



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

201 851

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlásené 21 04 78

(21) PV 2573 - 78

(51) Int. Cl.³ C 07 C 175/00
C 07 D 487/22

(40) Zverejnené 29 02 80

(45) Vydané 24 02 83

(75)

Autor vynálezu HORVATOVIČOVÁ ALŽBETA PhDr. RNDr.CSc., BRATISLAVA

HOLÚBKOVÁ BOŽENA Ing., BRATISLAVA

ŠEPITKA ANDREJ Ing., BRATISLAVA

(54) Spôsob delenia asimilačných farbív

1

Vynález sa týka spôsobu izolácie a identifikácie asimilačných farbív izolovaných z rastlinného materiálu.

Doterajšie spôsoby izolácie a delenia asimilačných pigmentov, ako sú chlorofyly a karotenoidové farbivá, boli založené na ich extrakcii acetónom. Po pridaní dietyléteru a vody nastane rozdelenie fáz, pričom karotenoidy prejdú do etyléteru a chlorofyly ostávajú vo fáze acetónu a vody.

Ďalšie delenie chlorofylov sa vykoná delením stĺpcovou chromatografiou, pričom ako adsorpčný materiál sa najčastejšie používa celulóza, škrob a sacharóza.

Karotenoidné farbivá sa taktiež najčastejšie delia stĺpcovou chromatografiou, pričom ako adsorpčný materiál sa používa škrob, sacharóza, uhličitán vápenatý, oxid horečnatý, oxid vápenatý a iné. Po nanosení vzorky karotenoidov na stĺpec kolóny sa kolóna vyvíja polárnejším rozpúšťadlom tak dlho, pokiaľ nedôjde k oddeleniu zón jednotlivých karotenoidov. Potom sa stĺpec sorbentu vyberie z kolóny, rozdelí podľa zón a jednotlivé zóny farbív sa eluujú polárnym rozpúšťadlom a ďalej identifikujú.

Nedostatkom doterajších postupov na delenie rastlinných asimilačných farbív je to, že na delenie chlorofylov a karotenoidných farbív bolo potrebné voliť samostatné postupy delenia a na delenie karotenoidov sa používali nad sebou dva až tri adsorpčné materiály.

Predložená metóda rieši tento problém, podstatne zjednodušuje rozdelenie asimilačných farbív za použitia jednej kolóny naplnenej polyamidovým práškom vhodnej zrnitosti a za použitia jedného vyvíjacieho postupu.

Príklad: Rastlinný materiál napr. ďatelina v množstve približne 2 g sa extrahuje postupne do 20 ml bezvodého acetónu do úplného vyextrahovania farbív. Po pridaní n-hexánu v množstve 5 až 10 ml a nasýteného roztoku kuchynskej soli v množstve 5 až 10 ml sa prevedú farbivá do n-hexánu. Zvyšky acetónu sa z n-hexánovej fázy vymyjú destilovanou vodou. V prípade, že v n-hexánovej fáze zostanú stopy vo forme emulzie, tieto sa odstránia odstredovaním.

Na prípravu stĺpcovej kolóny sa použije polyamidový prášok, napríklad typu "Miramid", z ktorého sa odstránia čiastočky menšieho priemeru než 0,08 mm. Z takto upraveného polyamidového prášku bez predchádzajúcej aktivácie sa pripraví suspenzia v n-hexáne alebo petroléteri, ktorá sa naleje do trubice o priemere 1 cm až vrstva polyamidového prášku v kolóne dosahuje ca 10 cm. Na takto pripravenú kolónu sa naniesie 2 ml extraktu asimilačných pigmentov, pričom je vhodná koncentrácia extraktu ca 0,5 mg chlorofylov v 1 ml extraktu.

Polyamidový prášok má tú výhodu, že je interný voči deleniu materiálom a v stĺpcovom prevedení chromatografie sa zabráňuje oxidácii oxilabilných látok vzdušným kyslíkom.

Po vsiaknutí vzorky extraktu do polyamidového stĺpca pridávame na stĺpec také množstvo n-hexánu, čo obyčajne predstavuje ca 2 ml, aby sa medzi zónou β -karotinu, oddelovanou ako prvou a ostatnými naslednými farbivami, ostávajúcimi na štarte kolóny, vytvorila medzifáza. Napokon β -karotin vytesníme zo stĺpca petroléterom.

Xantofyly sa oddeľujú zo štartu kolóny zmesou petroléteru a benzénu v rôznych pomeroch so stále vzrastajúcim obsahom benzénu, napríklad 4:1, 3:2 a 1:1. Posledné zvyšky xantofylov sa vytesňujú zmesou petroléteru a benzénu v pomere 1:1.

Pri pomere petroléter - benzén 1:1 sa začína eluovať už aj chlorofyl a, ktorý sa ďalej oddeľuje a eluuje pridávaním benzénu.

Ďalší použitý rozpúšťadlový systém benzén-chloroform v pomere 1:1 vytesní zmes a a b a zvyšok chlorofylu b sa vymyje metanolom.

Týmto spôsobom delenia sa dostane chlorofyl a chemicky čistý, frakcia chlorofylu b obsahuje stopy chlorofylu a.

Na urýchlenie delenia, počnúc stupňom druhým, tj. po vyeluovaní β -karotinu, možno použiť za účelom urýchlenia delenia tlakový balónik, ktorý sa nasadzuje na hrdlo sklenej trubičky. Čas delenia jednotlivých frakcií farbív sa týmto skráti na tretinu a ušetrí sa aj spotreba rozpúšťadiel.

V uvedenej tabuľke uvádzame experimentálny záznam delenia asimilačných farbív, sled použitých rozpúšťadiel, ich množstvo a trvanie delenia s použitím balónika a bez neho.

Stupeň delenia	farbivo	rozpúšťadlo	spotreba rozpúšťadla a čas trvania			
			s balónikom		bez balónika	
			ml	min	ml	min
1	karotín	hexán	2	3	7	10
2		petroléter	5		15	
3	luteín, violaxantín violaxantín, neoxantín neoxantín, chlorofyl <u>a</u>	petroléter-benzén 4:1	10		20	
		"- 3:2	10	7	25	25
		"- 1:1	10		20	
4	chlorofyl <u>a</u>	benzén	10	3	15	10
5	chlorofyl <u>a</u> + <u>b</u>	benzén - chloroform 1:1	5	3	5	5
6	chlorofyl <u>b</u>	metanol	10	4	15	10
		suma rozpúšťadiel v ml	62	-	122	-
		čas trvania v minútach	-	20	-	60

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob delenia asimilačných farbív vyznačujúci sa tým, že sa rastlinný materiál extrahuje n-hexánom, extrakt sa delí stĺpcovou chromatografiou na polyamidovom prášku zbavenom menšej frakcie než je priemer 0,08 mm za použitia eluačného činidla petroléteru, pričom na rozdelenie xantofylov sa použije po sebe zmes petroléteru a benzénu v pomeroch 4:1, 3:2 a 1:1 a v ďalšom na vytesnenie chlorofylov a a b sa použije zmes benzénu a chloroformu v pomere 1:1 a na konci zbytok chlorofylu b sa zo stĺpca vymyje metanolom.