

Chromatografia

Rozdział aminokwasów na żelu kwasu krzemionkowego

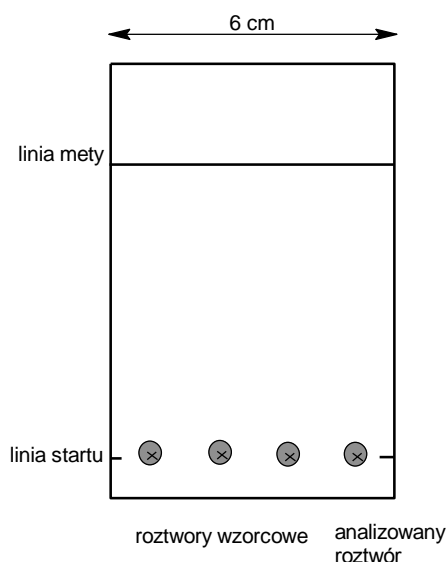
Aparatura i odczynniki: komory chromatograficzne, mikroaplikator, rozpylacz, płytki, suszarka

Roztwory wzorcowe aminokwasów: 0,02% metanolowe roztwory alaniny, argininy, kwasu glutaminowego, glicyny, leucyny, lizyny, metioniny, proliny, seryny

Układ rozwijający: metanol – woda (6:4)

Wywoływacz: 0,4% roztwór ninhydryny w n-butanolu z dodatkiem lodowatego kwasu octowego

Wykonanie: Na przygotowanych płytkach należy zaznaczyć miejsce odpowiadające linii startu w odległości 2 cm od dolnej krawędzi płytki. Od linii startu należy odmierzyć 10 cm i zaznaczyć ołówkiem linię mety. Następnie nanosi się na punktach startowych roztwory aminokwasów. Na pierwszych trzech punktach – roztwory wzorcowe, wskazane przez prowadzącego ćwiczenie, a na czwartym - analizowaną mieszaninę.



Płytki po naniesieniu roztworów suszy się. Następnie wkłada do komór chromatograficznych zawierający odpowiedni układ rozpuszczalników (po wcześniejszym kondycjonowaniu). Dolna krawędź płytki powinna być zanurzona w fazie ruchomej na głębokość 1-1,5 cm. Komorę zamyka się i rozwija chromatogram do osiągnięcia przez czoło rozpuszczalnika linii

metry. Następnie wyjmujemy się płytki z komór, suszy, a później spryskuje powierzchnię płytek roztworem wywoływacza (pod dygestorium). Płytki suszy się w strumieniu ciepłego powietrza, najpierw delikatnie a potem intensywnie. Wówczas ujawniają się aminokwasy w postaci fioletowych plamek (prolina barwi się na żółto). Plamki aminokwasów należy obrysować i zmierzyć odległość od punktu startu do środka plamki (w cm). Wartość Rf wynosi wtedy 1/10 odległości zmierzonej w cm.

Wartości otrzymanych współczynników należy zestawić w tabeli. Na podstawie tych wartości należy zidentyfikować analizowaną mieszaninę. Do sprawozdania należy dołączyć chromatogram (kserokopię). Należy zapoznać się ze wzorami chemicznymi i właściwościami chromatografowanych aminokwasów i krótko uzasadnić różnice w migracji aminokwasów.

Podstawą oznaczania aminokwasów jest reakcja między ninhydryną a aminokwasami. Podczas reakcji nadmiaru ninhydryny z ninhydryną zredukowaną i amoniakiem powstaje barwny produkt kondensacji tzw. fiolet Ruhemanna.

