

Tunnskiktskromatografi

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](#)

KORRESPONDENS
NCBE@reading.ac.uk
www.ncbe.reading.ac.uk



Guide för lärare

Tidsåtgång

Denna laboration kan enkelt genomföras på 40–60 minuter.

Felsökning

För att erhålla bra resultat är det viktigt att eleverna gör en liten, koncentrerad fläck på TLC-remsan. De måste också genast märka ut lösningens front när de tar bort TLC-remsan från flaskan, eftersom lösningen avdunstar snabbt. Pigmentfläckarna kan också blekna snabbt, så att positionen av dessa måste markeras så fort som möjligt efter att man markerat lösningsfronten.

Säkerhet

Lösningsmedel

I motsats till andra liknande protokoll används endast små volymer lösningsmedel och nästan bara i behållare som kan förslutas.

Lösningsmedlen som används i denna laboration är mycket lättantändliga och det finns en stor risk att vätskan eller ångan fattar eld. **Därför får man inte laborera där det finns öppna eldslågor.**

Kontrollera att rummet är väl ventilerat och att lärare och eventuella laboratorieassistenter känner till hur man släcker en eld.

Lösningsmedlet kan orsaka svåra ögonskador, så man **måste** bära ögonskydd. Läraren måste se till att eleverna bär ögonskydd hela tiden som de befinner sig i laboratoriet (det kan finnas elever som fortfarande håller på med laborationen och då kan skvätta lösningsmedel på dem som har slutat laborera). Flaskan med lösningsmedel som eleverna har måste märkas med "FARLIGT" samt en "Bild på en flamma och ett utrops-tecken".

Efter laborationen skall lösningsmedlet tas om hand enligt institutionens vanliga procedur. Lösningsmedlet får inte hällas ner i en vask.

Kiwifrukt-allergi

En del människor är allergiska mot kiwifrukt och skall då INTE utföra denna laboration. Alternativa förslag finns att hämta i *Science and Plants for Schools* (SAPS) hemsida (sid 10). *Anaphylaxis campaign* har mer information om kiwifrukt allergi: www.anaphylaxis.org.uk (titta under "food" i Factsheet sektionen).

Utrustning och material

Behövs till varje grupp

Utrustning

- en glasflaska med skruvlock *OBS! Viss plast löser sig i kromatografi-lösningen. Det är därför viktigt att använda en glasflaska med ett lock av metall eller plast som inte löser sig i lösningsmedlet.*
- en nyväsad penna med en fin spets
- en trubbig pincett (metall, ej plast)
- en plast (polypropylen) pipett för att hantera kromatografilösningen. *OBS: en 1 cm³ pipett eller liknande är lämplig – behöver inte mäta exakt volym. Spetsen på pipetten måste passa så att den kommer in i behållaren med kromatografilösningen. En plastspruta är olämplig eftersom lösningen löser upp bläckmarkeringarna på sprutan*
- ett rent 1,5 cm³ mikrocentrifugrör (Eppendorf-rör)
- ett ställ där mikrocentrifugrören kan stå vertikalt
- en ren plast-mikropipettspets (en 100 µl spets utan markeringar) eller en ren finspetsig Pasteurpipett av glas.
- En kniv (en engångs plastkniv av picnic-typ)
- En linjal för att mäta millimeter
- ögonskydd

Material

- En tvärgående skiva av en nyligen skuren, mogen kiwifrukt, approximativt 6 mm tjock som lagts i en plastpåse. **OBS:** Kiwifrukten måste vara av arten *Actinidia deliciosa*, var. 'Hayward' vilket är den vanligaste kiwifrukten i affärerna. När frukten har skurits degraderas snabbt de fotosyntetiska pigmenten som finns i vävnaden. Det är därför viktigt att inte skära i frukten mer än en timme innan den praktiska delen av laborationen startas. Nyligen köpt kiwifrukt eller sådan som lagrats i en frys under ca en vecka är utmärkt att använda i denna laboration, men om den oskurna kiwifrukten är mycket hård bör den ligga i rumstemperatur ett par dagar så att den mognar.
- En remsa av tunnskiktskromatografi (TLC)-papper, som skurits så att det passar insidan av glasflaskan med skruvlock: vanligen fungerar det med en rektangelformad TLC-remsa 15 mm x 75 mm. Den långa kanten av remsan får inte nudda insidan av glasflaskan. Den vita beläggningen på TLC-bladet kan lätt skrapas loss, så det måste klippas och hanteras varsamt. Det är en viktig förebyggande åtgärd att ha på sig engångshandskar när man skär till bladet, så att du förebygger att fett från din hud förorenar det. (Eleverna behöver inte handskar eftersom de endast ska hantera remsans sidor).



- Ungefär 1 cm³ nyttillverkad extraktionslösning i en försluten glasflaska med en etikett med säkerhetsvarningar*. Extraktionslösningen innehåller 5 delar propanon (kallas också aceton) plus 3 delar etoxyetan (kallas också eter).
OBS: Ingen annan lösning skall användas, ty då får man inte väntade resultat. T.ex. använd *inte* petroleumeter.
- Approximativt 2 cm³ av nygjord kromatografilösning i en försluten glasflaska, märkt med lämpliga säkerhetsvarningar*.
- Kromatografilösningen består av 2 delar propanon (kallas också propan-2-on eller aceton), 3 delar etoxyetan (kallas också dietyleter eller eter) och 5 delar cyklohexan.

* Använd gärna pappersetiketter på flaskorna, eftersom lösningsmedlet kan tvätta bort bläck som satts direkt på glaset eller flasklocket. Läs också dokumentet för säkerhet.

Resultat från författarna

Fotografiet till vänster visar ett typiskt kromatogram när denna metod använts.

Förråd

TLC-papper

För att få samma R_f-värden som visas i tabell 3, så är det nödvändigt att använda Macherey-Nagel DC Polygram®SIL G/UV254TLC papper. Dessa kan köpas från Fisher Scientific (www.fishersci.se) i paket om 50 papper (Produkt kod: 10640493). Varje papper har en storlek på 50 x 200 mm.

NCBE TLC Pack

NCBE säljer ett paket material med TLC papper, mikrocentrifugrör och pipettspetsar som kan användas i denna laboration.

Se: www.ncbe.reading.ac.uk

Ytterligare information

Crowhurst, R.N. et al (2008) Analysis of expressed sequence tags from Actinidia: applications of a cross-species EST database for gene discovery in areas of flavor, health, color and ripening. *BMC Genomics* 9, 351. The electronic version of this article can be accessed free-of-charge at www.biomedcentral.com/1471-2164/9/351

Tomkins, S.P. and Miller. M.B. (1994) A rapid extraction and fast separation of leaf pigments using thin layer chromatography. *School Science Review* 75 (273) 69-72.

Science and Plants for Schools (SAPS) har flera förslag på 'TLC på pigment från annat växtmaterial':

www.saps.org.uk/secondary/teaching-resources/1347-a-level-sert-practicals-tlc