

Одиннадцатый класс

Идентификация и определение аминокислот

В 2019 г. химическая общественность всего мира вспоминает о 100-летию со дня смерти российского учёного – создателя хроматографии – универсального и эффективного физико-химического метода разделения, обнаружения и определения соединений в их смеси. Российские учёные внесли определяющий вклад в создание данного метода. Хроматографические методы используют в различных областях аналитической химии для решения широкого круга задач: разделения сложных систем органического и неорганического происхождения на составные компоненты (например, для выделения растительных и животных пигментов); очистки от примесей веществ, таких как витамины, антибиотики и пр. Вещества при хроматографировании не изменяются химически, что особенно важно при многих биологических исследованиях.

В методе тонкослойной хроматографии (ТСХ) разделение обеспечивается движением подвижной фазы через нанесённый на подложку тонкий слой сорбента. В качестве сорбентов чаще всего применяют диоксид кремния – силикагель SiO_2 и оксид алюминия – Al_2O_3 . Для того чтобы установить положения зон разделённых определяемых веществ на пластинке обычно используют проявители – реагенты, образующие с определяемыми компонентами окрашенные соединения.

ТСХ с успехом применяют для разделения и обнаружения аминокислот в различных смесях, например, при идентификации аминокислот, присутствующих в активных центрах ферментов, при анализе дрожжей в гидролизатах белка и т.д.

Задание:

Используя имеющиеся на столе оборудование и реактивы, проведите разделение и идентификацию 3 аминокислот в представленной смеси методом тонкослойной хроматографии и определите суммарное содержание (m_2) аминного азота в растворе смеси аминокислот методом йодометрического титрования.

Ответьте на теоретические вопросы:

1. Какой российский учёный является создателем хроматографического метода анализа?
2. Чем определяется выбор растворителя (подвижной фазы) при тонкослойной

хроматографии?

3. Приведите формулы аминокислот: аргинина, лизина, пролина, глицина, лейцина, валина.

4. Напишите уравнения химических реакций, протекающих при определении суммарного аминного азота в смеси аминокислот йодометрическим методом.

Реагенты и аппаратура

Для ТСХ-анализа:

Разделительная камера или цилиндр с притёртой крышкой.

Капилляры – 2 шт.;

Пластинка для ТСХ «Sorbfil» (Краснодар) шириной 1-1.5 см и длиной до 12-15 см.

Пинцет

Подвижная фаза: смесь изопропанол – H₂O об.% 50:50.

Модельная смесь аминокислот

Реагент-проявитель, 0.2%-ный раствор нингидрина в ацетоне.

Перчатки латексные

Электроплитка

Простой карандаш

Клей-карандаш (1 на комнату)

Для количественного определения аминного азота аминокислот:

Раствор смеси аминокислот

0.1 % раствор тимолфталейна;

0.5 М раствор NaOH;

Суспензия фосфата меди;

Бумажный фильтр, синяя лента;

Уксусная кислота 80%, ледяная;

10 % раствор йодида калия;

0.01 М раствор тиосульфата натрия;

1% раствор крахмала;

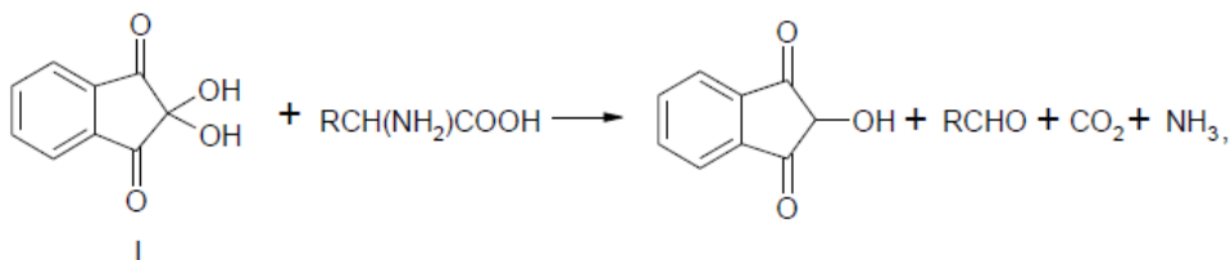
Бюретка для титрования

Коническая колба – 4 шт;
 Воронка коническая, диаметр 3 см – 1 шт;
 Воронка коническая, диаметр 5-7 см – 1 шт;
 Пипетка градуированная на 5 мл – 2 шт
 Пипетка градуированная на 10 мл – 1 шт
 Груша – 1 шт
 Пипетка на 1 мл – 1 шт;
 Пипетка Мора на 10 мл – 1 шт

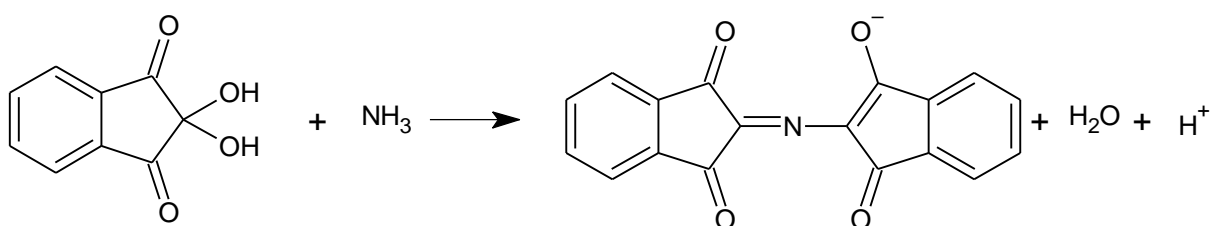
**Сущность метода идентификации и
количественного определения аминокислот**

В данной работе разделение смеси аминокислот осуществляется за счет различного распределения (растворимости) между двумя жидкими фазами: стационарной фазой - водой на поверхности сорбента и подвижной фазой – н-изопропанол – H₂O об.% 50:50. Носителем стационарной фазы является силикагель (готовые пластинки «Sorbfil»). Детекция аминокислот на пластинке производится с помощью нингидрина, который дает цветную реакцию с α-аминокислотами.

Нингидрин (I) расщепляет α-аминокислоту до альдегида, углекислого газа и аммиака:



а аммиак образует с нингидрином краситель фиолетового цвета (фиолетовый Румманна) (II):



Продвижение органического растворителя по пластине обеспечивается

капиллярными силами. Хроматографическое разделение методом ТСХ проводят в разделительной камере или в стакане с крышкой (чашка Петри).

Положение зоны хроматографируемого компонента устанавливают по величине коэффициента R_f , равной отношению скорости движения его зоны к скорости движения фронта растворителя. Величину R_f рассчитывают как отношение расстояния l , пройденного веществом, к расстоянию L , пройденному растворителем: $R_f = l/L$. Обычно для расчета выбирают точку в центре пятна.

Определение аминного азота аминокислот в препаратах с низким его содержанием (около 0.01 – 0.06 мг в 1 мл испытуемого раствора) проводят методом Поппенштейна. В основу метода положена способность аминокислот образовывать растворимые соединения с медью, количество которой определяют йодометрическим титрованием. Сущность метода заключается в том, что к слабощелочному раствору аминокислот прибавляют избыток суспензии ортофосфата меди $Cu_3(PO_4)_2$ в боратном буферном растворе. Для отделения образовавшихся при этом растворимых медных соединений от нерастворимого ортофосфата меди, смесь фильтруют. Затем к фильтрату прибавляют уксусную кислоту, которая отщепляет медь от комплексного соединения и превращается в ацетат меди. Для определения количества меди, участвующей в реакциях, к раствору добавляют йодид калия. Йод выделившейся в количестве, эквивалентном количеству меди, а следовательно, и азоту аминокислот, оттитровывают раствором тиосульфата натрия.

Методики определения

Методика разделения и идентификации аминокислот в смеси методом тонкослойной хроматографии

На пластинке для ТСХ проводят карандашом линию старта (не нарушая слой сорбента) на расстоянии 1 см от края. На стартовую линию наносят капилляром раствор смеси аминокислот так, чтобы диаметр пятна не превышал 4-5 мм, а центр пятна находился на линии старта. Подсушивают пластинку и вновь наносят анализируемую смесь на линию старта, подсушивают. Внимание, пластинки для ТСХ надо брать пинцетом аккуратно за края, не захватывая при этом центральную часть!

Пластинку с нанесенной пробой помещают вертикально в камеру (стакан) так,

чтобы она погружалась в подвижную фазу не более чем на 5 мм. Нанесенная проба должна быть выше слоя растворителя. Хроматографирование прекращают тогда, когда фронт растворителя пройдет 6-7 см. Время хроматографирования составляет около 1 часа. Далее пластинку аккуратно пинцетом вынимают из камеры (стакана), карандашом отмечают линию фронта растворителя, подсушивают пластинку над плиткой и обрабатывают из пульверизатора раствором нингидрина в камере для распыления.

После обработки пластинки раствором нингидрина её снова подсушивают: при нагревании при 70-80°C для проявления пятен на хроматограмме достаточно 3-5 мин.

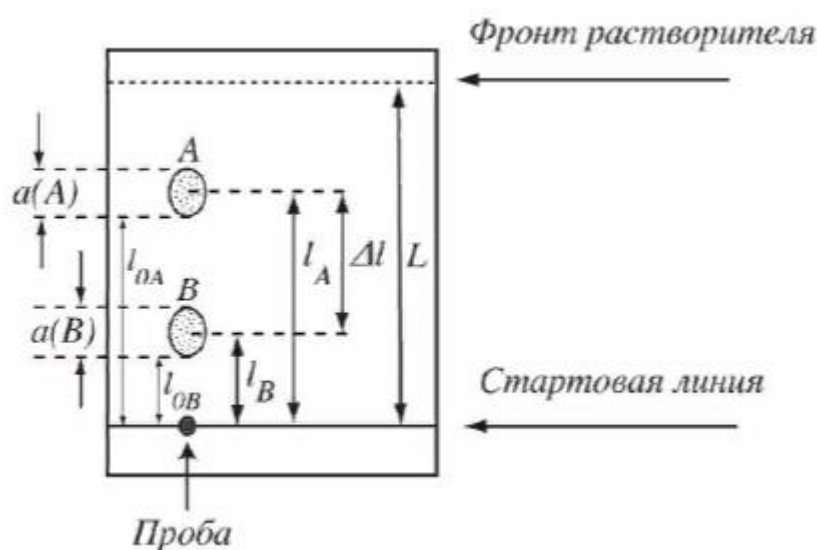


Рис. Определение на хроматограмме подвижностей хроматографических зон R_f

Рассчитывают величины R_f для каждого пятна (Рис.). Затем по величинам R_f и окраске пятен идентифицируют компоненты анализируемой смеси, используя данные таблицы.

Расчет R_f проводят согласно формуле:

$$R_f = \frac{l_i}{L}$$

Величины R_f и окраска пятен аминокислот на хроматограмме при разделении их методом ТСХ

Аминокислота	R_f	Цвет пятна
Аргинин	0.09 – 0.10	Красно-фиолетовый
Лизин	0.07 – 0.08	Сине-фиолетовый
Пролин	0.56 – 0.60	Сине-жёлтый
Глицин	0.67 – 0.69	Красный
Лейцин	0.75 – 0.80	Красно-фиолетовый

В выводах представьте качественный состав анализируемой смеси.

Хроматограмму вклейте в отчёт.

Методика определения суммарного содержания аминного азота в растворе смеси аминокислот методом йодометрического титрования

В мерную колбу вместимостью 50 мл, содержащую раствор смеси аминокислот, прибавьте 0.5 мл 0.1 % раствора тимолфталейна, перемешайте и по каплям прибавьте 0.5 М раствор гидроксида натрия до слабого голубого окрашивания. Прибавьте цилиндром 20 мл хорошо перемешанной суспензии фосфата меди, перемешайте. При исчезновении осадка прибавьте еще 5 мл суспензии фосфата меди, объем раствора в колбе доведите водой до метки, перемешайте и профильтруйте через плотный бумажный фильтр. Фильтрат должен быть прозрачным. При необходимости фильтрование можно повторить. Отберите 10 мл фильтрата в коническую колбу, прибавьте 0.4 мл 80% уксусной кислоты, прибавьте 7.5 мл 10 % раствора йодида калия, оставьте на 15 минут в темном месте и оттитруйте выделившийся йод 0.01 М раствором тиосульфата натрия. В конце титрования, когда раствор примет соломенно-желтую окраску, прибавьте 1.5 мл 1% раствора крахмала и продолжите титрование до исчезновения появившейся синей окраски, не возникающей в течение 10-15 секунд Титрование повторите до достижения двух результатов, отличающихся не более чем на 0.1 мл. Эти результаты усредните.

Произведите расчеты:

Массу аминного азота в смеси аминокислот X определяют по формуле:

$$X = \frac{14 \cdot 2 \cdot c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \cdot V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \cdot V_{\text{колбы}}}{V_{\text{аликвоты}}}$$

где $V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$ – объем раствора тиосульфата натрия, затраченного на титрование, мл;

$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$ – его концентрация, М;

$V_{\text{колбы}}$ – объем мерной колбы, 50 мл;

$V_{\text{аликвоты}}$ – объем аликвоты, 10 мл;

14 – относительная атомная масса азота;

2 – стехиометрический коэффициент (возникает из-за того, что один атом меди реагирует с двумя молекулами аминокислот, образуя соединения типа



В выводах представьте суммарное содержание аминного азота аминокислот в мг.