

Molekyylien erotus kromatografialla

CHEM-A1310/CHEM-C1300, 2022

Demon suorituspäivämäärä:

Ryhmän jäsenten nimet ja opiskelijanumerot:

Työssä valmistetaan väriliuos, joka ajetaan puhdistuskolonnin eli -pylvään läpi. Erikokoisten värimolekyylien odotetaan kulkevat eri nopeuksilla kolonnin sisältämän geelin läpi ja siten erottuvan toisistaan. Värimolekyylien tulisi poistua kolonnista eri aikoina.

Materiaalit

- 15 ml:n Falcon-putkessa: Blue Dextran 2000 (molekyylipaino 2 000 000 g/mol), 4 mg/ml puskuriliuoksessa
- 15 ml:n Falcon-putkessa: Fluorescein eli fluoreseiini (molekyylipaino 376.27 g/mol), 0.5 mg/ml puskuriliuoksessa
- Tyhjä Falcon-putki väriliuoksen sekoittamista varten
- 4 x muovinen 3 ml:n Pasteur-pipetti: yksi kumpaankin alkuperäiseen väriliuokseen, yksi yhdistetyn väriliuoksen pipetointiin ja yksi puskurin pipetointiin
- Econo-Pac® 10DG –erotuskolonne
- Statiivi
- Puskuri 50 ml Falcon-putkessa: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5
- 10 kpl lasisia koeputkia fraktioiden keruuta varten
- Tyhjä Erlenmeyer- tai dekantterilasi ylijäämäpuskurin keräystä varten

Muista henkilökohtaiset suojavälineet!

Työn suoritus

- 1) Lue työohje huolellisesti läpi!
- 2) Aseta kolonni statiiviin pystysuoraan siten, että alle mahtuu lasinen Erlenmeyer-pullo tai dekantterilasi.
- 3) Irrota ensin erotuskolonnin yläkorkki, väännä sitten alakorkki irti ja anna puskurin valua keräysastiaan. Kolonnin yläkammio tyhjenee. Tämä vaihe kestää 15-20 minuuttia. Varmista tällä välin keskustelemalla ryhmäsi kanssa, että ymmärrät tulevat työvaiheet.
- 4) Sekoita väriliuokset suhteessa 1:1, jotta saat oikean konsentraation vihreään väriliuokseen (blue dextran 2mg/ml ja fluorescein 0,25mg/ml). Tee vihreää väriliuosta tarkalleen 4 ml. Käytä sekoitukseen Pasteur-pipettejä ja Falcon-putkea.
- 5) Säädä kolonnin korkeutta tarvittaessa niin, että kolonnin alle mahtuu seuraavaksi koeputkiteline ja koeputket.
- 6) Väriliuos (tasan 3 ml) pipetoidaan kolonnin yläosaan seinämää pitkin ja annetaan imeytyä kolonnin sisään. Läpituleva neste kerätään ensimmäiseen lasiseen koeputkeen (fraktio 1).
 - seuraa värin imeytymistä kolonniin
- 7) Kun edellinen neste-erä on imeytynyt kokonaan ja pisaroiden tippuminen ensimmäiseen koeputkeen on loppunut, pipetoi 2 ml Tris-HCl-puskuria kolonniin ja anna imeytyä kolonniin. Kerää läpi tuleva neste seuraavaan lasiputkeen (fraktio 2).
- 8) Toista vaihe 7) vielä useaan kertaan ja kerää neste joka kerta uuteen putkeen (fraktiot 3, 4, 5 jne). Seuraa värien erottumista. Pidä putket järjestyksessä, voit numeroida putket. Viimeisen fraktioputken tulee sisältää täysin kirkasta puskuria ilman yhtään väriä. Voit tarkistaa viimeisen putken sisältämän liuoksen värittömyyden tarkastelemalla putkea valkoista paperia tai muuta valkoista taustaa vasten.
- 9) Kokeen jälkeen tarkastele fraktioita mielellään valkoista paperia vasten ja vastaa sivulla 3 oleviin kysymyksiin.
- 10) Demon lopuksi: Jos mahdollista, leikka opettajan avustuksella kolonni saksilla auki ja tarkastele sisällä olevaa stationäärifaasia. Näetkö ja/tai tunnetko faasin hiekkamaisen rakenteen?
- 11) Siivous: Laita erotuskolonni sekä muoviset Pasteur-pipetit roskeen. Kaada loput väriliuoksesta viemäriin ja laita Falcon-putki roskeen. Kaada kolonnin säilytyspuskuri dekansta/Erlenmeyerista viemäriin, huuhtelee astia ja jätä työpöydälle. Jos sinulle jäi Tris-HCl-puskuria isompaan 50 ml Falcon-putkeen, jätä putki puskuineen myös pöydälle. Kaada fraktioliuokset lasiputkista viemäriin, huuhtelee putket ja aseta ne kuivumaan ylösalaisin koeputkitelineeseen pöydälle, jossa on käsipyyhepaperi telineen alla. Poista kaikki merkinnät lasiputkista. Jätä statiivi paikoilleen työpöydälle.

Kysymyksiä:

1. Missä fraktiossa (koeputken/putkien numero) kukin väri sijaitsee? Ovatko värit erottuneet selvästi toisistaan eri fraktioihin? Onko eri väristen fraktioiden (sininen ja keltainen) välissä kirkas fraktio?

2. Kun vertaillet molekyyliä painoja (g/mol), mikä on Blue dextranin ja fluoreseiinin (fluorescein) kokoero?

3. Kumpi värimolekyyli on kooltaan isompi? Mihin perustuu värien erottuminen kolonnissa? Selitä mekanismi. Toimiko värimolekyylien erottelu omassa työssäsi tämän mekanismin mukaan?

4. Erottuivatko värimolekyylit täysin toisistaan vai oliko joku fraktio väriltään vihertävä? Jos näin oli, mistä tämä voisi johtua? Pohdi lisäksi yleisesti: miten eri molekyylien erottumista voisi tehostaa kromatografiassa?