



纸层析法分离氨基酸

南昌大学生物学实验教学中心 汪艳璐

实验目的

- 1、掌握分配层析的原理，学习氨基酸纸层析法的操作技术(包括点样、平衡、展层、显色、鉴定及定量)。
- 2、学习未知样品的氨基酸成分(水解、层析及鉴定)分析的方法。

实验原理

- 1、纸层析是以滤纸为惰性支持物的分配层析。滤纸纤维上的羟基具有亲水性，吸附一层水作为固定相，有机溶剂为流动相。当有机相流经固定相时，物质在两相间不断分配而得到分离。
- 2、溶质在滤纸上的移动速度用比移值***Rf***值表示：
- 3、 $Rf = \text{原点到层析斑点中心的距离} / \text{原点到溶剂前沿的距离}$
- 4、在一定的条件下某种物质的***Rf***值是常数。***Rf***值的大小与物质的结构、性质、溶剂系统、层析滤纸的质量和层析温度等因素有关。本实验利用纸层析法分离氨基酸。

实验材料与试剂

实验试剂

1、氨基酸标准液(1mg/mL)

亮氨酸、甘氨酸和脯氨酸标准液。

2、80%甲酸

3、0.1%茚三酮丙酮溶液

4、氨基酸混合液(每种氨基酸 500mg/mL)

5、正丁醇

实验器材

- 1、新华滤纸
- 2、培养皿
- 3、电热鼓风干燥箱
- 4、吹风机
- 5、毛细管
- 6、针、线、尺。
- 7、钟罩(高约430mm,直径约290mm，具磨口塞)

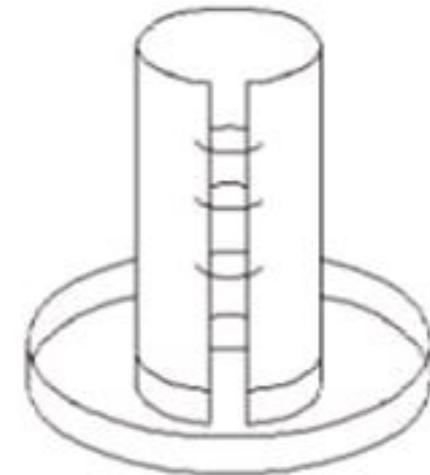
实验操作

标准氨基酸纸上层析

单向上行层析

氨基酸Rf值的测定

A、**滤纸**：选用国产新华1号滤纸， $6\text{cm} \times 7\text{cm}$ 。在距滤纸2cm处划线，用铅笔在线上标上四个点作为点样位子（留出缝线空间）。



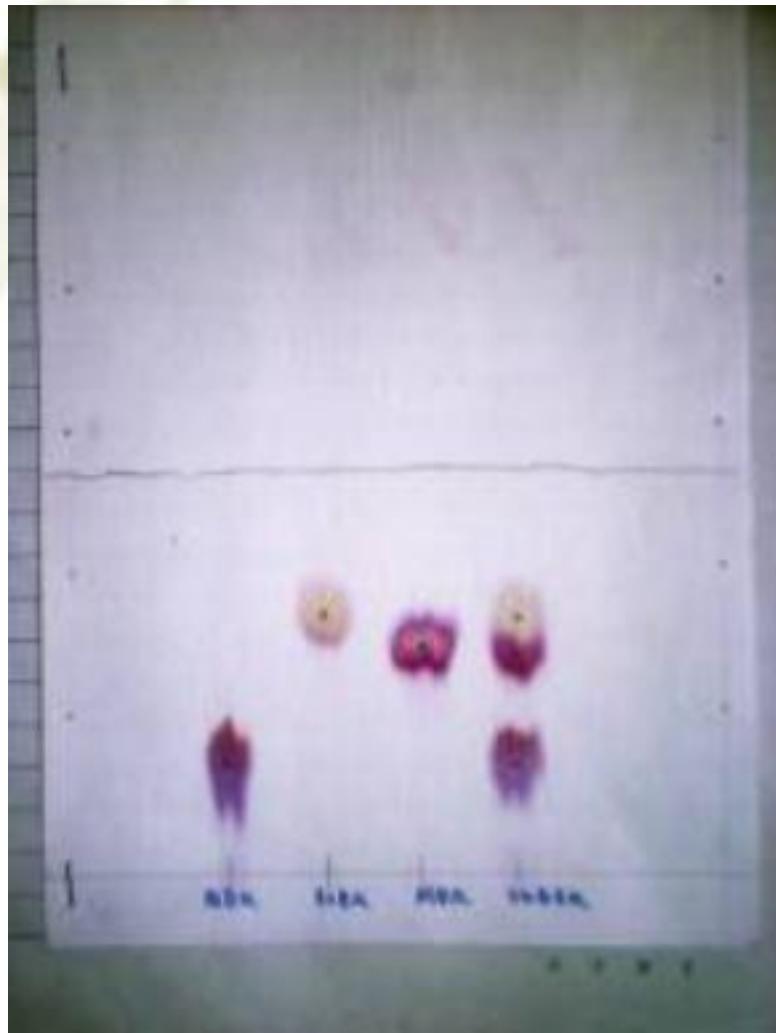
B、点样：点样要合适，样品点的太浓，斑点易扩散或拉长，以致分离不清。用毛细管吸取氨基酸样品，与滤纸垂直方向轻轻碰触点样处的中心，这时样品就自动流出。点样的扩散直径控制在**0.5cm**之内，点样过程中必须在第一滴样品**干**后再点第二滴，为使样品加速干燥，可用吹风机吹干，但要注意温度不可过高，以免氨基酸破坏，影响定量结果。

将点好样品的滤纸两侧比齐，用线缝好，揉成筒状。注意缝线处纸的**两边不要接触**。避免由于毛细管现象使溶剂沿两边移动特别快而造成溶剂前沿不齐，影响Rf值。

C、展层：将揉成圆筒状的滤纸放入培养皿内（注意滤纸不要碰皿壁），当溶剂展层至距离纸的上沿约1cm时，取出滤纸，立即用铅笔标出溶剂前沿位置

酸溶剂系统：正丁醇：80%甲酸：水=15:3:2(体积比)，茚三酮2ml。温度25°C，时间1h。

注意：使用的溶剂系统需新鲜配制，并要摇匀。



D、显色：待展层基本结
束后，置65°C鼓风箱中
10-20min，鼓风保温，
滤纸上即显出紫红色/
黄色斑点。

E、**Rf**值的计算：用尺测量显色斑点的中心与原点(点样中心)之间的距离和原点到溶剂前沿的距离，求出此值，即得氨基酸的**Rf**值。

计算出 3种氨基酸在酸系统中的**Rf**值，判断待测样组成。

	亮氨酸	甘氨酸	脯氨酸	待测氨基酸
原点到层析斑点中心的距离				
原点到溶剂前沿的距离				
Rf				
判断待测氨基酸				

注意

使用茚三酮显色法，必须在整个层析操作中避免手直接接触层析纸，因为手上常常有少量含氮物质。显色时它也呈现紫色斑点。污染了层析结果，因此操作时应戴橡皮手套或指套。同时也要防止空气中的氨。

思考题

- 1、为什么在展层时有时用一种溶剂系统，而有时用两种溶剂系统？
- 2、酸性溶剂系统(或碱性溶剂系统)对氨基酸极性基团的解离有何影响？
- 3、酸性溶剂系统(或碱性溶剂系统)对碱性氨基酸(赖、精、组)和酸性氨基酸(天冬、谷)的Rf值有什么影响？
- 4、什么是分配系数？