

Chromatografia cienkowarstwowa aminokwasów (TLC)

Zróżnicowana budowa aminokwasów pozwala na ich rozdział metodami chromatograficznymi (hydrofobowość, pKa, dodatkowe grupy funkcyjne). Do wykrywania i identyfikacji aminokwasów służy wiele reakcji barwnych, w tym reakcja ninhydrynowa, wykrywająca do 10^{-9} mola aminokwasu (ostrożnie, ninhydryna pozostawia niezmywalne fioletowe plamy na skórze).

Wykonanie ćwiczenia:

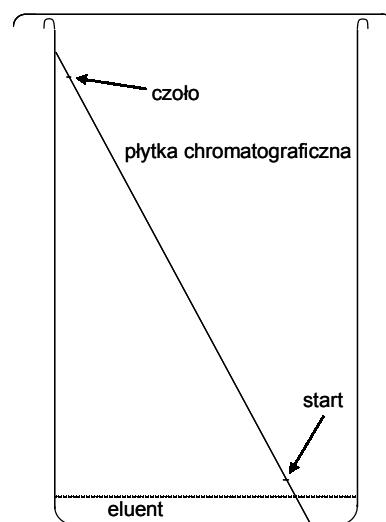
Na płytce do chromatografii cienkowarstwowej (płytki aluminiowa o wymiarach 90x40 mm lub szersza, pokryta żelem krzemionkowym,) należy zaznaczyć delikatnie ołówkiem linię startu (ok. 8 mm od dolnej krawędzi płytki), starając się nie uszkodzić powierzchni żelu. Należy unikać dotykania powierzchni płytki palcami. Na linii startu zaznacza się punkty nanoszenia roztworów w odstępach ok. 1 cm. (pięć torów dla roztworów wzorcowych i jeden dla analizowanej próbki). Jeżeli potrzebne są dwie płytki, należy przygotować tor dla analizowanej próbki na obu płytkach. Na przygotowaną płytkę nanosi się kapilarkami roztwory wzorcowe, tworząc plamki o średnicy nie większej niż 3 mm. Prowadzący ćwiczenia nanosi analizowaną próbkę.



Materiały i sprzęt:

- płytka do chromatografii TLC
- linijka i ołówek
- wzorce aminokwasów i kapilarki
- komora chromatograficzna
- eluent (1-butanol-kwas octowy-woda 4:1:1)
- wywoływacz (ninhydryna w acetonie)

Do komory chromatograficznej wlewa się eluent tworząc warstwę o głębokości ok. 5 mm. Płytkę umieszcza się pionowo w komorze, zwracając uwagę, by poziom cieczy nie sięgał do linii startu. Jeżeli w tej samej komorze mają być rozwijane dwie płytki, umieszcza się je tyłem do siebie, zetknięte tylko górnymi krawędziami. Boczne krawędzie płytek nie powinny dotykać ścianek komory. Komorę nakrywa się szalką i czeka na rozwinięcie chromatogramu (ok. 40-60 minut). Komora powinna stać w spokojnym miejscu, w temperaturze pokojowej.



Płytki wyjmuje się z komory, gdy poziom eluentu znajdzie się ok. 5 mm od górnej krawędzi płytki, zaznacza ołówkiem linię czoła rozpuszczalnika i suszy płytki suszarką (pod wyciągiem). Wywołanie chromatogramu polega na spryskaniu płytek roztworem ninhydryny (ostrożnie, pozostawia niezmywalne fioletowe plamy na skórze) i wysuszeniu w strumieniu gorącego powietrza. Po chwili pojawiają się kolorowe plamki, należy zaznaczyć ich położenie i opisać kolor. Następnie płytki zanurza się w roztworze utrwalacza (roztwór $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) i suszy, obserwując zmiany barwy plamek.

Po zmierzeniu odległości start-czoło i start-środek plamki należy obliczyć współczynniki R_f wszystkich analizowanych aminokwasów. Na podstawie współczynników R_f oraz zabarwienia plamek należy zidentyfikować nieznaną aminokwas.