

TYÖ 1. KASVIN VÄRIAINEIDEN EROTUS

[HUOM. Opettajan ohjeessa taustatietoja ja vastaukset kysymyksiin]

KOHDERYHMÄ: Työ soveltuu sekä yläkouluun että lukioon.

KESTO: 1 h.

TAVOITE: Oppia kromatografia menetelmänä ja poolisuuden vaikutus erottumiseen.

AVAINSANAT: Poolisuus – Erottaminen – Uuttaminen – Ohutlevykromatografia

TARVITTAVAT ENNAKKOTIEDOT: Poolisuuden käsite, ohutlevykromatografian perusteet

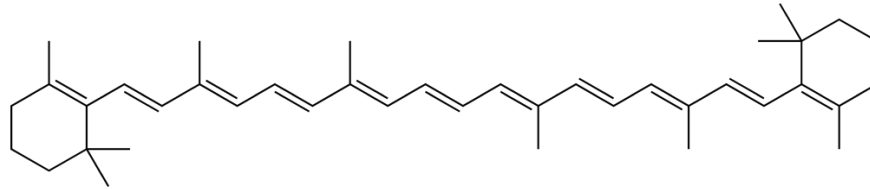


Kuva 1: Claude Alleva (Pixabay)

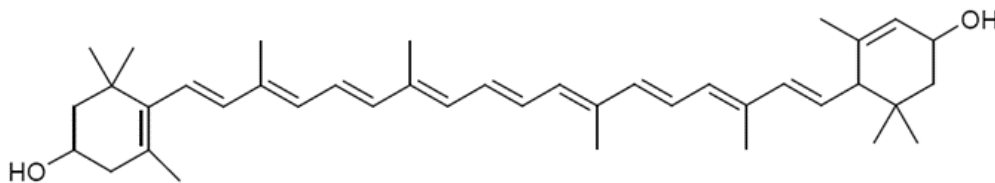
1. TYÖN IDEA

Värien monimuotoisuus on aina kiehtonut luonnontieteilijöitä, mutta vasta 1900-luvun alkupuolella alettiin ymmärtää pigmentteihin liittyvää kemiaa. Tätä ennen ei ollut pigmenttien tutkimiseen tarvittavia laboratoriovälineitä ja menetelmiä. Pigmentit esiintyvät luonnonmateriaaleissa niin pieninä ainemäärinä, että niiden eristäminen oli vaikeaa ja vaikka eristäminen olisi onnistunut, puhtaita näytteitä ei olisi voitu analysoida käytössä olevilla menetelmillä riittävän tarkasti. Tarkkoihin määrittäisiin olisi tarvittu paljon näytteitä. Vasta kromatografian kehittyminen antoi työkalut pigmenttien käsittelyyn laboratoriossa.

Kasveissa on sekä rasva- että vesiliukoisia pigmenttejä. Rasvaliukoiset pigmentit ovat karotenoideja. Karotenoidit voidaan jakaa karoteeneihin ja ksantofylleihin. Karoteenit (Kuva 1) ja ksantofyllit (Kuva 2) ovat rakenteeltaan samankaltaisia, isokokoisia isopreenihiilivetyjä, mutta ksantofyllien rakenteet sisältävät happea. Karoteenit ja ksantofyllit ovat pääosin keltaisia pigmenttejä, beta-karoteeni on oranssinkeltainen ja ksantofylli luteiini on keltainen, mutta ne jäävät usein kasveissa vihreän klorofyllin varjoon.



Kuva 1. Karoteenin (Beta-karoteenin) rakennekaava.



Kuva 2. Ksantofyllin (Luteiini) rakennekaava.

2. TAUSTATEORIA

Värien eristys ohutkerroskromatografialla perustuu molekyylien poolisuuseroon, minkä vuoksi ne liikkuvat levyllä eri nopeudella. Ohutkerroskromatografialevyssä on polaarista piihappogeeliä, minkä vaikutuksesta polaariset molekyylit liikkuvat levyä pitkin hitaammin kuin poolittomat. Esimerkiksi luteiini jää levyllä alemmaksi kuin beta-karoteeni, koska luteiini on polaarisempaa (sis. hydroksyyliiryhmiä) kuin beta-karoteeni. Eluentti - eli ajoliuos - on liuotin tai liuottimien sekoitus joka erottaa yhdisteet niiden polaarisuusjärjestykseen suhteessa ajoliuokseen.

3. ENNAKKOTEHTÄVÄT

- Mistä ruska johtuu?

- *Lehtivihreä hajoaa valon vähenemisen ja lämpötilan alenemisesta aiheutuneesta yhteyttämisen loppumisesta. Tämän takia lehden muut väriaineet pääsevät näkyviin.*
- Mitä väriaineita kasvien lehdistä on?
 - *Lehdistä löytyy vihreät klorofyllit (klorofylli a ja klorofylli b) ja kartenoideja jotka ovat väriltään keltaisia, oransseja tai punaisia.*
 - *Punalevissä esiintyy myös klorofylli c ja klorofylli d*
 - *Kartenoidit jakautuvat kahteen ryhmään: Karoteeneihin ja ksantofylleihin. Ksantofylleissä on happiryhmä, karoteeneistä ei löydy happiryhmää (hiilivety)*
- Missä kasvien väriaineet sijaitsevat?
 - *Kasvien väriaineet sijaitsevat viherhiukkasissa (kloroplasti)*
- Kerro poolisuudesta omin sanoin.
 - *Polaarinen molekyyli on sellainen, jolla on pysyvä dipolimomentti. Dipolimomentti on molekyylin ominaisuus, jota voidaan kuvata varauksen jakautumisella. Näin ollen molekyylin jokin osa on jatkuvasti negatiivisesti varautunut ja jokin toinen osa on jatkuvasti positiivisesti varautunut.*

4. TYÖTURVALLISUUS JA KEMIKAALIT

TYÖTURVALLISUUS JA JÄTTEIDEN KÄSITTELY

Käytä laboratoriotakkia, -laseja ja -hanskoja työskennellessäsi kemikaalien kanssa.

Lue työohjeen työturvallisuus ja kemikaalit -osio huolellisesti!

I. n-heksaani

- Helposti syttyvä neste ja höyry
- Voi olla tappavaa nieltynä ja joutuessaan hengitysteihin
- Ärsyttää ihoa
- Saattaa aiheuttaa uneliaisuutta ja huimausta
- Epäillään heikentävän hedelmällisyyttä
- Saattaa vahingoittaa elimiä (hermosto) pitkäaikaisessa tai toistuvassa altistumisessa (jos kemikaalia on hengitetty)
- Myrkyllistä vesieliöille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia



- **Ensiaputoimenpiteet:**

- **Hengitettynä:** Siirrä henkilö raittiiseen ilmaan ja pidä lepoasennossa, jossa on helppo hengittää. Kaikissa epävarmoissa tapauksissa tai kun oireet eivät hellitä, saatettava lääkärin hoitoon.
- **Iholle saatuna:** Huuhdo/suihkuta iho vedellä. Ihoärsytyksessä hakeuduttava lääkärin hoitoon.
- **Silmäkosketus:** Huuhdo huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Hakeuduttava silmälääkärin hoitoon.
- **Nieltynä:** Huuhdo suu. Ei saa oksennuttaa. Aspiraatiovaara. Ota välittömästi yhteys lääkäriin.

II. Dietyylieetteri

- Erittäin helposti syttyvä neste ja höyry.
- Haitallista nieltynä.
- Saattaa aiheuttaa uneliaisuutta ja huimausta.



- **Ensiaputoimenpiteet:**

- **Hengitettynä:** Huolehdi raittiista ilmasta. Jos hengitysvaikeuksia, siirrä henkilö raittiiseen ilmaan ja pidä lepoasennossa, jossa on helppo hengittää. Altistumisen tapahduttua tai jos epäillään altistumista: Ota yhteys lääkäriin.
- **Iholle saatuna:** Huuhdo/suihkuta iho vedellä. Suositellaan ennaltaehkäisevää ihon suojausta (suoja-voiteet ja -öljyt).
- **Silmäkosketus:** Huuhdo huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Kaikissa epävarmoissa tapauksissa tai kun oireet eivät hellitä, saatettava lääkärin hoitoon.
- **Nieltynä:** Huuhtelee suu vedellä (vain jos henkilö on tajuissaan). Ei saa oksennuttaa. Aspiraatiovaara. Ota yhteys lääkäriin.

III. Asetoni

- Helposti syttyvä neste ja höyry
- Ärsyttää voimakkaasti silmiä
- Saattaa aiheuttaa uneliaisuutta ja huimausta



- **Ensiaputoimenpiteet:**

- **Hengitettynä:** Anna raitista ilmaa. Kaikissa epävarmoissa tapauksissa tai kun oireet eivät hellitä, saatettava lääkärin hoitoon.
- **Iholle saatuna:** Huuhdo/suihkuta iho vedellä. Suositellaan ennalta ehkäisevää ihon suojausta (suoja-voiteet ja -öljyt).
- **Silmäkosketus:** Silmiä huuhdottava luomet auki juoksevan veden alla vähintään 10 minuuttia. Jos esiintyy silmien ärsytystä, tulee konsultoida silmälääkärä.
- **Nieltynä:** Huuhdo suu. Ei saa oksennuttaa. Aspiraatiovaara. Ota välittömästi yhteys lääkäriin.

5. TYÖN SUORITUS

Työskentelyn aikana näytteet on suojattava valolta mahdollisimman hyvin karotenoidien hajoamisen

estämiseksi.

a. Tarvittavat välineet

- Mittalasi 10 ml
- Ajoastiaksi 100 ml dekantterilasi
- Huhmare ja survin
- TLC-levy eli ohutkerroskromatografialevy (thin layer chromatography)
- Suodatinpaperia
- Suppilo
- Lyijykynä

b. Reagenssit

- Asetoni
- Dietyylieetteri
- n-heksaani
- Kasvin lehtiä

c. Työvaiheet

Esivalmistelu:

- Kerää reagenssit ja tarvikkeet ja punnitse n. 2g kasvien lehtiä.
- Silppua lehdet saksilla tai murskaa käsin (kuivat lehdet) pieniksi paloiksi huhmareeseen
- Leikkaa ohutkerroskromatografialevyt 6cm x 4cm kokoisiksi paloiksi.
- Ajoliuos valmistetaan sekoittamalla 2 ml n-heksaania ja 5 ml dietyylieetteriä ajoastiaan. Ajoliuoksen täytyy antaa kaasuuntua ajoastiassa kannen alla 5 minuuttia. Ajoastia pidetään vetokaapissa!



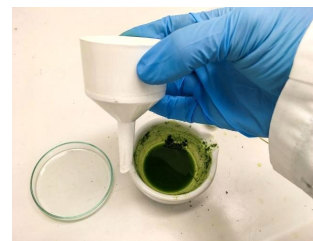
Lehtien murskaaminen asetonissa:

- Hienonna lehtisilppua noin 15 ml:ssa 100 % asetonia 10-12 minuutin ajan. Asetonia haihtuu hienonnuksen aikana, joten lisää sitä välillä (esim. 3ml kerrallaan). Liuosta pitää olla tarpeeksi suodatukseen, jotta ohutlevykromatografialevyä voi kastella liuoksessa. Jos liuosta on vähän, lisää asetonia.



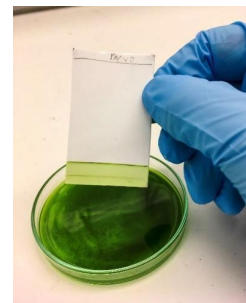
Asetoniliuoksen suodatus:

- Suodata homogenaatit eli tutkittavat aineet liuoksessa petrimaljoille käyttäen suppiloa ja suodatinpaperia.



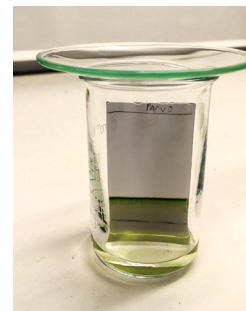
TLC-levyn kastaminen

- Työryhmä merkitsee pehmeällä lyijykynällä ajolevyn alareunaan pienen merkin 1 cm ja yläreunaan viiva 0,5 cm kohdalle. Levyn yläreunaan merkitään parin/ryhmän nimikirjaimet 0,5 cm alueelle.
- Kasta levyn alareuna näytteeseen ja anna imeytyä 1cm merkkiin saakka. Toista imeytys viisi kertaa.



TLC-levyn ajaminen ajoastiassa

- Suorita ajo upottamalla imeytetyn levyn alareuna ajoliuokseen ja laita ajoastian kansi takaisin paikoilleen. Anna liuotinrajan nousta noin 0,5 cm merkin kohdalle levyn yläreunaan.

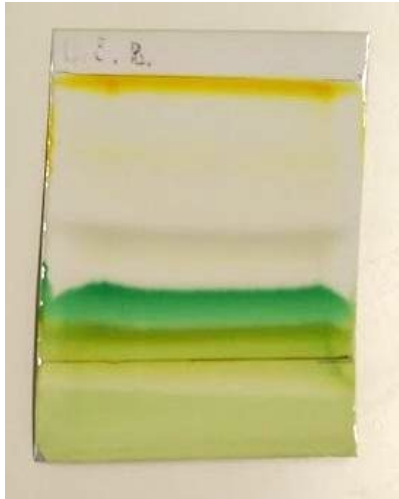


d. Siivoaminen ja jätteiden käsittely

- Liuosjätteet kerätään orgaaniseen jätteeseen.
- Anna asetonia sisältävien roskien kuivua ensin vetokaapissa, minkä jälkeen suodatinpaperit ja lehdet voidaan heittää sekajätteeseen.

6. TULOKSET JA KOONTI

Anna levyn kuivua ajon jälkeen. Piirrä ja merkitse vyöhykkeet omalle levylle. Liuotin ja ajo-olosuhteet vaikuttavat karotenoidien erottuvuuteen. Vertaa esimerkkiajosta saadut tulokset (katso kuva) omaan tulokseen. Käytetystä liuottimesta ja kromatografiasta riippumatta karotenoidit asettuvat seuraavaan järjestykseen:



1. beta-karoteeni (oranssi tai keltainen)
2. feofytiini (harmaanvihreä)
3. klorofylli a (sinivihreä tai oliivinvihreä)
4. klorofylli b (harmaanvihreä tai kirkkaanvihreä)
5. violaksantaani, neoksantaani ja kryproksantaani (keltainen)
6. kseaksantaani (ruskean keltainen)
7. luteiini (keltainen)

7. TEHTÄVÄT OPINTOKÄYNNIN JÄLKEEN

- Tutustukaa erilaisiin kromatografiamenetelmiin ja miten erotus tehdään. Tämän voi toteuttaa esimerkiksi ryhmätyönä.
- Tutustukaa kasvin lehden rakenteeseen. Mitä näkee paljain silmin? Mitä voi nähdä mikroskoopin avulla?

8. VIITTEET

- i. Helsingin yliopiston Kemianluokka Gadolinin työohjeet, http://www.kemianluokka.fi/files/uudet/Kasvien_piilotetut_v%e4rit_oppilas.pdf, 28.2.2014.
- ii. Johannes Pernaa, "Hyönteisten kemiaa lukion kemian opetuksessa", Pro gradu -tutkielma, 2008.
- iii. Avainkäsitteet: Zumdahl & Zumdahl Chemistry
- iv. Kuva 1: Claude Alleva, Pixabay, CC, Haettu 3.1.2023 osoitteesta <https://pixabay.com/photos/foilage-leaves-autumn-leaf-veins-539413/>
- v. Kuvat 2-7: Aalto-yliopisto Junior