

TÉMA	<b>BIELKOVINY</b>
<b>Úloha 8:</b>	<b><i>Kvalitatívna analýza aminokyselín papierovou chromatografiou</i></b>
<b>Princíp:</b>	<i>Chromatografia patrí medzi separačné postupy, kde sa na delenie používa systém dvoch fáz – stacionárna a mobilná. Mobilnou fázou sa zložky delenej zmesi postupne vymývajú (eluujú) zo stacionárnej fázy na základe svojich schopností rozdeliť sa medzi zložky použitej sústavy.</i>
<b>Reagencie:</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. štandardné 0,1 % roztoky aminokyselín (Arg, Asp, Cys, Leu, Lys, Pro, Trp, Tyr)</li> <li>2. zmes 1-butanolu, kyseliny octovej a vody v pomere 60:15:25 (mobilná fáza)</li> <li>3. 1 % roztok ninhydrínu v rozprašovači</li> <li>4. neznáma vzorka (zmes troch aminokyselín)</li> </ol>
<b>Materiál:</b>	filtračný papier, automatické pipety, sušič na vlasy, ceruzka, pravítko, termostát, kadička s objemom 600 ml (vysoká), vrchnák (Petriho miska, príp. dostatočne široká kadička)
<b>Postup:</b>	<p>Na filtračný papier (16 × 14 cm) si 2 cm od jej spodného okraja ceruzkou (nie perom) nakreslíme štartovaciu čiaru. Na ňu zakreslíme deväť bodov rovnomerne od seba (vzdialenosť medzi bodmi 1,5 cm). Na prvých osem z nich nanesieme po 5 µl štandardných roztokov aminokyselín (Arg, Asp, Cys, Leu, Lys, Pro, Trp, Tyr). Deviaty bod je určený pre 5 µl vzorky (do zošita nezapíšeme číslo vzorky). Roztoky nanášame opatrne automatickou pipetou. Pri nanášaní škvŕnu sušíme sušičom na vlasy. Pozíciu tej-ktorej aminokyseliny, resp. vzorky zaznamenáme ceruzkou priamo na papieri pod príslušnou škvŕnou. Papier s nanesenými roztokmi stočíme do valca tak, aby sa okraje neprekrývali. Okraje zaistíme zošívачkou a papier vložíme do kadičky (objem 600 ml), ktorá obsahuje mobilnú fázu, prikryjeme vrchnákom a necháme vyvíjať vzostupne (30 – 40 min). <b>Pozor, hladina mobilnej fázy nesmie byť vyššie ako 1 cm nad spodným okrajom platne.</b> V opačnom prípade by došlo k vyplaveniu aminokyselín do mobilnej fázy. Keď je čelo mobilnej fázy 1 až 2 cm pod horným okrajom, papier (chromatogram) vyberieme, ceruzkou označíme čelo mobilnej fázy a chromatogram vysušíme. Detekciu aminokyselín vykonáme tak, že chromatogram rovnomerne postriekame roztokom ninhydrínu a vložíme na 5 – 10 min do termostatu na 90 °C. Nakoniec ceruzkou označíme stredy všetkých viditeľných škvŕn.</p>
<b>Vyhodnotenie:</b>	<p>Určíme hodnoty <math>R_f</math> (retenčný faktor) pre jednotlivé štandardy ako aj pre zložky neznámej vzorky a porovnáme ich navzájom. <math>R_f</math> hodnoty vypočítame ako podiel vzdialenosti stredu škvŕny od štartu (A) a vzdialenosti čela mobilnej fázy od štartu (B): <math>R_f = A/B</math>. <math>R_f</math> je funkciou adsorpčnej schopnosti stacionárnej fázy a pre danú látku závisí od systému, v ktorom je meraný, t.j. od teploty, druhu adsorbentu a od zloženia mobilnej fázy.</p>
<b>Záver:</b>	Uvedieme, ktoré tri aminokyseliny obsahovala naša vzorka. K protokolu priložíme aj chromatogram, príp. ho môžeme prekresliť do vyhodnotenia.