

# Úloha 2: Izolace glycinu a identifikace neznámé aminokyseliny

## Zadané úlohy

1. Z hydrochloridu glycinu izolujte pomocí chromatografie na iontoměničích volný glycin ve formě zwitteriontu
2. Pomocí srovnávací tenkovrstevné chromatografie (TLC) identifikujte předložený vzorek aminokyseliny

## Teoretický úvod

### Práce s rotační vakuovou odparkou

Slouží k rychlému odpaření většího množství rozpouštědla a získání látky v něm rozpuštěné. Baňka se kontinuálně otáčí a tím se na její povrchu obnovuje vrstvička roztoku, tu za pomoci vakua odpařujeme. Vakuum vytváříme membránovou pumpou a musíme dbát na to, aby směs neměla moc vysokou teplotu a nebo aby nevykypěla.

### Srážení přídavkem špatného rozpouštědla

Krystalizace založená na principu změny rozpouštědla. K roztoku s rozpouštědlem ve kterém se látka dobře rozpouští dodáme rozpouštědlo, ve kterém ale daná látka rozpustná není, jako výsledek dojde vyloučení látky v pevné fázi.

### Odsávání na fritě

Proces oddělení pevné fáze od kapalné za sníženého tlaku. Kapalnou fázi jímáme do odsávací baňky a pevná zůstává na fritě, ke snížení tlaku se obvykle používá vakuová pumpa nebo vývěva.

### Chromatografie na ionexu

Ionexy neboli iontoměničové pryskyřice se používají k rozdělení iontových látek. Jsou to kopolymery inertního monomerů s monomerními jednotkami. Ty mají polární substituenty: kyselé nebo bazické. Ionexy jsou nejčastěji vloženy jako náplně ve sloupcových kolonách. Iontoměniče rozdělujeme na kationtové a aniontové. Po jejich používání je vždy potřeba udělat tzv. regeneraci.

### Dělení látek na chromatografické destičce

Princip TLC analýzy je založen na chromatografické destičce se silikagelem jejichž povrch je silně polární a tím pádem má vysokou afinitu k polárním sloučeninám zejména aminům. Při použití jako mobilní fáze amoniaku bude platit, že čím větší polarita sloučeniny, tím méně se bude pohybovat. K následné vizualizaci aminokyselin se používá ninhydrin, který obarvuje aminokyseliny na fialovo.

Postup

Izolace glycinu

Iontoměnič byl převeden do kyselého cyklu, přidáním 25 ml zředěné HCl a jejím protékáním rychlostí 1 kapka za 1 sekundu. Poté byl promyt iontoměnič destilovanou vodou do neutrality. Bylo naváženo 1,00 g hydrochloridu glycinu. Hydrochlorid glycinu byl potom rozpuštěn v malém množství vody. Roztok byl pomocí kapátka nanesen na sloupec ionexu. Sloupec ionexu byl opět promyt destilovanou vodou do neutrality. Po nastolení neutrality byl glycin jímán do baňky o objemu 250 ml. Pro eluci glycinu bylo použito 100 ml 5amoniak vu. Amoniak byl přidáván po malých dávkách a kolonou protékal pomalou rychlostí. Následně byl sloupec opět převeden do kyselého cyklu. Frakce amoniaku byla odpařena za použití odparky. Po vymytí amoniaku byla dále kolona regenerována za použití 10potom opět promyta do neutrality. Odpařený glycin byl rozpuštěn v malém množství vody a roztok byl znovu odpařen do sucha. PO opětovném odpaření byl glycin zase rozpuštěn v malém množství vody. Do kádinky bylo odměřeno 80 ml acetonu a vodný roztok glycinu byl přidán pomocí kapátka, tím byl glycin vystrážen. Vysrážený glycin byl odsát na fritě. Produkt byl převeden na hodinové sklo a zvážen (m=0,5 g)

Identifikace neznámé kyseliny

Na TLC destičku byly naneseny jednotlivé standardy aminokyselin (glycin, valin, feny-lalanin a lysin) a neznámý vzorek. Při nanášení jsme opatrní, abychom jednotlivé látky nezanesly. Po zaschnutí vzorků byla TLC destička vyvíjena ve vyvíjecí cele, na jejím dně byla vrstvička mobilní fáze. Po vyvíjení byla destička vyjmuta a bylo označeno, kam až mobilní fáze došla tzv. čelo. Horkovzdušnou pistolí mobilní fáze byla vysušena. Následně byla provedena detekce skvrn. Na destičku byl rozprášen roztok ninhydrinu a poté byla opět zahřívána. Porovnáváním skvrn byl identifikován náš vzorek.

Výpočty

$$m_{hydrochlorid\ glycin} = 1.00\ g \mid M_{hydrochlorid\ glycin} = 111.5\ g \cdot m^{-1}$$
$$m_{glycin} = 0.50\ g \mid M_{glycin} = 75.07\ g \cdot m^{-1}$$

$$n = \frac{m_{hydrochlorid\ glycin}}{M_{hydrochlorid\ glycin}}$$
$$\rightarrow \alpha = \frac{m_{glycin}}{n \cdot M_{glycin}}$$
$$\alpha = 73.6\%$$

Retenční faktory

	Valin	Lysin	Glycin	Fenylalanin	Vzorek č. 22
d(cm)	3,9	0,3	1,8	5,6	1,8
R <sub>F</sub>	0,6	0,46	0,28	0,86	0,28

Tab. 1: Retenční faktory

**Závěr**

Výtěžek čistého glycinu z 1,00 g hydrochloridu glycinu byl 73,6%. Porovnáním skvrn jednotlivých aminokyselin bylo zjištěno, že neznámý vzorek č. 22 byl glycin.