



Fotosünteesipigmentide määramine õhukese kihi kromatograafia (TLC) abil

Vajalikud vahendid: kartulilehe ekstraktid A ja B, kolm õhukese kihi plaati (TLC plaat), voolutusnõu fooliumist kattega, pintsel, pintsetid, pliiaats ja joonlaud, minigrip-kott TLC plaatidele.

Lehtede värvimuutus sügisel. Septembris, ilmade jahenedes hakkavad mitmeaastased taimed valmistuma talve saabumiseks. Sellest annab meile heitlehiste puude ja põõsaste puhul märku lehtede värvi muutumine. Lehed värvuvad sõltuvalt liigist ja ilmaoludest enne varisemist kollaseks, punaseks või pruuniks. Värvuse muutus on põhjustatud lehes asuvate värvainete – pigmentide – lagundamisest, kuid samuti suureneb sügisel mitmete taimeliikide leherakkude tsütoplasmas punaste, siniste ja violetsete pigmentide – antotsüanidiinide sisaldus. Lehepigmentidest tuntuim on kloroplastides paiknev ja fotosünteesil võtmerolli mängiv roheline pigment klorofüll. Vastavalt erinevustele selle struktuuris eristatakse mitmeid klorofüllimolekule, millest selles katses puutud kokku kahega: klorofüll a ja klorofüll b. Lisaks leidub kromoplastides karotenoidide rühma kuuluvaid valdavalt kollakaid pigmente – karoteene ja ksantofülle.

Õhukese kihi kromatograafia (TLC, ingl. k. *Thin Layer Chromatography*) on meetod, mida kasutatakse segude lahutamiseks. Sõna kromatograafia tuleneb kreeka keelsest sõnadest – $\chi\rho\acute{\omega}\mu\alpha$: *chroma*, värv ja $\gamma\rho\alpha\phi\epsilon\iota\nu$: *graphein*, kirjutama. Meetod seisneb uuritava segu voolutamises selleks ettenähtud plaadil. Plaat koosneb reeglina alusele (klaas, alumiiniumleht, plastik) kinnitatud imavast materjalist, milleks enamasti kasutatakse silikageeli, tselluloosi või alumiiniumoksiidi (nn statsionaarne faas). Segu kantakse plaadile peene pintsli või kapillaarpipetiga (oluline on jälgida, et plaati hoitakse ja tõstetakse ainult servadest!) ja asetatakse anumasse, mille põhjas on vooluti – lahusti või lahustite segu. (Lahustite segu kasutatakse juhul, kui puhta lahustiga ei saada soovitud tulemust – enamasti on põhjuseks see, et komponendid ei lahustu piisavalt hästi.) Plaadi imav pinnakiht (statsionaarne faas) tõmbab vedelikku (nn mobiilne faas) kapillaarjõu abil ülespoole, nii et plaadile tekib nähtav, aeglaselt tõusev vedeliku **front**. Segus olevad komponendid lahustuvad kasutatavas lahustis erineval määral ja haakuvad erineva tugevusega statsionaarse faasiga. Seda võib ette kujutada nii, et teatav aine vedab osa ajast lahustunud kujul ülespoole liikuvast mobiilses faasis ja teise osa statsionaarsele faasile kinnitunult. Vastavalt uuritava aine, plaadi ja lahusti omadustele (eeskätt polaarsus, laeng, suurus) on nende kahe aja suhe (lahuses ja statsionaarses faasis) segus olevate ainete jaoks erinev. Selle töö käigus puutud sellega kokku mõiste R_f juures. Segus olevate ainete erinevuste tõttu hakkab segu õhukese kihi plaadil liikudes jagunema osadeks ehk **fraktsioonideks**, mis on jälgitavad eraldiseisvate laikude/ribadena. Mida kauem lasta protsessil toimuda, seda suuremaks lähevad vahed. Nii on võimalik sobivate lahustite abil lahutada segud komponentideks.

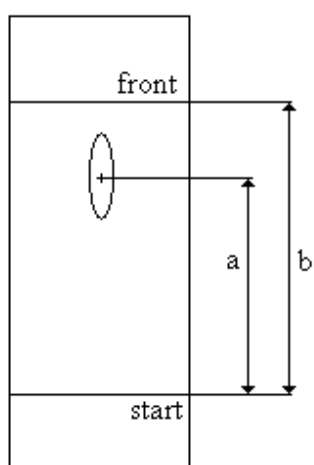
Sulle on antud uurida kaks proovi (A ja B), millest üks on suvise rohelise kartulilehe, teine sügisese kollase kartulilehe ekstrakt.



Katse kirjeldus

1) Tõmba joonlaua abil umbes 1,5 cm kaugusele TLC-plaadi ühest servast hariliku pliatsiga õrn joon, nn stardijoon (**ettevaatlikult**, et vältida plaadi pinna vigastamist). Seda nimetame plaadi alumiseks servaks.

2) Kanna peene pintsliga umbes 1 cm pikkune lehe-ekstrakti riba stardijoonele. Proovid A ja B kanna eraldi plaatidele. Proovi A kanna stardijoonele 7...10 korda järjest, proovi B aga 3...5 korda. Enne uut pealekandmist lase eelmisel kihil mõned sekundid kuivada. Ürita teha joon võimalikult sirge ja peen, jättes külgedele võrdselt ruumi.



Joonis B1

3) Aseta üks TLC plaat ettevaatlikult alumist serva pidi (kuhu kandsid pintsliga ekstrakti) voolutusnõusse ja kata see fooliumiga. Oota, kuni lahusti front (märgumisjoon) on jõudnud ~1,5 cm kaugusele plaadi ülemisest servast, seejärel tõsta plaat pintsettide abil voolutusnõust välja ja märgi kiirelt hariliku pliatsiga plaadile frontide asukoht (lahusti aurustub väga kiiresti!). Toimi samuti teise pigmendi ekstraktiga!

4) Arvuta tulemuste põhjal iga eraldi määratava pigmendi R_f väärtused. R_f (ingl. k. *retardation factor*) ehk **mahajäävuskoeffitsient** kirjeldab seda, kui palju aega veedab aine statsionaarses faasis (seotuna plaadi pinnaga), võrreldes vedelas faasis (lahusti koosseisus) veedetud ajaga. Teisisõnu, mida suurem on R_f väärtus, seda rohkem on aine veetnud lahustunud kujul ja seda kiiremini on aine molekulid koos lahustiga mööda plaati ülespoole liikunud. Teatud ainetele vastavad kindlad R_f väärtused, mis võimaldab meil hinnata nende ainete leidumist uuritavas segus. R_f leidmiseks tuleb laigu poolt läbitud teepikkus (a) jagada vedeliku poolt läbitud teepikkusega (b) (vt joon. B1). Laikude puhul mõõdetakse läbitud tee pikkust laigu keskkohast. R_f väärtused jäävad alati 1 ja 0 vahele.

Arvutused R_f väärtuste leidmiseks.

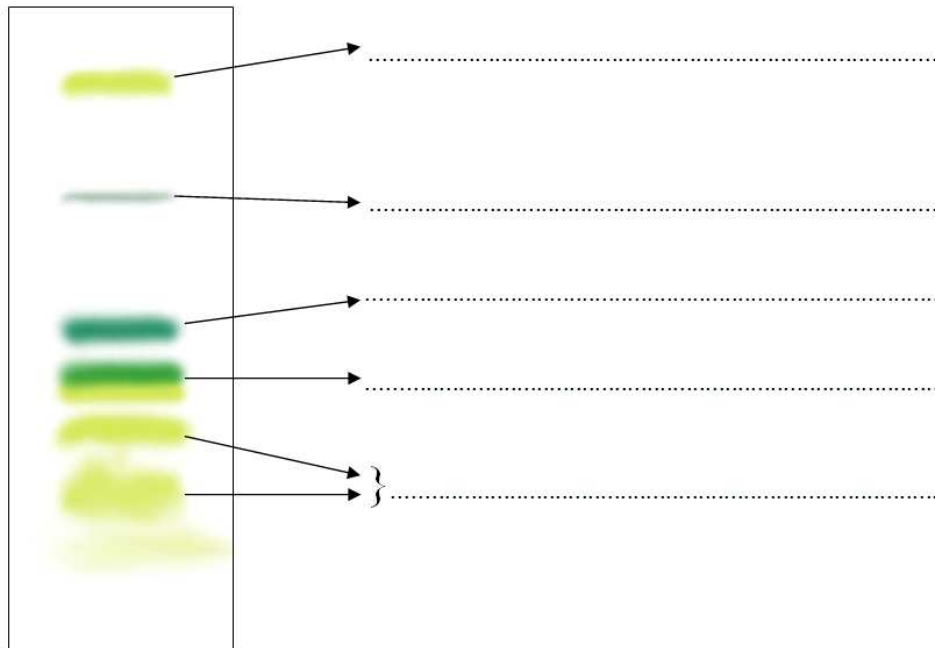
Proov A

Proov B



Eesti loodusteaduste olümpiaadi eksperiment 2009

- Lähtudes tabelist B1 ja enda leitud R_f väärtustest, nimeta joonisel B2 osutatud pigmendid ja lisa R_f väärtused.



Tabel B1

Ligikaudsed R_f väärtused antud vooluti e lahusti (heksaan:atsetoon, 5:2 ruumalasuhte järgi) korral.

Klorofüll a \rightarrow 0.30

Klorofüll b \rightarrow 0.25

Karoteenid (põhiliselt β -karoteen) \rightarrow 0.95

Ksantofüllid (violaksantiin, neoksantiin) \rightarrow \leq 0.2

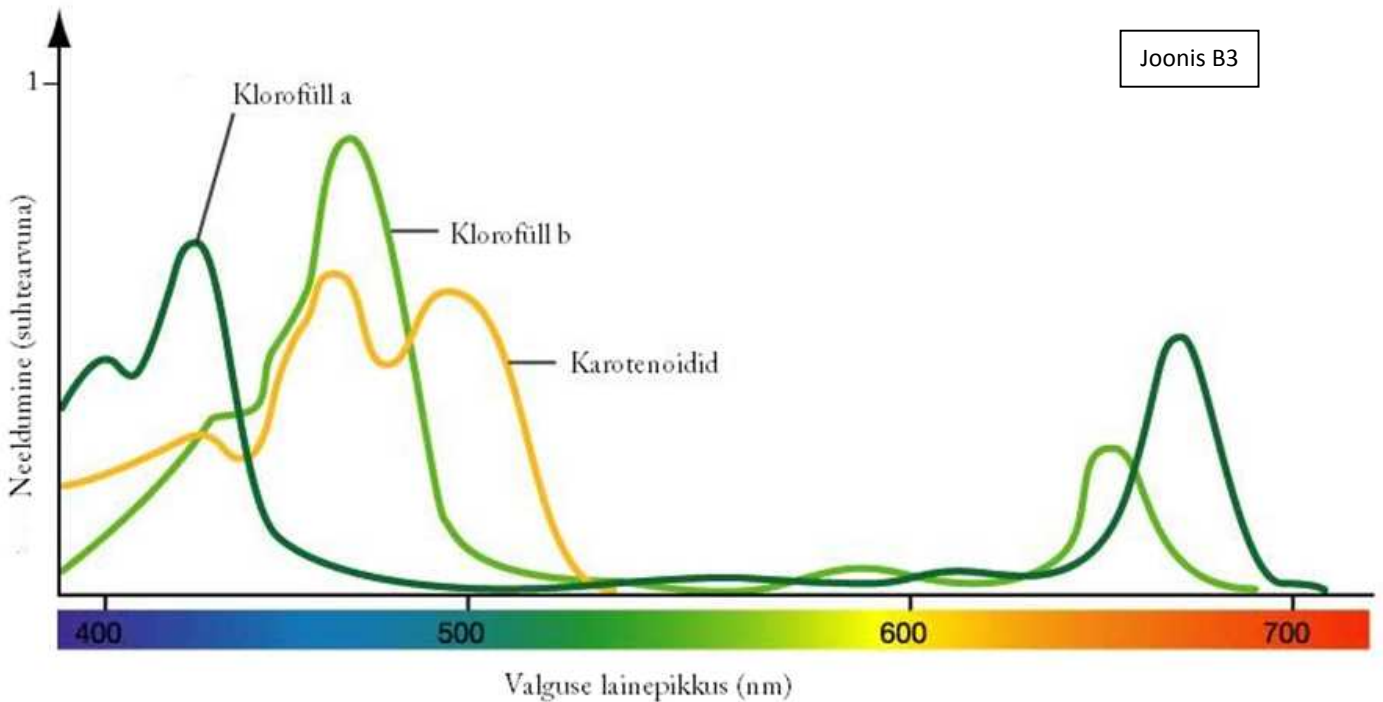
Feofütiin (klorofüllüli molekul, milles puudub Mg^{2+}) \rightarrow 0.4

- Suvised lehe ekstrakt on, sügisene (kirjuta õige täht).
Põhjenda vastust lähtuvalt oma katse tulemustest.

\rightarrow Pärast eksperimenti aseta õhukese kihi plaadid minigripi kotti, millele kirjuta oma võistlejakood!



Läbilaskvus- ja neeldumisspektrid



Spekter ja spektraalanalüüs. Spektriiks võib lihtsustatult nimetada mingi füüsikalise suuruse sõltuvust valguse lainepikkusest või sagedusest. Tavaliselt esitatakse spekter graafiku või diagrammina. Nähtava valguse puhul vaadeldakse näiteks valguse lainepikkuse seost valguse värvusega (värvusspekter). Olenevalt vaadeldavast suuruselt räägitakse ka neeldumisspektrist, läbilaskvusspektrist, peegeldumisspektrist jt. Igal ainel on need spektrid unikaalsed, mis võimaldab aineid kindlaks määrata spektraalanalüüsi abil.

Neeldumine ja läbilaskvus. Valguse neeldumine ja läbilaskvus on vastandlikud mõisted.

Valguse neeldumine tähendab valguse intensiivsuse (tugevuse) kahanemist mingi keskkonna läbimisel. Aine paistab meile valges valguses seda värvi, mida ta suhteliselt vähem neelab (näiteks oranž lahus neelab kõige vähem punast ja kollast valgust).

Läbilaskvust ehk transmissiooni mõõdetakse kui valguse intensiivsuse suhet enne ja pärast ainekihi läbimist (see suhe ehk läbilaskvuskoeffitsient jääb alati 0 ja 1 vahele).

$$T = \frac{I}{I_0}$$

T on läbilaskvuskoeffitsient, I_0 valguse intensiivsus enne ja I pärast ainekihi läbimist.



Bioloogia



Kood:

Eesti loodusteaduste olümpiaadi eksperiment 2009

Korrutades selle suhtearvu 100-ga, saame me väärtuse protsentides, palju aine mingi lainepikkusega valgust läbi laseb. (Kui transmissioon on 1 ehk 100% lainepikkusel X, tähendab see, et vaadeldav keskkond ei neela valgust sellel lainepikkusel. Samal lainepikkusel oleks neeldumiskoeffitsient 0.)

Graafikut, mis näitab teatud aine läbilaskvuskoeffitsiendi sõltuvust lainepikkusest, nimetatakse läbilaskvusspektriks.

Lähtuvalt nendest teadmistest joonista (ligikaudselt, vaba käega)

- klorofüllil (kas a või b) ja
- karotenoidide läbilaskvusspekter (abiks neeldumisspektrid joonisel B3) ning
- musta ja
- halli värvuse neeldumisspektrid.

a

b

c

d