

Stanovení aminokyselinového složení tripeptidu

Aminokyselinové složení tripeptidu zjistíme chromatografií aminokyselin uvolněných po totální hydrolyze peptidu.

Materiál a chemikálie:

- Tenká vrstva Silufol (silikagel na hliníkové fólii)
- Chromatografické soustavy:
 - A: fenol – voda (2:1, w/w)
 - B: CHCl_3 – methanol – NH_3 ve vodě (2:2:1, v/v)
- 1% roztoky aminokyselin: Ala, Pro, Glu, Gly, Lys, Leu, Phe, Val (10 mg/ml ve vodě)
- 0,2% roztok ninhydrinu v acetonu

Pracovní postup:

Vaším úkolem bude určit složení tripeptidu. Neznámý vzorek určený k analýze představuje hydrolyzát tripeptidu, neboť vlastní hydrolyzu vzhledem k její časové náročnosti nebudete provádět.

Na dvě desky Silufolu (7,5 x 7,5 cm) si tužkou nakreslete startovní linii asi 1 cm od spodního okraje (tak, aby při vložení do chromatografické soustavy nebyla startovní linie ponořena) a na ní vyznačte v pravidelných vzdálenostech 12 bodů. Krajiní body by měly být nejméně 0,5 cm od okraje desky. Na krajiní body a doprostřed (celkem 3x) naneste neznámý vzorek. Na zbývající místa naneste standardní roztoky aminokyselin. Nanáší se pokud možno vždy stejné množství vzorku kapilárami, vždy jedna tečka o průměru max. 2 mm. Jednu desku vyvíjejte v soustavě označené A a druhou v soustavě B. Po ukončení chromatografie (až čelo rozpouštědla dosáhne cca 0,5 cm pod okraj desky) vysušte obě desky fénem a proveďte detekci aminokyselin ponořením desky do 0,2% roztoku ninhydrinu v acetonu. Opět vysušte fénem, vybarvení skvrn se urychlí zahřátím. Porovnáním chromatografické pohyblivosti standardů a aminokyselin z neznámého vzorku zjistíte aminokyselinové složení daného tripeptidu.

Vyhodnocení:

Poté, co je ukončeno chromatografické dělení látek na TLC, změříme vzdálenost jednotlivých látek od startu a pro každou látku vypočítáme takzvaný retardační faktor R_F . Hodnota R_F udává, jak daleko zaostává skvrna analyzované látky za čelem rozpouštědla. R_F je pro danou látku v daném systému charakteristický.

