

## 2. Analiza fizykochemiczna peptydów

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. 1 mg badanego peptydu
2. Płytki chromatograficzne (10×20 cm) pokryte 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego
3. Układ rozwijający: BAWP (alkohol *n*-butylowy : kwas octowy : woda : pirydyna) o następującym składzie 1 : 1 : 1 : 1 (v/v/v/v)
4. Układ wywołujący: 1% roztwór ninhydryny w etanolu
5. Komora chromatograficzna do chromatografii cienkowarstwowej (TLC)
6. Kapilary
7. Kolba płaskodenna o pojemności 100 mL
8. Zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) wyposażony w kolumnę do rozdzielania w układzie faz odwróconych (C8)
9. 0,1 % roztwór kwasu trifluorooctowego (TFA) w wodzie (roztwór A)
10. 80% roztwór acetonitrylu (ACN) w roztworze A (roztwór B).
11. Strzykawka do HPLC o pojemności 50  $\mu\text{L}$
12. Probówki Eppendorfa

Wykonanie doświadczenia:

### 1. Analiza HPLC peptydu

W probówce Eppendorfa, rozpuścić 1 mg peptydu w wodzie z dodatkiem 0,1% TFA. Następnie pobrać z probówki 50  $\mu\text{L}$  roztworu w celu wykonania analizy HPLC. Peptyd poddać analizie stosując metodę z wykorzystaniem liniowego gradientu 20-80% roztworu B w ciągu 30 minut. Na podstawie otrzymanego chromatogramu określić objętość martwą kolumny oraz czas retencji analizowanego peptydu. Określić czystość peptydu, wyznaczyć współczynnik retencyjny  $k'$  oraz ilość pól teoretycznych kolumny.

### 2. Analiza jonu masowego (MS) i analiza elementarna peptydu

Pobrać z probówki kolejne 50  $\mu\text{L}$  rozpuszczonego peptydu i wykonać analizę jonu masowego w pracowni analiz fizykochemicznych. Przeprowadzić również analizę elementarną otrzymanego peptydu.

### 2. Analiza peptydu z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Na płytce chromatograficznej (**podczas wszystkich operacji należy unikać dotykania złoza płytki palcami**) w odległości 1 cm od brzegu narysować delikatnie miękkim ołówkiem linię, na której co 1,5 cm zaznaczyć punkty. W oznaczonych punktach nanieść kapilarą w kilku różnych objętościach roztwór peptydu. Odparować (do sucha) rozpuszczalniki strumieniem zimnego powietrza z suszarki do włosów. Włożyć płytkę do komory chromatograficznej nasyconej parami układu rozwijającego i pozostawić do momentu, gdy czoło układu rozwijającego osiągnie poziom około 2 cm od przeciwległego końca płytki. Po wyjęciu płytki z komory chromatograficznej niezwłocznie zaznaczyć ołówkiem poziom czoła układu rozwijającego, a następnie dokładnie wysuszyć płytkę za pomocą suszarki do włosów i spryskać (**pod włączonym wyciągiem!**) układem wywołującym (1% roztwór ninhydryny w etanolu) i ogrzewać. Na podstawie położenia pojawiających się plamek obliczyć wartości współczynników podziału ( $R_f$ ) dla badanych peptydów.

**Sprawozdanie z ćwiczenia powinno zawierać:** pełną charakterystykę fizykochemiczną peptydu (współczynnik  $R_f$ , czas retencji HPLC, współczynnik  $k'$  oraz ilość pól teoretycznych kolumny chromatograficznej użytej do rozdzielania, masę cząsteczkową peptydu oraz wyniki analizy elementarnej).