

Chromatografia żelowa – zdolność rozdzielcza, rozcieńczenie i odzysk kolumny chromatograficznej

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z techniką chromatografii żelowej na podstawie rozdziału roztworu barwników: 2,6-dichlorofenolindofenolu(DCPIP) oraz safraninu T.

Zakres wiadomości:

Rodzaje chromatografii, chromatografia żelowa, chromatogram i jego parametry, zdolność rozdzielcza kolumny, odzysk substancji z kolumny, rozcieńczenia roztworów, spektroskopia UV-Vis (prawo Lambert'a-Beera, zakres widzialny).

Materiały i aparatura:

- Roztwory barwników: safranin T ($\epsilon = 25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 520nm), DCPIP ($\epsilon = 21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 600nm)
- Kolumna chromatograficzna
- Ependorfy 1,5ml
- Zlewki
- Pipety automatyczne (3 zakresy)
- Spektrofotometr SPEKOL 11
- Żel Sephadex G50

Wykonanie ćwiczenia:

1. Na złożę Sephadex G50 nakropić 100 μl przygotowanego roztworu (zanotować godzinę).
 - Uważać, aby w trakcie nakładania roztworu nie zaburzyć powierzchni żelu.
 - Nakrapiać roztwór na środek żelu (nie dotykać pipetą ścian kolumny).
 - Nie dopuścić do wyschnięcia żelu podczas całego procesu.
2. Podczas trwającego rozdziału barwników na kolumnie, sporządzić odpowiednie rozcieńczenia wyjściowych roztworów barwników, w celu określenia ich stężenia (wykorzystanie prawa Lambert'a-Beera').
 - Pamiętać, aby wartość absorbancji mieściła się w przedziale 0 – 1.

3. Frakcje z kolumny zacząć zbierać do ependorfów przed pojawieniem się pierwszego z barwników i kontynuować do momentu całkowitego oczyszczenia się kolumny. W protokole notować zarówno dokładny czas jak i objętości zbieranego roztworu (ok. 1 ml/120s).
4. Roztwory ze wszystkich ependorfów zmierzyć na spektrofotometrze na dwóch długościach fali (maksima obydwu barwników: 520 i 600nm). Przykładowo - z każdego ependorfa pobrać 900µl i rozcieńczyć go tą samą objętością wody przed pomiarem spektrofotometrycznym (uwzględnić to w obliczeniach!). Objętość minimalna w kuwecie pomiarowej to ok. 1,5ml.

Tabela wyników:

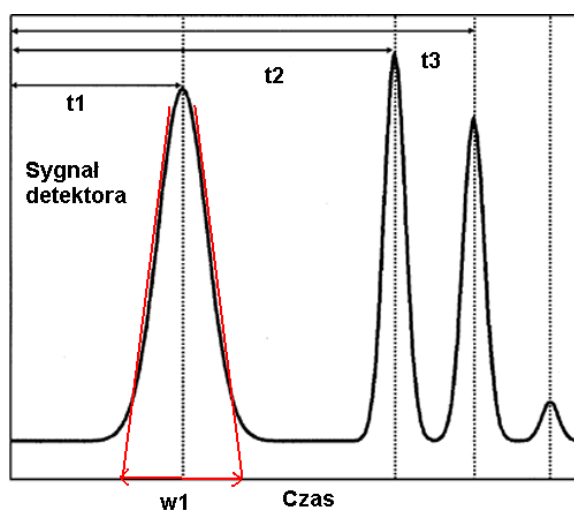
Absorbancja roztworu wyjściowego DCPIP:			Notatki/obliczenia		
Stężenie:					
Absorbancja roztworu wyjściowego safraninu T:			Notatki/obliczenia		
Stężenie:					
Frakcje z kolumny					
Godzina nałożenia roztworu barwników:					
Lp.	Czas	Objętość	Absorbancja		Obliczenia/notatki
			520nm	600nm	
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					
8.					
9.					
10.					
11.					
12.					
13.					
14.					
15.					
16.					
17.					

18.					
19.					
20.					

Opracowanie wyników:

1. Zdolność rozdzielcza kolumny R_s

Zdolność rozdzielcza kolumny, to podstawowy parametr charakteryzujący rozdział substancji przechodzących przez kolumnę. Niezbędne wartości do jej obliczenia zostały umieszczone na wykresie 1. W przypadku DCPIP i safraninu T wykreślić absorbancję A poszczególnych frakcji dla długości fali 520 i 600nm w funkcji czasu t .



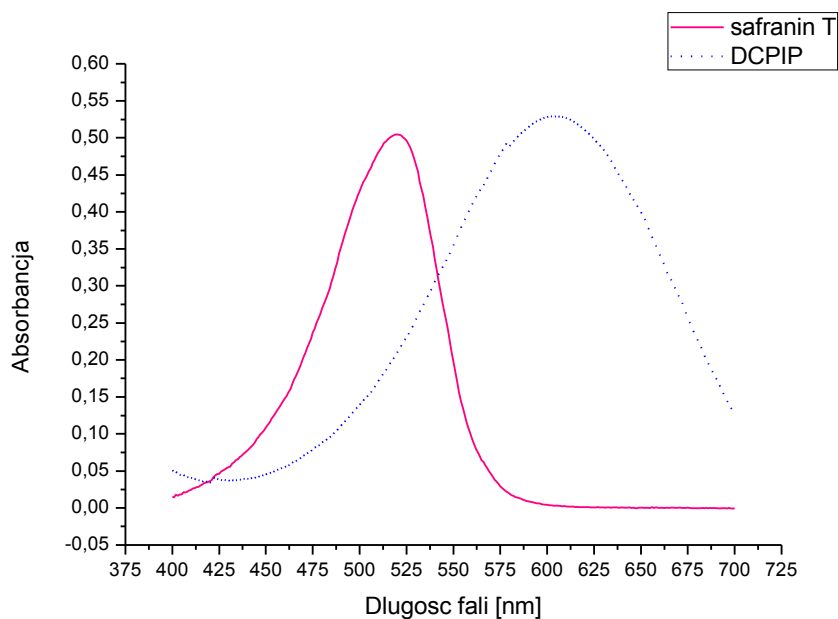
Wyk. 1. Parametry chromatogramu niezbędne do obliczenia zdolności rozdzielczej kolumny.

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2}$$

t_{r1}, t_{r2} – czasy retencji odpowiednio składnika 1 i 2; w_1 – szerokość piksu substancji 1.

Dobry rozdział następuje przy wartości $R_s \geq 1$.

Uwaga: Do analizy wyników postarać się wykorzystać informacje zawarte na wykresie widm absorpcyjnych roztworów barwników [Wyk.2]; oba roztwory są o jednakowym stężeniu. Sygnał pochodzący od DCPIP w maksimum absorpcyjnym safraninu T(520nm), stanowi 42% sygnału.



Wyk. 2. Widma absorpcyjne safraninu T oraz DCPIP (400-700nm).

2. Rozcieńczenie na kolumnie

Należy obliczyć, jak zostały rozcieńczone barwniki po przejściu przez kolumnę w porównaniu z roztworami wyjściowymi. Zanotowane dokładne objętości roztworu odebranego z kolumny wraz z wynikami spektrofotometrycznymi (analiza wykorzystująca prawo Lambert'a-Beer'a), pozwalają na obliczenie rozcieńczeń poszczególnych frakcji, a więc i całego roztworu.

3. Odzysk z kolumny

Mając objętości i stężenia poszczególnych frakcji, można łatwo obliczyć ilość substancji jaką udało nam się odzyskać z kolumny. Porównując wyniki do roztworów wyjściowych, obliczyć odzysk barwników z kolumny.

4. Obliczanie błędów

Przy określaniu rozrzutów pomiaru, proszę wziąć pod uwagę błędy pipet przy rozcieńczaniu, oznaczania spektrofotometrycznego oraz występujące przy zbieraniu frakcji z kolumny ($1\text{ml} \approx 30 \pm 2$ krople).

Literatura:

Biofizyka „Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami”, Z. Józwiak, G. Bartosz, PWN, Warszawa 2005

Opracował: mgr. inż. Sławomir Potocki