

SeparáčnÍ techniky

Praktická cvičení z lékařské chemie a biochemie

Všeobecné lékařství

Úloha 1: Dělení směsi hemoglobinu a ferrikyanidu gelovou filtrací

V našem modelovém experimentu budeme dělit směs velkých a malých molekul různé barvy: červený (červenohnědý) hemoglobin (methemoglobin) o velké molekulové hmotnosti (M_r 64 500) a žlutý ferrikyanid draselný (M_r 368). Postup dělení tak bude přímo viditelný.

Úkol:

Určete koncentraci hemoglobinu a ferrikyanidu draselného v neznámém směsném vzorku.

Reagencie a pomůcky:

Neznámý vzorek obsahující hemoglobin a ferrikyanid draselný
Ferrikyanid draselný (1 g/l)
Sacharóza (20 g/l)
NaCl (0,3 mol/l)
Chromatografická kolona (náplň - Sephadex G-50 Medium)

Postup:

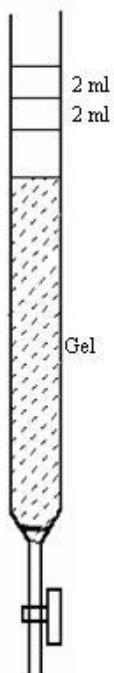
• Absorpční spektrum

Nejprve musíte zjistit, při jaké vlnové délce budete jednotlivé analyty měřit. Změřte absorpční spektrum ferrikyanidu (stačí proměřit oblast viditelného světla) a vyberte vlnovou délku, kterou budete dále používat. Svůj výběr zdůvodněte. Pro hemoglobin použijte vlnovou délku 570nm.

• **Kalibrační přímka** Sestrojte kalibrační přímku tak, že naředíte standard ferrikyanidu (o známé koncentraci), změříte jeho absorbanci při příslušné vlnové délce a data vynesete do grafu. Pro kalibrační přímku by mělo stačit 5–6 bodů v rozmezí 1 g/l až cca 0,05 g/l. Pro stanovení koncentrace hemoglobinu místo kalibrační přímky využijte molární absorpční koeficient $\epsilon=45\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

• Gelová filtrace a spektrofotometrie

Smíchejte 0,2 ml neznámého vzorku a 0,2 ml sacharózy (ta usnadní nanášení vzorku na kolonu) a dobře promíchejte. Směs rozdělte gelovou filtrací postupem popsáným níže. Dávejte přitom pozor, aby gel v koloně nevyschnul – vždy nad ním musí zůstat eluční roztok. Do gelové náplně v koloně také nesmí vniknout vzduch. Průtok mobilní fáze se reguluje kohoutem na dolním konci kolony u jejího ústí. **POZOR** – gelové částice v koloně nic vzájemně nedrží a snadno dojde k jejich zvržení! Vzorek nebo mobilní fáze (v našem experimentu roztok NaCl 0,3 mol/l) se tedy musí na povrch gelu aplikovat velmi opatrně.



- a. Nastavte hladinu eluentu (roztok NaCl) k horní rysce. *Dejte pozor, abyste při manipulaci neporušili sloupec gelu.*
- b. Naneste opatrně 0,2 ml vzorku těsně nad sloupec gelu (Díky roztoku sacharózy o vysoké hustotě se vzorek nemísí s eluentem, ale klesá na hladinu gelu.). K nanášení vzorku použijte automatickou pipetu s prodlouženou špičkou. *Dejte pozor, abyste při manipulaci neporušili sloupec gelu.*
- c. Pod výtok z kolony dejte zkumavku a otevřete kohout. Pokaždé, když eluent dosáhne nejbližší spodní rysky, zavřete kohout, vyměňte zkumavku za novou a jímejte další frakci. Objem každé frakce ve zkumavce je 2 ml.
- d. Jakmile hladina eluentu dosáhne nejspodnější rysky, doplňte eluent postupem jako u bodu **a** k horní rysce.
- e. Kroky **c** a **d** opakujte, dokud nevyteče žlutě zbarvená frakce ferrikyanidu. Získáte cca 15 frakcí, se kterými budete dále pracovat.
- f. Změřte absorbanci všech frakcí při vámi zvolených vlnových délkách (viz výše) proti deionizované vodě a z kalibrační přímky odečtěte koncentraci příslušného analytu v každé frakci. Pokud je absorbance větší než 2 (nebo pokud je vyšší než nejvyšší bod kalibrační přímky), nařeďte frakci 2x nebo vícekrát a absorbanci změřte znovu. Při počítání výsledné koncentrace musíte brát toto ředění v úvahu!
- g. Nakreslete eluční křivku (vyneste číslo frakce na osu x a absorbanci či koncentraci analytu ve frakci na osu y).
- h. Spočítejte eluční objem pro oba analyty. (Eluční objem je objem mobilní fáze, která je potřeba k vymytí většiny analytu z kolony.)
Eluční objem V_e = číslo zkumavky s nejvyšší absorbancí x objem frakce.
- i. Spočítejte koncentraci obou látek v původním neznámém vzorku. K tomu je třeba spočítat hmotnost (pozor nikoli koncentraci) dané látky ve všech frakcích, ve kterých se vyskytuje, tyto hmotnosti sečíst a přepočítat na objem analyzovaného vzorku.

Úloha 2: Tenkovrstevná chromatografie rostlinných barviv

Reagencie a pomůcky:

List libovolné rostliny

Skelný prach (či písek)

Miska s tloučkem

Silikagelová fólie

Obyčejná tužka

Průhledná lepicí páska

Postup:

Příprava extraktu (provede jedna skupina za celý kruh)

Do třetí misky nastříhejte list libovolné rostliny. Zasypte malým množstvím skelného prachu a směs pomocí tloučku utřete. Přidejte cca 1-2 ml acetonu a pokračujte ve tření. Vzniklý extrakt přepipetujte do několika mikrozkuvek (snažte se nabrat pouze extrakt, nikoli pevné částičky listu a skla) a krátce zcentrifugujte (lze nechat několik minut ustát). Čirý, intenzivně zbarvený supernatant použijte k separaci.

Aceton



Hexan



Separace

- Na silikagelové fólii vyznačte **obyčejnou** tužkou start (asi 1,5 cm od dolního okraje fólie) a naneste na něj mikropipetou malé množství vzorku (dle intenzity zbarvení extraktu 1-6 μ l). Nanášku je třeba provádět velmi pomalu a opatrně, aby výsledná skvrna byla co nejmenší (ideálně vzorek nanášejte opakovaně po malých množstvích – mezi nanáškami nechte skvrnu zaschnout). Dejte pozor, aby nedošlo k poškrábání silikagelové vrstvy. **Připravte dvě identické fólie.**
- Fólie vložte do dvou různých chromatografických van s různými mobilními fázemi (v první je hexan:aceton, 3:2 (v/v), ve druhé je pouze hexan) a rychle přikryjte skleněným víkem. Ujistěte se, že start je **nad** hladinou mobilní fáze.
- Jakmile čelo doputuje cca 1 cm pod horní okraj fólie, vyndejte chromatogram z vany a nechte uschnout. Tužkou obtáhněte jednotlivé zóny a vyznačte čelo chromatogramu. Přelete výsledný chromatogram průhlednou lepicí páskou – zpomalíte tak vyblednutí pigmentů.

Úloha 3: Dialýza

V tomto experimentu budeme demonstrovat polopropustnost dialyzační membrány – na jedné její straně bude škrob (polysacharid o velmi vysoké molekulové hmotnosti), na druhé straně Lugolův roztok (roztok elementárního jódu v jodidu draselném). Při setkání těchto dvou složek vzniká fialové zbarvení (více se o této reakci dozvíte při studiu sacharidů).

Chemikálie a pomůcky:

Škrobový maz

Zředěný Lugolův roztok (roztok jódu (1g/l) v KI (2g/l))

Dialyzační střevo

Provedení:

Namočte dialyzační střevo v misce s destilovanou vodou, aby změklo. Na jednom konci ho zavažte na uzel a dobře utáhněte. S pomocí jehly na druhém konci střevo rozevřete a dovnitř napipetujte cca 2 ml škrobového mazu a uzavřete celofánovou trubicí pevným uzlem i na druhém konci. Volné konce celofánu za zauzlením opláchněte destilovanou vodou ze stříčky (mohou být kontaminované škrobem) a umístěte do kádinky s cca 10 ml destilované vody. Do kádinky napipetujte cca 0,6 ml ředěného Lugolova roztoku. Pozorujte a vysvětlete změnu zbarvení.