

14. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA

1. Chromatografia cienkowarstwowa aminokwasów

Zasada:

Technikę chromatografii cienkowarstwowej wyróżnia kształt i rodzaj fazy stacjonarnej, uformowanej w postaci cienkiej warstwy nałożonej na płaskie podłoże, zapewniające dostateczną wytrzymałość mechaniczną. Płaskim podłożem zwykle są płytki szklane, płytki z folii aluminiowej lub plastikowej. Cienką warstwę złoża mogą stanowić: żel krzemionkowy (Kieselgel, silica gel), ziemia okrzemkowa (Kieselgur, celit, diatomaceous earth), niezmodyfikowana lub zmodyfikowana chemicznie celuloza, tlenek glinowy (Al_2O_3), podłoża jonowymiennie lub inne. Warstwę wybranego złoża można nałożyć na płytki samodzielnie, wykorzystując do nakładania zawiesiny specjalny przyrząd zwany powlekačem. Przygotowywane samodzielnie płytki należy zaktywować przed nałożeniem prób. W tym celu umieszcza się płytki w suszarce o temperaturze 120°C na 10 minut. Można korzystać też z gotowych płytek powleczonych określonym złożem, które są dostępne w sprzedaży. Technikę chromatografii cienkowarstwowej stosuje się do rozdziału niemal wszystkich grup związków ważnych biologicznie. Zazwyczaj rozdział zachodzi na zasadzie odwracalnej adsorpcji na powierzchni fazy stałej (chromatografia adsorpcyjna) lub podziału substancji między dwie fazy ciekłe (chromatografia podziałowa).

Wykonanie:

- Na gotowej płytce zaznaczyć delikatnie ołówkiem linię startu w odległości 1,5 cm od brzegu płytki. Na wykreślonej linii startu zaznaczyć 12 punktów w odstępach 1,5 cm, rozpoczynając w odległości 1,5 cm od brzegu płytki. W punktach tych zostaną naniesione kolejne roztwory aminokwasów wzorcowych (0,5%) oraz mieszaniny nr 1–3, zawierające aminokwasy przeznaczone do identyfikacji. Na górnym brzegu płytki, przeciwnym do punktów zaznaczonych na linii startu, należy zapisać nazwy lub numery nanoszonych wzorcowych aminokwasów i nieznanymi mieszanin.

Nanoszenie prób wzorcowych i badanych

Za pomocą kapilary nanosimy w zaznaczonych punktach wzorce aminokwasów w kolejności zapisanej na górnym brzegu płytki. Nanoszenie wykonujemy przez delikatne dotknięcie końca kapilary do podłoża płytki, tak aby średnica powstałej plamki roztworu na płytce nie była większa niż 3 mm. Podczas nanoszenia prób plamki suszymy strumieniem ciepłego powietrza z suszarki.

Rozwijanie chromatogramu

Chromatogramy cienkowarstwowe rozwija się w specjalnie przystosowanych komorach chromatograficznych ze szlifowaną szczelną pokrywą. Przed użyciem wewnętrzne dwie większe ściany komory wyłożyć bibułą filtracyjną. Do komory należy wlać ok. 120 ml mieszaniny rozpuszczalników służących do rozwijania chromatogramu, składającej się z n-butanolu, kwasu octowego, wody w stosunku objętościowym 4:1:1, przynajmniej na 25 minut przed wstawieniem płytek. Roztwór rozpuszczalników rozwijających chromatogram wlewać tak, aby bibuła była dokładnie nasączona i na dnie komory została warstwa roztworu. Takie przygotowanie komory chromatograficznej zapewnia maksymalne wysycenie wnętrza komory chromatograficznej parami rozpuszczalników. Płytke chromatograficzną z naniesionymi próbami chwycić za górną krawędź (unikając dotykania palcami dolnej części płytki). Wstawić płytkę pionowo do komory chromatograficznej (krawędź płytki z linią startu ma być zwrócona ku dołowi), ostrożnie wsuwając między równoległe rowki przeciwległych ścian komory. Krawędzie boczne płytki nie mogą dotykać bibuły, ponieważ może to spowodować nierównomierne wznoszenie się rozpuszczalnika. Rozwijanie chromatogramu prowadzić przez 60 minut w szczelnie zamkniętej komorze. Po tym czasie płytkę wyjąć z komory chromatograficznej i zaznaczyć ołówkiem front wzniesienia eluentu. Następnie płytkę wysuszyć pod dygestorium, w strumieniu ciepłego powietrza z termowentylatora.

Wywołanie chromatogramu

Wysuszoną płytkę, po ustawieniu pionowo pod dygestorium, spryskać z rozpylacza roztworem 0,3% kwaśnej ninhydryny w butanolu, tak aby rozpylany roztwór nie spływał po płytce. Płytkę ogrzewać strumieniem gorącego powietrza aż do pojawienia się zabarwionych plamek aminokwasów.

Interpretacja chromatogramu

Uwidocznione plamki obrysować ołówkiem, wyznaczyć środek plamki i zmierzyć odległość od miejsca startu do środka plamki, czyli drogę przebytą przez

każdy aminokwas. Zmierzyć drogę przebytą przez rozpuszczalnik. Obliczyć wartości współczynników R_f dla wszystkich wzorcowych aminokwasów i składników mieszanin nieznanymi aminokwasów. Na podstawie wartości R_f zidentyfikować skład rozdzielonych mieszanin aminokwasów.

2. Chromatografia cienkowarstwowa lipidów osocza

Zasada:

Chromatografia cienkowarstwowa, ze względu na łatwość wykonania, minimalne potrzeby aparaturowe i niski koszt, może być metodą z wyboru do rozdzielania lipidów osocza. Ekstrakt chloroformowy lipidów osocza (patrz ćwiczenie 8) można rozdzielić wstępującą techniką chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym, stosując układ rozpuszczalników: eter naftowy, stężony kwas octowy, eter etylowy w stosunku objętościowym 39:1:10. Technika ta pozwala rozdzielić i uwidocznić na chromatogramie frakcję estrów cholesterolu, triacylogliceroli, wolnych kwasów tłuszczowych, cholesterolu i fosfolipidów.

Wykonanie:

- Ćwiczenie należy wykonać w ten sam sposób, jak ćwiczenie 1, w którym opisano szczegółowo poszczególne etapy procedury.
- **Nanoszenie prób badanych i wzorcowych.** Po przygotowaniu płytek, jak opisano wcześniej, na starcie w dwóch miejscach nałożyć kapilarą chloroformowy ekstrakt lipidów. Jako próby wzorcowe nanieść 2% chloroformowy roztwór cholesterolu, roztwór fosfolipidów i roztwór triacylogliceroli.
- **Rozwijanie chromatogramu techniką wstępującą.** Do komory chromatograficznej wlać 120 ml eluentu o składzie eter naftowy, stężony kwas octowy, eter etylowy w stosunku objętościowym 39:1:10. Płytki z nałożonymi próbami wstawić do komory na 60 minut, jak opisano poprzednio, w celu rozwinięcia chromatogramu. Po tym czasie płytkę wyjąć z komory chromatograficznej i zaznaczyć ołówkiem front wzniesienia eluentu. Następnie płytkę wysuszyć pod dygestorium w strumieniu ciepłego powietrza z termowentylatora.
- **Wywołanie chromatogramu.** Wysuszoną płytkę wstawić na kilka minut do komory z J_2 w celu wybarwienia rozdzielonych frakcji lipidów. Pojawiające się żółto-brunatne zabarwienie wynika z wysycenia jodem podwójnych wiązań rozdzielanych związków. Alternatywnie, drugą płytkę spryskać odczynnikiem utleniającym (0,6% dwuchromian potasowy w 50% kwasie siarkowym).

- **Interpretacja chromatogramu.** Obliczyć wartości współczynników R_f dla wszystkich wzorcowych substancji oraz poszczególnych składników rozdzielanego ekstraktu lipidów, które należy zidentyfikować.

ODCZYNNIKI

Płytki pokryte żelem krzemionkowym; 0,2% roztwory aminokwasów wzorcowych: cystyna, arginina (Arg), glutamina (Gln), asparagina (Asn), treonina (Thr), leucyna (Leu), tyrozyna (Tyr), tryptofan (Trp), prolina (Pro); mieszaniny aminokwasów do identyfikacji: 1, 2, 3; roztwór elucyjny 1: n-butanol-kwas octowy-woda (w stosunku objętościowym 4:1:1); 0,3% roztwór kwaśnej ninhydryny w butanolu (0,3 g ninhydryny + 100 ml butanolu + 3 ml kwasu octowego); ekstrakt chloroformowy lipidów z osocza (25 mg/ml); roztwór elucyjny 2: eter naftowy-stężony kwas octowy-eter etylowy (w stosunku objętościowym 39:1:10); 2% roztwór chloroformowy cholesterolu; fosfolipidów; triacylogliceroles; J_2 , 0,6% dwuchromian potasu w 50% kwasie siarkowym.

NOTATKI