

Úloha 6: Stanovení aminokyselin pomocí papírové chromatografie (PC)

Princip:

Papírová chromatografie patří mezi separační metody, kdy k separaci aminokyselin dochází na základě rozdílné afinity mezi stacionární fází (papírem) a mobilní fází (nejčastěji směs rozpouštědel). Po separaci je pro každou aminokyselinu charakteristický retenční faktor R_f , což je poměr mezi vzdáleností o startu, kterou urazila aminokyselina a vzdáleností čela rozpouštědla.

Postup:

Na chromatografický papír se vyznačí místo „start“ (2 cm od spodního okraje), kde se budou nanášet jednotlivé aminokyseliny a vzorek. Postupně se nanese 6 aminokyselin a jeden neznámý vzorek, který je tvořen směsí dvou aminokyselin. Aminokyseliny musí být od sebe dostatečně vzdáleny, aby nedošlo k jejich smísení během vyvíjení v chromatografické komoře. Do chromatografické komory se nalije mobilní fáze (směs acetonitrilu a 0,1 M octanu amonného 3:2), tak aby výška hladiny byla cca 0,5 - 1 cm ode dna komory. Opatrně se vloží chromatografický papír a komora se uzavře víkem. Po 45-ti minutách nebo v okamžiku kdy mobilní fáze bude cca 2 cm od horního okraje chromatografického papíru, se vyvíjení ukončí a **ihned** se označí čelo mobilní fáze. Chromatografický papír se vysuší fénem a následně postříká ethanolovým roztokem ninhydrinu. Po opětovném vysušení se chromatogram vloží do sušárny vyhřáté na 110 °C po dobu 10 min. Po uplynutí této doby jsou na chromatogramu viditelné skvrny aminokyselin.

Vyhodnocení chromatogramu:

U všech vzniklých skvrn aminokyselin a neznámého vzorku se označí středy skvrn. Změří se vzdálenost mezi středem skvrny a startem (**a**) a vzdálenost mezi čelem mobilní fáze a startem (**b**). Vypočítá se retenční faktor R_f podle vzorce níže a identifikují se obě aminokyseliny v neznámém vzorku.

$$R_f = \frac{a}{b}$$

Laboratorní potřeby:

mikropipety 10 a 50 μ l
chromatografický papír Whatman 3MM
chromatografická komora
tužka
rozprašovač
pravítko
fén

Chemikálie:

ninhydrin 0,2% ethanolový roztok, acetonitril, octan amonný 0,1 M, glycin, cystein, kys. asparagová, asparagin, tyrosin, leucin, izoleucin, alanin