

Tenkovrstvová chromatografia (TLC) je jednoduchá a efektívna technika na separáciu a analýzu zmesí zlúčenín. Pri meraní menachinónu-7 (MK-7) môže TLC poskytnúť vizuálnu indikáciu prítomnosti tejto zlúčeniny v extraktoch a približné kvantitatívne údaje na základe porovnania s referenčnými vzorkami. Tu je podrobný postup, ktorý študenti môžu nasledovať:

## Materiály a zariadenia

1. **TLC platničky** (silikagélové alebo alumíniové)
2. **Stojan na chromatografiu**
3. **Rozpúšťadlá** (napr. hexán, etylacetát, metanol)
4. **Mikropipety a pipety**
5. **Vzorky obsahujúce MK-7** (extrakty z fermentovaných produktov, ako je natto alebo tempeh)
6. **Štandardný roztok MK-7** (pre porovnanie)
7. **UV lampy** (pre vizualizáciu)
8. **Fixátor (napr. etanol alebo aceton)** na zastavenie separácie
9. **Krycí film** (na ochranu platničiek pred prachom)
10. **Odmerné valce a miešadlá**
11. **Miska na odpad** (na vyhodenie použitých platničiek a chemikálií)

## Postup

### 1. Príprava vzoriek

- **Príprava extraktov:** Ak študenti pracujú s fermentovanými produktmi, mali by najprv pripraviť vzorky. Napríklad:
  - Odmerajte 10 g produktu (napr. natto alebo tempeh).
  - Pridajte 50 ml etanolu a miešajte pri izbovej teplote počas 30 minút.
  - Zmes prefiltrujte cez filtračný papier, aby ste odstránili pevné častice.
- **Príprava štandardného roztoku MK-7:**
  - Získajte štandardný roztok MK-7 s presne znášanou koncentráciou (napr. 1 mg/mL).
  - Dilujte na potrebnú koncentráciu (napr. 0,1 mg/mL) pre analýzu.

### 2. Príprava TLC platničiek

- **Nanášanie vzoriek:**
  - Na každú TLC platničku nakreslite jemnú líniu (pomocou ceruzky) približne 1 cm od spodného okraja platničky. Toto je vaše "spot" línia.
  - Naneste malé množstvo vzorky a štandardného roztoku MK-7 na líniu. Použite mikropipetu alebo kapilárnu rúrku na nanášanie.
  - Zabezpečte, aby ste na platničku naniesli dostatočne malé množstvá (1-2  $\mu$ L) a nechajte ich uschnúť.

### 3. Príprava chromatografickej komory

- **Rozpúšťadlový systém:**
  - Pripravte si zmiešané rozpúšťadlo (napr. hexán a etylacetát v pomere 3:1).
  - Naplňte chromatografickú komoru (napr. misku alebo sklenenú nádobu) na niekoľko milimetrov tak, aby sa rozpúšťadlo nedotýkalo línií, kde sú vzorky.

### 4. Chromatografia

- **Separáčna fáza:**
  - Vložte TLC platničku do chromatografickej komory tak, aby sa ponorila do rozpúšťadla (ale nie na líniu s nanesenými vzorkami).

- Uzavrite komoru a nechajte plochu dýchať počas 20-30 minút, kým rozpúšťadlo postúpi na vrchol platničky.
- Keď sa rozpúšťadlo dostane blízko k hornému okraju platničky, vyberte platničku a nechajte ju uschnúť.

### 5. Vizualizácia a analýza

- **Fixácia:**
  - Ak je to potrebné, nastriekajte alebo namočte platničku do fixátora (napr. etanol) na 10 sekúnd a nechajte ju zaschnúť.
- **Pozorovanie pod UV lampou:**
  - Vložte platničku pod UV lampu (254 nm) a pozorujte škvryny. MK-7 by sa mal javiť ako fluorescenčný bod.

### 6. Vyhodnotenie výsledkov

- **Porovnanie so štandardom:**
  - Porovnajte fluorescenčné body vzoriek s fluorescenčnými bodmi štandardného roztoku MK-7.
  - Na základe intenzity fluorescencie môžete odhadnúť množstvo MK-7 vo vzorke v porovnaní so štandardom.

### Poznámky

- **Bezpečnostné opatrenia:** Pri práci s chemikáliami je dôležité nosiť ochranné brýle, rukavice a plášť.
- **Dokumentácia:** Študenti by mali zaznamenať všetky použité vzorky a ich koncentrácie, ako aj pozorovania z chromatografie.

Tento postup poskytuje základ pre analýzu MK-7 pomocou TLC a umožňuje študentom získať praktické zručnosti v oblasti mikrobiológie a chromatografie.