

# Tunnskiktskromatografi

## Fotosyntespigment från kiwifrukt

John Schollar och  
Dean Madden

Laborationen är återgiven och översatt med tillstånd från NCBE, University of Reading, UK. Det har skett efter att Dean Madden har avlidit i januari 2017 och John Schollar har gått i pension.



Laborationen i sin helhet omfattas av ovanstående rättigheter enligt [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

**KORRESPONDENS**  
[NCBE@reading.ac.uk](mailto:NCBE@reading.ac.uk)  
[www.ncbe.reading.ac.uk](http://www.ncbe.reading.ac.uk)

### SYFTE

Syftet med denna laboration är att extrahera, separera och identifiera fotosyntespigment från kiwifrukt. Till skillnad från liknande metoder används en mycket liten volym lösningsmedel för att extrahera kloroplastpigmenten och är därför säkrare och billigare att utföra än andra liknande metoder.

### INTRODUKTION

Många frukter innehåller kloroplaster, men dessa och de klorofyller som de innehåller bryts vanligen ner när frukten mognar. Gröna kiwifrukt av sorten "Hayward" (den vanligaste sorten i våra butiker) skiljer sig från de flesta frukter genom att de även som mogna innehåller sina kloroplaster intakta. De nyare gulaktiga sorterna (kallas ibland gyllene kiwifrukt) bryter emellertid ner sina kloroplaster och klorofyller när de mognar. De förlorar då sin gröna färg som täcker den underliggande gula karotenoid pigmenteringen.

Fotosyntespigment kan extraheras från kiwifruktens kloroplaster genom att lösa upp fruktvävnad i ett lämpligt lösningsmedel. De olika pigmenten kan därefter separeras med hjälp av tunnskiktskromatografi och ett annat lösningsmedel.

Du bör kunna separera fem eller fler olika pigment och genom att beräkna deras R<sub>f</sub>-värden bör du kunna identifiera varje pigment.

Olika arter av kiwifrukt från släktet *Actinidia*. Det är bara de kiwifrukt som har grönt fruktkött som innehåller kloroplaster och fotosyntetiska pigment i den mogna frukten. Fotot är reproducerat med tillstånd från Plant & Food Research, New Zealand, ([www.plantandfood.co.nz](http://www.plantandfood.co.nz)) som äger upphovsrätten. Fotot omfattas av följande rättigheter, CC-BY-NC-SA, enligt Creative Commons. (Fotot publicerades första gången i en artikel av Crowhurst et al, 2008.)



## Rf-värden

Rf-värden kan användas till att identifiera pigmenten på ett kromatogram. Ett Rf-värde är ett förhållande som beräknas enligt nedanstående uppställning:

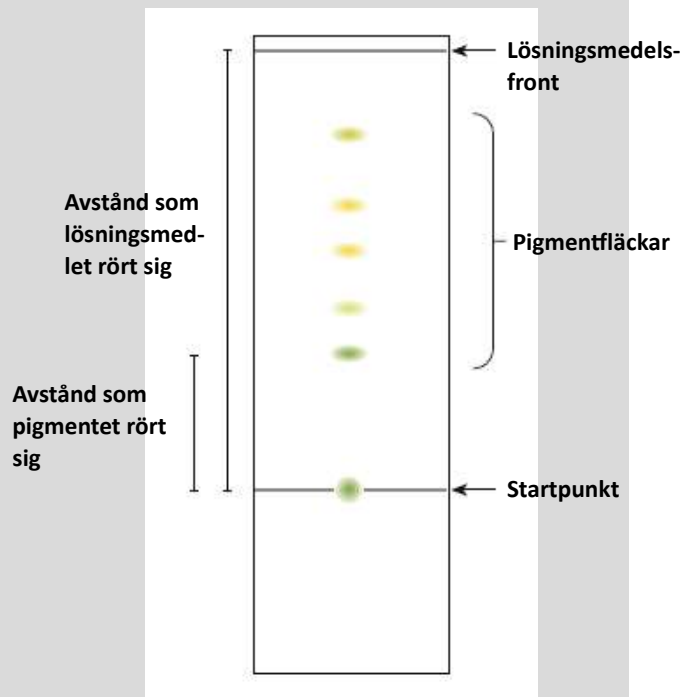
$$\frac{\text{Avståndet som pigmentet rört sig}}{\text{Avståndet som lösningsmedlet rört sig}}$$

Rf-värden ligger alltid mellan 0 och 1 (0 är ett pigment som inte rört sig alls, medan 1 är ett pigment som är så rörligt att det rör sig lika långt som lösningsmedlet).

Eftersom Rf-värdet för ett pigment varierar beroende på lösningsmedlet (eller blandning av lösningsmedel), så skrivs ofta Rf-värdet med namnet (eller namnen) på lösningsmedlet (lösningsmedlen) och proportionerna av dem efter numret, t.ex:

Rf = 0,24 (60% etanol)

Rf = 0,78 (cyklohexan : ethoxyetan : propan [5 : 3 : 2])



## SÄKERHET



Lösningsmedlen för extraktion och kromatografi är båda mycket eldfångda, så de får inte ställas nära öppna lågor.

Skvätt från lösningsmedlet kan orsaka svår ögonskada, så du måste bära skyddsglasögon under hela undersökningen.

En del människor är allergiska mot kiwifrukt. Om du är det skall du förstås inte utföra denna laboration. Alternativa förslag hittar du i Science and Plants for Schools (SAPS). De har experiment med pigment från annat växtmaterial (se under Ytterligare Information).

## UTRUSTNING OCH MATERIAL

**Följande behövs till varje elev**

*Utrustning*

- Skyddsglasögon
- Pipettspetsar av plast eller finspetsig Pasteur pipett
- 1 cm<sup>3</sup> plastpipett (ingen spruta)
- 1,5 cm<sup>3</sup> mikrocentrifugrör
- Plasticine®, BluTack® eller ett ställ där mikrocentrifugrören står vertikalt
- Kniv
- Pincett
- Linjal
- Spetsig penna med en fin spets

### Material

- En skiva kiwi frukt som förvaras i en plastpåse så att den inte torkar ut
- Approximativt 1 cm<sup>3</sup> extraktionslösningsmedel i en sluten glasbehållare
- Approximativt 2 cm<sup>3</sup> lösningsmedel för kromatografi i en sluten glasbehållare
- Remsa av tunt kromatografipapper, som skurits så det passar insidan av flaskan som innehåller lösningsmedlet för kromatografen.

**Extraktionslösningsmedlet** består av 5 delar propanon (kallas också propan-2-one eller aceton) plus 3 delar etoxyetan (kallas också dietyleter eller eter).

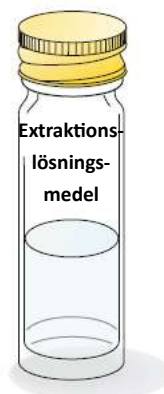
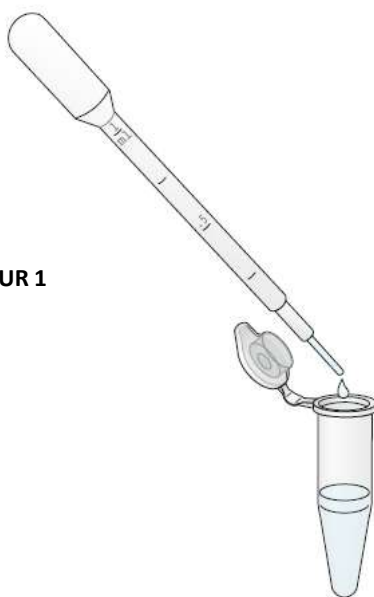
**Kromatografilösningsmedlet** består av 5 delar cyklohexan, 3 delar etoxyetan (kallas också dietyleter eller eter) och 2 delar propanon (kallas också propan-2-one eller aceton).



## TILLVÄGAGÅNGSSÄTT

1. Innan du börjar skall du sätta på dig dina skyddsglasögon.
2. Använd 1 cm<sup>3</sup> pipetten och tillsätt försiktigt **extraktionslösningsmedlet** till mikrocentrifugröret till den nivå som visas på Figur 1 (alldeles ovanför den spetsiga delen av röret).
3. Förslut mikrocentrifugröret och burken med extraktionslösningen ordentligt så att avdunstning av vätskan förhindras.
4. Ta ut kiwifrukten ur plastpåsen och lägg den på plastpåsen. Skär sedan med kniven en sträng av skalet, åtminstone 30 mm långt med ett lager av den gröna frukten fastsittande. *Den köttiga delen från frukten som sitter fast i skalet skall vara ca 1 mm tjockt.*

FIGUR 1

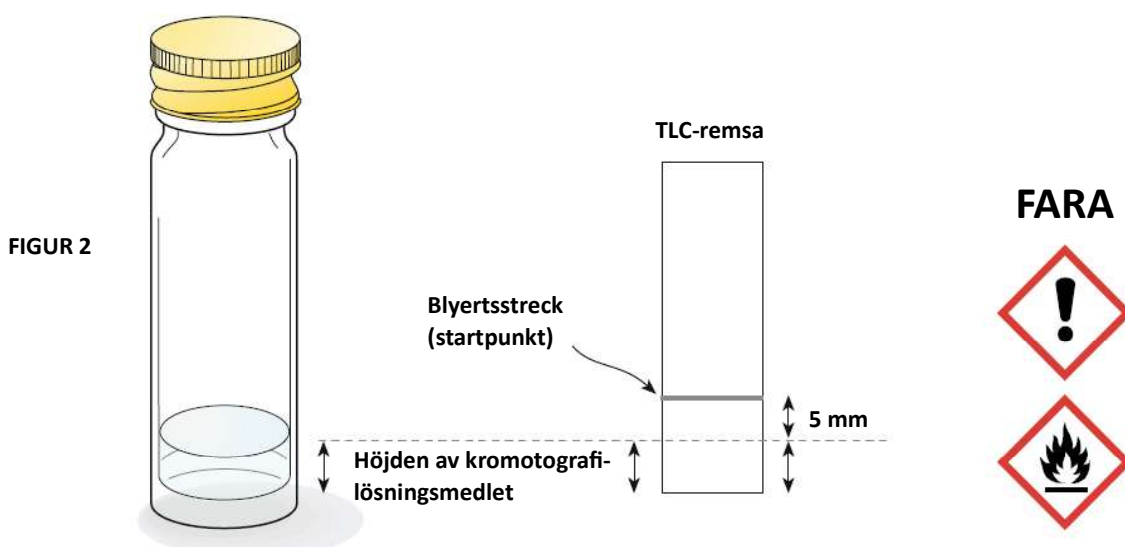


**FARA**



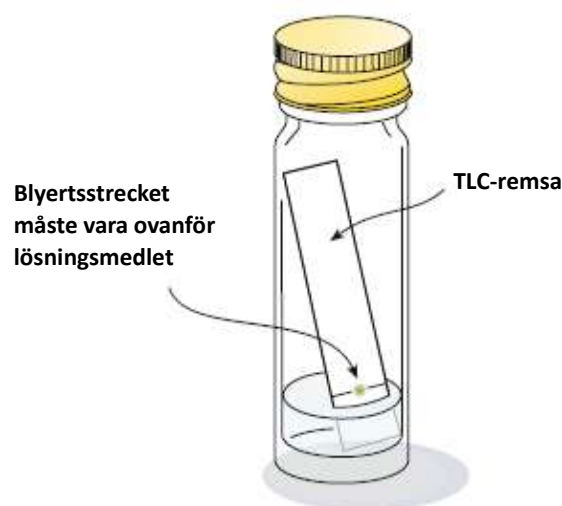
5. Skär kiwifruktremsan i två rektanglar, vardera ungefär 5 mm x 15 mm.
6. Använd pincetten för att lägga de två skivorna av kiwifrukten i mikrocentrifugröret.
7. Med hjälp av pincetten, tryck skalet och fruktköttet mot rörets sida. Krama också kiwifruktbitarna mellan pincetten. *Vätskan kommer långsamt att utveckla en grön färg.*
8. Efter ungefär en minuts tryckande skall du använda pincetten till att trycka ner fruktbitarna till botten av röret.
9. Stäng röret och låt det stå upprätt i ett ställ. *Efter omkring en minut kommer den tjockare vätskan att sjunka till botten av röret och ett tunnare, ljusgrönt lager stiger till ytan av röret. Mellan de två vätskelagren ser du spillror av kiwifrukten.*
10. Ställ flaskan med kromatografilösningen på en plan yta. Utan att öppna flaskan skall du mäta och skriva ner höjden av lösningen i flaskan.
- 11. VIKTIGT: När du utför detta momentet måste du vara MYCKET försiktig, så att du inte skadar ytan på tunnskikt-kromatografiremsan (TLC). Hantera den mycket försiktigt! Om du råkar skada remsan så får du be om en ny TLC-remsa.**

Försök att inte beröra det vita lagret på TLC remsan med dina fingrar – håll den i kanterna. Gör ett streck 5 mm högre upp än kromatografilösningen mycket försiktigt utan att pressa pennspetsen på remsan, så det bildas en linje som Figur 2 visar.

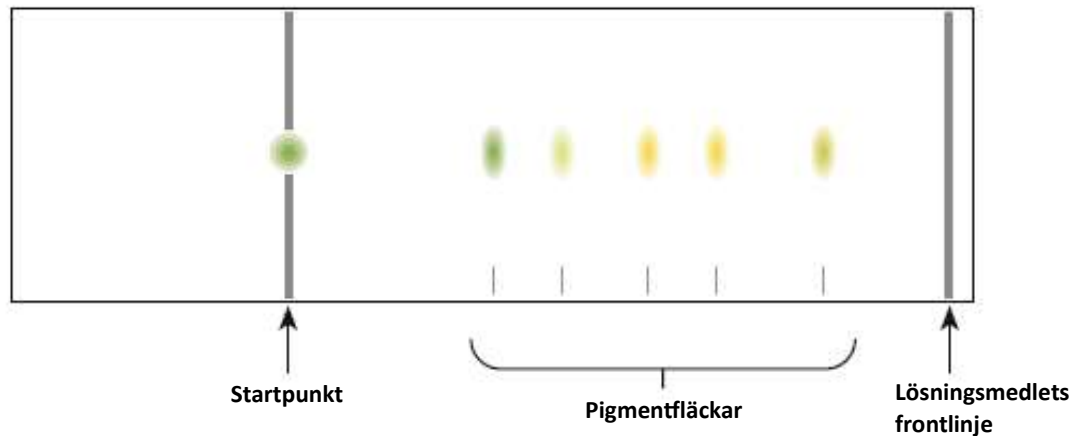


12. Ta nu Pasteurpipetten eller pipettspetsen. Öppna mikrocentrifugröret och placera pipettspetsen alldeles under ytan av det övre gröna skiktet av lösningen. Lite av den gröna vätskan dras in i spetsen på pipetten. **Låt inte spetsen komma ner i vätskan under det översta gröna skiktet.** Förslut mikrocentrifugröret.
13. Håll pipettspetsen vertikalt och nudda kort mitten av pennlinjen på TLC-remsan med pipettspetsen så att en enda, liten droppe sugns in i ytlagret på TLC-remsan. Ta omedelbart bort spetsen.
14. När fläcken har torkat tillsätt en andra droppe av det gröna kiwiextraktet på samma fläck. Fortsätt att tillsätta fler droppar tills du har en liten grön ring 3-5 mm i diameter. **OBS! Man måste vänta att tillsätta en ny droppe tills föregående droppe har torkat.** Du behöver tillsätta cirka 60–100 droppar av kiwiextraktet.
15. Ta bort locket från flaskan med kromatografilösningen. Håll översta änden av TLC-remsan (änden längst bort från den gröna ringen som bildats) med en pincett och sänk mycket försiktigt ner remsan i flaskan. När du gör detta, kontrollera också att ringen och linjen ligger ovanför lösningens nivå (se Figur 3). Om det ser ut som om ringen är nedsänkt i vätskan skall du stoppa och använda plastpipetten för att ta bort en liten del av kromatografivätskan och försöka ytterligare en gång.
16. Kontrollera att TLC-remsan inte ligger an på flaskan, utom där den lutar mot toppen av flaskan. Sätt på flasklocket och kontrollera att lösningen sugns upp i remsan.

FIGUR 3



FIGUR 4



17. När lösningen nått ungefär 2 mm från remsans topp (detta tar flera minuter), skall du använda pincetten och ta upp remsan ur flaskan och **omedelbart** med en penna markera den exakta positionen av lösningens framkant på TLC-remsan.
18. Sätt på flasklocket för att förebygga att lösningsmedlet avdunstar.
19. Så snabbt och noggrant du kan, skall du markera med en penna, läget av de olika pigmentens centra på TLC-remsan (se Figur 4).
20. Mät avståndet från startlinjen till lösningens front. Avläs resultatet till närmaste 0,5 mm. Skriv ner ditt resultat med 1 decimal.
21. Mät avståndet från startlinjen till centrum av varje pigmentfläck till närmaste 0,5 mm. Notera även fläckens färg. Skriv ner dina resultat i en kopia av Tabell 1. Om du har fler pigmentfläckar än det finns plats för i tabellen så skall du utvidga tabellen.

TABELL 1

Pigmentkod	Pigmentfärg	Avstånd från startpunkt (mm)
A – närmast startpunkt		
B		
C		
D		
E		

Ökande  
avstånd  
från  
startpunkt

22. Med hjälp av dina resultat skall du räkna ut Rf-värdena för varje pigment enligt följande:

$$R_f = \frac{\text{avstånd som pigmentet förflyttat sig}}{\text{avstånd mellan startpunkt och lösningsmedlets front}}$$

23. Skriv ner dina resultat i en kopia av Tabell 2 med 2 decimaler (gör tabellen större om det behövs).

TABELL 2

Din pigmentkod	Rf värde
A (närmast startpunkt)	
B	
C	
D	
E	

24. Tabell 3 visar Rf-värden för flera fotosyntespigment. Dessa värden har erhållits när man använt samma kromatografilösning som du använt. Använd de Rf-värden som finns i Tabell 3 och dina egna beräknade Rf-värden för att fullfölja en kopia av Tabell 4.

TABELL 3

Pigmentnamn	Rf värde
Xantofyll	0,40
Klorofyll B	0,42
Klorofyll A	0,47
Feofytin	0,55
Karoten	0,93

TABELL 4

Pigmentkod	Ditt Rf värde	Föreslaget pigment
A (närmast startpunkt)		
B		
C		
D		
E		

## YTTERLIGARE UNDERSÖKNINGAR

1. Jämför kromatogram från den gröna varianten av kiwifrukten "Hayward" med ett som bildas av en gyllene variant som "Gold" eller "SunGold".
2. Nättidskriften *Science and Plants for Schools* (SAPS) har flera förslag på tunnskiktskromatografi på växtpigment (inklusive antocyanin från färgade blad, etc) se: "TLC of plant photosynthetic pigments":

<http://www.saps.org.uk/secondary/teaching-resources/1347-a-level-set-practicals-tlc>