіти з основами хроматографічного аналізу, принципами поділу речовин, типами хроматографічних систем та їхнім використанням у біотехнологічних дослідженнях і сформувати у здобувачів систему знань про принципи, типи, можливості та галузі застосування хроматографічних методів аналізу у біотехнологічних дослідженнях.

Основні завдання:

- ознайомити здобувачів вищої освіти із фізико-хімічними засадами хроматографічного розділення речовин;
- розглянути основні типи хроматографії, їх відмінності та сфери використання;
- навчити інтерпретувати хроматограми та обчислювати основні параметри розділення;
- сформувати навички вибору оптимального хроматографічного методу для аналізу біотехнологічних об'єктів;
- розвинути вміння використовувати результати хроматографічного аналізу для контролю якості сировини, напівпродуктів і кінцевої продукції біотехнологічного виробництва.

2. ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

2.1. Загальні відомості про хроматографічні методи аналізу

Хроматографія – це фізико-хімічний метод поділу сумішей, який ґрунтується на різному розподілі компонентів між двома фазами: **рухомою** (елюентом) та **нерухомою** (сорбентом).

Хроматографічні методи аналізу посідають одне з провідних місць серед сучасних фізико-хімічних способів дослідження речовин біологічного походження, розділення та ідентифікації компонентів складних сумішей. Їхня універсальність зумовлена високою чутливістю, селективністю, можливістю визначення компонентів у складних багатокомпонентних системах без попереднього видалення домішок. Отже, хроматографічні методи аналізу базуються на явищі **розподілу речовин між двома фазами** – рухомою (мобільною) та нерухомою (стаціонарною). Завдяки різній швидкості міграції речовин через систему фаз відбувається їх розділення, кількісне та якісне визначення. Компоненти (речовини), які мають більшу спорідненість до нерухомої фази, затримуються довше, тоді як речовини, які краще розчиняються у рухомій фазі, мігрують швидше. У результаті формується просторове або часове розділення речовин, що дає змогу проводити їх якісний і кількісний аналіз.

Термін «*хроматографія*» походить від грецьких слів *chroma* – колір і *grapho* – пишу. Вперше цей метод було використано для розділення пігментів зеленого листя (рис. 1). У подальшому метод зазнав значного розвитку, набувши універсальності та високої точності. Сьогодні хроматографія використовується для аналізу органічних і неорганічних речовин, біомолекул, лікарських препаратів, харчових добавок, метаболітів і навіть газів навколишнього середовища.

Перевагами хроматографічних методів є:

- висока роздільна здатність і точність аналізу;

- можливість визначення мікрокількостей компонентів;
- універсальність щодо типів речовин;
- поєднання функцій розділення й аналітичного визначення;
- можливість автоматизації процесу.



Рис. 1. Розділення пігментів зеленого листя методом хроматографії

Основні етапи хроматографічного процесу:

1. Внесення проби на колонку або шар сорбенту.
2. Рух рухомої фази, яка переносить розчинені компоненти.
3. Диференційне утримування речовин на нерухомій фазі.
4. Вихід розділених компонентів у певній послідовності (елуція).
5. Реєстрація сигналів детектором і побудова **хроматограми**.

У біотехнології хроматографія відіграє ключову роль у контролі якості сировини, моніторингу біохімічних процесів, виділенні та очищенні білкових препаратів, ферментів, нуклеїнових кислот, амінокислот, ліпідів тощо. Її застосування дозволяє отримати високочисті біологічно активні речовини, що є критично важливим для медичної, фармацевтичної та харчової промисловості.

Отже, хроматографія широко використовується у біотехнологічних дослідженнях – від контролю якості поживних середовищ та визначення концентрації метаболітів до очищення білкових препаратів, ферментів, гормонів, вітамінів. У харчовій біотехнології цей метод застосовують для аналізу жирних кислот, ароматичних речовин, барвників, антибіотиків тощо.

У порівнянні з іншими методами (наприклад, екстракцією, діалізом або електрофорезом), хроматографічні методи мають значно ширший діапазон застосування, дають змогу працювати з невеликими об'ємами проб і характеризуються високою відтворюваністю результатів.

Таким чином, хроматографія є не лише методом аналізу, але й потужним інструментом **очищення та фракціонування** біотехнологічних продуктів, що визначає її фундаментальне значення для майбутніх фахівців у галузі біотехнології та біоінженерії.

2.2. Принципи хроматографічного розділення

Усі хроматографічні процеси базуються на **різниці у швидкості переміщення речовин** через систему, що містить дві фази. Принцип дії хроматографічних методів ґрунтується на **розподілі компонентів суміші між двома фазами**, які перебувають у тісному контакті:

- **рухомою фазою (елюентом)** — газом або рідиною, що переносить аналізовані речовини через систему;
- **нерухомою фазою (сорбентом або носієм)** — твердою чи рідкою речовиною, яка утримується в колонці, на пластинці або іншій підкладці.

Під час взаємодії з цими фазами окремі компоненти суміші проявляють різну спорідненість до сорбенту: одні речовини довше затримуються на нерухомій фазі, інші швидше рухаються з потоком рухомої фази. Результатом цього процесу є **розділення речовин у часі або просторі**.

Основними факторами, що визначають ефективність розділення, є:

- хімічна природа аналітів (полярність, молекулярна маса, заряд);

- фізико-хімічні властивості фаз (розчинність компонентів у рухомій і нерухомій фазах, адсорбційна здатність сорбенту, розмір молекул і дифузійна рухливість);
- температура, тиск та швидкість потоку рухомої фази.

Узагальнено хроматографічне розділення можна описати **рівноважним процесом адсорбції або розподілу**, коли між фазами встановлюється динамічна рівновага, що визначає швидкість переміщення кожного компонента. Рівновага між фазами встановлюється по-різному для кожного компонента, що і створює відмінності у часі виходу з колонки.

Кількісно ефективність розділення характеризується такими параметрами:

- **час утримування (t_r)** – проміжок часу від моменту введення зразка до реєстрації піку компонента;
- **коефіцієнт розподілу (K)** – співвідношення концентрацій речовини у стаціонарній і рухомій фазах:

$$K = C_{нф} / C_{рф} \quad (1)$$

де $C_{нф}$ – концентрація речовини в нерухомій фазі,

$C_{рф}$ – концентрація речовини в рухомій фазі.

Чим більший коефіцієнт розподілу, тим довше речовина затримується в колонці;

- **фактор селективності (α)** – відношення коефіцієнтів розподілу двох компонентів;
- **ефективність колонки (N)** — показник якості розділення, який відображає кількість теоретичних тарілок у системі;
- **висота еквівалентної теоретичної тарілки (НЕТР)** — показник роздільної здатності системи.

Залежно від механізму взаємодії аналіту з фазами виділяють чотири основні принципи хроматографічного розділення:

1. **Адсорбційний** – розділення відбувається внаслідок різного ступеня адсорбції речовин на твердій поверхні сорбенту.
2. **Розподільний** – базується на різній розчинності компонентів у двох

рідинах, одна з яких є рухомою, інша – закріпленою на твердій основі.

3. **Іонообмінний** – ґрунтується на електростатичних взаємодіях між зарядженими групами аналізованих речовин і функціональними групами іонообмінника.

4. **Молекулярно-ситовий (гель-фільтраційний)** – базується на відмінностях у розмірах молекул, які по-різному проникають у пори гелю.

Кожен із цих принципів використовується для певного класу речовин, а вибір конкретного типу хроматографії залежить від **хімічної природи аналізованої сполуки** та мети дослідження.

2.3. Класифікація хроматографічних методів

Хроматографічні методи аналізу відзначаються великою різноманітністю. Їх класифікують за кількома ознаками, що відображають тип взаємодії між фазами, агрегатний стан фаз, механізм розділення, спосіб проведення аналізу та характер руху рухомої фази. Така багаторівнева класифікація дає змогу обґрунтовано обирати оптимальний метод для дослідження конкретних біотехнологічних об'єктів.

За агрегатним станом фаз (за фізичним станом рухомої фази):

- **газова хроматографія (ГХ)** – рухома фаза представлена газом, зазвичай інертним (гелій, азот, водень), а стаціонарна – твердим сорбентом або рідиною, нанесеною на твердий носій. Метод призначений переважно для аналізу летких сполук;
- **рідинна хроматографія (РХ)** – рухомою фазою є рідина, часто у вигляді розчинника або суміші розчинників, яка транспортує розчинені речовини через тверду або рідку нерухому фазу. Використовується для аналізу нелетких, термолабільних та біологічно активних сполук.

За механізмом розділення (за типом взаємодії речовини з нерухомою фазою):

- **адсорбційна** – ґрунтується на різному ступені адсорбції речовин на

поверхні твердого сорбенту;

- **розподільна** – базується на різній розчинності компонентів у двох несумісних рідинах;
- **іонообмінна** – використовує здатність іонообмінників до оборотного зв'язування йонів або молекул із зарядженими групами;
- **гель-фільтраційна (молекулярно-ситова)** – розділення відбувається залежно від розмірів молекул;
- **афінна (споріднена)** – спирається на специфічну взаємодію біомолекул (антиген–антитіло, фермент–субстрат тощо).

За способом проведення (за формою реалізації процесу):

- **колонкова** – розділення здійснюється у спеціальній колонці, заповненій сорбентом;
- **планарна (площинна)** – процес відбувається на площині: пластинці з нанесеним сорбентом (**тонкошарова**), або якщо сорбентом є целюлоза паперу, а рухомою фазою – розчинник (**паперова**).

За метою аналізу:

- **аналітична хроматографія** – використовується для якісного та кількісного аналізу;
- **препаративна хроматографія** – застосовується для виділення й очищення речовин у значних кількостях.

За температурним режимом:

- **ізотермічна хроматографія** – температура залишається сталою протягом аналізу;
- **температурно-програмована** – передбачає поступову зміну температури (особливо у газовій хроматографії) для покращення розділення компонентів.

Крім того, сучасна наука виокремлює комбіновані методи, наприклад **газо-рідинну, іонообмінно-гель-фільтраційну або рідинну хроматографію з мас-спектрометричним детектуванням (LC-MS)**, що поєднують декілька принципів розділення.

Класифікація хроматографічних методів

Ознака класифікації	Тип хроматографії	Характеристика
За агрегатним станом фаз	Газова (ГХ)	Рухома фаза – газ, нерухома – рідина або твердий сорбент
	Рідинна (РХ, ВЕРХ)	Обидві фази рідкі; застосовується для термолабільних речовин
За механізмом розділення	Адсорбційна	Поділ на основі різної сили адсорбції компонентів на поверхні сорбенту
	Розподільна	Компоненти розподіляються між двома рідкими фазами
	Іонообмінна	Розділення за здатністю обмінювати іони між фазами
	Гель-фільтраційна	Поділ за розміром молекул у пористому гелі
	Афінна	Специфічна взаємодія ліганд-молекула (наприклад, фермент-субстрат)
За способом проведення аналізу	Колоночна	Розділення в колонці з сорбентом
	Планарна	Розділення на площині (ТШХ, паперова хроматографія)
За метою використання	Аналітична	Для якісного і кількісного аналізу речовин
	Препаративна	Для виділення речовин у чистому вигляді

Хроматографічні методи є гнучкими та легко адаптуються до різних об'єктів дослідження. Завдяки цьому їх застосовують як у мікроаналітичних роботах, так і у великих виробничих масштабах для очищення біотехнологічних продуктів.

У біотехнологічних дослідженнях найпоширенішими є **іонообмінна, гель-фільтраційна, афінна, високоефективна рідинна (ВЕРХ)** та **тонкошарова** хроматографія, що забезпечують високу точність і можливість роботи з мікрокількостями складних біологічних зразків.

2.4. Основні види хроматографії

Хроматографічні методи охоплюють широкий спектр технік, що різняться за принципом дії, типом фаз і призначенням. Найчастіше у біотехнологічній практиці застосовують такі види хроматографії: **тонкошарову, газову, рідинну (високоєфективну), іонообмінну, гель-фільтраційну та афінну.**

Газова хроматографія (ГХ) використовується для аналізу летких або термостійких речовин, це один із найпоширеніших і найточніших методів поділу летких органічних сполук. Рухомою фазою є інертний газ (гелій, азот, водень), а нерухомою – тверда речовина (може бути полімерна плівка) або рідина, нанесена на твердий носій. Розділення здійснюється у колонці, розташованій у термостаті, а компоненти детектуються термокондукційним або полум'яно-іонізаційним детектором (рис. 2). У поєднанні з мас-спектрометрією (ГХ-МС) вона дає можливість точно ідентифікувати компоненти навіть у складних біологічних зразках.



Рис. 2. Газовий хроматограф Neochrom (Україна) з автосемплером

Основні складові установки газової хроматографії (рис. 3):

- **газ-носії** (гелій, азот, водень, аргон) – 1;
- **інжектор (випарник)** для введення проби – 2;
- **хроматографічна колонка** – капілярна або насипна – 3;
- **детектор** (полум'яно-іонізаційний, теплопровіднісний, електронно-захоплюючий тощо) – 4;
- **реєстратор** або комп'ютерна система збору даних – 5.

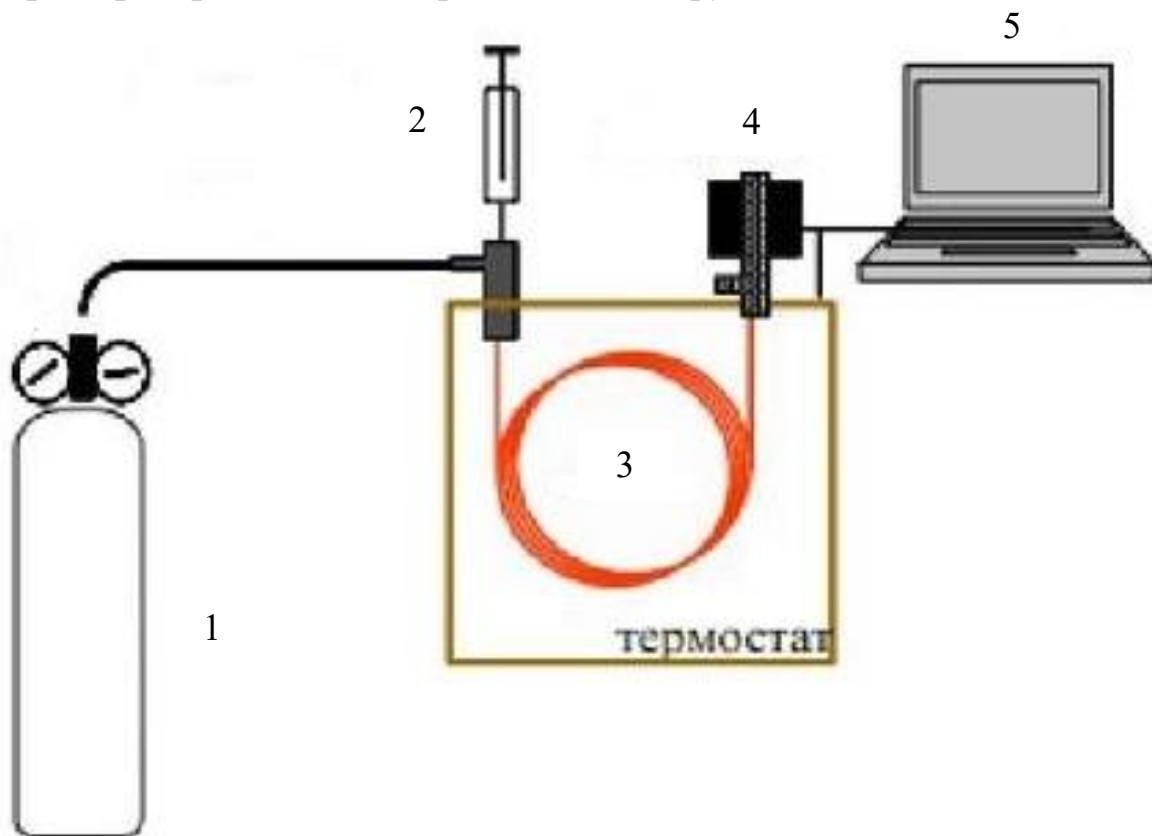


Рис. 3. Основні складові установки газової хроматографії

Принцип роботи ґрунтується на **різній швидкості міграції компонентів у потоці газу**. Компоненти з меншою спорідненістю до нерухомої фази рухаються швидше і виходять із колонки раніше.

Основні параметри ГХ: температура колонки (100-250 °C), тип носія (гелій, азот, водень), довжина колонки (1-100 м), детектори – полум'яно-іонізаційний, термокондуктометричний, мас-спектрометричний.

Газова хроматографія застосовується для аналізу летких і термостабільних речовин: летких метаболітів, спиртів, кислот, ефірних олій, естерів, жирних

кислот, ароматичних сполук, розчинників. Завдяки високій чутливості метод дозволяє визначати мікроконцентрації компонентів навіть у складних біологічних матрицях.

Переваги методу:

- висока роздільна здатність;
- швидкість аналізу (від кількох хвилин до десятків секунд);
- можливість автоматизації процесу;
- визначення речовин у дуже малих концентраціях.

Недоліки:

- застосовується лише для летких і термостійких речовин;
- потребує попередньої підготовки проби.

У біотехнології газову хроматографію використовують для:

- аналізу жирних кислот, спиртів, ароматичних сполук;
- контролю субстратів і продуктів ферментації;
- виявлення летких домішок у лікарських і харчових препаратах.

У **рідинній хроматографії (РХ)** рухомою фазою є розчинник або суміш розчинників, а нерухомою – твердий сорбент чи рідина, закріплена на носії. Залежно від тиску, під яким подається елюент, виділяють:

- **низьконапірну рідинну хроматографію (НРХ)** – класичний лабораторний варіант;
- **високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ, англ. HPLC)** – сучасна автоматизована система, що забезпечує надзвичайно високу точність і швидкість аналізу.

ВЕРХ – це один із найсучасніших та найточніших методів, є одним із найпотужніших методів аналізу складних біологічних сумішей. Рухома фаза подається під високим тиском через колонку з дрібнодисперсним сорбентом, що забезпечує швидке та ефективне розділення. ВЕРХ широко застосовується в біотехнології для аналізу вуглеводів, вітамінів, антибіотиків, нуклеотидів, амінокислот, пептидів, білків, та інших біомолекул. Використання градієнтного елюювання та різних типів колонок (зворотно-фазових, іонообмінних, афінних)

забезпечує універсальність методу. Завдяки автоматизації процесу та широкому вибору детекторів метод дозволяє отримати відтворювані результати навіть при аналізі мікродоз речовин (рис. 4).



Рис. 4. Аналітичний рідинний хроматограф з автосамлером

Основні елементи системи ВЕРХ (рис. 5):

- резервуари з елюентом (вода, буфер, органічний розчинник) – 1;
- насос, що створює тиск (до 400 атм) – 2;
- інжектор для введення проби – 3;

- **хроматографічна колонка** (зазвичай із силікагелем, модифікованим C18) – 4;
- **детектор** (ультрафіолетовий, флуоресцентний, рефрактометричний) – 5;
- **система збору даних** (комп'ютер) – 6.

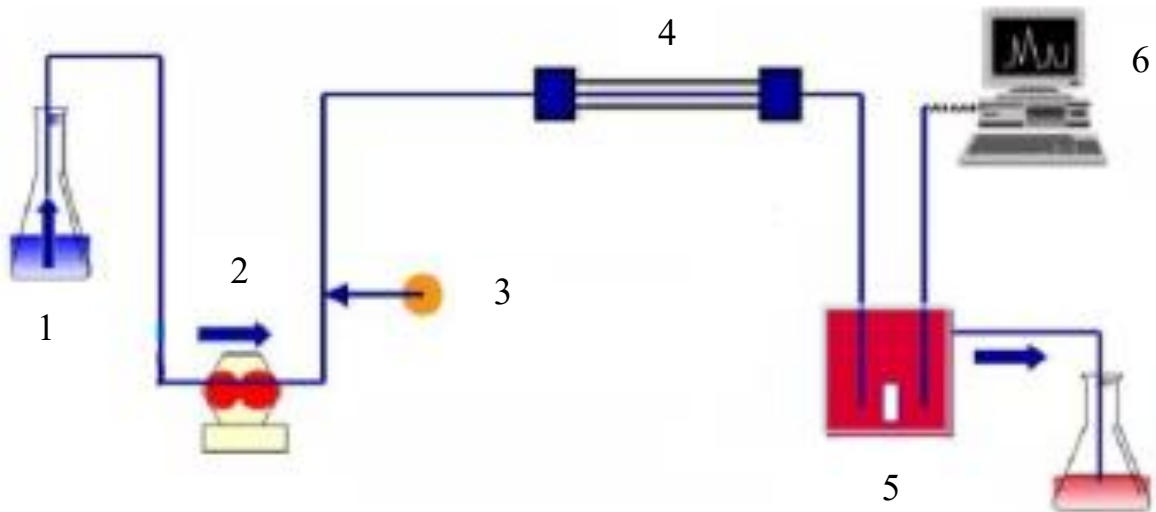


Рис. 5. Основні елементи системи ВЕРХ

Методи ВЕРХ бувають:

- **нормально-фазові** (полярна нерухома фаза, неполярна рухома);
- **зворотно-фазові** (неполярна нерухома фаза, полярна рухома);
- **іонообмінні, гель-проникні, афінні** – для специфічних завдань.

Переваги ВЕРХ:

- висока роздільна здатність;
- точне кількісне визначення компонентів;
- можливість аналізу термолабільних сполук;
- автоматизація процесу.

Типові області застосування:

- аналіз вітамінів, амінокислот, пептидів;
- контроль якості лікарських препаратів;
- визначення домішок у ферментних і білкових продуктах.

У біотехнології ВЕРХ застосовується для:

- очищення і контролю чистоти біомолекул;
- визначення складу ферментних препаратів;
- контролю якості фармацевтичних і харчових продуктів.

Адсорбційна хроматографія. У цьому методі розділення речовин відбувається завдяки різному ступеню їх адсорбції на поверхні твердого сорбенту (силікагель, оксид алюмінію, активоване вугілля). Компоненти, які сильніше взаємодіють із сорбентом, рухаються повільніше, тоді як слабше адсорбовані – швидше вимиваються рухомою фазою. **Цей тип** хроматографії **ефективний** для аналізу ліпідів, каротиноїдів, стероїдів, ароматичних сполук.

Розподільна хроматографія. Механізм розділення базується на різній розчинності речовин у двох несумісних фазах – рухомій і стаціонарній, закріпленій на твердому носії. Речовини розподіляються між фазами відповідно до коефіцієнтів розподілу. Такий підхід забезпечує м'яке розділення термолабільних сполук — амінокислот, пептидів, вітамінів. Розподільна хроматографія часто **використовується** для аналізу амінокислот, цукрів і метаболітів клітинного походження.

Іонообмінна хроматографія базується на здатності речовин з різним зарядом обмінюватися іонами з функціональними групами сорбенту, здатності іонообмінних смол зв'язувати йони певного знаку. Залежно від типу груп сорбенту розрізняють **аніонообмінну** (для аналізу аніонів, білків з негативним зарядом) та **катіонообмінну** (для катіонів, амінокислот, поліпептидів) хроматографію. У цьому методі сорбентом є **іонообмінна смола**, що містить функціональні групи, здатні до оборотного зв'язування йонів або заряджених молекул. Розділення відбувається внаслідок різної сили взаємодії молекул-аналітів із зарядженими групами сорбенту, а саме відмінностей у зарядах та силі електростатичної взаємодії аналітів із сорбентом.

У біотехнології іонообмінна хроматографія **широко застосовується** для очищення білків, ферментів, гормонів, нуклеїнових кислот, а також для фракціонування біомолекул за ізоелектричною точкою. Метод дозволяє точно

регулювати умови розділення, змінюючи рН або іонну силу елюенту.

Гель-фільтраційна (молекулярно-ситовна) хроматографія базується на відмінностях у розмірах молекул. Використовують гелі з певною пористістю (наприклад, сефадекс, сефароза, поліакриламідні гелі). Великі молекули не проникають у пори й вимиваються першими, тоді як менші затримуються довше.

Метод **широко застосовується** для очищення білкових препаратів, визначення молекулярної маси макромолекул, виділення ферментів і нуклеїнових кислот із сумішей, очищення ферментних препаратів, видалення домішок із культуральних рідин.

Афінна (споріднена) хроматографія – високоспецифічний метод, ґрунтується на специфічній взаємодії **ліганд–біомолекула**, тобто біологічному принципі **«ключ–замок»**: розділення базується на специфічній взаємодії молекул – наприклад, антигену з антитілом, ферменту з інгібітором чи рецептором. Як ліганди використовують ферменти, антитіла, субстрати або коферменти, що ковалентно зв'язані з носієм. Афінна хроматографія **використовується** для виділення окремих білків або ферментів із багатокомпонентних сумішей із надзвичайно високою селективністю.

Переваги:

- висока специфічність;
- можливість виділення цільових білків у нативному стані;
- мінімальні втрати активності.

Метод активно застосовують у **фармацевтичній біотехнології** для очищення інсуліну, гормонів росту, моноклональних антитіл, ферментних препаратів.

Тонкошарова хроматографія (ТШХ) – один із найпростіших і найпоширеніших методів, належить до планарних методів. Це простий і швидкий метод розділення речовин. Сорбент (частіше силікагель або оксид алюмінію) наносять тонким шаром на скляну чи алюмінієву пластинку. Зразок наносять точково на стартову лінію і пластинку занурюють у камеру з розчинником, який піднімається вгору за рахунок капілярного ефекту. Після

завершення процесу плями виявляють за допомогою ультрафіолетового випромінювання або хімічних реагентів. Застосовується переважно для якісного аналізу, контролю чистоти реакційних сумішей, визначення амінокислот, вуглеводів, органічних кислот, пігментів.

Основні етапи аналізу:

1. **Нанесення проби** мікропіпеткою на стартову лінію пластинки.
2. **Розвиток хроматограми** – пластинку поміщають у камеру з розчинником, який піднімається капілярними силами.
3. **Виявлення плям** – за допомогою УФ-лампи або специфічних реагентів.
4. **Обчислення R_f** – відношення відстані, пройденої речовиною, до відстані, пройденої фронтом розчинника:

$$R_f = L_{\text{реч}} / L_{\text{фронт}} \quad (2)$$

де $L_{\text{реч}}$ – шлях речовини,

$L_{\text{фронт}}$ – шлях розчинника.

Переваги ТШХ:

- простота виконання;
- невелика кількість зразку;
- низька вартість;
- простота апаратури;
- швидкість аналізу;
- можливість одночасного дослідження кількох проб (зразків);
- візуальний контроль результатів.

Недоліки: обмежена точність і чутливість у порівнянні з іншими видами хроматографії.

Метод широко **використовується у біотехнології** для ідентифікації амінокислот, жирних кислот, цукрів, контролю процесів ферментації та чистоти продуктів, аналізу екстрактів рослинної та мікробної сировини, визначення ліпідів, амінокислот, пептидів і метаболітів у навчальних, контрольних і дослідницьких лабораторіях.

2.5. Детектування та обробка результатів хроматографії

У хроматографічному аналізі важливу роль відіграє система детектування. Після проходження компонентів через колонку або сорбційний шар необхідно зафіксувати момент їх виходу, тобто здійснити їх **реєстрацію (детектування)**. Для цього використовують **детектори** – прилади, що реєструють зміни фізичних параметрів потоку (поглинання, провідність, теплопровідність тощо). Тип детектора залежить від виду хроматографії та властивостей аналізованих речовин (природи аналіту).

Найпоширеніші типи детекторів (табл. 2):

- **ультрафіолетові (УФ)** – реєструють поглинання УФ-випромінювання у певному діапазоні довжин хвиль. Ефективні для речовин, які містять ароматичні або подвійні зв'язки (білки, нуклеїнові кислоти, ароматичні сполуки)
- **рефрактометричні (за показником заломлення)** – універсальні, реагують на зміну показника заломлення, але менш чутливі, використовуються у ВЕРХ (для цукрів, спиртів, полімерів).
- **флуоресцентні** – дуже чутливі, фіксують випромінювання збуджених молекул, застосовуються для речовин, здатних до флуоресценції.
- **електропровідні (електрохімічні)** – базуються на вимірюванні струму окисно-відновних реакцій, використовуються у іонообмінній хроматографії.
- **полум'яно-іонізаційні (ПІД) та електронозахоплюючі (ЕЗД)** – основні детектори для газової хроматографії, чутливі до органічних сполук.
- **мас-спектрометричні (МСД)** – дозволяють ідентифікувати речовини за масою і структурою, поєднують високу селективність із кількісною точністю.

Результатом аналізу є **хроматограма** – графік залежності інтенсивності сигналу детектора від часу. Кожний пік на хроматограмі відповідає окремому компоненту суміші, а площа піку пропорційна його концентрації. За положенням

піку визначають час утримування, за площею – концентрацію. Для кількісного аналізу використовують метод внутрішнього стандарту або калібрувальні криві, що будуються за стандартними зразками.

Таблиця 2

Основні типи детекторів у хроматографії

Вид детектора	Принцип дії	Область застосування
УФ-детектор	Вимірює поглинання ультрафіолетового випромінювання	Білки, пептиди, вітаміни, ароматичні сполуки
Рефрактометричний (РД)	Реагує на зміну показника заломлення	ВЕРХ (для цукрів, спиртів, полімерів)
Полум'яно-іонізаційний (ПІД)	Визначає концентрацію вуглеводнів у полум'ї водню	Газова хроматографія
Теплопровіднісний (ТПД)	Реєструє зміни теплопровідності газової суміші	Загальний газовий аналіз
Електрохімічний (ЕХД)	Фіксує струм, що виникає при окисно-відновних реакціях	Біомолекули, антиоксиданти
Мас-спектрометричний (МС)	Ідентифікує молекули за масою та зарядом	Комплексний аналіз, метаболоміка

Під час обробки результатів розраховують:

- **час утримування (t_r)** – час між моментом ін'єкції зразка та появою піку;
- **площу піку (S)** – визначає концентрацію компонента;
- **ефективність колонки (N) та селективність (α);**
- **коефіцієнт розділення (R_s)**, який характеризує ступінь відокремлення компонентів.

Для математичної обробки результатів використовують спеціалізоване програмне забезпечення, яке автоматично обчислює площі піків, проводить базову корекцію, розраховує селективність та ефективність розділення.

2.6. Застосування хроматографічних методів у біотехнології

Хроматографічні методи аналізу мають надзвичайно широке застосування у біотехнологічних дослідженнях, вони є невід'ємною частиною експериментальної бази сучасної біотехнології. Їх застосовують на всіх етапах біотехнологічного процесу – від контролю якості вихідної сировини до аналізу кінцевого продукту, перевірки чистоти готової продукції.

Основні напрями застосування:

- ✓ **Аналіз, очищення та концентрування біологічно активних речовин** – фракціонування амінокислот, білків, ферментів, пептидів, нуклеїнових кислот, вітамінів, коферментів, ліпідів, цукрів. Афінна, іонообмінна та гель-фільтраційна хроматографія забезпечують отримання високоочищених препаратів (білків, ферментів, гормонів, нуклеїнових кислот, ліпідів) для подальших біохімічних і фармацевтичних досліджень.
- ✓ **Аналіз складу культурального середовища та контроль процесів ферментації** – визначення вмісту поживних речовин, вітамінів, метаболітів, інгібіторів росту, відстеження динаміки біосинтезу продуктів (накопичення цільового продукту) під час ферментації, концентрації продуктів метаболізму, утворення побічних метаболітів, визначення вмісту субстратів, побічних речовин та інгібіторів у культуральному середовищі.
- ✓ **Фармацевтична біотехнологія (виробництво лікарських засобів і вакцин)** — контроль чистоти, стабільності та ідентифікація активних компонентів. Контролю якості лікарських засобів біотехнологічного походження, зокрема інсуліну, інтерферонів, моноклональних антитіл, вакцин.
- ✓ **Харчова біотехнологія** — аналіз жирних кислот, ароматичних речовин, антиоксидантів, барвників і токсинів.
- ✓ **Контроль якості готової біотехнологічної продукції** —

фармацевтичних препаратів, харчових добавок, косметичних засобів. Визначення домішків, залишкових реагентів, токсичних продуктів метаболізму, стабільності складу препаратів.

- ✓ **Дослідження метаболічних шляхів** — ідентифікація проміжних метаболітів і продуктів клітинного метаболізму.
- ✓ **Аналітичні дослідження в молекулярній біології.** ВЕРХ та ГХ-МС використовуються для аналізу амінокислот, нуклеотидів, коферментів, стеролів, жирних кислот, що є важливими біомаркерами стану клітин.

У сучасних біотехнологічних лабораторіях хроматографія поєднується з іншими аналітичними методами — мас-спектрометрією (LC–MS), спектрофотометрією, капілярним електрофорезом. Така інтеграція дозволяє отримати **комплексну характеристику біосистем** і забезпечити точний контроль над процесами культивування, синтезу та очищення продуктів.

Отже, хроматографічні методи аналізу забезпечують **високу точність, селективність і чутливість** при дослідженні складних біологічних систем, роблячи їх основним інструментом у біотехнологічній практиці. Знання принципів і можливостей цих методів є необхідною складовою професійної підготовки майбутніх фахівців у галузі біотехнології та біоінженерії.

Таким чином, хроматографічні методи є невід’ємною складовою аналітичного інструментарію біотехнолога. Хроматографія є не лише аналітичним методом, а й важливим інструментом **контролю якості, оптимізації технологічних процесів і забезпечення безпеки біотехнологічної продукції**. Володіння принципами їх роботи, розуміння переваг і обмежень кожного виду хроматографії є необхідною умовою для ефективного виконання наукових і виробничих завдань.

3. МЕТОДИЧНІ ПОРАДИ ДО ВИКОНАННЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

Самостійна робота здобувачів освіти є важливим елементом навчального процесу та спрямована на поглиблення знань, набуття практичних навичок аналізу, інтерпретації результатів і самостійного прийняття рішень у межах професійної компетентності біотехнолога.

Під час вивчення теми *«Хроматографічні методи аналізу»* студенти повинні не лише опанувати теоретичні основи методів розділення, але й навчитися застосовувати їх на практиці – для аналізу біологічних об'єктів, визначення складу культуральних середовищ і очищення біопродуктів.

Мета самостійної роботи:

- закріпити теоретичні знання з основ хроматографії;
- засвоїти класифікацію методів і принципи дії різних типів хроматографічних систем;
- навчитися добирати оптимальний метод розділення для конкретного біотехнологічного завдання;
- оволодіти навичками обробки хроматографічних даних (інтерпретація хроматограм, розрахунок концентрацій, визначення часу утримування тощо);
- ознайомитися з сучасним лабораторним обладнанням і програмним забезпеченням для хроматографічного аналізу.

Завдання для самостійного опрацювання:

1. Опрацювати теоретичний матеріал з питань класифікації, принципів дії та видів хроматографії.
2. Ознайомитися з будовою хроматографічної колонки, типами сорбентів і детекторів.
3. Підготувати коротке повідомлення або презентацію (5–7 хвилин) на одну із тем:
 - історичний розвиток хроматографічних методів;

- порівняльна характеристика адсорбційної та розподільної хроматографії;
- сучасні тенденції розвитку вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ/HPLC);
- застосування іонообмінної хроматографії в очищенні білків;
- використання хроматографії для контролю якості харчових продуктів або біопрепаратів.

4. Виконати розрахункове завдання.

5. Дати письмові відповіді на контрольні запитання.

Приклад розрахункового завдання

Після проведення хроматографічного аналізу студент отримує хроматограму з кількома піками. Необхідно визначити концентрації компонентів за площею піків.

Вихідні дані:

- Час утримування (t_r) та площі піків компонентів:

Компонент	t_r , хв	Площа піку, у.о.
A	2,3	120
B	3,7	250
C	5,4	180

Калібрувальні дані:

Концентрація, мг/мл	Площа піку, у.о.
0,5	100
1,0	200
1,5	300

Необхідно:

1. Побудувати калібрувальну залежність «площа піку – концентрація» для стандартного зразка.
2. За площею піків визначити концентрації компонентів A, B, C у пробі.

3. Проаналізувати відмінності у часі утримування та зробити висновки щодо полярності речовин.

Запитання для самоперевірки

1. У чому полягає основний принцип хроматографічного розділення речовин?
2. Які фактори впливають на ефективність хроматографічного процесу?
3. Поясніть різницю між адсорбційною та розподільною хроматографією.
4. У чому полягає сутність іонообмінної хроматографії?
5. Що визначає вибір рухомої та нерухомої фаз у рідинній хроматографії?
6. Які переваги має високоефективна рідинна хроматографія порівняно з традиційною?
7. Для яких цілей використовують гель-фільтраційну хроматографію?
8. Як проводиться кількісне визначення компонентів за хроматограмою?
9. Які види детекторів використовуються у сучасних хроматографічних системах?
10. Назвіть приклади застосування хроматографічних методів у біотехнології.

Методичні поради здобувачам:

- перед виконанням завдання обов'язково повторіть основні поняття: сорбент, рухома фаза, коефіцієнт розподілу, час утримування;
- уважно проаналізуйте будову хроматографічної установки – її принципову схему можна знайти в навчальних посібниках або методичних відеоматеріалах;
- при виконанні розрахунків користуйтеся одними й тими самими одиницями вимірювання;
- у висновках звертайте увагу не лише на кількісні результати, але й на логіку розділення – які фізико-хімічні властивості зумовили різницю у t_r .
- під час підготовки презентації чи реферату намагайтеся проілюструвати матеріал графіками або прикладами хроматограм.

4. ПРАКТИЧНІ ЗАВДАННЯ

Практичні завдання спрямовані на закріплення теоретичних знань і набуття навичок роботи з хроматографічними методами аналізу.

Завдання 1. Визначення коефіцієнта розподілу речовини

Мета роботи: визначити коефіцієнт розподілу речовини між рухомою та нерухомою фазами.

Обладнання та реактиви: хроматографічна колонка, розчинник (елюент), зразок суміші, аналітичні ваги, мірні колби.

Теоретичні відомості:

Коефіцієнт розподілу показує, наскільки речовина «віддає перевагу» одній фазі над іншою, і обчислюється за формулою:

$$K = C_{nf} / C_{rf} \quad (3)$$

де C_{nf} – концентрація речовини в нерухомій фазі,

C_{rf} – у рухомій фазі.

Приклад розрахунку:

У результаті аналізу отримано $C_{nf} = 0,015$ моль/л та $C_{rf} = 0,005$ моль/л.

Отже,

$$K = 0,015 / 0,005 = 3.$$

Висновок: речовина має у 3 рази більшу спорідненість до нерухомої фази, ніж до рухомої.

Завдання 2. Визначення коефіцієнта рухливості (R_f) у ТШХ

Мета роботи: визначити коефіцієнти рухливості компонентів суміші методом тонкошарової хроматографії.

Обладнання: ТШХ-пластинка, камера для хроматографування, мікропіпетка, УФ-лампа, розчинник.

Хід роботи:

1. На стартову лінію пластинки наносять зразок досліджуваної суміші.

2. Поміщають пластинку в камеру з розчинником.
3. Після підняття фронту розчинника пластинку висушують і виявляють плями.
4. Вимірюють відстані від старту до центру плями ($L_{реч}$) і до фронту розчинника ($L_{фронт}$).
5. Обчислюють коефіцієнт Rf :

$$Rf = L_{реч} / L_{фронт} \quad (4)$$

Приклад:

Фронт розчинника піднявся на 8,0 см, пляма речовини – на 5,6 см.

$$Rf = 5,6 / 8,0 = 0,7$$

Висновок: коефіцієнт $Rf = 0,70$ відповідає речовині середньої полярності.

Завдання 3. Визначення концентрації компонентів за хроматограмою

Мета: виконати кількісний аналіз суміші за площею піків хроматограми.

Теоретичні відомості: Площа піку (S_i) пропорційна кількості відповідної речовини.

Вміст компонентів визначають за формулою:

$$w_i = S_i / \sum S_i \times 100\% \quad (5)$$

де S_i – площа піку i -го компонента,

$\sum S_i$ – сума площ усіх піків.

Приклад розрахунку:

отримано три піки з площами: $S_1 = 240$, $S_2 = 360$, $S_3 = 400$.

$$\sum S_i = 240 + 360 + 400 = 1000$$

$$w_1 = 24\%, w_2 = 36\%, w_3 = 40\%$$

Висновок: компонент 3 є основним (40%), компонент 1 – мінімальний (24%).

5. КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Що таке хроматографія і в чому полягає її принцип?
2. Які основні фази беруть участь у хроматографічному процесі?
3. Які етапи проходить проба під час хроматографічного аналізу?
4. Поясніть фізико-хімічну суть коефіцієнта розподілу.
5. Як визначається коефіцієнт R_f у тонкошаровій хроматографії?
6. Які існують основні типи хроматографії за агрегатним станом фаз?
7. Назвіть основні механізми поділу речовин у хроматографії.
8. У чому полягає різниця між адсорбційною та розподільною хроматографією?
9. Які гази використовують як рухому фазу в газовій хроматографії?
10. Що є нерухомою фазою у ВЕРХ?
11. Які детектори застосовуються у газовій хроматографії?
12. Які біотехнологічні об'єкти доцільно аналізувати методом ВЕРХ?
13. Опишіть принцип побудови хроматограми.
14. Як визначають кількісний склад суміші за хроматограмою?
15. Назвіть основні переваги та недоліки газової хроматографії.
16. У яких випадках доцільно використовувати тонкошарову хроматографію?
17. Як здійснюється ідентифікація речовин у ТШХ?
18. Яке значення має вибір елюенту в процесі хроматографії?
19. Які фактори впливають на ефективність розділення речовин у колонці?
20. Де застосовують хроматографічні методи у біотехнологічних дослідженнях?

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Афанасьєва К. С. Фізичні методи в молекулярній генетиці : навч. посіб. Київ : Київ. ун-т, 2016. 127 с.
2. Біотехнології та біоінженерія. Вступ до фаху : навчальний посібник / О. І. Юлевич С. І. Луговий, О. І. Каратєєва, Є. В. Баркарь. Миколаїв : МНАУ, 2022. 285 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/11705>
3. Каратєєва О. І., Юлевич О. І. Загальна біотехнологія : курс лекцій. Миколаїв : МНАУ, 2022. 107 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/12054>
4. Мартиненко О. І. Методи молекулярної біотехнології : лаборатор. практикум. Київ : Академперіодика, 2010. 232 с.
5. Методи біотехнологічних досліджень : курс лекцій / уклад. Є. В. Баркарь. Миколаїв : МНАУ, 2019. 44 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/5161>
6. Методи біотехнологічних досліджень. Ч. 2 : курс лекцій / уклад. Є. В. Баркарь. Миколаїв : МНАУ, 2023. 50 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/16707>
7. Методи біотехнологічних досліджень : методичні рекомендації для виконання лабораторних робіт для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти / уклад. Є. В. Баркарь. Миколаїв : МНАУ, 2025. 38 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/22488>
8. Методи біотехнологічних досліджень : метод. реком. для самост. вивчення дисципліни для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП "Біотехнології та біоінженерія" спеціальності 162 "Біотехнології та біоінженерія" денної форми здобуття вищої освіти / уклад. Є. В. Баркарь. Миколаїв : МНАУ, 2022. 27 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/12256>
9. Методи досліджень в біотехнології : конспект лекцій / уклад.:

О. С. Волошина, М. М. Антонюк. Київ : Нац. ун-т харч. технологій, 2012. 157 с.

10. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв : конспект лекцій / уклад. О. С. Волошина. Київ : НУХТ, 2015. 206 с.

11. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв : лаб. практикум / уклад. О. С. Волошина. Київ : НУХТ, 2014. 89 с.

12. Мінаєва В. О. Хроматографічний аналіз : підручник. Черкаси : Вид. від. Черкас. нац. ун-ту ім. Богд. Хмельн., 2013. 284 с.

13. Федорченко С. В., Курта С. А. Хроматографічні методи аналізу : навч. посіб. Івано-Франківськ : Прикарпат. нац. ун-т ім. Василя Стефаника, 2012. 146 с.

14. Фізико-хімічні методи дослідження органічний сполук : метод. посіб. до лаб. практикуму для студентів хім. спец. вищ. навч. закл. / М. В. Сливка, М. Ю. Онисько, А. О. Кривов'яз, В. Г. Лендел. Ужгород : ВАТ «Патент», 2010. 36 с.

15. Хроматографічні та електрофоретичні методи аналізу біологічних макромолекул : метод. вказівки / уклад.: В. Ю. Черненко, Ж. М. Івахненко. Київ : Інформ.-вид. центр "Вид-во "Політехніка" Нац. техн. ун-ту України "Київ. політехн. ін-т", 2005. 48 с.

Навчальне видання

МЕТОДИ
БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.
Хроматографічні методи аналізу

Методичні рекомендації

Укладач: **Баркарь Євген Володимирович**

Формат 60 x 84 1/16. Ум. друк. арк. 3,0.
Тираж 15 прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54008, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.