

## Лабораторная работа № 4

### Хроматография

#### Задание 1 «Бумажная хроматография. Разделение железа (III) и меди (II)»

**Цель работы:** разделить и идентифицировать ионы железа и меди методом круговой бумажной хроматографии.

**Сущность работы.** Хроматография на бумаге – разновидность метода распределительной хроматографии. Носителем для неподвижного растворителя служит при этом фильтровальная бумага.

Анализ смеси веществ проводят по следующей схеме: на круглый обеззоленный фильтр в центр наносят каплю разделяемой смеси, фильтр подсушивают и помещают в хроматографическую камеру с ПФ. ПФ под действием капиллярных сил поднимается по «фитилю», достигает стартового пятна с разделяемой смесью, вместе с ней перемещаются с различной скоростью определяемые вещества.

Анализируемый раствор наносят на стартовую линию с помощью стеклянного капилляра в объеме не более 5–10 мкл. Чем меньше площадь стартового пятна, тем менее размытой будет зона вещества после хроматографирования. Поэтому пробу наносят в одну и ту же точку в несколько приемов, каждый раз подсушивая пятно.

Зоны разделяемых веществ имеют вид концентрических колец, которые могут быть видимыми и невидимыми; в последнем случае хроматограмму проявляют – опрыскивают раствором специфического реагента, либо подвергают воздействию УФ-излучения (см. рис.1).

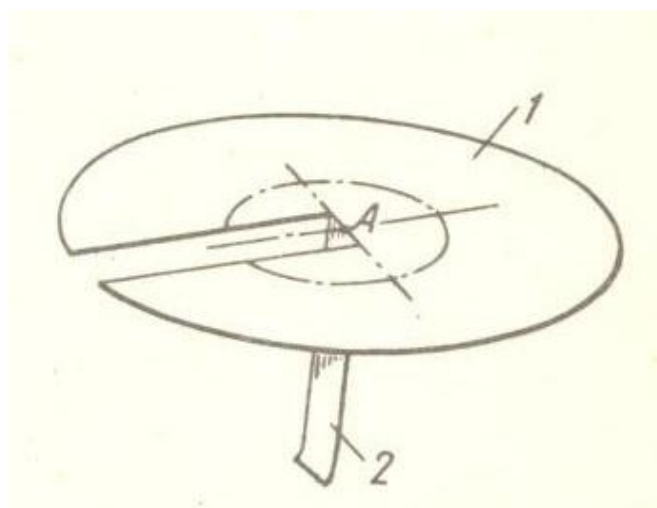


Рис.1 Круговая хроматограмма

1 – круглый фильтр; 2 – «фитиль», погружаемый в растворитель;  
А – место нанесения анализируемого раствора

Скорость перемещения компонентов определяется соответствующими коэффициентами распределения: чем меньше коэффициент распределения,

тем быстрее вещество передвигается по сорбенту. В качестве характеристики удерживания используется величина  $R_f$  – подвижность, определяемая как отношение расстояния фронтов компонента и ПФ:

$$R_f = \frac{l}{L},$$

где  $l$  – расстояние, пройденное зоной компонента от старта пятна, см;  
 $L$  – расстояние, пройденное подвижной фазой, см.

Под фронтом растворителя понимают видимую границу распространения растворителя по бумаге.

Величина  $R_f$  каждого катиона не зависит от концентрации определяемого катиона, температуры, присутствия других катионов и природы аниона, с которым связан изучаемый катион, но зависит от состава и свойств используемой ПФ, а также сорта хроматографической бумаги. У катионов железа (III) и меди (II) значения  $R_f$  значительно отличаются по величине. Поэтому удается их четкое разделение на бумаге.

**Оборудование и реактивы:** стандартный раствор соли  $\text{Fe}^{3+}$ , 1 мг/мл, стандартный раствор соли  $\text{Cu}^{2+}$ , 1 мг/мл, раствор  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 10% -ный, подвижная фаза – смесь этанола с 5М  $\text{HCl}$  (9:1) по объему, обеззоленная фильтровальная бумага «синяя лента», капилляры стеклянные, хроматографическая камера.

### **Выполнение работы.**

1. На круглом обеззоленном фильтре «синяя лента» диаметром 12,5 см простым карандашом намечают контуры «фитиля» длиной 40 мм и шириной 4 мм (см. рис.2).

2. На центр фильтра с помощью капилляра наносят каплю раствора разделяемой смеси. Раствор наносят в несколько приемов, чтобы впитывание происходило за счет капиллярных сил бумаги. Образовавшееся пятно осторожно обводят простым карандашом, т.е. фиксируют его положение на бумаге. Бумагу высушивают, вырезают «фитиль», как показано на схеме.

3. В хроматографическую камеру помещают кристаллизатор и тигель с 10 мл подвижной фазы. Кислоту добавляют к органическому растворителю, чтобы предотвратить адсорбцию ионов бумагой. На кристаллизатор сверху помещают фильтр, следя за тем, чтобы «фитиль» был погружен в растворитель, и закрывают камеру крышкой. Во время разделения не рекомендуется открывать крышку камеры, перемещать камеру.

3. Когда произойдет размывание первичного пятна растворителем, и фронт ПФ пройдет заданное расстояние, бумагу вынимают, отмечают карандашом границы фронта растворителя, высушивают в токе теплого воздуха и приступают к проявлению зон.

4. Для проявления зон локализации ионов  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  фильтр опрыскивают раствором  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  из стеклянного пульверизатора

(металлический непригоден!). В результате на хроматограмме проявляется синяя зона  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  и коричневая зона  $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ .

5. Рассчитывают для обоих катионов значения  $R_f$ , считая началом их пути наружную границу первоначального пятна, отмеченную карандашом, а концом пути – наружные границы появившихся после проявления кольцевых зон локализации. Расстояние же, пройденное фронтом растворителя, мм, отсчитывают от центра хроматограммы (центра бумажного круга).

6. Рассчитывают коэффициент разделения  $\alpha$  как отношение подвижностей  $R_f$  и оценивают степень разделения катионов.

## Задание 2 «Разделение смеси аминокислот»

**Цель работы:** разделить и идентифицировать смесь простейших аминокислот –  $\alpha$ -аланина и аспарагиновой кислоты методом круговой бумажной хроматографии.

**Сущность работы.** Хроматография на бумаге – разновидность метода распределительной хроматографии. Носителем для неподвижного растворителя служит при этом хроматографическая бумага.

Разделению смеси аминокислот мешают следы металлов в бумаге для хроматографии, которые вымывают раствором 8-оксихинолина или комплексона III. Для этого из хроматографической бумаги № 1 или № 2 вырезают круглые листки диаметром 10–12 см и обрабатывают 0,1%-ным раствором 8-оксихинолина, приготовленным на смеси н-бутанола, ледяной уксусной кислоты и воды в соотношении по объему (8:1:1). Бумагу погружают на 1–2 мин в раствор 8-оксихинолина, затем подсушивают, помещают в хроматографическую камеру и пропускают ПФ до полного обесцвечивания темноокрашенных соединений 8-оксихинолина с катионами металлов. Затем бумагу многократно промывают дистиллированной водой и сушат на воздухе. Эта подготовка выполняется заблаговременно.

Анализ смеси веществ проводят по следующей схеме: на круглый обеззоленный фильтр в центр наносят каплю разделяемой смеси, фильтр подсушивают и помещают в хроматографическую камеру с ПФ. ПФ под действием капиллярных сил поднимается по «фитиллю», достигает стартового пятна с разделяемой смесью, вместе с ней перемещаются с различной скоростью определяемые вещества.

Анализируемый раствор наносят на стартовую линию с помощью стеклянного капилляра в объеме не более 5–10 мкл. Чем меньше площадь стартового пятна, тем менее размытой будет зона вещества после хроматографирования. Поэтому пробу наносят в одну и ту же точку в несколько приемов, каждый раз подсушивая пятно.

Зоны разделяемых веществ имеют вид концентрических колец, которые могут быть видимыми и невидимыми; в последнем случае хроматограмму проявляют – опрыскивают раствором специфического реагента, либо подвергают воздействию УФ-излучения (см. рис.1., предыдущая работа).

Скорость перемещения компонентов определяется соответствующими коэффициентами распределения: чем меньше коэффициент распределения, тем быстрее вещество передвигается по сорбенту. В качестве характеристики удерживания используется величина  $R_f$  – подвижность, определяемая как отношение расстояния фронтов компонента и ПФ:

$$R_f = \frac{l}{L},$$

где  $l$  – расстояние, пройденное зоной компонента от старта пятна, см;  
 $L$  – расстояние, пройденное подвижной фазой, см. Под фронтом растворителя понимают видимую границу распространения растворителя по бумаге.

При этом в качестве подвижной фазы используют смесь *n*-бутанола, ледяной уксусной кислоты и воды в объемном соотношении (4:1:5), смесь тщательно взбалтывают и после расслоения берут верхний слой. Проявителем служит раствор с массовой долей нингидрина 0,25% в водонасыщенном *n*-бутиловом спирте. Нингидрин дает с аминокислотами оранжево-коричневое окрашивание бумаги.

**Оборудование и реактивы:** стандартный раствор  $\alpha$ -аланина, 0,5 мг/мл, стандартный раствор аспарагиновой кислоты, 0,5 мг/мл, раствор нингидрина 0,25% в водонасыщенном *n*-бутиловом спирте, подвижная фаза – *n*-бутанола, ледяной уксусной кислоты и воды в объемном соотношении (4:1:5), хроматографическая бумага № 1 или № 2, капилляры стеклянные, хроматографическая камера.

### **Выполнение работы.**

1. На предварительно подготовленной хроматографической бумаге простым карандашом намечают контуры «фитиля» длиной 40 мм и шириной 4 мм (см. рис.2).

2. На центр бумаги с помощью капилляра наносят каплю раствора разделяемой смеси. Раствор наносят в несколько приемов, чтобы впитывание происходило за счет капиллярных сил бумаги. Образовавшееся пятно осторожно обводят простым карандашом, т.е. фиксируют его положение на бумаге. Бумагу высушивают, вырезают «фитиль», как показано на схеме.

3. В хроматографическую камеру помещают кристаллизатор и тигель с 10 мл подвижной фазы. На кристаллизатор сверху помещают круг бумаги, следя за тем, чтобы «фитиль» был погружен в растворитель, и закрывают камеру крышкой. Во время разделения не рекомендуется открывать крышку камеры, перемещать камеру.

3. Когда произойдет размывание первичного пятна растворителем, и фронт ПФ пройдет расстояние, не доходя до края бумаги, бумагу вынимают, отмечают карандашом границы фронта растворителя, высушивают в токе теплого воздуха и приступают к проявлению зон.

4. Для проявления зон локализации аспарагиновой кислоты и  $\alpha$ -аланина бумагу опрыскивают проявителем из стеклянного пульверизатора. Из

появляющихся двух кольцевых окрашенных зон локализации первая принадлежит аспарагиновой кислоте, вторая –  $\alpha$ -аланину.

5. Рассчитывают для обеих аминокислот значения  $R_f$ , считая началом их пути наружную границу первоначального пятна, отмеченную карандашом, а концом пути – наружные границы появившихся после проявления кольцевых зон локализации. Расстояние же, пройденное фронтом растворителя, мм, отсчитывают от центра хроматограммы (центра бумажного круга).

6. Рассчитывают коэффициент разделения  $\alpha$  как отношение подвижностей  $R_f$  и оценивают степень разделения аминокислот.

### **Задание 3 «Хроматографическое разделение растительных пигментов на бумаге»**

**Материалы и приборы.** Фарфоровая ступка с пестиком, химический стакан на 250 мл, стеклянная палочка, полосы фильтровальной бумаги размером 4x25 мм, штатив с кольцом, воронка, стеклянный песок, свежие зеленые листья, ацетон 85%-ный водный раствор, мел.

**Принцип метода.** Метод распределительной хроматографии смесей, состоящих из нескольких близких по строению и свойствам веществ, основан на явлении адсорбции. Разделение таких веществ основано на неодинаковом коэффициенте распределения каждого из них (коэффициент распределения – это отношение скорости движения веществ к скорости движения растворителя). Каждое вещество, обладая характерным коэффициентом распределения, продвигаясь вместе с растворителем через слой адсорбента, адсорбируется на разной высоте этого слоя – происходит разделение смеси веществ. В случае хроматографии окрашенных веществ участки их адсорбции видимые, а в случае бесцветных веществ бумагу после хроматографии обрабатывают специальными реактивами, дающими с исследуемыми веществами цветные комплексы.

**Ход работы.** Берут 2 г мелко измельченных свежих листьев, помещают их в фарфоровую ступку и добавляют небольшое количество стеклянного песка и щепотку мела (для нейтрализации органических кислот, находящихся в растительном соке). К полученной смеси небольшими порциями добавляют 10 мл ацетона, непрерывно растирая содержимое ступки. Когда в ступке образуется однородная масса, ее фильтруют через бумажный фильтр в химический стакан. В отфильтрованный ацетоновый экстракт из листьев опускают на 2-3 мм полосу фильтровальной бумаги, укрепленную при помощи зажима на стеклянной палочке. Полоска бумаги не должна касаться стенок стакана. Спустя 20-30 мин наблюдают зональное разделение разноокрашенных растительных пигментов на полосе фильтровальной бумаги.

## Задание 4 «Определение динамической обменной емкости катионита»

**Цель работы:** определить динамическую обменную емкость катионита

**Сущность работы.** Свойство ионита поглощать определенное количество ионов из раствора характеризуется обменной емкостью. Обменную емкость выражают количеством миллимоль-эквивалентов обменивающегося иона на единицу массы сухой смолы или объема набухшего ионита (мэкв/г или мэкв/мл).

В настоящее время ионный обмен широко используется для устранения жесткости природных вод, которая обусловлена наличием в воде солей кальция и магния. При пропускании такой воды через колонку с катионитом в  $\text{Na}^+$ -форме, катионы магния и кальция поглощаются ионитом, а вместо них в элюат поступает эквивалентное количество ионов натрия. Определение обменной емкости катионита в этой работе практически сводится к фиксации момента проскока, когда часть ионов кальция и магния будет проходить в элюат, хотя пропускаемая через катионит жесткая вода еще будет обменивать ионы кальция и магния на ионы натрия.

При выполнении данной работы следует:

1. Определить жесткость пропускаемой через катионит исходной воды;
2. Определить динамическую обменную емкость катионита, пропуская исходную воду с установленной жесткостью через катионит в  $\text{Na}^+$ -форме и фиксируя момент проскока ионов кальция и магния в вытекающем из колонки растворе (элюате)

**Выполнение работы.**

### 1. Определение жесткости воды

В коническую колбу вместимостью 250 мл вносят пипеткой 10 мл жесткой воды, приливают цилиндром 90 мл дистиллированной воды, 5 мл аммиачного буфера, добавляют щепотку индикатора эриохром черного или хром темно-синего. Содержимое колбы титруют раствором трилона Б, добавляя его по каплям до перехода фиолетово-красного в синий. Титрование повторяют до получения 3-х воспроизводимых результатов.

Расчет жесткости воды проводят по формуле:

$$Ж(\text{H}_2\text{O}) = \frac{C_H \cdot V \cdot 1000}{10}, \text{ мэкв/л} \quad (2.19),$$

где  $V$  – средний объем трилона Б, израсходованный на титрование, мл;  $C_H$  – молярная концентрация эквивалента трилона Б, моль-экв/л; 10 – объем воды (мл), взятой для титрования; 1000 – множитель для перехода единиц измерения от моль-экв к ммоль-экв (мэкв)

### 2. Определение ДОЕ катионита.

Через ионообменную колонку с катионитом в  $\text{Na}^+$ -форме пропускают воду, жесткость которой предварительно определялась трилонометрически. Устанавливают момент проскока ионов кальция и магния в элюате. Для этого в маленькую пробирку вносят каплю раствора индикатора в аммонийном

буфере и добавляют несколько капель вытекающей из ионообменной колонки воды. Если цвет содержимого пробирки голубой, проскока еще не произошло. Если у раствора наблюдается сиреневатый оттенок, то в элюате, вытекающем из колонки, уже появились ионы кальция или магния. При этом фиксируется объем пропущенной воды до проскока .т.е. объем умягченного элюата. Объем катионита вычисляют путем умножения площади сечения колонки на высоту слоя катионита. (При диаметре колонки в 2 см площадь сечения ее составляет  $3.14 \text{ см}^2$ ).

Расчет динамической обменной емкости катионообменника проводят по формуле:

$$ДОЕ = \frac{V_1 \cdot Ж(H_2O) \cdot 1000}{V_2}, \text{ мэкв/м}^3 \quad (2.20),$$

где  $V_1$  – объем умягченного элюата, мл;  $V_2$  – объем катионита,  $\text{см}^3$ ;  
 $Ж(H_2O)$  – жесткость пропускаемой через колонки воды, мэкв/л; 1000 – множитель для перевода единиц измерения от мэкв/л к мэкв/м<sup>3</sup>.

## **Работа 5 «Определение ионов никеля и цинка в смеси с использованием разделения их на анионите»**

**Цель работы:** определить содержание никеля и цинка в смеси с использованием их предварительного разделения на анионите АВ-17 в  $\text{Cl}^-$  - форме.

### **Сущность работы.**

Для разделения катионов  $\text{Zn(II)}$  и  $\text{Ni(II)}$  используют способность ионов цинка образовывать с  $\text{HCl}$  отрицательно заряженный хлоридный комплекс  $[\text{ZnCl}_3]^-$ . Ионы никеля таких комплексов не образуют. При пропускании через колонку с анионообменником в  $\text{Cl}^-$  -форме раствора, содержащего катионы никеля и отрицательно заряженные комплексные ионы цинка, происходит поглощение последних, а ионы никеля проходят через анионообменник в элюат.

### **Выполнение работы**

#### **1. Разделение цинка и никеля**

В стакан емкостью 100мл помещают смесь из 1,5–3 мл 0,25 М раствора  $\text{ZnSO}_4$  и 1,5–3мл 0,25 М раствора  $\text{NiSO}_4$ .

К анализируемому раствору добавляют 5 мл 6 М раствора  $\text{HCl}$ , при этом катионы цинка образуют хлоридные комплексные анионы  $[\text{ZnCl}_3]^-$ . Полученный раствор пропускают со скоростью 1 капля в 1 секунду через колонку с анионитом АВ-17 в  $\text{Cl}^-$  -форме. Вытекающий из колонки раствор, содержащий ионы никеля, собирают в коническую колбу емкостью 250 мл. Для полного вымывания из анионита ионов никеля через колонку пропускают отдельными порциями по 10-15 мл около 100мл 2М раствора  $\text{HCl}$ .

Для извлечения ионов цинка анионит промывают 100мл дистиллированной воды со скоростью 2 капли в 1 секунду. Промывание проводят отдельными порциями по 10–15 мл дистиллированной воды так, чтобы каждая новая порция прибавлялась только после полного вытекания предыдущей. Элюат, содержащий ионы цинка, собирают в другую коническую колбу емкостью 250мл.

Следует помнить, что над слоем анионита всегда должна находиться жидкость.

## 2. Определение никеля

Содержание ионов никеля в солянокислом растворе определяют комплексометрическим методом. Для этого в коническую колбу с ионами никеля добавляют 50 мл дистиллированной воды, 10 мл 6М раствора NaOH и по каплям 12 % NH<sub>4</sub>OH до изменения окраски красной лакмусовой бумаги в серо-голубой цвет (красную лакмусовую бумагу помещают в раствор и, не вынимая ее, следят за изменением цвета). После этого добавляют щепотку индикатора мурексида и титруют трилоном Б до перехода желтой окраски раствора в фиолетовую.

Содержание никеля определяют по формуле:

$$m(\text{Ni}^{2+}) = \frac{C \cdot V \cdot M_{\text{э}}}{1000} \quad (1),$$

где  $C$  – молярная концентрация эквивалента трилона Б, моль-экв/л ;  
 $V$  – объем трилона Б, израсходованный на титрование, мл;  $M_{\text{э}}(\text{Ni}^{2+})$  – молярная масса эквивалента никеля в данной реакции, г/моль-экв;  
 $m(\text{Ni}^{2+})$  – масса никеля в исследуемом растворе, г

## 3. Определение цинка

В коническую колбу, содержащую ионы цинка, добавляют по каплям из бюретки 12 % раствор аммиака до щелочной среды по красному лакмусу, 5 мл аммиачной буферной смеси, щепотку индикатора эриохрома черного или хрома темно-синего и титруют трилоном Б до изменения фиолетово-красной окраски в синюю.

Содержание цинка определяют по формуле:

$$m(\text{Zn}^{2+}) = \frac{C \cdot V \cdot M_{\text{э}}}{1000} \quad (2),$$

где  $C$  – молярная концентрация эквивалента трилона Б, моль-экв/л;  
 $V$  – объем трилона Б, израсходованный на титрование, мл;  $M_{\text{э}}(\text{Zn}^{2+})$  – молярная масса эквивалента цинка в данной реакции, г/моль-экв;  
 $m(\text{Zn}^{2+})$  – масса цинка в исследуемом растворе, г

## Задание 6 «Разделение и обнаружение галогенидов. Тонкослойная хроматография»

**Цель работы:** разделить и идентифицировать галогенид-ионы методом одномерной восходящей тонкослойной хроматографии.



**Сущность работы:** В тонкослойной хроматографии (ТСХ) процесс разделения происходит в слое тонкодисперсного сорбента, нанесенного на стеклянную или металлическую пластинку. В органическом анализе наибольшее распространение получила адсорбционная ТСХ (подвижная фаза – жидкость, неподвижная фаза – адсорбент).

Анализ смеси веществ проводят по следующей схеме: на пластинку сорбента на небольшом расстоянии от края наносят на линию старта каплю разделяемой смеси, пластинку подсушивают и помещают в хроматографическую камеру с ПФ. ПФ под действием капиллярных сил поднимается по сорбенту, вместе с ней перемещаются с различной скоростью определяемые вещества.

Анализируемый раствор наносят на стартовую линию с помощью стеклянного капилляра в объеме не более 5–10 мкл. Чем меньше площадь стартового пятна, тем менее размытой будет зона вещества после хроматографирования. Поэтому пробу наносят в одну и ту же точку в несколько приемов, каждый раз подсушивая пятно.

Зоны разделяемых веществ имеют вид пятен, которые могут быть видимыми и невидимыми; в последнем случае хроматограмму проявляют – опрыскивают раствором специфического реагента, либо подвергают воздействию УФ-излучения.

Скорость перемещения компонентов определяется соответствующими коэффициентами распределения: чем меньше коэффициент распределения, тем быстрее вещество передвигается по сорбенту. В качестве характеристики удерживания используется величина  $R_f$  – подвижность, определяемая как отношение расстояния фронтов компонента и ПФ (рис. 1)

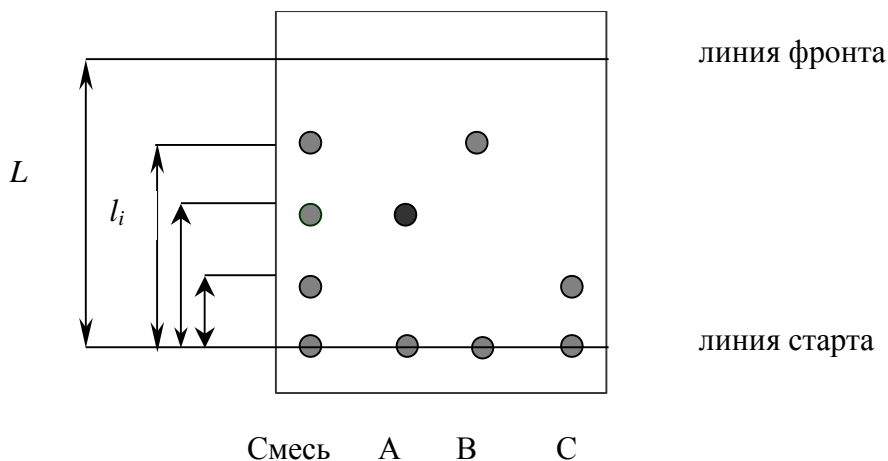


Рис.1. Плоскостная хроматограмма. Определение  $R_f$

$$R_f = \frac{l}{L} \quad (3),$$

где  $l$  – расстояние от линии старта до центра пятна компонента, см;  
 $L$  – расстояние, пройденное ПФ от линии старта до линии фронта, см.

Под фронтом растворителя понимают видимую границу

распространения растворителя по пластинке.

Величина  $R_f$  не зависит от концентрации определяемого вещества и от присутствия других веществ, но зависит от природы вещества, природы ПФ и НФ и температуры.

Качественный анализ проводят, сравнивая  $R_f$  компонентов смеси и стандартных веществ.

**Оборудование и реактивы:** стандартный раствор NaCl, 1 М, стандартный раствор KBr, 1 М, стандартный раствор KI, 1 М, бромкрезоловый пурпурный, 0,1%-ный раствор в этаноле с добавлением 1 капли аммиака, подвижная фаза – смесь ацетона (65 мл), н-бутанола (20 мл), конц. аммиака (10 мл), дистиллированной воды (5 мл), хроматографическая пластинка марки «Silufol» или др, капилляры стеклянные, хроматографическая камера.

#### **Выполнение работы.**

1. На дно хроматографической камеры помещают подвижную фазу (высота слоя около 0,5 см), закрепляют на задней стенке камеры кусочек фильтровальной бумаги, смоченный в растворителе, затем закрывают крышкой и оставляют на 15–20 мин для насыщения камеры парами ПФ.

2. На хроматографической пластинке на расстоянии около 1 см от краев отмечают линию старта и линию фронта и с помощью капилляра наносят на стартовую линию каплю раствора разделяемой смеси, рядом наносят по капле растворов индивидуальных галогенидов, используемых в качестве стандартов.

3. Пластинку высушивают, помещают в хроматографическую камеру и плотно закрывают крышкой. Во время разделения не рекомендуется открывать крышку камеры, перемещать камеру. Анионы продвигаются по пластинке в виде аммонийных солей, катионы щелочных металлов остаются на старте.

4. Когда фронт ПФ пройдет заданное расстояние и произойдет разделение компонентов, пластинку вынимают, высушивают в токе теплого воздуха и приступают к идентификации пятен.

5. Для обнаружения пятен хроматограмму опрыскивают раствором бромкрезолового пурпурного и подсушивают. Аммонийные соли дают желтые пятна, а ионы щелочных металлов – ярко-синие (на старте). После хроматографирования сопоставляют положение пятен исследуемой смеси и индивидуальных веществ, затем делают вывод о присутствии или отсутствии их в анализируемом растворе.

6. Для идентификации компонентов сравнивают рассчитанные величины  $R_f$  для компонентов смеси и индивидуальных веществ. Рассчитывают коэффициент разделения  $\alpha$  для пар ионов как отношение подвижностей  $R_f$  и оценивают степень разделения. Делают вывод о закономерности изменения величины  $R_f$  в ряду галогенид-ионов.

## **Задание 7 «Разделение аминокислот с помощью распределительной хроматографии на бумаге»**

**Цель:** разделить и идентифицировать аминокислоты. Смесь их дана в виде раствора. Задача разработана для глицина, аланина, валина и фенилаланина.

**Задачи:** при помощи распределительной хроматографии разделить аминокислоты на бумаге.

**Оборудование:** глицин, аланин, валин, фенилаланин, 0,5% раствор нингидрина в метаноле или ацетоне, мерный цилиндр на 1 литр, хроматографическая бумага, предметное стекло.

Перед работой получают у преподавателя контрольную задачу – раствор двух неизвестных аминокислот, а у лаборанта – лист хроматографической бумаги, отрезанной по размеру цилиндра, расчертить его карандашом так, как показано на рис. 101. По линейке проводят на расстоянии 2 см от нижнего обреза горизонтальную прямую АБ. Рисуют кружки диаметром 3 мм на расстоянии 2 см друг от друга. Над каждым кружком ставят цифры 1,2,3.

Растворы аминокислот на бумагу наносят на отдельном столе. Бумагу кладут на предварительно тщательно вымытое стекло. Под нижний край бумаги подкладывают стеклянную пластинку или тетрадку так, чтобы та часть бумаги, где нарисованы кружки, оставалась на весу и не касалась поверхности стекла. Капиллярами, специально приготовленными для каждого раствора, на бумагу в кружки последовательно наносят капли растворов исследуемых смесей аминокислот и «свидетелей». Надо так напрактиковаться, чтобы наносимая капля не распространялась за пределы нарисованного кружка. Раствор на кружок наносят 5-6 раз после высыхания предыдущей капли.

После высыхания всех нанесенных капель тщательно моют руки с мылом, свертывают бумагу в цилиндр и сшивают лист через край так, чтобы края не накладывались друг на друга и чтобы получился более или менее правильный цилиндр. Особое внимание обращают на то, что при смешивании точки А и Б совпали. На дно стеклянного цилиндра (осторожно, не замочить стенок) наливают смесь *n*-бутилового спирта, уксусной кислоты и воды (4:1:5). Высота слоя растворителя не выше 1 см от дна цилиндра.

Бумажный цилиндр осторожно вставляют вертикально в стеклянный цилиндр так, чтобы он не касался стенок и чтобы нанесенные капли находились на нижнем конце бумажного цилиндра. Для лучшей центровки бумажного цилиндра в стеклянном часто помещают мятую фильтровальную бумагу, сверху между стенками бумажного и стеклянного цилиндров.

Стеклянный цилиндр плотно закрывают крышкой с резиновой прокладкой. Оставляют цилиндр на столько, чтобы растворитель поднялся почти до верхнего края. Тогда осторожно вынимают бумажный цилиндр, помещают карандашом границу фронта растворителя, раскрывают шов,

выпрямляют бумагу и вешают ее для просушки под тягу или в сушильный шкаф (70-800 С).

Когда растворитель полностью испарится, хроматограмму проявляют. В качестве проявителя для  $\alpha$ -аминокислот применяют 0,5% раствор нингидрина в метаноле или ацетоне. Этим раствором опрыскивают хроматограмму несколько раз из пульверизатора так, чтобы бумага становилась только слабо влажной и на ней не образовывались бы размывающие струйки раствора. Затем сушат ее на воздухе и прогревают в сушильном шкафу при 1100С до появления лиловых пятен. Значительно лучше просушить хроматограмму постепенно в темноте. Проявившиеся пятна легко обводят карандашом и при желании закрепляют раствором сульфата никеля, после чего раз просушивают хроматограмму на воздухе.

Качественный состав контрольной смеси аминокислот определяют по величине  $R_f$  каждого пятна, сравнивая с  $R_f$  вычисленными по хроматограмме для «свидетелей». Значения  $R_f$  аминокислот в этой системе: глицин 0,13; аланин 0,18; валин 0,36; фенилаланин 0,46.

В этом варианте задачу можно выполнить и для других аминокислот (таб.1), а также для простейших углеводов (таб.2). При хроматографировании углеводов проявляют аммиачным раствором нитрата серебра (черное пятно).

Таблица 1 –  $R_f$  простейших аминокислот при хроматографировании на бумаге типа “быстрая”

Аминокислота	Система растворителей и величина $R_f$								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Глицин.....	0,45	0,07	0,02	0,03	0,36	0,44	0,28	0,41	0,15
Аланин.....	0,55	0,10	0,03	0,05	0,44	0,67	0,43	0,54	0,24
Норвалин.....	-	0,22	0,12	0,19	0,71	-	-	-	-
Валин.....	0,62	0,18	0,11	0,15	0,65	0,73	0,64	0,65	0,43
Изолейцин.....	0,67	0,31	0,18	0,27	0,76	0,78	0,71	0,66	0,43
Лейцин.....	0,69	0,36	0,21	0,31	0,78	0,78	0,72	0,68	0,43
Фенилаланин.....	0,64	0,36	0,36	0,33	0,79	0,73	0,66	0,66	0,52
Серин.....	0,47	0,08	0,01	0,02	0,34	0,48	0,34	0,51	0,14
Пролин.....	0,58	0,11	0,12	0,12	0,57	0,73	0,49	0,56	0,42
Триптофан.....	0,58	-	-	0,30	-	0,78	0,70	0,63	0,43
Орнитин.....	0,16	0,02	0,00	0,00	0,24	0,30	0,31	0,29	0,10
Лизин.....	-	0,02	0,00	0,01	-	-	-	-	0,13
Аспаргиновая кислота	0,45	0,02	0,00	0,00	0,31	0,38	0,15	0,48	0,07
Глутаминовая кислота	0,51	0,02	0,00	0,01	0,38	0,45	0,19	0,48	0,09
Цистин.....	-	0,02	0,00	0,00	0,25	-	0,20	-	0,06

\*Системы растворителей: I – ацетон – вода 3:2; II – трет – амиловый спирт; III – бензиловый спирт; IV – н – бутанол – бензиловый спирт 1:1; V – изомасляная кислота; VI – тетрагидрофуран – вода 3:2; VII – тетрагидрофуриловый спирт – вода 4:1; VIII – пиридин – вода 65:35; IX фуриловый спирт – пиридин – вода 67:8:25.

Таблица 2 Rf простейших углеводов и родственных им соединений при хроматографировании на бумаге типа «быстрая»

Соединение	Система растворителей и величина Rf			
	I*	II	III	IV
D – Глюкоза	0,18	0,13	0,16	0,45
D – Галактоза	0,16	0,14	0,12	0,41
D – Манноза	0,20	0,15	0,22	0,49
L – Сорбоза	0,20	0,16	-	-
D – Фруктоза	0,23	0,18	0,21	0,48
D – Ксилоза	0,28	0,19	0,29	0,54
D- Арабиноза	0,21	0,21	0,22	0,48
D – Рибоза	0,31	0,22	-	-
D – Дезоксирибоза	-	-	0,32	-
Лактоза	0,09	0,07	0,03	0,34
Мальтоза	0,11	0,08	0,07	0,39
Сахароза	0,14	-	-	-
Аскорбиновая кислота	0,38	0,19	-	-

\*Системы растворителей: I – н- бутанол – уксусная кислота – вода 4:1:5; II – изомасляная кислота; III – лутидин – трет – амиловый спирт – вода 7:7:6; IV – пиридин – изомиловый спирт – вода 7:7:6.

### Использованы лабораторные работы из пособий:

1. Гиндуллина Т.М. Хроматографические методы анализа: учебно-методическое пособие /Т.М. Гиндуллина, Н.М. Дубова – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2010. – 80 с.

2. <https://biohimist.ru/>

3. <https://biohimist.ru/64-laboratornye/laby-hromatograficheskoe-razdelenie>