

Princip ionexové chromatografie a analýza aminokyselin

Teoretická část: vysvětlení principu ionexové (iontové) chromatografie, příprava vzorku pro analýzu aminokyselin (kyselá a alkalická hydrolyza), derivatizace

Praktická část: předvedení analýzy reálného vzorku s ohledem na obsah aminokyselin.

I. ÚVOD

1. Aminokyseliny

Aminokyselina je v chemii obecně jakákoliv molekula obsahující karboxylovou (-COOH) a aminovou(-NH₂) funkční skupinu. V biochemii se většinou tímto termínem rozumějí pouze alfa-aminokyseliny, tj. takové, ve kterých jsou obě skupiny navázány na stejném uhlíkovém atomu. V ještě užším smyslu (například v molekulární biologii) se tímto pojmem většinou rozumí biogenní alfa-L-aminokyseliny - 20 základních stavebních složek všech proteinů.

Až na nepatrné výjimky jsou všechny proteiny ve všech živých organismech sestaveny z pouhých 20 druhů aminokyselin. Posloupnost (sekvence) těchto aminokyselin určuje primární strukturu proteinu. Funkce proteinu závisí především na jeho terciární případně kvartérní struktuře, která je kromě sekvence aminokyselin dána mnoha dalšími faktory, např. okolním prostředím. Sekvence aminokyselin v proteinech je kódována genetickým kódem tripletů DNA.

1.1 Reaktivita

Nositelem reakcí je karboxylová a aminová skupina aminokyselin. Aminokyseliny mohou tvořit soli, díky karboxylové skupině probíhá esterifikace, aminová skupina umožňuje acetylaci.

Odstranění karboxylové skupiny se nazývá dekarboxylace, odstranění aminové skupiny pak deaminace. Důležitou reakcí během metabolismu aminokyselin je transaminace, přesun aminové skupiny z jedné molekuly na druhou.

Vznik peptidové vazby je reakce, při které reagují alfa-karboxylová skupina jedné aminokyseliny s alfa-aminovou skupinou druhé za odštěpení molekuly vody. Toto řetězení aminokyselin je principem spojování v peptidy a proteiny a je to nejdůležitější reakce aminokyselin.

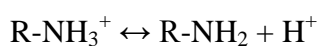
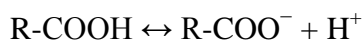
1.2 Rozpustnost

Aminokyseliny se snadno rozpouštějí v polárních rozpouštědlech (voda, ethanol), v nepolárních rozpouštědlech jsou nerozpustné.

1.3 Náboj

Každá aminokyselina obsahuje aspoň dvě kyselé skupiny, které jsou schopné disociace: -COOH a $-NH_3^+$ a tvoří konjugované zásady $-COO^-$ a $-NH_2$.

V roztoku jsou kyselina i její konjugovaná zásada v protonové rovnováze:



Jak se ustaví rovnováha, záleží na pH prostředí, tedy na koncentraci protonů v okolí. Karboxylová skupina je silnější kyselina a proton snadněji odštěpuje než přijímá.

Při nízkém pH, kdy je koncentrace vodíkových iontů v roztoku vysoká, obě dvě skupiny váží proton. Při stoupajícím pH se nejprve uvolní proton vázaný v karboxylové skupině, protože ta má menší disociační konstantu: při pH krve (7,4) nebo cytoplasmy (7,1) existuje karboxylová skupina pouze jako karboxylátový ion $R-COO^-$, zatímco aminoskupina je protonovaná kyselina $R-NH_3^+$. Vzniká tak amfiont, obojetný ion, který nese kladný i záporný náboj.

Pokud je pH vysoké, uvolní se proton i z aminoskupiny a obě dvě funkční skupiny se nachází ve stavu konjugované zásady.

1.4 Izelektrický bod

Izelektrický bod je taková hodnota pH, při které má daná aminokyselina nulový volný elektrický náboj - nachází se ve formě amfiontu, který se nepohybuje v elektrickém poli.

Izoelektrické pH u aminokyselin, které mají dvě disociovatelné skupiny, leží uprostřed hodnot pK na obou stranách izoiontového uspořádání:

Situace je složitější u aminokyselin, které kromě alfa-karboxylové a alfa-aminové skupiny obsahují i jiné funkční skupiny, například kyselina asparagová, lysin nebo tyrosin.

1.5 Důkaz aminokyselin – „Derivatizace“

Aminokyseliny se prokazují reakcí s ninhydrinem nebo fluorescaminem. Ninhydrin dekarboxyluje aminokyseliny na oxid uhličitý, amoniak a aldehyd, redukovaný ninhydrin pak reaguje se vzniklým amoniakem za vzniku modrého komplexu. Tato reakce je základem kvantitativního stanovení aminokyselin. Fluorescamin je citlivější činidlo, které umožňuje odhalit i nanogramová množství aminokyselin.

1.6 Aminokyseliny v živých organismech

Aminokyseliny jsou součástí proteinů a peptidů, tedy strukturních bílkovin, enzymů i mnoha hormonů. To ale není jejich jediná funkce, jsou potřeba jako dárce uhlíkových řetězců k syntéze porfyrinů, purinů nebo pyrimidinů, přímo se účastní syntézy močoviny. Jejich deriváty, biogenní aminy, slouží kromě jiného jako neurotransmitéry při nervovém přenosu (dopamin, noradrenalin aj.) nebo jako látky, které ovlivňují růst buněk (spermin, spermidin) Rozkladem některých aminokyselin v odumřelých tělech organismů vznikají tzv. mrtvolné jedy - páchnoucí látky putrescin a kadaverin.

Nadbytečné aminokyseliny, které nejsou hned zabudovány do proteinů, nejsou skladovány, ale jsou zbaveny dusíku a rozloženy. Při svém katabolismu poskytují uhlíkové kostry, které jsou dále zužitkovávány. Podle toho, do které metabolické dráhy vstupují a jaký může být jejich konečný produkt, se aminokyseliny dělí na aminokyseliny glykogenní, ketogenní a takové, které jsou glykogenní i ketogenní. Glykogenní aminokyseliny mohou být přeměněny na glykogen, ketogenní pak na tuk.

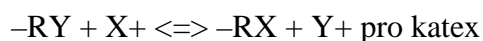
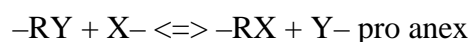
V organismu neustále probíhá obnova proteinů a tedy i obměna jednotlivých aminokyselin. Aminokyseliny jsou syntetizovány de novo nebo přijímány s potravou; vyšší

živočichové ztratili schopnost tvořit některé aminokyseliny a jsou závislí na jejich přísunu zvenčí - tyto esenciální aminokyseliny jsou nutnou součástí stravy. Rostliny a bakterie mají stále schopnost tvořit tyto aminokyseliny, protože u nich nacházíme metabolické dráhy, které živočichům chybějí - například šikimátová cesta k syntéze rozvětvených aminokyselin.

Poruchy metabolismu aminokyselin jsou příčinou některých vrozených chorob, jako je fenylketonurie, tyrosinosa nebo nemoc javorového sirupu.

2. Ionexová chromatografie

Ionexová chromatografie (chromatografie na iontoměničích) je metoda chromatografie, kde stacionární fáze je ionex. Při tomto způsobu chromatografie zachycuje sorbent určitý typ iontů výměnou za jiný iont. Podstatou je chemická reakce:



kde Y^- a Y^+ jsou vyměnitelné ionty, které jsou vázány na funkční skupiny ionexu. Při iontové výměně difundují sorbované ionty z okolního roztoku do ionexu, vytěsňují a vyměňují ekvivalentní množství jiných iontů vázaných na jiných výměnných skupinách. Tento pochod je obousměrný, takže v určitém okamžiku dochází k ustavení rovnováhy. V ionexové chromatografii se však nikdy nevyužívá plná výměnná kapacita ionexu, o celkové rychlosti výměny rozhoduje především difúze kapalinovým filmem a u velmi zředěných roztoků také difúze ionexem.

Při technice iontové výměny jde o separaci iontů, proto je vždy používána vodná mobilní fáze. Stacionární fáze (iontoměnič, ionex) je zpravidla makromolekulární matrice obsahující kyselou nebo bazickou funkční skupinu. Katexy jsou iontoměniče s kyselou funkční skupinou (sulfo-kyselina, karboxylová kyselina) nesoucí záporný náboj, anex obsahuje bazickou funkční skupinu (aminoskupinu) a je nositelem kladného náboje. Ion obsažený v ionexu bývá vyměněn za ion obsažený v mobilní fázi nebo ve vzorku a na principu soutěžení ionexu o tyto ionty dochází k separaci.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podobně probíhá také ligandová výměna, kdy na iontoměniči, obvykle katexu, je zachycen iontovou výměnou vhodný kov, na takto upravenou kolonu se přivádí mobilní fáze obsahující látku schopnou vytvářet s vázaným kovem komplex (ligand). K separaci na jednotlivé složky dochází na základě vzájemné relace stabilit vytvořených komplexů dělených sloučenin a vázaného kovu. Iontoměničová technika se využívá jak při přípravě vzorků pro chromatografické analýzy (SPE), tak ve vysoce účinné kapalinové chromatografii zřídka v plošném uspořádání kapalinové chromatografie.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3. Chemikálie

Podle návodu od vedoucího cvičení budou připraveny pufry pro analýzu aminokyselin do 250 ml odměrných baněk.

Dále budou připraveny zásobní roztoky aminokyseliny lysinu o dvou koncentracích 1 a 10 μM do mikrozkušavek o objemu 1 ml.

4. Příprava vzorku (kyselá hydrolýza)

Reálný vzorek rostliny (0.3 g svěží hmotnosti) se zváží a následně nadrtí na co nejmenší kousky. Nadrcené kousky rostliny je nutné kvantitativně převést do speciální plastové nádoby z plastu odolného vůči agresivnímu prostředí. K takto připravenému vzorku se přidá 6 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Nádobka se uzavře a nechá se po dobu 24 hodin hydrolyzovat při 120 °C v termobločku.

5. Aminoanalyzátor

Připravené pufry se zapojí na příslušná místa v přístroji a celý systém se pod dohledem obsluhy odvzdušní. Následně bude přístroj naprogramován a připravené vzorky lysinu o dvou koncentracích budou analyzovány.