



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Olomoucký kraj

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

PROVEĎTE KVALITATIVNÍ STANOVENÍ AMINOKYSELIN POMOCÍ TLC CHROMATOGRAFIE

Pomůcky:

dělicí nálevka, kádinka 250ml vysoká, hodinové sklo nebo Petriho miska, tužka, pravítko, lahvička s rozprašovačem

Chemikálie:

n-butanol, kyselina octová koncentrovaná, destilovaná voda, ninhydrin, aceton, vodné roztoky aminokyselin

Pracovní postup:

1. Připravte si vyvíjecí směs: v dělicí nálevce si dokonale promíchejte n-butanol, kyselinu octovou a vodu v poměru 6:1:1(v/v/v) a nechejte 24 hodin stát.
2. Připravte si chromatografickou komoru - vyšší kádinku a hodinové sklo nebo Petriho misku na zakrytí kádinky.
Vyvíjecí směs nalijte na dno kádinky do výše asi 1cm a komoru nechte sytit parami rozpouštědla.
3. Připravte si TLC destičku vhodného formátu (podle výšky kádinky) a na jednom konci vyznačte opatrně tužkou linii startu asi 15 – 20mm od okraje destičky, aby start nebyl ponořen ve vyvíjecí směsi. Na linii startu vyznačte body pro nanášení vzorků ve vzdálenosti 20 – 30 mm od sebe.
4. Ze standardních vodných roztoků aminokyselin připravte různé směsi.
5. Standardní roztoky aminokyselin a jejich směsi naneste opatrně kapilárou nebo mikropipetou v množství 10 μ l na vyznačená místa na linii startu. Kruhové body nanesených vzorků by neměly přesáhnout průměr 5 – 7mm. Destičku s nanesenými vzorky vysušte.
6. TLC destičku opatrně postavte do kádinky tak, aby linie startu nebyla ponořena ve vyvíjecí směsi. Kádinku zakryjte a nechte vyvíjet (viz obrázek).
7. Když čelo rozpouštědla dosáhne 10 – 20mm od horního okraje destičky, destičku vyjměte a tužkou vyznačte čelo mobilní fáze. Chromatogram vysušte.
8. Připravte si roztok ninhydrinu 4g/l v acetonu do lahvičky s rozprašovačem a tímto roztokem postříkejte v digestoři chromatogram. Poté jej usušte v sušárně při 105°C.
9. Pravítkem odměřte vzdálenost středu jednotlivých skvrn od startu a vzdálenost start-čelo. Vypočítejte R_f vzorků jednotlivých aminokyselin a určete jednotlivé aminokyseliny ve vzorcích připravených směsí.

Poznámky, upozornění z hlediska BOZP:

Ninhydrin je toxická látka.

Kyselina octová koncentrovaná je žíravina.



Obr.: Chromatografické komory

Otázky a úkoly:

1. Zhodnoťte, která ze zkoumaných aminokyselin je nejvíce rozpustná v použitých rozpouštědlech.
2. Zhodnoťte, která ze zkoumaných aminokyselin je nejméně rozpustná v použitých rozpouštědlech.