

TAIMELEHEPIGMENTIDE KROMATOGRAAFILINE UURIMINE

Tööjuhendi koostaja: Rudolf Bichele, täiendanud Jaanus Uibu
Tartu Ülikool, Teaduskool

TAUSTAINFO – KUIDAS TUVASTADA PIGMENTE

Õhukese kihi kromatograafia (ingl k *thin layer chromatography*, TLC) on meetod segus olevate ainete tuvastamiseks. Selleks läheb vaja inertse, poorse ainega (tavaliselt silikageeliga) kaetud õhukest metallplaati, voolutamislõud (tavaliselt keeduklaas) ja voolutit (vett või sobivat orgaanilist lahust). Uuritav segu kantakse plaadile märgitud stardijoonele ja asetatakse plaat voolutit sisaldavasse nõusse, nii et selle alumine serv on vooluti sees. Nõu kaetakse fooliumiga ja oodatakse, kuni vooluti nivoo tõuseb kapillaarjõu toimele plaadi ülaserava lähedale. Sealjuures liiguvad segu lahustuvad komponendid plaadil erineva kiirusega (vähem lahustuva aine molekulid veedavad rohkem aega plaadiga seostunult ja vähem aega koos voolutiga mööda plaadi kapillaare üles liikudes), jäädes plaadile üksteisest eristuvate laikudena. Kohe pärast plaadi voolutist väljavõtmist märgitakse plaadile front, milleni vooluti jõudis. Nüüd saame lihtsa mõõtmise ja jagamistehte abil (kaugus stardijoonest vastava laigu keskmeni jagatud stardijoonest ja fronti kaugusega) leida iga plaadil eristunud aine jaoks R_f väärtuse (**retentsioonikoefitsient**, ingl k *retention factor*), mis väljendab selle aine eripärast liikumiskiirust antud plaadil ja voolutis. Mida suurem on R_f väärtus, seda kiiremini on aine molekulid koos lahustiga mööda plaati ülespoole liikunud, samas kui väiksema R_f väärtusega ainete molekulid on olnud tugevamini seotud plaadi pinnamaterjaliga. R_f väärtused jäävad alati 1 ja 0 vahele. Teades kindlate ainete R_f väärtusi antud tingimuste korral ja nende värvust, saame R_f kaudu hinnata nende ainete leidumist uuritavas segus – käesoleva katse puhul pigmentide leidumist taimellehtede ekstraktis.

Meetodi täpsem kirjeldus leidub näiteks lehel

https://et.wikipedia.org/wiki/%C3%95hukese_kihi_kromatograafia.

TÖÖJUHEND

EESMÄRK: uurida ja määrata õhukese kihi kromatograafia meetodil taimelehtedes olevaid pigmente ning tuvastada, milline kahest olemasolevast lahusest (voolutist) selleks paremini sobib.

Soovitus õpetajale: võimalik on kasutada ka sobivalt valitud „legendi“, mis uuringule täpsema eesmärgi annab. Näiteks võib rääkida õpilasfirmast, mis soovib vastavaid lehti uurida, et leida, kas neist saaks asuda tööstuslikult eraldama teatud pigmente toidulisandite, toiduvärvide vm tootmiseks. Samuti tuleks leida vooluti (lahus), mis sobiks kõige paremini pigmentide üksteisest eraldamiseks. Selleks on antud katses testimisel kaks tavalist kromatograafias kasutatavat voolutit.

Vajalikud vahendid:

Klassile:

- UV-lamp (2...3 tk klassi kohta)

Koos töötavale õpilaste paarile:

- uuritavad rohelised taimelehed plastkarbis (2...3 grammi);
- uhmer nuiaga;
- atsetoon (5 ml, suletava korgiga klaaspurgis, tähistatud);
- Pasteuri pipett;
- paberkäterätt;
- 1,5 ml mikrotuub.

Igale õpilasele:

- väike ärälõigatud ülaotsaga Pasteuri pipett (kasutamiseks kapillaarina);
- 2 õhukese kihi kromatograafia (TLC) plaati (laius selline, et mahub 100 ml keeduklaasi);
- 2 keeduklaasi (100 ml, kasutamiseks voolutusnõudena **A** ja **B**);
- 2 fooliumlehte voolutusnõude katmiseks;
- vooluti **A** (heksaan:atsetoon ruumalasuhtes 5:2), 5 ml, suletava korgiga klaaspurgis, tähistatud);
- vooluti **B** (atsetoon, 5 ml, suletava korgiga klaaspurgis, tähistatud);
- kontoritarbed: marker, harilik pliiaats, pastapliiaats, joonlaud, kalkulaator.

Töö käik:

I Pigmentide eraldamine taimelehest – lehe ekstrakti valmistamine

1. Rebi uuritavad lehed tükikesteks ja aseta uhmrisesse.
2. Lisa uhmrisesse kogu sulle antud atsetoon ning uhmerda lehed katki – pigmendid lahustuvad atsetoonis. Kui atsetoon uhmerdamise ajal ära aurab, küsi seda juurde. Lahus ehk **lehe ekstrakt** peaks olema uhmerdamise lõpuks tumeroheline.
3. Tõsta Pasteuri pipeti abil ca 1 ml lehe ekstrakti mikrotuubi. Lase kaasatunud lehemassil põhja settida, nii et peale jääb tumeroheline selge lahus – lehe ekstrakt.

II Pigmentide lahutamine õhukese kihi kromatograafiaga – sobiva vooluti leidmine

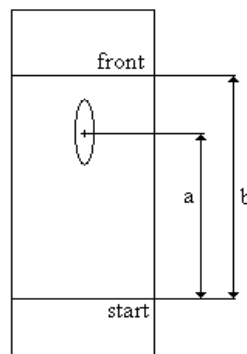
4. Kalla kogu sulle antud vooluti A voolutusnõusse A ning vooluti B voolutusnõusse B. Kata mõlemad nõud õhutihedalt fooliumiga.
5. Tõmba mõlemale TLC plaadile hariliku pliiatsi ja joonlaua abil **väga õrnalt** (et vältida plaadi pinna vigastamist) umbes 1,5 cm kaugusele TLC plaadi ühest lühikesest servast õrn joon, nn **stardijoon**. Stardijoonepoolset serva nimetame edaspidi plaadi alumiseks servaks. Stardijoon alla kirjuta ühele plaadile A ja teisele B – erinevate voolutite tähised.
6. Kanna kapillaariga (lõigatud otsaga pipetiga) mõlema plaadi stardijoonele lehe ekstrakti täpp. Kui pigmentide eraldamisel saadud lehe ekstrakt on tumeroheline, kanna seda stardijoonele 2-3 korda. Helerohelist ekstrakti võid kanda stardijoonele 5–10 korda. Ürita teha täpp võimalikult väike (\varnothing 5 mm).
7. Aseta TLC plaat tähisega A ettevaatlikult voolutusnõusse, milles on vooluti A, teine TLC plaat voolutusnõusse voolutiga B, ning kata nõud fooliumiga. Aseta plaadid voolutusnõudesse nii, et plaadi stardijoonele kantud täpp jääb allapoole.
8. Oota, kuni lahusti **front** (märgumisjoon) on liikunud ~1 cm kaugusele plaadi ülemisest servast, siis tuleb voolutamise lõpetada ja kromatogramm on valmis. Tõsta plaadid pintsettide abil voolutusnõust välja, aseta paberile ja märgi kiirelt hariliku pliiatsiga plaadile fronti asukoht (vooluti aurustub väga kiiresti!).
9. Otsusta, kumb vooluti, A või B on sobilikum pigmentide lahutamiseks taimelehe-ekstraktist!

III Kromatogrammi uurimine

10. Vali paarilisega uurimiseks see TLC plaat, millel pigmendid on paremini üksteisest lahutunud.
11. Vaata kuivanud plaati UV-lambi all. Märgi hariliku pliiatsiga nende vöötide piirjooned, mis UV valguses punakalt helenduvad!

12. Mõõda joonlauaga lahutatud

pigmentilaikude keskpunktide (vt joonist!) ja
vooluti frondi kaugused stardijoonest (**a** ja **b**),
sisesta need protokollli ja arvuta laikudele
retentsioonikoefitsiendi R_f väärtused!



$$R_f = \frac{a}{b}$$

13. Mõõda joonlauaga lahutatud

pigmentilaikude keskpunktide (vt joonist!) ja
vooluti frondi kaugused stardijoonest (**a** ja **b**),
sisesta need protokollli ja arvuta laikudele
retentsioonikoefitsiendi R_f väärtused!

14. Mõõda joonlauaga lahutatud pigmentilaikude keskpunktide (vt joonist!) ja vooluti frondi
kaugused stardijoonest (**a** ja **b**), sisesta need protokollli ja arvuta laikudele
retentsioonikoefitsiendi R_f väärtused!

15. Kasutades allolevat Infot, määra taimelehtedes olevad pigmendid.

Meie silikageelplaadi voolutamisel vastava voolutiga saab leheekstraktis eristada järgmisi pigmente:

- **Karoteenid** (peamiselt β -karoteen) - $R_f \approx 0,95$; helekollane vööt;
- **Feofütiin** (klorofüllü molekul, milles puudub Mg^{2+} ioon) - $R_f \approx 0,40$; helehall vööt, UV all roosa;
- **Klorofüll a** - $R_f \approx 0,30$; erkroheline vööt, UV all punane;
- **Klorofüll b** - $R_f \approx 0,25$; tuhmim, kollaka varjundiga roheline vööt, UV all punane;
- **Ksantofüllid** (violaksantiin, neoksantiin) - rohekaskollased vöödid, $R_f < 0,20$;
- **Antotsüaniin** - $R_f < 0,10$; väga õrn hallikas vööt, UV all roosa.

16. Kleebi oma TLC plaat PROTOKOLLI

NÄDISPROTOKOLL*

Nimi:

Kuupäev:

TAIMELEHEPIGMENTIDE KROMATOGRAAFILINE UURIMINE

Kasutatav vooluti: b väärtus (stardi- ja frondijoone vahemaa): cm

Uuritav taim:

Kromatogrammi värviliste laikude uurimine ja määramine					
Laik	Värvus	Värvus UV all	R _f (a/b)	Pigmendi nimi	R _f tabeli järgi
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					

*soovitame paberprotokolli asemel tulemused sisestada arvutiprotokolli!