

## Aminohapete planaarkromatografiline määramine.

31.08.15

<http://tera.chem.ut.ee/~koit/arstpr/ah.pdf>

### 1 Sissejuhatus

#### 1.1 Meetodi olemus.

Planaarkromatograafia on kromatograafiliste meetodite perre kuuluv ainete lahutamise ja määramise meetod, mis võimaldab teostada keeruliste segude komponentide kvalitatiivset ja vahel harva ka kvantitatiivset analüüsi. Määratavad ained kantakse kapillaari, mikrosüstla või spetsiaalse aplikaatori abil sorbendikihile laigu või triibuna. Sorbendikihiks võib kasutada klaas-, plast- või metallplaadile kantud peeneteralise materjali (silikageeli, tselluloosi, alumiiniumoksiidi, ioniidi) kihti paksusega 0,05...0,2 mm. Sorbendi asemel võib kasutada ka poorset materjali (paberit, plasti jne.).

Laigu või triibu tsentri pealekandmise kohta plaadil nimetatakse stardijooneks. Ainete lahutamiseks asetatakse plaat otsapidi kromatografeerimisnõus paiknevasse eluenti, mis kapillaarjõudude toimel hakkab liikuma piki sorbendi kihti ülespoole. Eluendi, sorbendi ja lahutatavas segus olevate ainete molekulide vahel eksisteerivate vastasmõjude tõttu toimub eluendi liikumise käigus segu lahutumine komponentideks. Elueerimisprotsess lõpetatakse kui eluendi front on jõudnud plaadi ülaservast 5-10 mm kaugusele. See kaugus tähistatakse plaadil ning seda joont nimetatakse lõpujooneks.

Eluendi poolt läbitud vahemik (elueerimistee  $h_0$ , mm) saadakse stardijoonest ja lõpujoone vahelise distantsi mõõtmisel.

Lahutatud ainete nähtavaks tegemiseks (juhul kui nad ei ole värvilised) kasutatakse mitmeid võtteid: keemilised reaktsioonid, fluorestsentsindikaatorite lisamine sorbendikihti plaatide valmistamise käigus või nende lahustega plaadi pritsimine koos järgneva vaatlusega ultravioletvalguses.

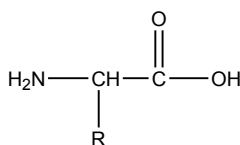
Kuna ainete poolt läbitud vahemaa on erinev, saab nende erinevat liikuvust kasutada ainete kvalitatiivseks määramiseks. Seega iseloomustab ainelaigu tsentri kaugus stardijoonest  $h_x$  (mm) seda, millise ainega on tegemist. Paremini iseloomustab aineid nende liikuvus (suhteline retentsioon), mis leitakse järgmisest valemist:

$$R_F = \frac{h_x}{h_0}$$

Eeldusel, et sorbendikihile on kantud alati sama suur kogus proovi, saab ainete kvantitatiivseks määramiseks kasutada ka laigu intensiivsust: mida suurem on aine hulk segus, seda intensiivsem on laik ja mõningal määral ka laigu suurus – mida suurem laik seda rohkem on segus antud komponenti. Laikude intensiivsust hinnatakse võrdlemisel uuritava aine kindlate koguste laikude intensiivsusega kas visuaalselt või densitomeetrit (optilise tiheduse mõõtmise riist) kasutades.

#### 1.2 Aminohapped.

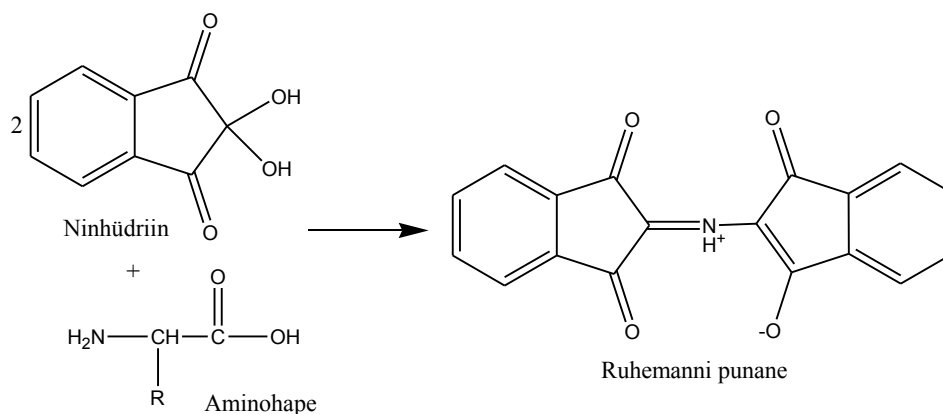
Proteiinid (valgud) koosnevad peptiidsidemega seotud aminohapetest. Elusorganismides esinevate  $\alpha$ -aminohapete (karboksüülhappe- ja aminorühm on sama süsiniku juures) üldine struktuurvalem on toodud Joonisel 1.



**Joonis 1.**  $\alpha$ -aminohapete üldvalem (R – varieeruv rühm).

### 1.3 Aminohapete paberchromatograafiline määramine.

Aminohapete lahutamine toimub kromatograafilisel paberil. Eraldatud aminohapped muudetakse nähtavaks kasutades ninhüdrüini lahust. Viimane moodustab valkude ja aminohapetega reageerides mitmesuguse koostisega keemilisi ühendeid, millelele on omane punakaslilla värvus (Joonis 2).



**Joonis 2.** Punase värvusega ühendi moodustumine aminohapete reaktsioonil ninhüdrüiniga.

Järgnevas tabelis on toodud mõningate aminohapete struktuurvalemid, molekulmassid ja  $R_F$  väärtused. Katseliselt saadud  $R_F$  väärtused sõltuvad tugevalt teostatava töö tingimustest, nagu hälbed eluendi koostises, paberi niiskusesisaldus, kambri ning eluendi temperatuur.

Aminohappe nimetus	Struktuurvalem	Molaarmass	$R_F$ väärtus
Leutsiin	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	131,18	0,75 – 0,90
Metioniin	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{S} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	149,21	0,45 – 0,65
Alaniin	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	89,10	0,34 – 0,55
Seriin	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{OH} \end{array}$	105,10	0,19 – 0,35

## 2 Töö eesmärk

Aminohapete kvalitatiivne analüüs ehk identifitseerimine juhendaja poolt antud tundmatus aminohapete segus.

## 3 Reaktiivid ja töövahendid

1. Eluent<sup>1</sup>.  
[Valmistatakse segu n-butanoolist, etaanhapest (puhtusega 98 – 100 %) ning destilleeritud veest ruumala vahekorraga 5:1:5. Segu segatakse 10 minuti vältel ning seejärel lastakse seista kihistumiseni. Edasiseks kasutamiseks eraldatakse ülemine kiht.]
2. Ninhüdrüini lahus.  
[Lahustatakse 0,3 g ninhüdrüidi 100 ml n-butanoolis. Saadud lahusele lisatakse 3 ml jäääädikhapet.]
3. Aminohapete (leutsiin, metioniin,alaniin ja seriin) individuaalsed 0,02 M lahused.  
[Valmistamine: 0,026 g leutsiini, 0,030 g metioniini, 0,018 galaniini ja 0,021 g seriini lahustatakse destilleeritud vees ning lahuse ruumala viiakse 10 ml-ni.]
4. Kromatograafiline paber mõõtudega 85 x 50 mm.
5. Kromatograafiline kamber ligikaudsete sisemiste mõõtmetega 7 cm kõrge ning 5,5 cm diameeter. Kambri ülaserv on tasane ning see kaetakse kahe kaanega, millest alumises on pilu kromatograafilise paberi sisestamiseks.
6. Kapillaar analüüsitava lahuse kandmiseks paberi stardijoonele.
7. Gradueeritud katseklaas.
8. Harilik pliiats.
9. Kuivatuskapp temperatuuriga ~ 60° C.
10. Filterpaber suurusega 10 x 10 mm või diameetriga ~ 12 cm.
11. Pulverisaator ninhüdrüini lahusega.
12. Joonlaud.
13. Käärid.
14. Kummikindad.

## 4 Analüüsi käik

Töö teostamisel **peab kasutama kummikindaid** vältimaks kromatograafilise paberi saastumist nahalt pärinevate aminohapetega ning ninhüdrüini lahuse sattumist nahale, kui kasutatakse pulverisaatorit või töötatakse ninhüdrüiniga töödeldud paberiga. Kromatograafilise paberi ettevalmistamisel tuleb kasutada alusena filterpaberi tükki või ketast.

Töökäsitatava kromatograafilise paberi tüki peale tõmmatakse hariliku pliiatsiga (kasutades joonlauda) paberi lühema servaga paralleelne **nõrk** joon – stardijoon, mis asub servast ligikaudu 1 cm kaugusel. Sama pliiatsiga märgitakse stardijoonele 5 täppi, mis asuvad nii äärtest kui üksteisest ligikaudu võrdsel kaugusel (ca. 8 mm).

Enne proovide kandmist kromatograafilisele paberile ja kromatograafilise kambri täitmist eluendiga sobitatakse kromatograafilise paberi pikkus kromatograafilise kambri kõrgusega. Selleks asetatakse kambrile piluga kaas. Läbi pilu pistetakse kromatograafiline paber stardijoonega alla poole ning märgitakse pliiatsiga kaanest välja jääva osa piir. Paber võetakse välja ning kambri väljaulatav osa murtakse täisnurga alla. Murdejoon peaks olema ca. 1 mm allpool paberi väljaulatanud osa piirist. Eluendi kamber täidetakse seejärel eluendiga: gradueeritud katseklaasi mõõdetakse 5 ml varem valmistatud eluenti ja valatakse see kromatograafilise kambri põhja. Kamber kaetakse 10 minutiks kahe kaanega, et kamber küllastuks eluendi aurudega.

Nüüd asetatakse paber uuesti lauale ning kantakse punktide juurde proovide tähised (selleks võib kasutada aminohapete algustähti ja juhendajalt saadud proovi numbrit). Järgnevalt kantakse stardijoonele eelnevalt märgitud kohtadesse aminohapete lahused (leutsiin, metioniin,alaniin ja seriin) ning proovi

<sup>1</sup> Nurksulgudes toodud eeskirjad lahuste valmistamiseks on ainult infoks, üliõpilane neid lahuseid ise ei valmista.

lahus. Selleks võetakse iga lahuse jaoks puhas ja kuiv kapillaar (mikropipett) ning kastetakse selle ots vajalikku lahusesse. Täidetud kapillaariotsaga puudutatakse kromatograafilisel paberil varem märgitud kohta. Kapillaari ots eemaldatakse paberilt kui sinna imbunud lahusest tekkinud märja laigu diameeter on 2 – 3 millimeetrit. Soovitav on mikropipetiga proovi peale kandmist eelnevalt harjutada filterpaberil. Pärast lahuste pealekandmist lastakse laikudel täielikult kuivada. Seejärel võetakse kromatograafiline paber, asetatakse see eluendi kambri läbi alumise kaane pilu ning kaetakse veel ilma piluta kaanega. Kontrollitakse, et paberi alumine äär ulatuks kambri põhjas olevasse eluendi kihti.

Elueerimine lõpetatakse, kui eluendi front on jõudnud ligikaudu 1 cm kaugusele kaanest. Paber võetakse kambrist välja ning asetatakse horisontaalselt puhtale filterpaberilehele. 2 – 3 minuti möödudes märgitakse pliiatsijoonega eluendi front ning seejärel asetatakse kromatograafiline paber koos aluspaberiga kuivatusahju (60° C juures). Kui paber on kuivanud, siis viiakse see tõmbekapi alla ning pritsitakse pulverisaatorist ninhüdrini lahusega kergelt niiskeks. Pabereid peaks hoidma ligikaudu 45° nurga all. Nüüd viiakse kromatograafiline paber koos aluspaberiga uuesti 15 minutiks kuivatuskappi, et kiirendada värvilaikude tekkimist.

Vahepealset aega võib kasutada hoolikaks kinnaste pesuks (mitte võtta kindaid käest enne kui need on pestud). Seejärel pestakse destilleeritud veega hoolikalt mikropipetid ning asetatakse need filterpaberil kuivatuskappi. Kromatograafilises kambri kasutatud eluent valatakse eluendi jääkide nõusse ja kamber asetatakse tagurpidi filterpaberile nõrguma.

Kui laigud on ilmunud ja paber kuivanud, siis märgitakse ära laikude kontuurid ning keskpunktid ning arvutatakse eespool toodud meetodil nende  $R_F$  väärtused. Võrreldes iga aminohappe standardi ning prooviseigus esinenud laikude  $R_F$  väärtuseid, tehakse kindlaks prooviseigus esinenud aminohapped.

## 5 Töö tulemus

Testsegust leitud aminohapete nimetused.