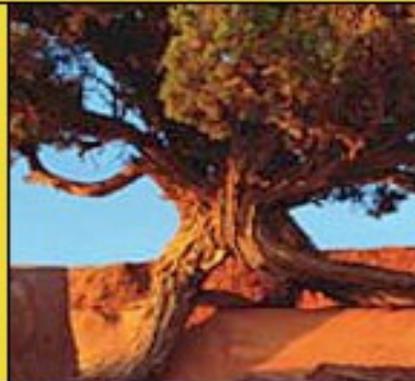


实验二 氨基酸的薄层层析





一、实验目的

- 1 . 了解薄层层析的一般原理以及层析技术优点
- 2 . 掌握硅胶薄层层析的基本技术



二、实验原理

薄层层析是层析法的一种。

层析法是利用被分离样品混合物中各组分的物理、化学差别，使各组分以不同程度分布在两个相中，这两个相通常使一个被固定在一定的支持物上的，称为固定相；另一个是移动的，称为流动相；当流动相流过固定相时，在移动过程中由于各组分在两相中的分配情况不同（或吸附性质不同、或电荷分布不同、或离子亲和力不同等），而以不同速度前进，从而达到分离的目的。

薄层层析是将一种固定支持物均匀地涂在薄板上，对物质进行层析的方法。本实验采用吸附薄层层析，即所用固定支持物是吸附剂（硅胶 G 粉），主要是根据吸附剂对样品中各组分的吸附能力不同，使得各组分的移动速度不同，从而达到分离混合物的目的。



二、实验原理

氨基酸在硅胶 G 薄板上展层时，与硅胶分子有一定的吸附力。由于**不同氨基酸的理化性质**（分子极性、分子大小和形状、分子亲和力等）**不同**，使其与硅胶分子间的**吸附力不同**，造成各种氨基酸在展层过程中在薄板上**移动的距离不同**，从而将不同的氨基酸分离出来。

氨基酸在薄板上移动的速率可用 **Rf 值** 表示。Rf 是**原点至各斑点中心的距离 r** 与**原点至展开剂前沿的距离 R** 的比值。将标准氨基酸和混合氨基酸在同一薄板上一起展开，通过在同一薄板上的已知标准氨基酸的 Rf 值和未知组分的混合氨基酸的 Rf 值进行对照，就可初步鉴定未知混合氨基酸的成分。



三、实验试剂与器材

1. 实验试剂

- (1) 混合氨基酸：未知组分
- (2) 标准氨基酸：甘氨酸、亮氨酸
- (3) 展开剂——正丁醇：冰乙酸：蒸馏水 = 4:1:1
- (4) 显色剂——0.1%茚三酮无水乙醇溶液
- (5) 吸附剂——硅胶 G
- (6) 粘合剂——0.5% 羧甲基纤维素钠

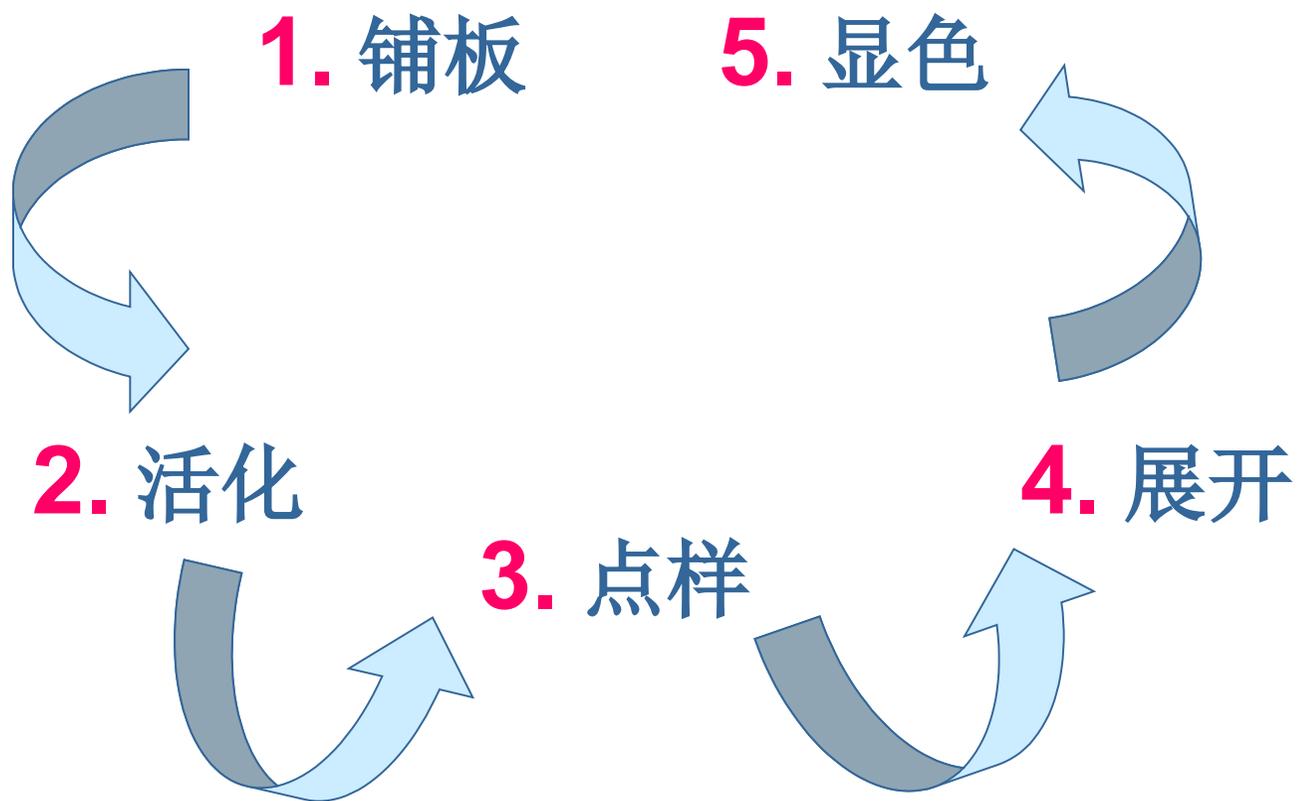


三、实验试剂与器材

2. 实验器材

- (1) 托盘天平、研钵、玻璃板 (5.5cm×10cm)、玻璃棒、量筒 (10ml)、烘箱
- (2) 铅笔、直尺、橡胶手套、点样毛细管
- (3) 立式层析缸、热吹风机
- (4) 玻璃喷雾器

四、实验步骤





四、实验步骤

注意事
项

1 . 铺板

称取 **2g** 硅胶 G ，在研钵中加入 **5ml** 0.5% 羧甲基纤维素钠，研磨成糊。



取洗净烘干的玻璃板一块，水平放置。在玻璃板的一端倒上调好的硅胶 G 糊，用玻璃棒将硅胶 G 糊刮向另一端，轻轻在玻璃板下端敲打，使硅胶 G 糊均匀分布，即成 1mm 厚的薄板。水平放置，室温干燥待用。

2 . 活化

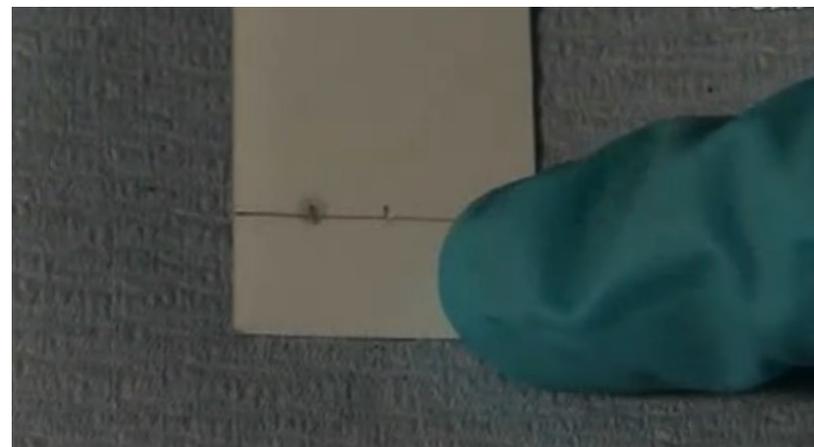
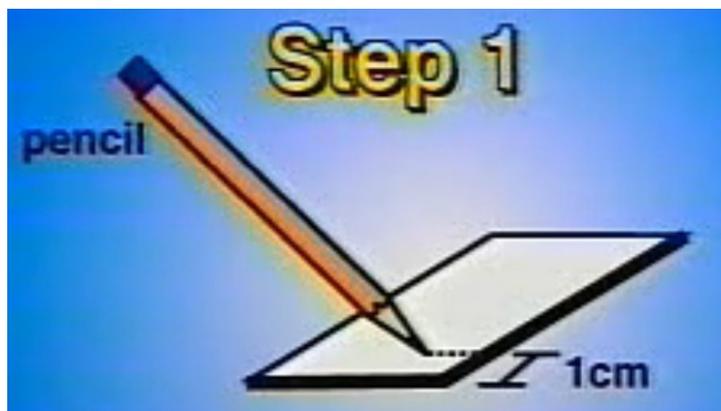
将薄板置 105°C 烤箱烘烤 60min 使活化，置干燥器备用。

四、实验步骤

3 . 点样

注意事
项

先在薄板上距离边缘 **1.5cm** 处划一条直线，确定点样位置。用**毛细管点样**，每个斑点点**两次**。点样时，毛细管与薄膜垂直方向轻轻碰点样处，每点在纸上扩散的直径不超过 **2mm**。点样过程中，必须在第一点样品干后再点第二滴。操作者需戴上**橡胶手套**。





四、实验步骤

4 . 展开

将适量展开剂倒入层析缸，加盖密闭，保持 10 分钟，使缸内展开剂蒸气达到饱和。将薄板放进层析缸（点样端朝下），注意点样线要高于展开溶剂液面，不能浸入。加盖密闭，进行层析。当展开剂前沿达到薄板 3/4 高度时（约 50min），将薄板自层析缸内取出，用铅笔在前沿处作一记号，然后用电吹风吹干。

四、实验步骤

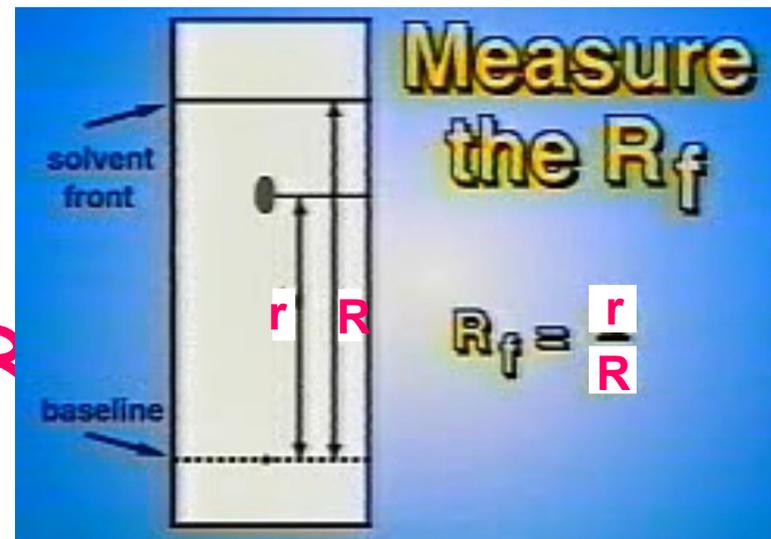
5 . 显色

用玻璃喷雾器向薄层板均匀喷洒 0.1% 茚三酮无水乙醇溶液。待乙醇挥干后，将薄板置 105℃ 烤箱中烘烤或者用热吹风机吹干，至呈现紫红色氨基酸斑点为止。用铅笔圈出氨基酸斑点，量出点样线至展开剂前沿的距离 R 及点样线至各斑点中心的距离 r ，计算迁移率 R_f 。



五、结果处理

$$R_f = \frac{\text{原点至斑点中心的距离 (} r \text{)}}{\text{原点至展开剂前沿的距离 (} R \text{)}}$$



标准氨基酸的 R_f 值 VS 混合氨基酸的 R_f 值



确定混合氨基酸中含有哪些种氨基酸。



六、思考题

1. 影响 R_f 值的因素？
2. 本实验在操作过程中有哪些方面是实验成功的关键？



参考答案

2. 影响 Rf 值的因素：

① 展层溶剂的样品组分的性质：

样品组分若在固定相中溶解度较大，在流动相中溶解度小，则 Rf 值小；反之，Rf 值大。

② 吸附剂的性质和质量。

③ 吸附剂的活度。

④ 薄层的厚度。

⑤ 层析槽的形状、大小和饱和度。

⑥ 展层方式。

⑦ 杂质的存在和量的多少。

⑧ 展层的距离。

⑨ 样品量。

⑩ 温度。

由于影响 Rf 值的因素很多，故不能仅根据 Rf 值来鉴定未知样品组分。一般采用几种薄层层析法来确证样品的未知组分，如一种用吸附薄层层析，另一种用聚酰胺薄层层析等。实践中，也可把未知样品与标准品混合点样，然后进行薄层层析。如果在几个不同类型的薄层层析中，两者都不发生分离，则可证明这两个化合物是相同的。

