

1. Úloha, Analýza vybraných aminokyselin pomocí metody TLC

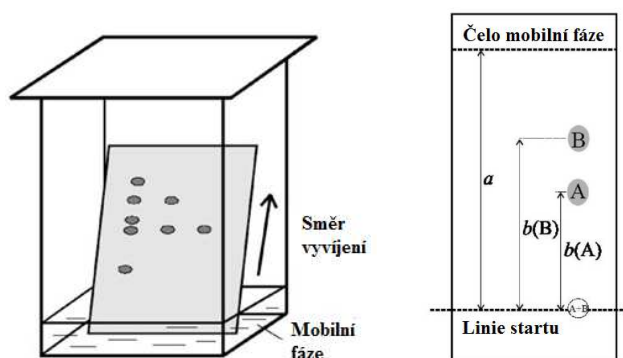
Chromatografie umožňuje účinnou separaci látek, která je nutná pro spolehlivou identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek sledované látky. Různé látky se liší svými adsorpčními vlastnostmi, rozdělovacími koeficienty, svými rozměry, náboji atd., což se využívá v chromatografii k jejich rozdělení ve vhodném chromatografickém uspořádání. K rozdělení látek dochází na základě jejich různé pohyblivosti v systému dvou fází – stacionární (zakotvené) a mobilní (pohyblivé). Stacionární fází může být pevná látka (papír, SiO_2 , Al_2O_3) ale i kapalná fáze zakotvená na pevném nosiči, mobilní fází pak bývá kapalina nebo plyn. Podle způsobu uspořádání chromatografického zařízení dělíme chromatografii na plošnou a sloupcovou. Na základě mechanismu určujícího rozdělení látky mezi stacionární a mobilní fází pak lze chromatografii specificky rozdělit na: adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, afinitní, atd.

Tenkovrstvá chromatografie (TLC, Thin Layer Chromatography) je případem plošné chromatografie s převládajícím adsorpčním mechanismem dělení analyzované směsi látek. Provádí se na tenké vrstvě sorbentu (celulóza, silikagel, alumina), který je nanesen na vhodné podložce (sklo, kovová fólie, plast). Stacionární fáze musí dobře ulpívat na zvoleném podkladu a být ve formě jemných částic jednotné velikosti (mezi 1 – 5 μm). Mobilní fází je směs organických rozpouštědel, někdy ve směsi s vodnou fází. Nejčastěji se používá ethanol, aceton, chloroform, benzen a hexan.

Vzorek se nanáší na začátek vrstvy (start) společně se standardy. Po zaschnutí nanesených vzorků se vrstva vloží do vyvíjecí komory s vhodnou směsí rozpouštědel (mobilní fáze), nasycené parami mobilní fáze. Linie startu s nadávkovaným vzorkem je umístěna nad hladinou mobilní fáze hladinou (minimálně cca 0,5 cm do mobilní fáze), a komora se uzavře. Dochází ke vztlínání mobilní fáze vzhůru stacionární fází po povrchu destičky. Mobilní fáze rozpouští složky vzorku a unáší je vzhůru po povrchu destičky. Jelikož jednotlivé složky vzorku interagují se stacionární fází různě (jsou různě intenzivně brzděny oproti čelu mobilní fáze), dochází k jejich vzájemnému rozdělení. Vyvíjení chromatogramu probíhá tak dlouho, dokud se čelo vztlínající směsi rozpouštědel nepřiblíží k okraji desky (cca 1 – 2 cm, je nutno vyznačit). Poté se chromatogram vyjme, vysuší a vhodným způsobem detekce se určí jednotlivé skvrny.

K detekci se běžně používají fluorescenční látky (fluoreskující při osvětlení UV zářením). Stanovované látky velmi často tuto fluorescenci zhášejí, takže se pod UV lampou objevují na

chromatogramu v podobě tmavých skvrn. Využívají se i další způsoby detekce, založené na postřiku chromatogramu vhodným činidlem, které se stanovovanou látkou vytváří barevnou sloučeninu. Tenkovrstvou chromatografií lze stanovovat širokou škálu organických i anorganických látek při vysoké citlivosti a nízké ekonomické náročnosti. Metoda je časově velmi nenáročná, takže je velmi rozšířená v průmyslu v oblasti mezioperační kontroly. Vzhledem ke své univerzálnosti je vhodná i pro první orientaci ve složení neznámého vzorku v oblasti sledování znečištění životního prostředí, medicíně i chemickém výzkumu.



Obr. 1. Princip TLC a stanovení RF

V TLC se nejčastěji využívá těchto dvou separačních principů – adsorpce (separované látky jsou poutány na povrch sorbentu) a rozdělovací rovnováhy (separované látky se rozdělují mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny, tj. stacionární fáze je kapalina zakotvená na vhodném nosiči). Migrační chování jednotlivých separovaných látek vyjadřuje získaný chromatogram, kde pro každou separovanou látku můžeme definovat hodnotu retenčního (retardačního) faktoru:

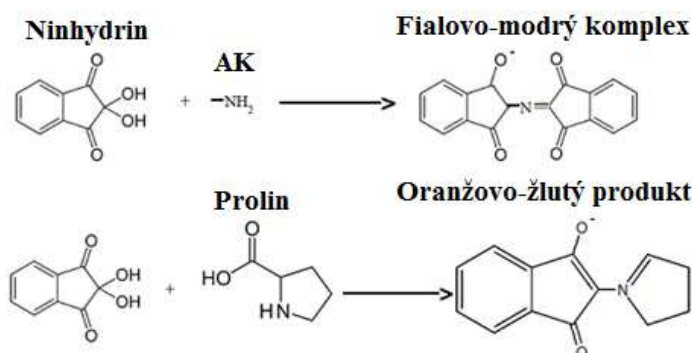
$$RF = \frac{b}{a}$$

kde: a je vzdálenost mezi čelem mobilní fáze (tj. linií, kam až dostoupila mobilní fáze během separace) a linií startu,

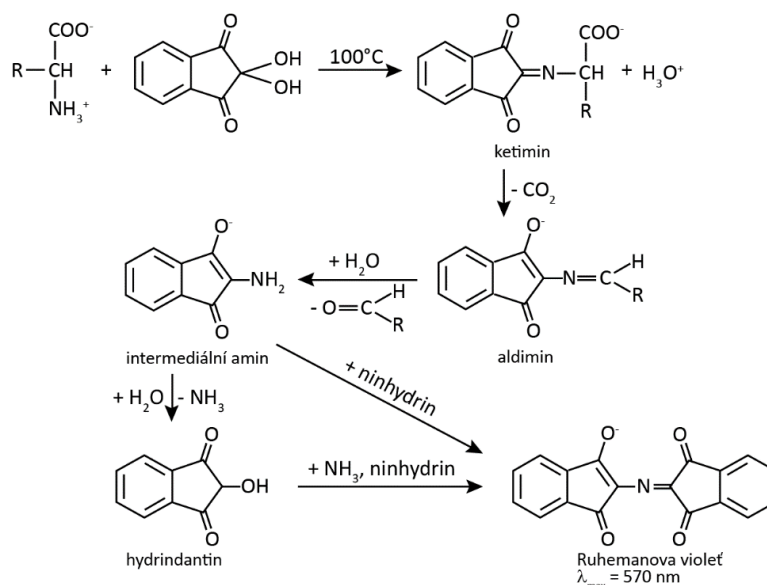
b je vzdálenost středu skvrny separované látky od linie startu.

Retardační faktory pro určitý separační systém (určitá stacionární fáze na TLC desce a mobilní fáze) se určují na základě vyhodnocení skvrn standardů (chemicky čisté látky). Detekce aminokyselin v TLC se velmi často provádí reakcí s ninhydrinem (postřikání chromatogramu

roztokem, odpaření, záhřev), většina AK poskytuje žluté, červenofialové a modrofialové produkty.



Obr. 2. Princip reakce AK s ninhydrinem



Obr. 3. Princip reakce AK s ninhydrinem, detailní popis reakce

Pracovní postup:

1. Připravte si vyvíjecí lázeň.

Připravte si směs mobilní fáze pro TLC: n-butanol : kyselina octová : voda (3:1:1; v:v). V odměrné baňce (50 ml) smíchejte 30 ml n-butanolu s 10 ml kyseliny octové a doplňte 10 ml destilované vody po rysku, směs důkladně protřepejte a potřebné množství MF nalijte do vyvíjecí nádoby na TLC, nádobu uzavřete skleněným víkem a ponechte 30 ml odstát (nádobu se musí před analýzou vzorků AK nasytit parami roztoku MF).

2. Připravte si roztoky standardů aminokyselin.

Roztoky standardů aminokyselin je potřeba připravit jednotlivě v koncentraci 5 mg/ml. Na analytických váhách navažte postupně: 50 mg Prolinu, 50 mg Izoleucinu, 50 mg Glutaminu a 50 mg kyseliny Asparagové, s přesností na 1 desetinné místo, každou navážku jednotlivě rozpusťte v 10 ml destilované vody v odměrné baňce (10 ml).

3. Připravte si TLC destičku.

Pomocí obyčejné tužky si na destičku načrtněte startovní a finální linii pro MF (dle výšky hladiny MF ve vyvíjecí nádobě pro TLC, zpravidla 1 cm), výši finální linie si na destičku načrtněte ve výšce 1 – 2 cm od horního konce destičky. Pomocí obyčejné tužky si na startovní linii vyznačte pozice jednotlivých standardů a neznámého vzorku (celkem 4 pozice) a destičku si podepište svými iniciály na horní straně.

4. Naneste vzorky na TLC destičku.

Pomocí mikropipety naneste na destičku 1 μ l každého vzorku, nejprve všechny tři standardy a poté neznámý vzorek (na startovní linii a do správných pozic).

5. TLC analýza.

Vložte TLC destičku do vyvíjecí nádoby tak, aby startovní linie se vzorky byla umístěna dole, nejlépe zároveň s hladinou MF. Nádobu uzavřete a ponechejte separaci běžet, dokud mobilní fáze nedosáhne finální linie (čelo) TLC destičky, pak TLC destičku ihned vyjměte z vyvíjecí nádoby. TLC destičku nechte mírně oschnout a poté postříkejte připraveným roztokem ninhydrinu, vložte ji na 5 min do sušicí lázně (100°C) a na základě zbarvení skvrn a jejich pozice detekujte dle standardů separované aminokyseliny v neznámém vzorku. Stanovte také retenční faktory všech separovaných látek.