

Organika II

Praktické cvičení z lékařské biochemie Chromatografie

Ing. Libuše Arnoštová, CSc.

2009

Obsah

1. Teoretický úvod do problematiky praktického cvičení 3
2. Úloha 1 – Dělení směsi barviv z břechťanu pomocí TLC 5
3. Úloha 2 – Dělení směsi barviv z papriky pomocí TLC 6
4. Úloha 3 – Dělení pigmentů ze zelených listů pomocí papírové chromatografie 6
5. Úloha 4 – Dělení pomocí gelové chromatografie 7

Teoretický úvod do problematiky praktického cvičení

Organické látky se v přírodě vyskytují v čisté podobě velmi zřídka, naopak je často nalzáme ve směsích. I v lidském těle se, samozřejmě, jedná o nejrůznější typy směsí s různými složkami. Složky mohou být jednoduché a s malou molekulovou hmotností, i složité – např. biopolymery (nukleové kyseliny, bílkoviny) s molekulovou hmotností velmi vysokou.

Rozdělení přírodních látek na jednotlivé složky bylo vždy jedním z podstatných úkolů chemie. Ať už jde o dělení různých směsí rostlinných materiálů za účelem izolace účinné látky, použitelné např. jako léčivo, nebo separace jednotlivých složek lidské krve s diagnostickým účelem, vždy se používají stejné techniky – separační metody.

Některé separační metody jsou dobře známy již několik století. Jedná se např. o krystalizaci, sedimentaci, srážení nebo extrakci, tedy metody založené na principu rozdělení složek směsi mezi různé fáze. Tyto postupy se v určitých případech používají i dnes, pro dělení složitých směsí v biologickém materiálu se však v dnešní době používají nejvíce metody založené na chromatografii.

O co se jedná ?

Chromatografie je, ve stručnosti, metoda, založená na rozdílné pohyblivosti jednotlivých látek. Jednotlivé složky dělené směsi se nestejněměrně rozdělují mezi fázi, která zůstává na jednom místě (stacionární) a tu, která během procesu svou polohu mění (mobilní). Chromatografii prvně použil před sto lety (1903) ruský botanik a chemik Cvět. Ten si nejprve povšiml, že na vlhkém papíře barvy „putují“ a vytvářejí různé mapy. Svoje pozorování zobecnil a jako první popsal jak plošnou tak sloupcovou chromatografii. Dělení probíhalo tak, že do trubice naplněné uhlíčitánem vápenatým aplikoval drcený přírodní materiál (listy) a promýváním vhodnými rozpouštědly oddělil od sebe některé složky rostlinných barviv. Protože tyto rostlinné složky byly barevné, metodě se říká chromatografi (z řeckých slov pro barvu χηρομα a psáti γραφειν).

Podobný pokus, i když v modernějším uspořádání, provedeme i v našem praktiku. Principem je dělení na základě rozdílné pevnosti fyzikální sorpce na pevnou fázi. Mobilní fází je v tomto případě kapalina, stacionární fází byl u Cvěta CaCO_3 v trubici - koloně, u nás to bude silikagel nanesený v tenké vrstvě na fólii.

Obecně, pro chromatografii můžeme zvolit uspořádání, kdy stacionární fáze je umístěná vertikálně, ve sloupci=koloně, takové chromatografii se říká sloupcová. Další možností je, že adsorpční vrstva s nosičem (např. silikagelem) je fixována na plochou destičku či jiný pevný materiál, pak se jí říká chromatografie na tenké vrstvě. V tomto plošném uspořádání je možné také použít papír, který se pro mnoho látek svými vlastnostmi hodí – v tom případě hovoříme o chromatografii papírové. V praxi se však dnes tento typ chromatografie používá zřídka.

V obou případech je stacionární fází voda adsorbovaná na povrchu nosiče (papíru nebo silikagelu).

Podle skupenství stacionární a mobilní fáze ve **sloupcovém uspořádání** a podle typu separačního mechanismu (tj. podle sil, které se uplatňují při rozdělování) můžeme základní typy chromatografie přehledně rozřadit takto :

Některé typy chromatografií podle základního uspořádání

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Typ chromatografie
plynná	pevná	plynová chromatografie (gas-solid chromatography, GSC)
plynná	kapalná	plynová chromatografie (gas-liquid chromatography, GLC)
kapalná	pevná	Kapalinová chromatografie (liquid-solid chromatography, LSC)
kapalná	kapalná	Kapalinová chromatografie (liquid –liquid chromatography, LLC)
Některé speciální případy		
kapalná	pevná	Chromatografie na měničích iontů, pevnou fází iontoměnič
kapalná	kapalná	HPLC, na nosiči vázaná kapalina tvoří stacionární fázi, vysoké citlivosti se dosahuje použitím velkého tlaku vyvinutého v tenké kolonce, zkratka HPLC
kapalná	kapalná	Gelová chromatografie, kapalina zachycená v gelu je stacionární fází, vzorek se dělí podle velikosti dělených molekul

do tabulky jsou použity údaje z jednak publikované přednášky RNDr. Freborta, UP Olomouc ,
jednak z textu „Separační techniky biomakromolekul“ing. Igora Hochela, CSc., VŠCHT Praha

Pomůcky, které si přinesete s sebou :

pravítko

nůžky (1 do dvojice)

obyčejnou tužku, gumu

Úloha č. 1 Dělení směsi barviv z břechťanu pomocí TLC

Princip :

V listech zelených rostlin se nalézá větší počet lipofilních barviv, jejichž charakteristickou vlastností je rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech.

Pro fotosyntézu mají rozhodující význam chlorofyly **a** a **b** a karotenoidy. Jsou to látky citlivé vůči vzdušnému kyslíku a světlu. Rychlé rozdělení listových barviv lze provést chromatografií na vrstvě silikagelu.

Využívají se komerčně dodávané desky Silufol.

Pomůcky a chemikálie

CaCO₃, aceton pro extrakci barviv

směs n-hexan: isopropanol: voda (80 : 20 : 0,05)

technický benzín

listy břechťanu n. jiný rostlinný materiál

malá třecí miska s tloučkem, filtrační papír, žluté špičky k nanášení vzorků, Silufol

Pracovní postup

2 g listů rozetřeme v třecí misce s malým množstvím mořského písku a několika ml acetonu. Směs zfiltrujeme přes papírový filtr smočený acetonem a filtrát uschováme.

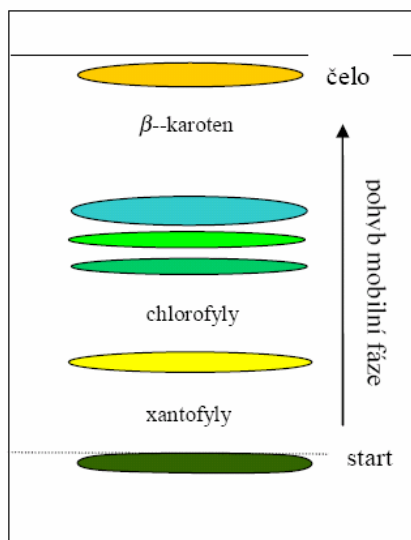
Přípravu extraktů provede laborantka, studenti dostanou hotové zahuštěné extrakty.

Ze Silufolu ustrihneme 2 pruhy o šířce 5 cm, poznačíme startovní čáru (tužkou, ne propisovačkou) ca 2 cm od spodního okraje.

Extrakty nanese na startovní čáru Silufolu asi 1,5 -2 cm od okraje v podobě teček, v asi 15 vrstvách. Skvrna by měla být co nejmenší. Mezi jednotlivými přísadkami necháme rozpouštědlo vyschnout (možno urychlit fénem). Ve vyvíjecí nádobce je asi 1,5 cm eluční směsi a filtrační papír. Nádobka musí zůstat zakrytá – tím se nasatí prostředí parami soustavy.

Folii vložíme do vyvíjecí nádobky s vyvíjecí soustavou . Jakmile čelo soustavy dosáhne asi 0,5 cm od okraje folie, folii vyjmeme a obyčejnou tužkou obtáhneme okraje zóny rozpouštědla i barviv. Necháme v dogestoři vyschnout.

Změříme vzdálenosti od startu k rozdělené látce a od startu k čelu (hranice, kam doputovalo rozpouštědlo). Vypočteme R_f pro jednotlivé skvrny.



$$R_f = \frac{\text{vzdálenost START - ROZDĚLENÁ LÁTKA}}{\text{vzdálenost START - ČELO}}$$

Úloha č. 2 Dělení směsi barviv z papriky pomocí TLC

Princip :

Paprika obsahuje přes 40 nepolárních barviv, většinou na bázi karotenoidů. Tyto látky, lišící se od sebe počtem –OH skupin a tedy i polaritou, jdou dobře dělit na tenké vrstvě podobně jako chlorofyly z minulé úlohy, je však třeba použít méně polární vyvíjecí soustavu.

5 g červené papriky rozetřeme v třecí misce s 20 ml benzínu, směs zfiltrujeme přes papírový filtr, přelijeme na odpařovací misku a odpaříme ca na poloviční objem a uschováme. Vzorky připraví laborantka.

Provedení:

Vzorek nanese na Silufol postupem uvedeným u minulé úlohy. Vyvíjíme v benzenu až do doby než čelo dosáhne ca 0,5 cm od okraje folie. I nadále postupujeme jako v úloze 1.

Úloha 3 Dělení pigmentů ze zelených listů pomocí papírové chromatografie

Princip: Jedno z prvních uspořádání vzestupné chromatografie bylo to, které použijeme znovu pro dělení zelených pigmentů. Pigmenty zeleného extraktu listových barviv je možné jednoduše rozdělit pomocí chromatografie na filtračním papíře – papírové chromatografie. Jde pouze o jiný způsob vyvíjení u plošného uspořádání, eluční soustava je současně rozpouštědlem dělené směsi, avšak princip dělení je podobný. Výsledky jsou v porovnání s chromatografií na Silufolu s naneseným malým množstvím vzorku podstatně horší.

Provedení:

Pruh filtračního papíru (asi 5 cm široký a 150 cm dlouhý) ponoříme jedním koncem do kádinky s acetonovým extraktem pigmentů. Poté jej připevníme tak, aby nespadol do tekutiny na dně nádoby (připevníme krycím sklem) Je nutné dbát na to, aby visel svisle a aby se nedotýkal nádoby na dolním a bočními okraji. Tekutina kapilárně vzlíná papírem a můžeme pozorovat dělení barviv podobně jako v úloze 1.

Pruhy filtračního papíru usušte v digestoři a přiložte k protokolu.

Úloha č. 4 Dělení pomocí gelové chromatografie

Princip :

Gelová chromatografie dělí látky ze směsi na základě jejich rozdílné velikosti a tvaru. Stacionární fází je voda zakotvená v gelu, mobilní fází je voda (nebo vodný roztok) vně částic gelu. Gel má určitou velikost pórů. Látky, které mají větší molekulu než je rozměr pórů nejsou gelem zachycovány a projdou kolonou velmi rychle. Látky, které jsou menší se zpomalí tím, jak vnikají do porézní struktury. Gelová chromatografie je použitelná jednak pro rychlé oddělení látek s velkou molekulou (velkou molekulovou hmotností) od malých (např. odsolování), jednak analyticky (např. pro určení relativní molekulové hmotnosti látky).

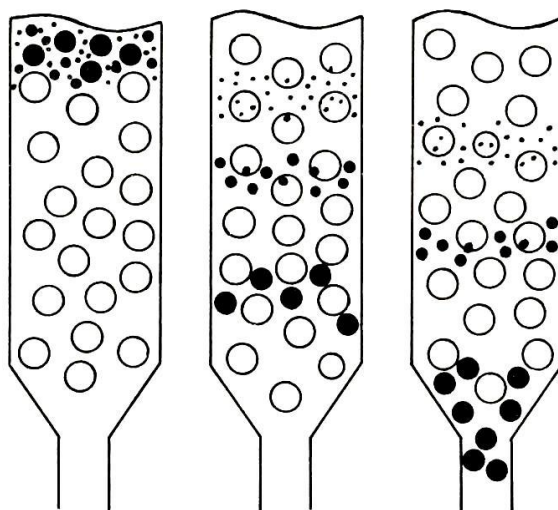
My použijeme roztok obsahující dvě barevné látky, které se navzájem liší ve své molekulové hmotnosti a také velikosti molekuly. Blue Dextran 2000 má velkou molekulu a z kolony je tedy okamžitě vymýván, hexakynoželézitan draselný má molekulovou hmotnost menší a bude se tedy v koloně zdržovat déle.

Obě látky budete na výstupu z kolony jímat a zaznamenáte průběh jejich vymývání z kolony pomocí spektrofotometrického stanovení.

Dextran Blue je barva, která má tak vysokou molekulovou hmotnost, že s její pomocí měříme tzv. mrtvý objem kolony. To je objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci kolony.

Provedení:

Kolonu připravenou na pracovním stole (*Sephadex*) otevřete a kapalinu nad gelem necháte téměř vytéci. Ponecháte jen malou vrstvu



(1 mm). Zavřete kolonu. Pak do ní pipetou OPATRNE (neměli byste gel příliš zvlížit a nanesená vrstva by měla být vodorovná) nanese 0,6 ml barevné směsi (dextranová modř a hexakvanoželezitan draselný v poměru 1:1), pootevřete kohout a směs necháte vsáknout do gelu. Kolonu zavřete a pomalu, opatrně doplníte vodu po horní značku. Pod ústí kolony sběrnou nádobu na první frakci, otevřete kohout a jímáte vytékající bezbarvý roztok do kádinky. Barevné roztoky jímejte do označených zkumavek (1-20), tj. do zkumavek začněte jímat frakce jakmile se na výstupu z kolony objeví modrá barva. Měňte zkumavky, vždy když hladina vody klesne na úroveň prostřední značky. Takto jímáte frakce po 1.5 ml až se obě barvy z kolony vymyjí, což je po odběru více než 30 ml.

POZNÁMKA : První frakce jsou bezbarvé – než se začne eluovat modrá barva-jímejte je do kádinky, odměřte odměrným válcem objem a změřte na fotometru jako jednu hodnotu. Po měření kolonu promyjte elučním roztokem – destilovanou vodou, 100 ml. Zde už frakce nejímáte. Nad gelem ponecháte dostatečnou vrstvu roztoku, aby nedošlo k jeho vyschnutí. Ani po práci ani během dělení vzorků gel nesmí nikdy vyschnout !

Změříte absorbance frakcí: při 620 nm modré a při 440 nm žluté, proti destilované vodě jako blanku. Pokud bude zabarvení příliš intenzivní, musíte vzorek ředit a ředění pak do absorbance započítat.

absorbance původního vzorku = absorbance naměřená x (1/ředění)

Vyhodnocení:

Na milimetrový papír sestrojíte eluční křivku : na osu x nanese objem v ml (pořadové číslo frakce x 1,5 ml + přídavek prvních, dohromady jímaných frakcí), na osu y naneste hodnoty absorbancí a pro obě frakce narýsujete křivku, která vyjadřuje průběh jejich eluce.

Milimetrový papír rozdávají laborantky. Všechny grafy podepíšte a přiložte k protokolu.

