

Separáční techniky

Praktick cvičení z lékařské chemie a biochemie

Všeobecné lékařství

Úloha 1: Dělení směsi Blue Dextranu a ferrikyanidu gelovou filtrací

V našem modelovém experimentu budeme dělit směs velkých a malých molekul různé barvy: modrý polysacharid označovaný Blue Dextran 2000 o velmi velké molekulové hmotnosti (M_r 2 000 000) a žlutý ferrikyanid draselný (M_r 368). Postup dělení tak bude přímo viditelný.

Úkol:

Určete koncentraci Blue Dextranu a ferrikyanidu draselného v neznámém směsném vzorku. Sestrojte eluční křivku a určete eluční objem (V_e) obou látek.

Reagencie a pomůcky:

Neznámý vzorek obsahující Blue Dextran 2000 a ferrikyanid draselný
Blue Dextran ($c=1$ g/l)
Ferrikyanid draselný ($c=1$ g/l)
Sacharóza ($c=20$ g/l)
NaCl ($c=0,3$ 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 obou látek (obě jsou barevné, proto vám stačí proměřit oblast viditelného světla) a vyberte si vlnové délky, které budete dále používat.

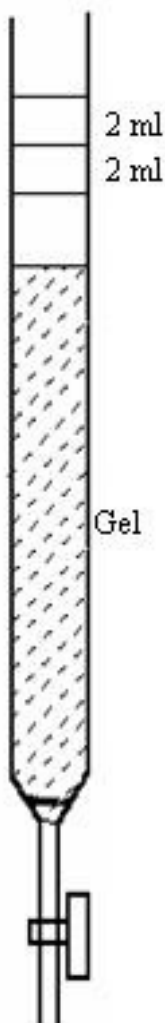
- **Kalibrační přímka**

Sestrojte kalibrační přímku tak, že si naředíte standard (vzorek o známé koncentraci), změřte jeho absorbanci při příslušné vlnové délce a data vynesete do grafu. Pro kalibrační přímku by mělo stačit 5-6 bodů v rozmezí 1g/l- cca 0,05 g/l).

- **Gelová filtrace+spektrofotometrie**

Smíchejte si 0,2 ml neznámého vzorku a 0,2 ml sacharózy (ta usnadní nanášení vzorku na kolonu) a dobře promíchejte.

Nikdy nenechte vyschnout gel v koloně! Vždy musí zůstat eluční roztok nad gelem. Do gelové náplně v koloně 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 zvršení! Vzorek nebo mobilní fáze (v našem experimentu 0,3 M NaCl) se tedy musí na povrch gelu aplikovat velmi opatrně.



- a. Nastavte hladinu eluentu 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. Dejte zkumavku pod výtok z kolony a otevřete kohout. Pokaždé, když eluent dosáhne nejbližší spodní rysky, zavřete kohout, vezměte novou zkumavku a jímejte další frakci. Objem 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 (bod c a d) opakujte, dokud nevyteče žlutě zbarvená frakce ferrikyanidu. Získáte cca 15 frakcí, s kterými budete dále pracovat.
- f. Změřte absorbanci všech frakcí při vámi zvolených vlnových délkách (viz výše) proti deionizované vodě a z kalibrační přímky odečtete koncentraci příslušného analytu v každé frakci. Pokud je absorbance větší než 2 (nebo pokud je vyšší než nejvyšší bod kalibrační přímky), nařed'te frakci dva- až 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 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 každé frakce.

- i. Spočítejte hmotnostní koncentraci obou barviček v původním neznámém vzorku. K tomu je třeba spočítat celkovou hmotnost dané barvičky a přepočítat na původní objem analyzovaného vzorku.

Úloha 2: Tenkovrstevná chromatografie rostlinných barviv

Reagencie a pomůcky:

Aceton



List libovolné rostliny

Miska s tloučkem

Obyčejná tužka

Hexan



Skelný prach (či písek)

Silikagelová fólie

Průhledná lepicí páska

Postup:

Příprava extraktu (provede jedna skupina za celý kruh)

Do třecí 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 mikrozkuhavek (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.

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). Nanáška tvaru tenkého vodorovného proužku je výrazně lepší, než kruhová skvrna. 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 do poloviny fólie, vyndejte chromatogram z vany a nechte uschnout. Tužkou obtáhněte jednotlivé zóny a vyznačte čelo chromatogramu. Přelepte 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.