

CHROMATOGRAFIA

Instrukcja wykonania ćwiczenia

Zadanie I. ROZDZIELANIE AMINOKWASÓW

1. Przygotowanie komory chromatograficznej

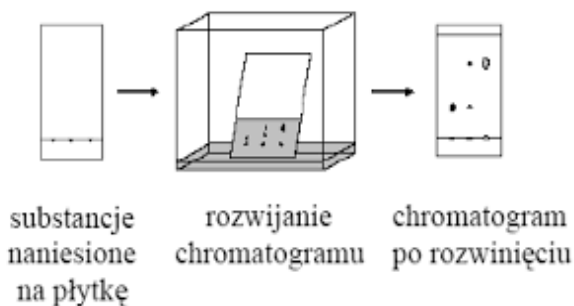
Do komory chromatograficznej wyłożonej bibułą nalać mieszaninę rozpuszczalników **propan-1-ol – amoniak** (w stosunku objętościowym **70:30**) (układ rozwijający). Komorę zamknąć i odstawić na kilkanaście minut celem nasycenia komory parami rozpuszczalników.

2. Przygotowanie chromatogramu i nanoszenie substancji

Na płytce chromatograficznej, wzdłuż krótszego boku płytki, za pomocą cienkiej kapilary na linii startu (około 1 cm od brzegu płytki) w równych odległościach nanieść kolejne roztwory wzorcowe aminokwasów (**DL-alanina, L-leucyna, L-lizyna**) i ich **mieszaninę**. Plamki można suszyć ostrożnie zimnym strumieniem powietrza.

3. Rozwijanie chromatogramu

Płytkę włożyć do uprzednio przygotowanej komory chromatograficznej tak, aby dolna krawędź była w momencie zanurzenia możliwie równoległa do powierzchni cieczy w komorze. Należy zwrócić uwagę, aby krawędzie boczne nie dotykały ścian komory, gdyż powoduje to nierównomierne wznoszenie się rozpuszczalnika. Rozwijanie prowadzić do chwili, aż poziom rozpuszczalnika na płytce osiągnie wysokość około 0,5 cm od góry. Płytkę należy następnie wyjąć, zaznaczyć linię czoła rozpuszczalnika i wysuszyć dokładnie suszarką.



4. Wywoływanie chromatogramu

Wysuszoną płytkę spryskać w pozycji pionowej **roztworem ninhydryny**, następnie ogrzać ciepłym strumieniem powietrza (można użyć suszarki do włosów). Zaznaczyć plamki odpowiednich aminokwasów.

5. Opis ćwiczenia

W opisie należy zrobić rysunek wykonanego chromatogramu, obliczyć wartości R_f aminokwasów oraz wskazać skład badanej mieszaniny.

Zadanie II. BADANIE SKŁADU BARWNIKÓW ROŚLIN ZIELONYCH (rozdzielanie chlorofili a i b oraz karotenoidów – karotenu i ksantofilu)

1. **Zielone liście** utrzeć w moździerzu z odrobiną piasku (w celu łatwiejszego zniszczenia ścianek komórkowych) i kilkoma kroplami acetonu.
2. Za pomocą kapilary nanieść roztwór na płytkę i rozwijać w układzie **aceton – toluen** (w stosunku objętościowym **1:2**). Próbkę należy nanosić kilkakrotnie w tym samym miejscu, zachowując jednocześnie małą średnicę plamki.
3. Po rozwinięciu należy szybko analizować chromatogram, gdyż barwniki łatwo blakną. Plamki obu chlorofili są blisko siebie, wyraźnie natomiast oddziela się od nich karoten i ksantofil.
4. Przerysować chromatogram i napisać wnioski.



Zadanie III. CHROMATOGRAFICZNE OCZYSZCZANIE *p*-NITROANILINY

1. Na dnie kolumny chromatograficznej umieścić tamponik z waty. Watę docisnąć przy pomocy długiej bagietki. Kolumnę umieścić pionowo w statywie, zamknąć kran i wsypać **8 g żelu krzemionkowego**.
2. Pipetą Pasteura delikatnie po ściankach kolumny dodać nad żel około **20 cm³ eluenta (octan etylu/eter naftowy w stosunku objętościowym **1:1**)**.
3. Otworzyć kran kolumny i „wpuścić” rozpuszczalnik w żel.
4. Zamknąć kolumnę po całkowitym wniknięciu rozpuszczalnika w żel.
5. Za pomocą pipety Pasteura ostrożnie wprowadzić do kolumny około **2 cm³ gotowego roztworu *p*-nitroaniliny** i otworzyć odpływ kolumny.
6. Wyeluować żółtą substancję z kolumny, dodając w sposób ciągły **mieszaninę octan etylu/eter naftowy w stosunku objętościowym **1:1**** i zbierając do probówek frakcje o objętości około 5 cm³.
7. Żółte frakcje zebrać do jednej kolby okrągłodennej, a następnie oddestylować rozpuszczalnik na wyparce obrotowej.
8. Zanieczyszczony po chromatografii żel przenieść do specjalnie oznakowanego słoika.