

PRIMA ESERCITAZIONE

SEPARAZIONE DI UNA MISCELA CAFFEINA E BENZOATO DI SODIO

Si lavora in gruppi (un gruppo per banco)

Occorrente: occhiali; mascherina; guanti; spatola; 2 beute da 100 ml; imbuto, imbuto separatore; sostegno con anello; provette e portaprovette; becker da 25 ml; cilindro da 50 ml:

Preparazione: sciogliere 0,5 g della miscela caffeina sodio benzoato (4-5 punte di spatola) in 3 ml di NaOH 2N, e diluire con circa 30 ml di acqua.

Utilizzando un imbuto, trasferire la soluzione nell' imbuto separatore: aggiungere 25 ml di cloruro di metilene, chiudere l'imbuto separatore con il tappo ed effettuare l'estrazione. Lasciare stratificare i due solventi (CH_2Cl_2 è più denso e si posiziona in basso). Si toglie il tappo dell'imbuto separatore, si pone una beuta da 100 ml sotto il gambo dell'imbuto e si apre il rubinetto facendo scendere la soluzione organica. Si chiude il rubinetto dell'imbuto quando il menisco di separazione delle due fasi raggiunge il rubinetto. Si esegue una seconda estrazione con altri 25 ml di CH_2Cl_2 unendo la seconda fase organica (CH_2Cl_2) a quella della prima estrazione.

NB: La tecnica per eseguire le estrazioni verrà illustrata prima di iniziare l'esperienza.

Le fasi organiche riunite contengono la caffeina.

La fase acquosa alcalina contenente il benzoato di sodio viene raccolta in un'altra beuta pulita.

REAZIONI DI RICONOSCIMENTO CAFFEINA

A 5 ml della soluzione di CH_2Cl_2 aggiungere 2 ml di HCl 2M; dopo agitazione e stratificazione delle due fasi, si aggiungono poche gocce di potassio iodobismutato (Reattivo di Druggendorf) alla fase acquosa: si forma immediatamente un precipitato rosso-arancio.

REAZIONI DI RICONOSCIMENTO BENZOATO DI SODIO

1) Una porzione della soluzione acquosa alcalina viene acidificata con HCl 2M: si forma un precipitato bianco di acido benzoico.

2) Ad 1 ml della soluzione acquosa, portata a pH neutro con HCl 2M si aggiunge la soluzione di FeCl_3 : il precipitato salmone che si forma si scioglie in etere; la soluzione eterea si colora di rosso.

LE SOLUZIONI ACQUOSE SI SMALTISCONO NELL'APPOSITO CONTENITORE PRESENTE IN LABORATORIO.

LE SOLUZIONI DI CHCl_3 SI SMALTISCONO NELL'APPOSITO CONTENITORE ALLESTITO IN UNA DELLE CAPPE ASPIRANTI.

SAGGI DI SOLUBILITA' E CARATTERISTICHE ACIDO/BASE. (individuale)

Occorrente: mascherina; guanti; occhiali; provette; portaprovette; bacchetta di vetro; cartina indicatrice di pH.

Una sostanza è definita “solubile” in un determinato solvente se 1 g di essa si scioglie in 10-30 cc ad una temperatura di 15-25°C. (equivale a circa 30 mg – una punta di spatola - in circa 1-2 ml di solvente)

Per provare la solubilità mettere in una provetta una punta di spatola di sostanza (eventualmente ridotta prima a polvere fine nel mortaio) e 1 ml (20 gocce) del solvente in esame. Agitare con decisione anche per 2-3 minuti. Se si ha una sola fase omogenea e limpida si ha completa solubilità.

I due solventi più usati sono l'acqua e l'etere etilico. Le prove di solubilità in etere etilico vanno eseguite in cappa aspirante.

Per determinare le caratteristiche acido/base di una sostanza si opera come segue:

Si saggia la sua solubilità in acqua ed in etere etilico.

Se la sostanza è solubile in acqua, va determinato il pH, bagnando nella soluzione ottenuta una bacchetta di vetro e umettando con essa una cartina indicatrice di pH. Si usano cartine universali con pH 1-14.

Se la sostanza è insolubile in acqua e solubile in etere etilico, si saggia la sua solubilità in HCl 2N, NaHCO₃ sat., Na₂CO₃ sat. e NaOH 2N (in questo ordine!!). Dalle prove di solubilità ricavare il carattere acido/base della sostanza saggiata.

NOTA BENE: se la sostanza risulta solubile in NaHCO₃, NON vanno effettuate le prove di solubilità in Na₂CO₃ e NaOH. Se la sostanza risulta solubile in Na₂CO₃, NON vanno effettuate le prove di solubilità in NaOH.

SAGGIARE LA SOLUBILITA' IN H₂O, etere etilico, NaHCO₃ sat, Na₂CO₃ sat, NaOH 2N, HCl 2N DI ALCUNE DELLE SEGUENTI SONTANZE, IDENTIFICARNE LE CARATTERISTICHE ACIDO/BASE:

Acido benzoico; acido salicilico; Acido tartarico; Benzocaina; Metile-p-idrossibenzoato; Saccarosio; Acido citrico; Acido acetilsalicilico; Mannitolo; Glucosio; Caffèina.

LE SOLUZIONI ACQUOSE SI SMALTISCONO NELL'APPOSITO CONTENITORE PRESENTE IN LABORATORIO.

LE SOLUZIONI ETeree SI SMALTISCONO NELL'APPOSITO CONTENITORE ALLESTITO IN UNA DELLE CAPPE ASPIRANTI.

SECONDA ESERCITAZIONE

SUBLIMAZIONE (individuale)

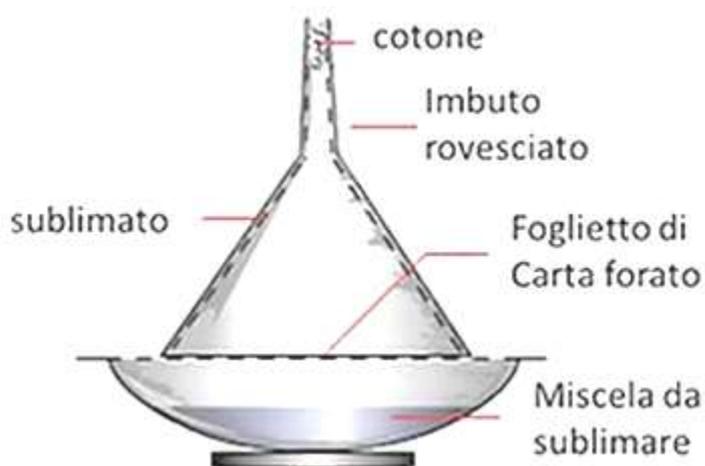
Sublimazione del cloruro di ammonio: separazione da una miscela cloruro di ammonio/carbone:

Da eseguire in gruppi di 2-3 studenti

Occorrente: mascherina; occhiali di protezione; guanti; 2 vetrini da orologio puliti, un imbutino pulito il cui gambo viene tappato all'estremità con un batuffolino di ovatta o di carta, spatola.

Accendere la piastra riscaldante a circa 150-200°C. Mettere 2-3 spatolate di miscela NH_4Cl /carbone in un vetrino da orologio e coprire con l'imbutino. Mettere il tutto sulla piastra riscaldante calda (utilizzando le pinze di metallo) e scaldare per ottenere la sublimazione di NH_4Cl . Con le pinze di metallo allontanare dalla piastra l'apparecchio per la sublimazione e poggiarlo sul cubo/parallelepipedo di legno (attenzione non poggiarlo sul banco, l'escursione termica troppo rapida potrebbe rompere il vetrino). Lasciar raffreddare l'apparecchio sublimatore; togliere il batuffolo di cotone dal gambo e recuperare in il sublimato grattandolo dalle pareti dell'imbutino con la spatola e facendolo scendere nel gambo dell'imbuto in un vetrino pulito.

Se la quantità di sublimato è sufficiente raccoglierlo in un contenitore.



Cristallizzazione dell'acido benzoico da acqua:

Occorrente: Mascherina; occhiali di protezione; guanti; beuta da 25 ml; bacchetta di vetro; pinze di legno; imbutino di vetro; carta da filtro; portaprovette e una provetta,

3-4 spatolate abbondanti di ac. benzoico vengono poste in una beuta da 25 ml. Nella beuta deve essere aggiunta una quantità di acqua tale da lasciare abbondante corpo di fondo a freddo ma portata all'ebollizione deve essere in grado di sciogliere la sostanza. **NOTA:** Non riempire mai la beuta più di 1/3 del suo volume.

Per ottenere questo si aggiunge una piccola quantità di H₂O. Ci si reca alla cappa e si riscalda all'ebollizione la sospensione agitando continuamente prendendo la beuta con una pinza di legno (non di metallo) o con una cravattina di carta. Se all'ebollizione la sostanza non risulta disciolta, si deve aggiungere ancora acqua in piccole quantità, riportare il tutto all'ebollizione, finché la dissoluzione è completa. Tutta la fase di riscaldamento della soluzione di acido benzoico si effettua sotto cappa. A dissoluzione completata all'ebollizione allontanare la beuta dalla piastra ed attendere il lento raffreddamento.

Si osserva la precipitazione di acido benzoico in scaglie iridescenti.

Se la sostanza non riprecipita significa che il volume di solvente aggiunto è eccessivo per la quantità di sostanza utilizzata. In questo caso bisogna concentrare la soluzione (per ebollizione) e attendere il raffreddamento.

Si prepara il filtro a pieghe, lo si pone nell'imbutino e l'imbutino a sua volta si pone su una provetta pulita.

Si raccoglie in maniera quantitativa tutto il cristallizzato sul filtro a pieghe e il filtrato (acque madri di cristallizzazione) nella provetta.

Il cristallizzato si lava con H₂O distillata fredda (2 lavaggi da circa 1-2 ml).

Si lascia asciugare a T ambiente; quando il cristallizzato è secco si controlla la purezza determinando il pf.

Le acque di cristallizzazione si scartano nel recipiente per lo smaltimento delle soluzioni.

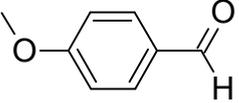
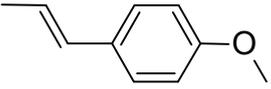
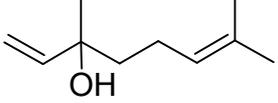


ANALISI TLC DEI SEMI DI ANICE (*PIMPINELLA ANISUM*). (un gruppo per banco)

Campioni da analizzare

- Anice frutto, preparazione della soluzione in esame: Agitare circa 0,10 g di droga polverizzata con 2 ml di diclorometano per 15 min e filtrare con pipetta Pasteur mediante batuffolo di ovatta.

Sostanze di riferimento

para-anisaldeide	p-A	
trans-anetolo	t-A	
linalolo	L	

Fase stazionaria – Gel di Silice F₂₅₄

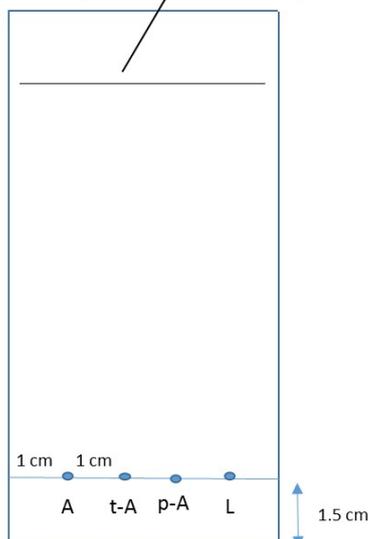
Fase Eluente – Toluene 93% / Etile acetato 7%



Preparare una vaschetta cromatografica, di dimensioni adatte alla lastrina, con circa 15 ml di miscela eluente (Toluene 93% / Acetato di etile 7%) ed un foglietto di carta assorbente (circa 10 x 10cm); chiudere ed agitare per bagnare il foglietto di carta.

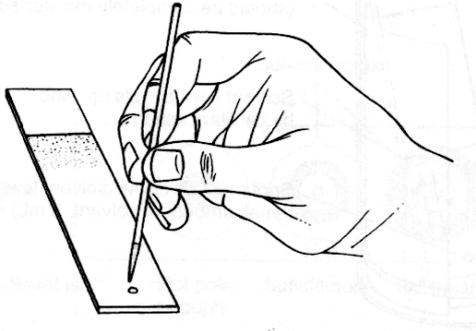
Preparare una lastrina TLC in gel di silice fluorescente a 254nm di dimensioni 5 x 10 cm; su un lato corto tracciare una linea sottile (senza incidere la silice) ad 1,5 cm circa dal bordo.

A fine corsa cromatografica
Segnare con una linea il
fronte del solvente

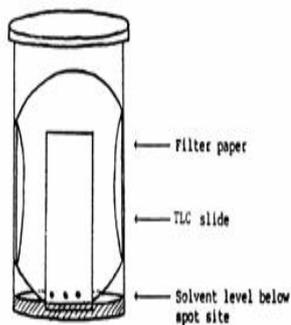


Sulla linea segnare 4 punti distanti tra loro circa 1 cm e quelli esterni a distanza di 1 cm dai bordi. Scrivere sotto questi punti i campioni che vi verranno depositati: Miscela da analizzare **A** per il primo punto, i composti standard **p-A**, **t-A** e **L** per gli altri.

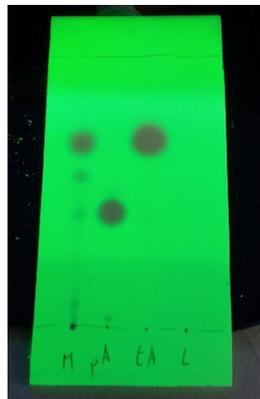
Con dei capillari sottili deporre su ogni punto piccole aliquote della corrispondente soluzione. Utilizzare un capillare esclusivamente per un campione (evitare di inquinare le miscele e gli standard).



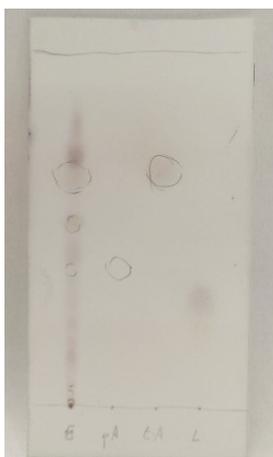
Porre la lastrina nella vaschetta cromatografica con la parte seminata posta in basso; chiudere la camera e far correre l'eluente fino a circa un cm dal bordo superiore. Non aprire o muovere la camera durante l'eluizione.



Al termine aprire, estrarre la lastrina, segnare con una linea il fronte del solvente e asciugare la lastrina con l'aiuto di un phon sotto cappa.



Osservare alla luce UV-254nm la lastrina e segnare delicatamente con la matita le macchie osservabili nel campione e negli standard.



Sotto cappa immergere la lastrina in una soluzione di Vanillina solforica lasciar asciugare qualche minuto e scaldare su una piastra tra 100 e 120 °C per 5-10 min.

Lasciar raffreddare e segnare le nuove macchie comparse.

Confrontare le macchie presenti nei campioni A e B rispetto agli standard.

TERZA ESERCITAZIONE

CALCINAZIONE (individuale)

OPERARE LA CALCINAZIONE SOTTO CAPPA

Occorrente: Mascherina; occhiali di protezione; guanti; capsula o crogiolo di porcellana; spatola.

Con questo saggio per via secca si può capire se la sostanza solida è:

ORGANICA: ad es. acido benzoico

INORGANICA: ad es. ZnO

METALLORGANICA (anione organico, catione inorganico): ad es. Calcio pantotenato.

Si mettono nel crogiolo 1-2 punte di spatola di sostanza (si consiglia di non eccedere con la quantità).

Prendere il crogiolo con le pinze di metallo. Si va alla cappa e si scalda sulla fiamma ossidante del bunsen, prima blandamente (ci può essere la proiezione di materiale dovuto alla perdita di acqua o alla decomposizione della sostanza) poi più vivacemente, fino a completa calcinazione.

SOSTANZE ORGANICHE: le sostanze organiche hanno come caratteristica comune quella di CARBONIZZARE. Se il riscaldamento viene continuato, la parte carboniosa viene ulteriormente ossidata e il carbone si trasforma in CO₂. Quindi alla fine della calcinazione la sostanza organica deve lasciare il crogiuolo **PULITO**. Di solito i vapori delle sostanze organiche prendono fuoco più o meno spontaneamente. Alcune sostanze organiche lasciano un residuo vetroso nero omogeneo. Il residuo non deve dare colorazione alla fiamma.

METALLORGANICA: prendono fuoco più o meno spontaneamente, e anche dopo 15-20 minuti di riscaldamento lasciano dei residui inorganici (minerali). Di solito è difficile ottenere una mineralizzazione completa: normalmente i residui lasciati sono simili alla cenere di una sigaretta: il colore grigio finale è dovuto a due componenti: la parte organica nera per i residui carboniosi e il bianco dei sali minerali. E' utile saggiare le ceneri con il filo di Pt per osservare la colorazione della fiamma ed acquisire informazioni sui cationi presenti nella sostanza.

NB: il calcio glicerofosfato e il calcio fosfato non danno colorazione rossa perchè con il riscaldamento si forma calcio ortofosfato che non da colorazione.

INORGANICHE: l'unica sostanza inorganica che prende fuoco è il sodio tiosolfato: dà affioramenti gialli di zolfo che si incendiano con esalazioni acri di anidride solforosa. Le altre sostanze della FU, restano inalterate, danno qualche scoppietto oppure sublimano ma senza prendere fuoco (NH₄Cl), o fondono rigonfiando (borace, H₃BO₃), oppure cambiano colore diventando gialle (ZnO, TiO₂). L'ossido di zinco torna bianco dopo raffreddamento.

DETERMINAZIONE PUNTO DI FUSIONE CON IL METODO DEL CAPILLARE (individuale)

Occorrente: mascherina; guanti; spatola, capillari chiusi per pf, coccio di porcellana porosa.

METODO DEL CAPILLARE CON IL PRERISCALDAMENTO

Per punto di fusione con preriscaldamento s'intende che la sostanza deve essere messa nel blocco riscaldante circa 5°C prima dell'inizio della fusione ed il riscaldamento dovrebbe essere regolato in modo tale che la temperatura salga di circa 1°C al minuto. Segnare l'intervallo di temperatura tra l'inizio della fusione e la fine di questa.

Se la sostanza non fonde, ma si decompone dando sostanze più o meno colorate, si segna l'intervallo di questa trasformazione e si dice che il punto di fusione è con decomposizione indicando la temperatura con accanto la dizione "dec" o "d".

Attenzione: non farsi ingannare dal fenomeno del rammollimento. Questo fenomeno che si riscontra nel comportamento di alcune sostanze consiste nella trasformazione del cristallo che collassa, rassomigliando ad una spugna strizzata con tutto il liquido intorno. Questo non è il punto di fusione, ma viene definito punto di rammollimento.

Preparazione del campione per l'esecuzione del punto di fusione

Pulire un coccio di porcellana con un pezzo di carta assorbente (non bagnare con acqua).

Mettere sul coccio di porcellana pulito 1 punta di spatola di sostanza e polverizzare i cristalli schiacciando con la parte piatta di una spatola.

Riempire il capillare chiuso (se necessario aiutandosi con una spatola) fino a far depositare sulla fondo una colonnina di circa 2 mm di altezza.

Tenendo la parte chiusa verso il basso, far cadere il capillare nel tubo di plastica o di vetro per far assestare tutto il campione verso il fondo del capillare.

Determinazione del punto di fusione di una sostanza a p.f. ignoto

Se non si ha alcuna idea sul punto di fusione di una sostanza, bisogna preparare 3 capillari carichi ed eseguire le seguenti operazioni.

1 **Primo capillare**: si inserisce il **primo capillare**, si riscalda innalzando la temperatura rapidamente (5°C/min); si ottiene una misura indicativa sul punto di fusione della sostanza (quello reale sarà leggermente più basso di quello osservato in questa misura rapida). Immaginiamo di ottenere un valore di 130-135°. Si lascia raffreddare l'apparecchio fino ad almeno 20 °C al disotto del valore osservato (fino a 110-115°C).

2 Si riaccende il riscaldamento regolando la velocità di riscaldamento in modo tale che la temperatura salga di 1-3°C/min.

3 Si inserisce nel blocco il **secondo capillare**: questa operazione fornirà un dato più affidabile. Immaginiamo di aver ottenuto 124-125°C. Si fa raffreddare lo strumento di circa 10°C.

- 4 Si regola la velocità di riscaldamento in modo tale che la temperatura salga di 1°C al minuto. Il **terzo capillare**: si inserisce nel blocco quando questo ha raggiunto la temperatura di 119-120°C.
- 5 Si legge il punto di fusione.

Determinazione del punto di fusione di una sostanza a p.f. noto

Avendo idea del pf della sostanza si evita la misurazione con riscaldamento rapido. Si preriscalda l'apparecchio fino a 10°C al disotto del pf della sostanza; si imposta la velocità di riscaldamento a 1-3 °C/min, si inserisce il primo capillare e si determina il pf. Lasciar raffreddare e ripetere l'operazione per confermare la misura.

ES.

Acido benzoico (p.f.=121-124°C).

Preparare due capillari.

Scaldare lo strumento rapidamente fino a 115-116°C.

Mettere il capillare e abbassare la velocità di riscaldamento a 1-3°C al minuto.

Determinare il punto di fusione.

Ripetere

QUARTA ESERCITAZIONE

RICONOSCIMENTO GRUPPI FUNZIONALI (individuale)

Occorrente: mascherina; occhiali; guanti; spatola; provette; portaprovette; cartina indicatrice di pH.

RICONOSCIMENTO DEGLI ESTERI CON SAGGIO DI ANGELI RIMINI Etile acetato

Mettere 3-4 gocce di acetato di etile in una provetta. Aggiungere una punta di spatola di idrossilamina cloridrato ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) solida. Aggiungere una minima quantità di acqua ed alcalinizzare con NaOH 2N fino a pH 7.5-8. Riscaldare a bagnomaria fino a completa solubilizzazione. Raffreddare e acidificare con HCl 2N. Aggiungere alcune gocce di soluzione di cloruro ferrico. Si avrà una colorazione violetta dovuta all'idrossammato ferrico.

NB: se si aggiunge la soluzione di FeCl_3 alla soluzione alcalina si avrà il precipitato di $\text{Fe}(\text{OH})_3$ di colore ruggine. Riacidificando si forma l'idrossammato ferrico di colore violetto.

RICONOSCIMENTO DELLE ALDEIDI CON SAGGIO DI FEHLING Glucosio

Mettere una spatolata di glucosio in una provetta. Aggiungere 0.5 ml di una soluzione denominata Fehling A e 0.5 ml di una soluzione denominata Fehling B. Mettere la soluzione a scaldare a bagnomaria. Dopo qualche minuto si ha la precipitazione di Cu_2O di colore rosso-mattone.

NB: L'eventuale colorazione verde è dovuta a reazioni secondarie ed indica saggio negativo.

RICONOSCIMENTO DEI CHETONI CON SAGGIO DELLO IODOFORMIO Acetone

10-15 gocce di acetone sono messe in una provetta. Si aggiungono circa 15 gocce di NaOH 2N e, quindi, goccia a goccia e agitando, una soluzione di I_2 al 10% in KI acquoso al 20%, fino a persistenza di un lieve eccesso di iodio (colore rosso-bruno della soluzione). Si scalda la provetta a bagnomaria e si continua l'aggiunta della soluzione fino ad ottenere nuovamente una colorazione rosso-bruna persistente per circa 2 minuti. Con l'aggiunta di poche gocce di NaOH 2N sotto agitazione si elimina l'eccesso di iodio e si lascia raffreddare la soluzione decolorata. Lo iodoformio precipita come solido cristallino giallo.

RICONOSCIMENTO DEI FENOLI CON CLORURO FERRICO Resorcina

Ad una piccola quantità di fenolo o resorcina sciolto in 1 ml di acqua o di etanolo, si aggiungono 1-2 gocce di una soluzione acquosa o alcolica al 3% di FeCl_3 e si osserva la variazione di colore.

RICONOSCIMENTO DEI CARBOIDRATI CON SAGGIO DI MOLISH Glucosio

Mettere una punta di spatola di glucosio nella provetta e sciogliere nella minima quantità di H_2O . Aggiungere 2-3 gocce di α -naftolo e **LAVORANDO ALLA CAPP** eseguire le seguenti operazioni cercando di NON AGITARE la provetta: tenendo la provetta con la pinza e lontano dagli occhi si fa

scivolare qualche goccia di H_2SO_4 concentrato lungo la parete della provetta. All'interfaccia tra H_2SO_4 e H_2O si forma un anello di colore rosso violetto.

RICONOSCIMENTO DI AMMINOACIDI CON NINIDRINA

Sodio glutammato

Mettere una punta di spatola di glutammato di sodio nella provetta. Sciogliere nella minima quantità di H_2O . Aggiungere qualche goccia di ninidrina e scaldare a bagnomaria. Il saggio è positivo se compare lentamente una colorazione violetta.

NB: la ninidrina macchia la pelle! usare i guanti durante l'esecuzione del saggio e il lavaggio della provetta.

RICONOSCIMENTO DI ALCALOIDI

Caffeina

Disciogliere in 5 ml di acqua posti in provetta qualche milligrammo di sostanza in esame, acidificare con HCl 2M e quindi aggiungere 1 ml di potassio iodobismutato. Si forma immediatamente un precipitato arancio o rossoarancio.

RICONOSCIMENTO DI AMMINE PRIMARIE AROMATICHE

Sulfamerazina

In una provetta contenente circa 2 ml di acqua aggiungere una punta di spatola della sostanza da analizzare. Acidificare la soluzione con HCl 2M e aggiungere 0,2 ml di sodio nitrito soluzione. Dopo 1 o 2 min, aggiungere 1 ml di β -naftolo soluzione: si sviluppa una colorazione arancione o rossa intensa e generalmente si forma un precipitato dello stesso colore.

RICONOSCIMENTO DI BENZOATI

Sodio benzoato

In una provetta, aggiungere una punta di spatola della sostanza in esame e 1 ml di acqua. Aggiungere 0,5 ml di cloruro ferrico soluzione. Si forma un precipitato giallo-pallido, solubile in etere.

RICONOSCIMENTO DI SALICILATI

Sodio salicilato

Preparare 1 ml di soluzione contenente la sostanza in esame e acqua. Aggiungere 0,5 ml di cloruro ferrico soluzione. Si forma una colorazione violetta che persiste dopo aggiunta di 0,1 ml di acido acetico 2M.

RICONOSCIMENTO DI TARTRATI

Ac. tartarico

A) Disciogliere circa 15 mg della sostanza in esame in 5 ml di acqua. Aggiungere 0,05 ml di una soluzione solfato ferroso e 0,05 ml di idrogeno perossido soluzione diluita. Si forma una colorazione gialla che svanisce rapidamente. Quando questa colorazione è svanita aggiungere, goccia a goccia, NaOH 2M. Si sviluppa una colorazione violetta o porpora.

ESECUZIONE DI UNA CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (un gruppo per banco)

IDENTIFICAZIONE CALCIO PANTOTENATO

Occorrente: occhiali; guanti; mascherina; tubicini da saggio; cubo di legno; vaschetta cromatografica; lastre TLC (gel di silice).

3 campioni: **a, b, c**;

2 soluzioni di riferimento: **R_a** - calcio pantotenato; **R_b** – acido 3-amminopropionico.

Preparare 3 tubicini da saggio segnati rispettivamente **a, b, c** contenenti ognuno una puntina di spatola di sostanza in esame (**a, b o c**) e aggiungere in ognuno 0.5 ml di etanolo (10 gocce).

Su una lastra cromatografica di gel di silice (5x10cm), con una matita, segnare una linea parallela alla base a circa 1,5 cm dalla base stessa. E' bene non calcare per non rovinare lo strato sottile di silice. Si segnano 5 punti equidistanti sulla linea disegnata. *Attenzione, i punti esterni non devono essere a meno di 1 cm dal lato della lastrina!*

Con un capillare si depone la soluzione del campione **a**, sul secondo una goccia della soluzione **b**, sul terzo una goccia della soluzione **c**, sul quarto una goccia della soluzione di riferimento **R_a** e sul quinto una goccia della soluzione di riferimento **R_b**. Sotto ogni punto si consiglia di scrivere a matita con cautela **a, b, c, R_a** e **R_b** rispettivamente.

La lastrina è posta in una camera cromatografica nella quale è presente l'eluente (1 cm max!) costituito da una miscela H₂O/Etanolo 35:65. Si eluisce con la camera cromatografica ben chiusa evitando movimenti della stessa. Quando il livello dell'eluente è arrivato a circa 1 cm dalla sommità della lastrina, quest'ultima viene prelevata dalla camera e con una matita si segna il fronte del solvente.

Lasciare asciugare la lastra TLC sotto cappa e poi spruzzare con una soluzione di ninidrina (mettere la lastra TLC su un foglio di carta e poi spruzzare); scaldare leggermente la lastra dopo averla spruzzata.

Identificare quale dei campioni (**a, b o c**) è calcio pantotenato, ed identificare in esso l'impurezza (acido 3-amminopropionico).