

# ÅRHUS AKADEMI



## BIOLOGI ØVELSE

### KROMATOGRAFI

---

NIELS ROHOLT

**Kromatografi** (græsk: '*chroma* = farve; *gra'fia* = skrive), der betyder "farveskrift", er en metode til adskillelse af bestanddelene i stofblandinger på grund af stoffernes forskellige evne til at opløses og **adsorberes** (latin: *ad* = til; *sor'bere* = suge. Dvs. optages på overfladen af et andet stof) i forbindelse med bestemte hjælpestoffer. Kromatografi benyttes til analyse og til renfremstilling af stoffer.

Den første kromatografimetode blev udarbejdet i 1903 af den russiske botaniker M. TSWETT (1872-1920). Han lod en blanding af bladfarvestoffer (klorofyl, karotin, xanthophyl m.v.) opløst i petroleumssæter sive ned gennem et lodretstående glasrør fyldt med fint pulveriseret calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$  = kalk). Han iagttog, at de forskellige farvestoffer først alle adsorberedes øverst i røret, men at der, efterhånden som mere af opløsningen sivede igennem, dannedes forskellige grønne, røde og gule farvede zoner. Forklaringen er, at de stærkest adsorberbare stoffer efterhånden fortrænger de svagere adsorberbare, så disse føres længere ned, hvor de atter adsorberes. Skyller man efter med det rene opløsningsmiddel, ender man med at få en søjle med skarpt adskilte zoner, et kromatogram, hvori hver farvezone indeholder ét bestemt stof. Ved hjælp af denne kromatografimetode, der i dag kaldes **adsorptionskromatografi**, påviste Tswett, at grønne blade indeholder flere røde og gule farvestoffer, og at det grønne **farvestof**, klorofyl, i virkeligheden er to stoffer (*klorofyl a* og *klorofyl b*). Tswett's metode, hvor han benytter  $\text{CaCO}_3$  og petroleumssæter som "løbevæske", egner sig kun til lipofile stoffer.

Englænderne A.J.P. MARTIN og R.L.M. SYNGER (nobelpris i kemi 1952) indførte den såkaldte **fordelingskromatografi**, hvor stofferne adskilles ved deres fordeling mellem opløsningsmidlet og en ubevægelig flydende fase. Glasrøret (kolonnerøret = "søjlen") kan være fyldt med kiselgel (= silicagel) eller stivelse fugtet med vand. Stofferne, der skal adskilles, opløses i en lille mængde af det organiske opløsningsmiddel. Dernæst tilsættes der mere opløsningsmiddel. Vandet udgør i dette tilfælde den ubevægelige flydende fase. Det organiske opløsningsmiddel bindes ikke til kiselgelen eller stivelsen og løber ned gennem søjlen. De opløste stoffer vil under gennemløbet fordele sig på en bestemt måde mellem vandfasen og den organiske fase. De mere lipofile stoffer opløses bedst i det organiske opløsningsmiddel, som er den bevægelige fase, og de følger hurtigt med, medens de mere hydrofile stoffer bedre opløses i den stationære vandfase, som bliver tilbage eller løber langsommere igennem. Det er almindeligt, at man tilsætter så meget opløsningsmiddel (elureringsmiddel), at alle stoffer ender med at dryppe ud af kolonnerøret. Stofferne opsamles i en automatisk fraktionerings-opsamler, hvorefter de kan undersøges hver for sig.

**Papirkromatografi** indebærer, at man i stedet for et kolonnerør anvender filterpapir, der består af cellulose. Cellulosen absorberer vandet og er altså bærer af den stationære fase.

Med papirkromatografien fik biokemikerne et hjælpemiddel, som revolutionerede arbejdet med adskillelse (separation) af bl.a. aminosyrer og sukkerstoffer, dvs. biokemisk vigtige hydrofile stoffer, som ikke kunne adskilles med den ældre adsorptionskromatografi. Papirkromatografi kan også anvendes 2-dimensionalt og sammen med **radioaktive stoffer**. MELVIN CALVINS undersøgelser af fotosyntesen er et eksempel på dette (se side 185 i J. Bremer).

*Yderligere kilder:*

Jens Bremer: side 202-204)

# ÅRHUS AKADEMI



## BIOLOGI ØVELSE

### Øvelse: Papirkromatografi (fordelingskromatografi) af aminosyrer

#### Materialer.

Whatmans kromatografikar	Demineraliseret vand
Kromatografipapir	Pasteur-pipetter
Måleglas	Seperationstragt
Blyant, lineal	Stativ
Aminosyrer (lysin, alanin leucin)	Ninhydrin (farligt!)
n-Butanol	Acetone
Eddikesyre	Varmeskab

#### Fremgangsmåde

I øvelsen benyttes **Whatmans kromatografikar** og **kromatografipapir**.

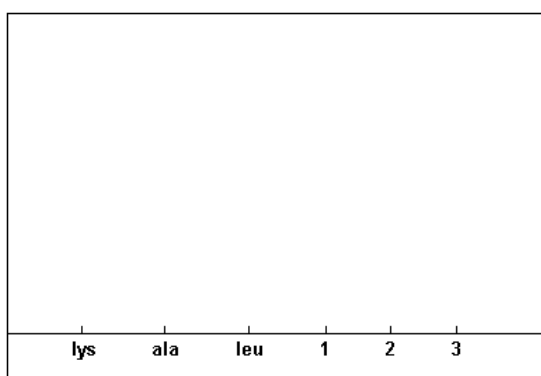
I karret hældes et 0,5 til 1,0 cm højt lag af **løbevæske**(eleureringsvæske), der er en blanding af:

4 dele n-butanol  
1 del eddikesyre  
5 dele vand.

Løbevæsken blandes først i en **seperationstragt**. Efter et par minutters henstand, deler væsken sig i 2 faser, af hvilke den organiske bruges.

Før du hælder løbevæsken i kromatografikarret, kan du som kontrol fylde karret med vand, for at se, hvor meget løbevæske, der skal benyttes. Efter påfyldningen af løbevæske skal du hurtigt lukke karret med låget, så atmosfæren i karret bliver mættet med løbevæske.

På kromatografipapiret, der er et filterpapir, tegnes med blyant (ikke kuglepen eller lignende!) en basislinie 1,5 cm fra den ene langside af papiret. Med samme afstand afsættes der 6 blyantsmærker på basislinien, som vist i figur 1. Undgå så vidt muligt at berøre papiret med fingrene andre steder end langs med kanterne.



Figur 1.

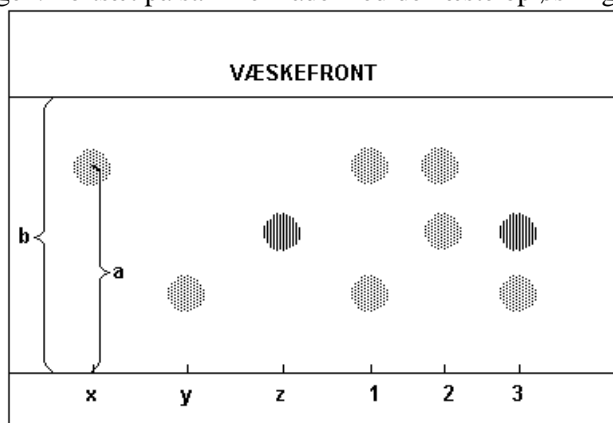
I øvelsen benyttes der 3 aminosyrer: **lysin, alanin** og **leucin**.

Af hver af de 3 aminosyrer laves 2 ml opløsning, der hver indeholder 0,03 g af hver af aminosyrerne (reagensglassne skal være helt rene!). Desuden fremstiller hver af holddeltagerne en blanding af 2 eller 3 af aminosyrerne. Blandingsforholdet holdes hemmeligt for de andre deltagere. De ukendte prøver benævnes 1, 2 og 3. Blandingerne fremstilles ved hjælp af lige dele af de kendte opløsninger. Derved bliver koncentrationen af hver aminosyrer 2 henholdsvis 3 gange lavere end i stamopløsningerne. Opløsningerne er holdbare i længere tid i køleskab.



## BIOLOGI ØVELSE

En pasteur-pipette (eller et glasrør) trækkes ud til et tyndt kapillær, hvis munding er ca 1mm i diameter. Pipetten dyppes ned i den første opløsning, **lysin**, som derved suges et par cm. op i kapillæret. Spidsen tørres af med filterpapir og trykkes derefter mod det første mærke, **lys**, i nogle sekunder. Derved dannes der på papiret en plet med 3-4 mm's diameter, indeholdende omkring 0,001 ml af opløsningen. Tilbageblivende opløsning i pipetten blæses ud, og pipetten skylles 2 gange i destilleret vand, som hver gang suges højere op end opløsningen. Fortsæt på samme måde med de næste opløsninger.



Figur 2

Når opløsningsmidlet er fordampet fra alle pletterne, foldes kromatografipapiret sammen, så det danner en cylinder. Papirets korte sider hæftes sammen med nogle specielle clips, der sikrer, at siderne ikke kommer direkte i kontakt med hinanden.

		Prøve		
	$R_f$	1	2	3
lysin				
alanin				
leucin				

Papircylinderen sættes derefter ned i kromatografikarret, hvis væskenniveau ikke må nå op til blyantslinien på papiret. Låget lægges hurtigt på, hvorefter karret holdes lukket under hele forsøget. Efter ca. 50. minutter er løbevæskens front steget omkring 10 cm, hvorefter forsøget kan afbrydes. Papircylinderen tages ud og løbevæskens væskefront markeres med blyant. Papiret tørres i varmeskab ved 100°C i 5 minutter. Herefter fugtes papiret med **ninhydrin**, der kan "fremkalde" aminosyrerpletterne.

Der opvarmes derefter på ny i varmeskabet i 5-10 minutter, hvorefter de forskellige aminosyrer fremtræder som violette pletter.

Afstanden mellem basislinien og løbevæskens front betegnes  $b$  og afstanden mellem basislinien og en bestemt aminosyreplets midtpunkt (tyngdepunkt) kaldes  $a$ , se figur 2.

Forholdet  $a/b$  kaldes **retardationsfaktoren** eller  **$R_f$ -værdien**. Denne skal beregnes (med 2 decimaler) for de 3 kendte aminosyrer. Noter dernæst de tre ukendte opløsnings sammensætning, ved at sætte krydser i nedenstående tabel.

Spørgsmål:

1. Hvor stor en mængde aminosyrer findes der i de forskellige pletter, hvis der anvendes 1 mm<sup>3</sup> af hver af opløsningerne?
2. Find de 3 aminosyrers formler i lærebogen og diskuter (gerne uddybende), hvorfor de 3 aminosyrer vandrer afsted med forskellig hastighed.