Ćwiczenie 2.2: Rozdział aminokwasów metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

1. Przygotowanie komór chromatograficznych z eluentem

1. Odbierz od asystenta komorę chromatograficzną do rozdziału aminokwasów.
2. Wlej kolejno do komory:
    - 8 mL *n*-butanolu,
    - 2 mL wody destylowanej,
    - 2 mL stężonego kwasu octowego (lodowatego).
3. Dokładnie wymieszaj zawartość komory, aby eluent był klarowny i przezroczysty.
   Uwaga: Jeśli roztwór jest mętny — natychmiast poinformuj asystenta. Nie wolno używać mętnego eluentu.
4. Przyklej do węższych ścianek komory paski bibuły filtracyjnej:
    - Zwilż paski przygotowanym eluentem, aby dobrze przylegały.
    - Użyj szklanej bagietki do dociskania bibuły — unikaj dotykania wnętrza komory palcami.
5. Szczelnie przykryj komorę szklaną płytką i odstaw na minimum 15 minut, aby ustabilizować warunki (równowaga fazowa).

2. Przygotowanie płytek TLC

1. **Najpierw wysłuchaj uwag asystenta** na temat obchodzenia się z płytkami TLC.
   Płytki łatwo adsorbują zanieczyszczenia na powierzchni, a warstwa sorbentu jest bardzo krucha.
   Dlatego:
    - pracuj w czystych rękawiczkach,
    - unikaj dotykania warstwy sorbentu,
    - obchodź się z płytkami ostrożnie, aby nie uszkodzić powierzchni.
2. Z płytki TLC (20 cm × 20 cm) wytnij paski o wymiarach 10 cm × 7,5 cm (zgodnie z instrukcją asystenta).
3. W rękawiczkach zaznacz delikatnie ołówkiem:
    - linię startu,
    - punkty aplikacji próbek aminokwasów i mieszaniny aminokwasów.
4. Zapoznaj się z wyjaśnieniami asystenta dotyczącymi właściwego nanoszenia linii startu oraz kolejności aplikacji próbek.

3. Nakrapianie próbek na płytki

1. **Do każdego aminokwasu i mieszaniny aminokwasów używaj osobnej, czystej kapilary!**
   Nigdy nie stosuj tej samej kapilary do różnych roztworów — unikniesz w ten sposób zanieczyszczeń i błędów w analizie.
2. Nanieś próbki na linię startu (krople ≤ 2 mm średnicy).
3. Zachowaj równe odstępy pomiędzy punktami.
4. Na każdą płytkę nanieś: wskazane przez asystenta roztwory aminokwasów.
5. Przećwicz technikę aplikacji na płytkach testowych przed nakrapianiem właściwym.

---

4. Rozdział aminokwasów

1. Wysusz płytki (suszarka do włosów, ciepły strumień) do całkowitego odparowania rozpuszczalnika.
2. Za pomocą pincety umieść płytkę w komorze:
    - linia startu musi być nad poziomem eluentu,
    - sorbent skierowany do wnętrza komory,

- płytka nie może dotykać bibuły na ściankach.

3. **Szczelnie przykryj komorę płytką szklaną, aby uniemożliwić dopływ powietrza z zewnątrz.** Dzięki temu warunki wewnątrz komory pozostaną stabilne, co zapewnia prawidłowy rozdział.
4. Nie poruszaj komory podczas rozdziału!
5. Wyjmij płytkę, gdy front eluentu osiągnie ~1 cm od górnej krawędzi.
6. Natychmiast zaznacz pozycję frontu ołówkiem i wysusz płytkę (do zaniku zapachu octu).

5. Wywoływanie plamek aminokwasów (wszystkie czynności wykonuj pod wyciągiem!)

1. **Przed spryskaniem płytki ninhydryną dokładnie ją wysusz suszarką, aż zapach octu nie będzie wyczuwalny.**
2. Upewnij się, że płytka jest całkowicie sucha.
3. Skrop obszar między linią startu a linią mety ninhydryną (aerozol lub rozpylacz).
4. Odczekaj ~2 minuty.
5. Podgrzewaj płytkę suszarką:
    - najpierw ciepłe powietrze,
    - potem gorące, aż pojawią się wyraźne barwne plamki aminokwasów.

---

6. Opracowanie wyników

1. Oblicz współczynniki Rf dla wszystkich widocznych plamek.
2. Wspólnie stwórz tabelę z wartościami Rf: wzorcowych aminokwasów,
3. Porównaj wartości i zidentyfikuj aminokwasy obecne w próbkach.