



## Eksperiment: Fotosyntesepigmenter og TLC

Baseret på side 214-216

### Formål

At undersøge forskellige planters indhold af fotosyntesepigmenter ved metoden TLC.

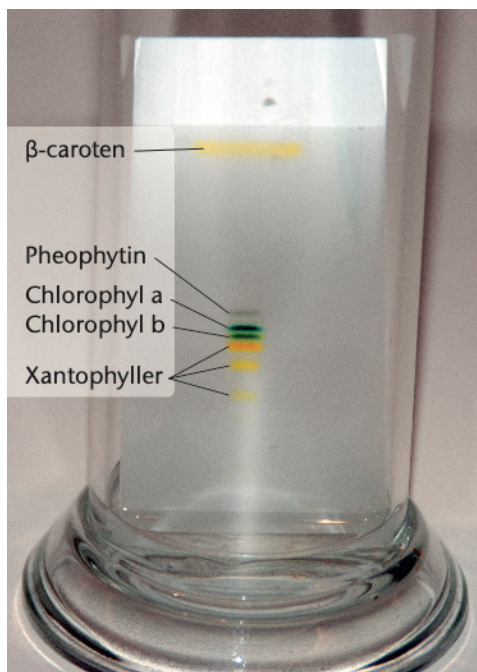
### Teori

Fotosyntesens lysafhængige processer foregår i tilknytning til chloroplastrenes thylakoidmembraner hvor der sidder en række lysabsorberende pigmenter. De vigtigste pigmenter og deres struktur er beskrevet på s. 214-216 i Bind 3.

En plantes indhold af disse lysabsorberende pigmenter kan undersøges ved hjælp af metoden tyndtlagschromatografi (TLC). Denne metode er beskrevet på s. 250-251 i Bind 2.

Som mobil fase anvendes en løbevæske der er en blanding af organiske opløsningsmidler. Som stationær fase anvendes en plade beklædt med silicagel, se figur 368, side 250, Bind 2.

Figur 1 viser resultatet af en TLC. Her ses den rækkefølge de lysabsorberende pigmenter vil placere sig i når de adskilles.



Figur 1. TLC af fotosyntesepigmenter. Figur 300, Bioteknologi A bind 3.



Når der udføres TLC, vil det variere fra gang til gang hvor langt løbevæsken bevæger sig. For at kunne sammenligne resultater fx fra forskellige gruppers TLC-plader kan forholdet mellem løbevæskens væskefront  $l_{\text{front}}$  og den afstand  $l_{\text{pigment}}$  de enkelte pigmenter har bevæget sig, derfor beregnes.

$$R_f = \frac{l_{\text{pigment}}}{l_{\text{front}}}$$

Dette forhold kaldes *retentionsfaktoren*  $R_f$  idet retention betyder tilbageholdelse. Værdien for  $R_f$  af det enkelte pigment har en værdi mellem 0 og 1. Den konkrete værdi vil afhænge af løbevæskens sammensætning. Afstandene måles fra pigmenternes startposition.

### Materialer (pr. gruppe)

- Løbevæske: heptan / acetone / ethanol (75:20:5)
- Plantemateriale: friske grønne blade fra et udvalg af planter
- Morter med pistil
- Reagensglas med tilhørende propper
- Mikropipette (10  $\mu\text{L}$ ) med tilhørende spidser
- Chromatografikar med låg eller stort cylinderglas/bægerglas dækket med glasplade/låg fra petriskål eller urglas. Karret skal helst være mindst 20 cm højt
- Filtrerpapir
- TLC-plader med silicagel (kiselgel)
- Blyant

### Sikkerhed

- Løbevæske indeholder en blanding af sundhedsskadelige og brandfarlige væsker. Derfor skal den blandes i stinkskab og må ikke fjernes fra stinkskalet under eksperimentet. Undersøg selv hvilke H- og P-sætninger der gælder for de enkelte stoffer.
- Løbevæsken bortskaffes som organisk affald.

### Fremgangsmåde

1. Hæld ca. 0,5 cm løbevæske i chromatografikarret. Anbring et filtrerpapir i hele karrets højde og sæt låg på. Lad det stå i 20-30 minutter. Derved kommer det mobile system i ligevægt.
2. Afvej 2 g friske blade fra forskellige planter.
3. Fremstil ekstrakter af bladene ved at rive dem i små stykker og anbringe dem i en morter (forskellige planter kan fordeles mellem grupperne).
4. Overhæld bladene (i stinkskab) med 8 mL løbevæske. De mases grundigt ved hjælp af pistillen til en mørkegrøn væske.
5. Hæld forsigtigt supernatanten over i et reagensglas og sæt straks prop på.



6. Klip en TLC-plade så den passer til kromatografikarret, og tegn med en blyant en linje ca. 1,5 cm fra bunden. Tegn forsigtigt så silicabelægningen på pladen ikke ødelægges.
7. Udtag med mikropipette 10  $\mu\text{L}$  af et planteekstrakt og sæt en plet midt på blyantstregen. Lad pletten tørre og gentag 4-5 gange.
8. Gentag evt. punkt 7 med planteekstrakter fra andre planter så hver plante har sin egen plet i ca. 1 cm's afstand fra andre pletter og fra sidens kant.
9. Anbring TLC-pladen i chromatografikarret med pletterne nedad. Undgå at løbevæsken kommer i kontakt pletterne når pladen anbringes.
10. Sæt låg på chromatografikarret og lad pladen stå. Løbevæsken vil trække op ad pladen og trække pigmenterne med opad i større eller mindre grad.
11. Når væskefronten er nået ca. 80-90 % op af pladen, tages pladen op, og der tegnes straks en blyantstreg dér hvor væskefronten er nået til ( $l_{\text{front}}$ ).
12. Pladen lægges til tørre under udsugning og fotograferes med det samme.

### Efterbehandling

1. Anvend fotoet til efterbehandlingen og angiv antallet af farvede streger på pladen.
2. Vurder ud fra figur 1, hvilke pigmenter der findes i planten.
3. Bestem  $R_f$  for hver af pigmenterne.
4. Sammenlign resultaterne med andre gruppers resultater, og forklar hvad forskelle kan skyldes.
5. Er der forskel på hvilke pigmenter forskellige planter indeholder, eller er der stor lighed? Hvis der er stor lighed hvad kan det så skyldes?
6. Argumentér for – ud fra fasernes kemiske sammensætning - om det er den stationære eller den mobile fase der er mest polær.
7. Argumentér for polariteten af de forskellige pigmenter ud fra deres kemiske struktur og deres  $R_f$ -værdi.
8. Diskutér fejlkilder i forsøget.
9. Udarbejd en konklusion hvor der bl.a. tages stilling til, om eksperimentets formål er opfyldt.