

Laboratorní práce

Chromatografie

I. Dělení směsi aminokyselin chromatografií na tenké vrstvě

Pomůcky a chemikálie

mobilní fáze ethanol-voda (7:3), 2% roztoky aminokyselin (his, gly, glu) ve směsi voda: ethanol (1:2), neznámá aminokyselina, 0,2% ninhydrin v ethanolu, chromatografická komůrka, rozprašovač aerosolu, Silufol, špičky k nanášení vzorků, fén, pravítko, tužka, sušárna

Chromatografií uskutečníme v provedení na tenké vrstvě na hliníkové folii zvané Silufol (5 x 15 cm). jedná se o chromatografií adsorpční.

Na Silufolu vyznačíme jemně slabou čáru tužkou 2,5 cm od okraje (start). Naneseme vzorky známých aminokyselin a jedné neznámé. Vzorky aminokyselin nanášíme žlutou špičkou (na jedno místo 2-3 kapky, skvrnu po nanesení každé kapky vysušíme fénem). Skvrny vzorků nesmí být v průměru větší než 3-5 mm.

Folii vložíme do chromatografické komůrky s rozdělovací směsí (mobilní fáze) tak, aby mobilní fáze vstupovala na folii u startu. Čelo mobilní fáze se asi po 45 minutách dostane 2 cm od konce folie.

Poté folii vyjmeme, vysušíme na vzduchu nebo opatrně fénem, postříkáme aerosolem vyvíjecího činidla (0,2% ninhydrinu v ethanolu) a zahřejeme v sušárně na 110°C. (vše v digestoři)

Vyhodnocení výsledků zapíšeme do tabulky:

Do tabulky zapíšeme hodnoty R_f standardních aminokyselin. U každé z nich změříme délku dráhy skvrny od startu (h) a pro všechny délku dráhy mobilní fáze (start-čelo - H). Hodnota R_f je bezrozměrný podíl dráhy skvrny k dráze mobilní fáze. Vypočteme hodnoty R_f neznámé aminokyseliny. Zaznamenáme barvu skvrn.

Vysvětlení zkratk aminokyselin: his = histidin, gly = glycin, glu = kyselina glutamová

AMK	h (skvrny)	H	R_f	Barva skvrny
1.				
2.				
3.				
X				

Úkol č. 1.: porovnejte hodnoty R_f

Úkol č. 2.: určete aminokyselinu X

II. Stanovení lipofilních listových barviv a jejich rozdělení adsorpční chromatografií

Adsorpční chromatografie patří k nejstarším a nejrozšířenějším chromatografickým metodám. Pevný adsorbent je obtékán vhodným rozpouštědlem, které unáší analyzovanou směs, na povrchu adsorbentu dochází k dělení. Nejčastějšími užívanými adsorbenty jsou látky pórovité struktury. Podle povahy se dělí na polární (silikagel, oxid hlinitý) a nepolární (aktivní uhlí). Podle způsobů provedení rozlišujeme sloupcovou chromatografií a tenkovrstevnou chromatografií.

V listech zelených rostlin se vyskytuje větší počet lipofilních barviv, jejichž charakteristickou vlastností je rozpustnost v tučných a tukových rozpouštědlech. Pro fotosyntézu mají rozhodující význam chlorofyly *a* a *b* a karotenoidy. Jsou to látky citlivé vůči vzdušnému kyslíku a na světlo. Rychlé rozdělení listových barviv lze provést chromatografií na vrstvě silikagelu. Využívají se komerčně dodávané desky Silufol.

Pomůcky a chemikálie

mořský písek, aceton, směs benzín: isopropanol: voda (100 : 10 : 0,25), technický benzín zmrazené listy špenátu, mletá sladká paprika, malá třecí miska s tloučkem, filtrační papír, žluté špičky k nanášení vzorků, silufol

Pracovní postup

2 g listů špenátu rozetřeme v třecí misce s malým množstvím mořského písku a několika ml acetonu. Směs zfiltrujeme přes papírový filtr namočený acetonem. Extrakt odpaříme do sucha a znovu rozpustíme v několika kapkách acetonu. 5 g červené papriky rozetřeme v třecí misce s 20 ml technického benzínu, směs zfiltrujeme přes papírový filtr, přelijeme na odpařovací misku a odpaříme dosucha. Odparek rozpustíme v 1 ml benzínu. (Přípravu extraktů provede laborantka, studenti dostanou hotové zahuštěné extrakty). Takto zahuštěné extrakty naneseme na startovní čáru asi 2 cm od okraje v podobě teček, ve dvou až třech vrstvách. Folii vložíme do vyvíjecí nádoby (kádinky, přikryté hodinovým sklem) s vyvíjecí soustavou benzín: isopropanol: voda (100 : 10 : 0,25). Jakmile čelo soustavy dosáhne okraje folie, folii vyjmeme a obyčejnou tužkou obtáhneme okraje zóny barviv a také si poznačíme konkrétní typ barvy. Pokud máte pastelky pokuste se zakreslit. Bude k dispozici také digitální fotoaparát, takže nejzdařilejší extrakty můžeme fotografovat (vezměte flashdisky).

Úkol č. 3.: Co znamená chromatografie? O jakou metodu se jedná

Úkol č. 4.: Vyhledejte, co znamená pojem aminokyselina a jaký je jejich význam?

Úkol č. 5.: Co znamená 2% roztok AMK ve vodě? Jak připravíme 450 g 2% roztoku AMK?

Úkol č. 6.: Vyhledejte a zapište, co znamená chemicky fotosyntéza.

Úkol č. 7.: Vysvětlete pojem lipofilní barvivo.