

Aminosavak azonosítása vékonyréteg-kromatográfián

A vizsgálat elve: a rétegre cseppentett aminosavak a futtatószerrel előrehaladva, eltérő adszorpciójuk miatt, egymástól elválnak. Színessé tételük után az aminosavakat az azonosan futtatott standard aminosav foltokhoz hasonlítva az R_f értékek alapján határozzuk meg.

Eszközök, vegyszerek. 0,1m%-os aminosav oldatok (6db), eluens (i-propanol, etanol, víz 8:1:1 arányú elegye), ninhidrin 0,5%-os alkoholos oldata (vegyifülke alatt), 20x20cm-es vékonyréteglap, előkészített minta (kiadása az aminosav standardokból), plexi szélező sablon, vonalzó, sulifix ragasztó, pipetta (2-20 μ l-es), hajszárító, Chrompress 10-es típusú futtatószekrény.

A vizsgálat menete

A szélezősablon és a favonalzó segítségével a lap három oldaláról lekaparjuk a réteget. Vályút karcolunk a rétegre, ennek távolsága a réteg aljától kb. 2-3cm-re legyen. A lekapart felületeket egyenletesen bekenjük a ragasztóval úgy, hogy kevés ragasztó kerüljön a rétegre is. A vályú felett 0,5-1 cm-re ceruzával vékonyan jelöljük ki a startvonalat és egymástól egyenlő távolságokra a nyolc mintahelyet. Az aminosav oldatokat felcímkézett mintatartókkal együtt az ismeretlen kiadásához beadjuk.

A standardokból és a mintából összesen 8 helyre cseppentünk 1-2 μ l-t:

| | | | | | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| 1. hely A,B | 2. hely B,C | 3. hely C,D | 4. hely D,E | 5. hely E,F | 6. hely F,A | 7. hely ismeretlen | 8. hely ismeretlen |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|-----------------------|

A,B,C...stb. jelölések az aminosavakat jelentik (az aminosav sorrendet jegyezze fel!). A felcseppentést több részletben, állandó beszárítással (hajszárító) végezzük úgy, hogy közben ne sértsük fel a réteget, ill. a folt nagysága a lehető legkisebb legyen. A réteget a futtatószekrény szűrőpapír-sablonjára helyezük úgy, hogy az alsó ragasztás és a vályú közé kerüljön a kereszt (futtatószer beömlési helye). Felhelyezzük a védőfóliát. A szekrény fedelét óvatosan lezárjuk, a leszorító pántokat átellenesen megszorítjuk. A jobb oldali párnapumpával a fedélyomást 10 bárta növeljük, de közben a pumpát tilos magára hagyni! Elindítjuk az eluenspumpát. A futtatást kb. a réteg 4/5 részéig folytatjuk. Leállítjuk az eluenspumpát, óvatosan nyitjuk a fedélen található hengeres szelepet, a párnából leengedjük a vizet. Nyitjuk a fedelet, és azonnal eltávolítjuk a fedélhez tapadt réteget. A réteget működő vegyifülke alatt szárítjuk, függőlegesre állítva, ninhidrin oldatával lepermetezzük. Az előhívott réteglapot szkenneljük, kinyomtatjuk (tanári segítség!), meghatározzuk az R_f értékeket. Megállapítjuk a minta aminosav-összetételét.

Beadandó végeredmény: az aminosavak R_f értékei, a minta aminosav-összetétele.