

Chromatografia cukrów

Cukry, podobnie jak i inne związki organiczne, np. aminokwasy, dają się rozdzielić również metodami chromatograficznymi, w tym także na drodze chromatografii bibułowej. Identyfikację plam cukrowych na chromatogramach przeprowadzić można przez porównanie z odpowiednimi standardami lub przez wykonanie barwnych reakcji na poszczególne grupy cukrów. Ponieważ rozwijanie chromatogramów metodą wstępującą lub zstępującą wymaga kilku godzin, studenci wykonywać będą chromatografię krążkową, która skraca ten czas do około dwóch godzin.

Wykonanie

Z otrzymanego kwadratowego kawałka bibuły chromatograficznej (Whatman I) wycina się krążek o średnicy dostosowanej do wielkości szalki Petriego (rysunek). Obrys krążka należy wykonać posługując się ołówkiem i cyrklem. Na krążku należy następnie zaznaczyć (również ołówkiem) mały okrąg o promieniu 1 cm i podzielić obszar krążka na sześć sektorów (jak na rysunku).

Odpowiednie roztwory cukrów nanosi się w punktach startu przy pomocy kapilary. Na pięciu sektorach będą to 5% roztwory odpowiednich standardów, a na szóstym — badana próba. Plamki powinny być możliwie małe – w każdym sektorze należy nanieść jedną niewielką kroplę.

Po wysuszeniu krążka w jego środku należy zrobić nożyczką otwór, przez który przeciąga się knot zrobiony z kawałka waty. W dolnej szalce Petriego umieszcza się eluent (ok. 100 mL), składający się z *n*-butanolu, acetonu, wody i stężonego roztworu amoniaku w stosunku 30:50:20:3. Następnie na szalce kładzie się krążek tak, by knot (ale nie krążek) był zanurzony w eluencie, po czym przykrywa się szalkę i pozostawia na około dwie godziny. Po tym czasie eluent zaczyna wychodzić poza obręb szalki.

Chromatogram należy wyciągnąć i wysuszyć, po uprzednim usunięciu knota. Następnie krążek przeciąga się przez roztwór azotanu srebra w acetonie (0.1 mL nasyconego wodnego roztworu AgNO_3 w 20 mL acetonu) i ponownie suszy. Wyschnięty chromatogram przeciąga się przez roztwór wodorotlenku sodowego w alkoholu (1 mL 10 M wodnego NaOH w 20 mL etanolu) do chwili pojawienia się plam cukrowych, a następnie przez rozcieńczony roztwór tiosiarczanu sodowego w celu odbarwienia tła i lepszego uwidocznienia plam.

Pod wpływem tego wywoływacza aldopentozy dają prawie natychmiast mocne ciemnobrązowe plamy. Ketoheksozy natomiast dają taką samą plamę, jednak z pewnym opóźnieniem. Słabe plamy dają także dwucukry redukcyjne. Dwucukry nieredukcyjne nie barwią się w ogóle. Jeżeli badana próba nie zabarwi się lub daje jedynie słabą plamę, można wykonać następujące czynności:

Do około 0.5 mL badanej próby należy dodać 1–2 krople stężonego roztworu kwasu solnego i całość zagotować do wrzenia. Następnie przy pomocy kapilary nanieść na nowy krążek bibuły kroplę zhydrolizowanego roztworu i rozwinąć chromatogram zgodnie z powyższą instrukcją.

Po wywołaniu chromatogramu uzyska się albo jedną plamę (jeżeli dwucukier złożony był z jednego rodzaju cukru prostego), albo dwie plamy (gdy dwucukier składa się z dwóch różnych rodzajów cukrów prostych).

Materiały i sprzęt:

- bibuła chromatograficzna
- ołówek, cyrkiel i nożyczki
- szalka Petriego, kapilary, wata
- wzorcowe roztwory cukrów
- eluent
- roztwory AgNO_3 i NaOH
- roztwór $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

