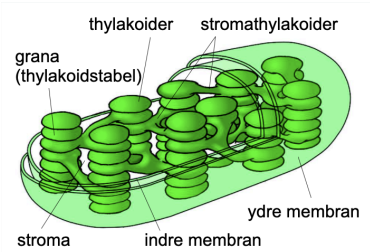
Marta H. Karon |
Sorø Akademis Skole

# KARANTÆNE KROMATOGRAFI

## KLOROPLAST




Her ses organellet kloroplast. I dets indre er der en matrix (substans) kaldet *stroma*, hvilken er omgivet af en dobbeltmembran - den indre og ydre. I stroma er der *thylakoider*, hvilke er flade membransække - som stablet kaldes *grana*. Der er dog også den del af thylakoiderne hvilket ikke er grana: Disse kaldes *stromathylakoider*.

## HVORFOR BLIVER BLADE GULE?

Når årstiden skifter fra sommer til efterår, er træet ofte den første indikator - dets blade skifter fra sommerlige grønne nuancer, til varme gule og grønne farver. Men hvorfor sker dette?

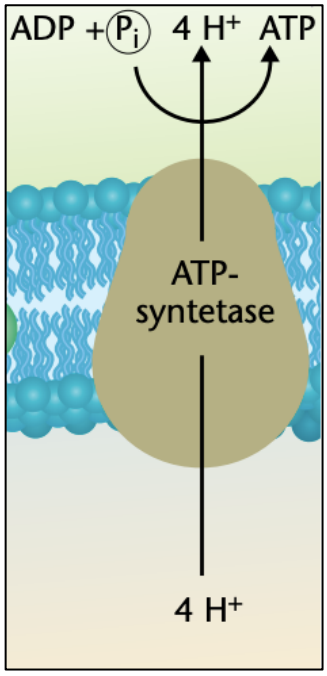
Farven skifter et stykke tid før bladet falder - og dette er der en grund til! Bladet bruger nemlig meget energi på at danne et bestemt pigment, hvilket er et molekyle der absorberer nogle bølgelængder lys, men det reflekterer andre. I bladet er der mange af disse pigmenter, men i største grad pigmentet klorofyl. Når det er ved at bliver koldt, går reaktionerne i træet langsommere, og de korte dage betyder at træet får mindre energi fra sollyset. Træet begynder derfor at suge næringsstoffer ud af bladene for at gemme dem i stammen til vinter - og herunder sker der en nedbrydning af pigmentet klorofyl. På denne måde sparer træet energi når bladene begynder at falde. Men under denne nedbrydning af klorofyl, kommer bladets andre pigmenter til syne - og fordi disse pigmenter reflekterer gult, orange eller rødt lys, bliver bladene netop disse farver før de falder af.

## PIGMENTER

I alle fotosyntetiske planter findes pigmenterne klorofyl. Disse pigmenter gør at planten er såkaldt fotoautotrof og dermed er selvernærende med lys som energikilde. Dette skyldes at det er nemlig disse klorofyller der absorberer solens lysenergi - og herunder snakkes der derfor også om dets rolle som primær metabolit, da pigmentet er direkte involveret i plantens basale livsproces: fotosyntesen. Som tidligere nævnt er klorofyller et pigment, hvilket betyder at de bringer energi til denne proces ved at absorberer de røde og blå bølgelængder fra lyset - mens de reflekterer de grønne, hvilket giver bladene deres farve. Der findes to typer klorofyller i planten: Klorofyl a og klorofyl b - hvor omkring 25% af den samlede mængde klorofyller i spinatplanten består af sidstnævnte. Klorofyl a er altså det primære pigment i planten. Men hvad er så forskellen på de to? Som der ses på figur 2, absorberer de to pigmenter forskellige bølgelængder. Dette er smart, da det skaber en udvidelse af det lysområde hvorfra planten kan udnytte energien til brug i fotosyntesen. Udover disse klorofyler findes der i planten også pigmentgruppen carotenoid, som er en gruppe hjælpefarvestoffer der ligesådan hjælper planten med at udnytte energien fra andre bølgelængder (*se figur 2, caretenoids*). Carotenoider

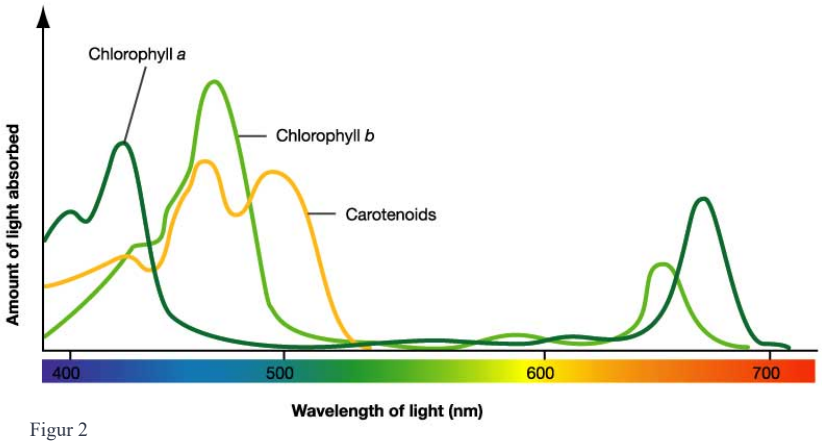
**ATP-SYNTETASER**

Hvordan dannes molekylet ATP ud fra 4 $H^+$-ioner?




Dannelsen af ATP sker i komplekset *ATP-syntase*. En "pumpe" kaldet *cytokram-bf*, pumper hydronerne ($H^+$-ioner) ind i thylakoidernes indre. De kan ikke selv diffunderer over membranen til stroma - og her kommer ATP-syntasen ind. Denne faciliterer nemlig transporten for hydronerne til stroma, og udnytter energien herfra til at danne ATP fra ADP + $P_i$

førstenævnte er xantofyller, og sidstenævnte er karotener.. Efter carotenoiderne absorberer energi, transporterer de det til klorofyllerne, hvor de bruges til fotosyntesen.




Figur 2

## FOTOSYNTESEN

Fotosyntesen foregår i plantens kloroplaster, også kendt som grønkorn. I kloroplasternes indre membransystemer, thylakoiderne, er der placeret forskellige proteiner, hvortil de fotosyntetiske pigmenter er bundet. Fordi disse samlinger af farvestofmolekyler er bundet til forskellige proteiner i membranen, opdeler man dem i to funktionelle enheder - nemlig fotosystem I, og fotosystem II. Fotosystem II er placeret overvejende i grønkornets thylakoidstabel kaldet grana, hvor fotosystem I er placeret i dets stromathylakoider, hvilke grana er forbundet med. Der er en funktionsmæssig kobling mellem de to systemer. Disse to systemer foregår under den del af fotosyntesen der kaldes den lys-afhængige del. Denne sker i kloroplastens thylakoidmembraner, hvor der dannes biokemisk energi, altså energiholdige molekyler som ATP og NADPH, ved omdannelsen af lysenergien.

Det første der sker i denne lys-afhængige proces er at lys rammer fotosystem II. Her rammes en elektron i klorofylmolekylet, som bliver rig på energi, og derfor sent til et elektrontransportsystem. Samtidig spalter lysenergien vand, som kan beskrives ved reaktionen

$$2\,H_2O \rightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$$

De $4H^+$-ioner bliver brugt til at danne det energi-lagrende molekyle ATP, og de $4e^-$ bruges som erstatning for de elektroner, som klorofylmolekylerne gav væk. I fotosystem I energiberiger solenergien ligesådan klorofyl-molekylernes elektroner. Disse bliver brugt til at lave det andet energibærende molekyle, nemlig NADPH. Disse to molekyler bliver senere begge brugt i næste proces af fotosyntesen, nemlig den lys-uafhængige del, kaldet Calvins cyklus. Her bliver der dannet glukose, som i respirationen omdannes til energi i form af ATP-molekyler.

## POLARITET

Et molekyle består af atomer bundet sammen af intramolekylære bindinger. Forskellige atomer har forskellig elektronegativitet - altså forskellige evne til at trække i elektroner. Ved at udregne elektronegativitetsforskellen mellem to atomer, kan man finde polariteten i deres binding

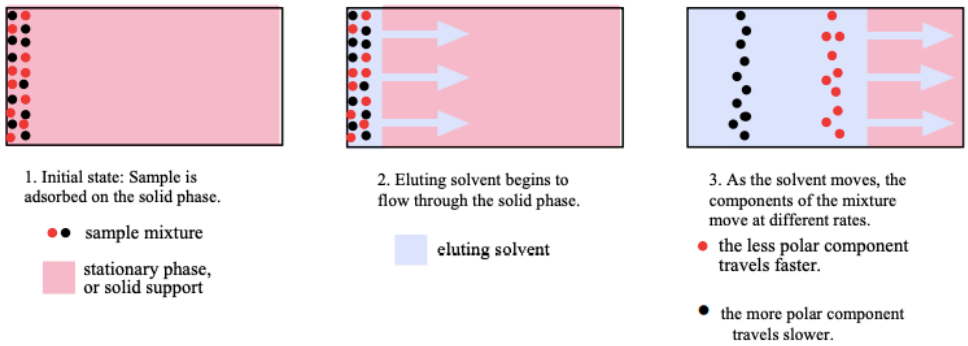
$\Delta EN = 0{,}0\text{-}0{,}5$ upolær

$\Delta EN = 0{,}5\text{-}2{,}0$ polær

## KROMATOGRAFI

Men hvordan kan vi finde frem til disse pigmenter, når vi ikke kan se dem med det blotte øje? Kemien har et svar! Kromatografi, eller tyndlagskromatografi (TLC), er en teknik indenfor den analytiske kemi, der bruges til separation af forskellige stoffer - f.eks. pigmenter. I praksis tager man et stykke kromatografi-papir, eller i dette tilfælde almindeligt papir, og laver en streg omkring 1cm fra bunden. På denne streg sættes det stof man vil undersøge, hvorefter papiret placeres i en væske, med en væskehøjde lavere end den markerede streg. Herefter vil væsken bevæge sig op gennem papiret ved såkaldte kapillærkræfter. Princippet i kromatografien er at stoffet udsættes for to forskellige medier: det bevægelige, og det faste - også kaldet henholdsvis den mobile og den stationære fase. Når den mobile fase bevæger sig over den stationære fase, vil denne, samt den stationære fase, interagerer med molekylerne. Da stoffets molekyler har forskellige kemiske egenskaber, som f.eks. deres polaritet, vil nogle molekyler være mere tiltrukket til den stationære fase, og grundet intermolekylære bindinger bevæge sig langsommere over papiret, mens andre vil være mere tiltrukket til den mobile fase, og bevæge sig hurtigere. På denne måde vil molekylerne bevæge sig forskellige længder op ad papiret, og derved skabe en separation (*se figur 1*).

Figur 1




I nedenstående forsøg er det den stationære fase, altså papiret, der er den mest polære. Dette er fordi papir består af cellulose, som har mange OH-grupper. Isopropyl alkohol såvel som ethanol er ligesådan polær, da de begge har en OH-gruppe - men dog også har en stor upolær del, hvilket gør at de kun er en smule polære. Derfor vil det gælde at jo mindre polært pigmentet er, des længere vil det bevæge sig op ad papiret.

## ”OPSKRIFT” TIL SPINAT FORSØG

Nu kan vi koble vores viden om kromatografien, samt om plantens forskellige pigmenter, og opstille et forsøg til at separerer de forskellige pigment-molekyler der findes i spinat, baseret på vores hypotese: spinat indeholder klorofyl a, klorofyl b, xantofyl og β-karoten. Til dette laver vi en forenklet version af den klassiske kromatografi. Vi skal bruge:

1. Tre små stykker papir, omkring 10cm
2. 50g spinat
3. Omkring 50mL hospitalssprit 70%, denatureret med isopropylalkohol til spinat-massen, samt et par dl til kromatografiet - alt afhængigt af glassets volumen og højde samt papirets længde
4. En spisepind eller lignende, til at dryppe spinatstoffet på papiret
5. en lineal
6. en blyant
7. træpinde

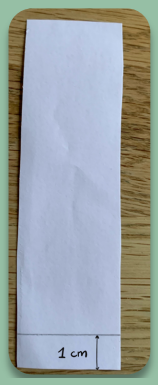
### Spinatmassen

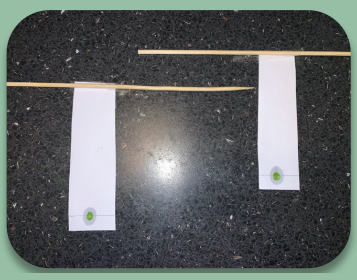
Spinaten afmåles, og puttes i en blender, eller stavblendes, sammen med en smule hospitalssprit. Når spinaten er godt blendet, bruges en si til at separere væsken fra spinatbladene, som på billedet nedenfor. Nu har vi stoffet der skal undersøges

### Forberedelse til forsøg

1. På det lille stykke papir måles 1cm fra bunden - her tegnes en streg. Denne vil virke som startlinjen, hvorpå stoffet skal sættes
2. Papiret fastsættes til en pind, så det kan hæves over væsken - og undgå at nå startlinjen
3. En spisepind eller lign. dyppes i spinatmassen, og med denne laves en prik i midten af startlinjen.
   Dette gentages to gange, med to forskellige stykker papir

4. I et glas tilsættes der en mængde sprit der lige akkurat rør bunden af papiret - men ikke når op til startlinjen!
   De to stykker papir hænges op på over samme glas, så alle variabler er de samme. Papirstrimlerne på dog IKKE røre hinanden



**Kontrolforsøg**

For at kontrollerer at der ikke er andre faktorer der har indflydelse på resultatet, som f.eks. pigment i papiret, opstilles et kontrolforsøg. Kontrolforsøget skal være identisk med det reelle forsøg der laves med spinatmassen, dog skal denne dråbe stof undværes. På denne måde kan vi sikre os at pigmenterne der dukker på papiret skyldes spinatmassen.

# RESULTAT AF FORSØGET

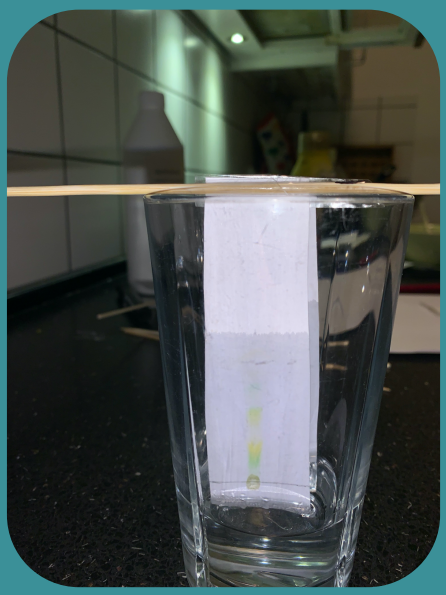
Nedenstående ses de to forskellige strimler papirs udvikling over tre timer. Strimmel A og B har været under samme forhold. Derudover ses kontrolforsøget efter 1 time og 30 minutter

**KONTROLFORSØG**

**1 t 30 min.**

**Papir A**

30 min.



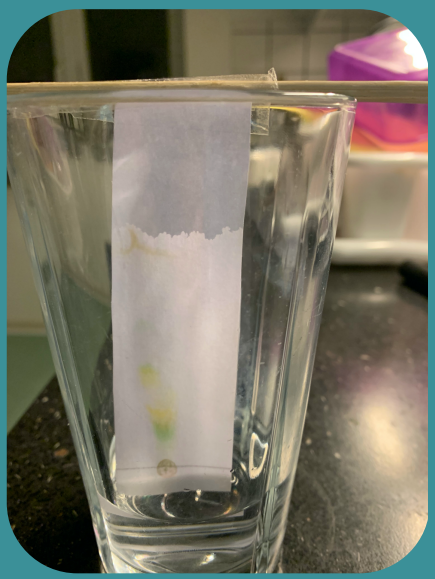
1t 30 min.

3 t

**Papir B**

30 min.

1 t 30 min.



3 t.

**DEN NATUR-VIDENSKABELIGE METODE**

I denne metode skelnes der mellem den kvalitative og kvantitative metode.

I den kvalitative metode indsamles der data vha. sanser - f.eks. det vi kan se. Her brugte vi den kvalitative metode, til at visuelt at bedømme pigmenterne

I den kvantitative metode indsamles der data vha. numeriske resultater, som mål og udregninger. Det blev brugt her, da der blev målt afstand fra startlinje til pigmenter, samt da der blev udregnet Rf-værdier

## KVALITATIVE OBSERVATIONER

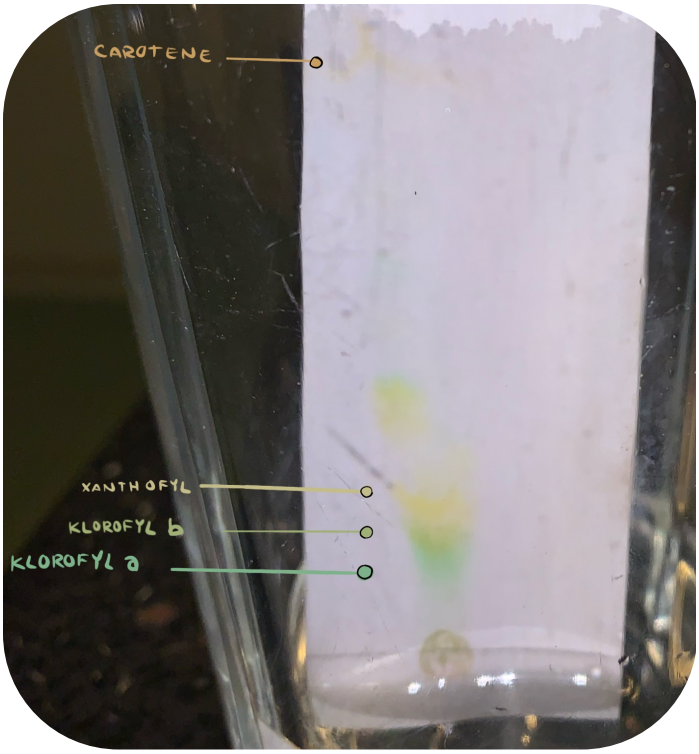
Det kan ses at kontrolforsøget er helt hvidt, og rent fra pigmenter - hvilket betyder at ingen andre faktorer havde indflydelse på resultatet. Derudover kan vi se de to strimler er relativt ens, men dog ikke helt tilfredsstillende, når de eksakt samme forhold tages i betragtning. Efter 30 minutter på papir B kan vi se en stor forskel i absorptionen fra papir A. Absorptionen på papir B er skæv, samt meget hurtigere, end den på papir A ved samme tidspunkt. Dette må altså betyde at papiret har varierende absorption. Der ses dog de samme pigmenter på begge papirstrimler, hvilket betyder papirets kvalitet ikke har indflydelse på den kvalitative vurdering af pigmenterne. På basis af farverne på papiret, kan vi kvalitativ bedømme hvilke pigmenter de tilhører, da:

*Klorofyl a* er blå-grøn

*Klorofyl b* er oliven-grøn

*Xantofyl* er gul

*Karoten* er orange



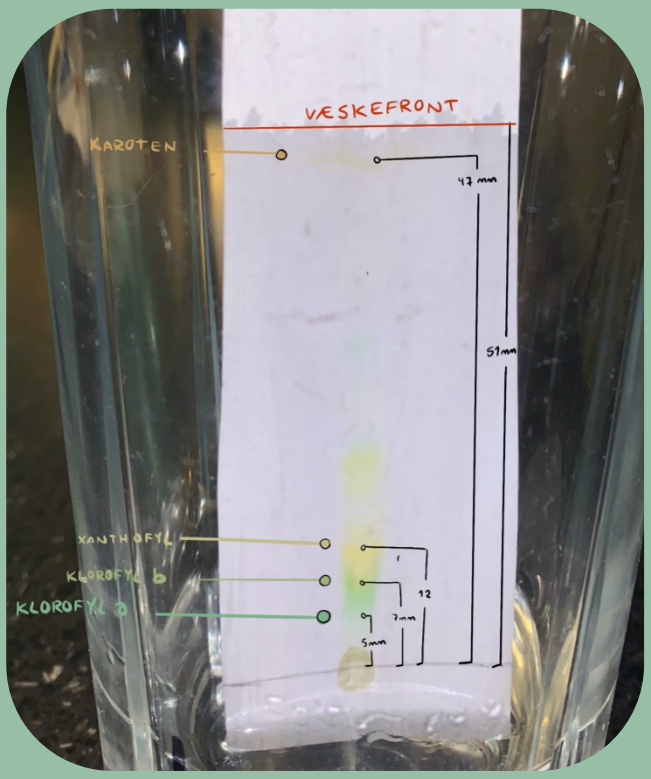

## KVANTITATIVE DATA

For kvantitativt at bedømme afstanden et pigment har bevæget sig, kan man finde Rf-værdien (den **R**efraktive **f**aktor). Denne beskriver forholdet mellem den strækning pigmentet har bevæget sig op ad papiret, relativt til den afstand væsken har bevæget sig. Det gælder at jo tættere Rf-værdien er på 1, des længere er pletten løbet. Rf-værdien beskrives ved:

$$R_f = \frac{Afstand\ pigmentet\ bevægede\ sig}{afstand\ opløsningsmidlet\ bevægede\ sig\ (fra\ startlinjen\ til\ væskefronten)}$$

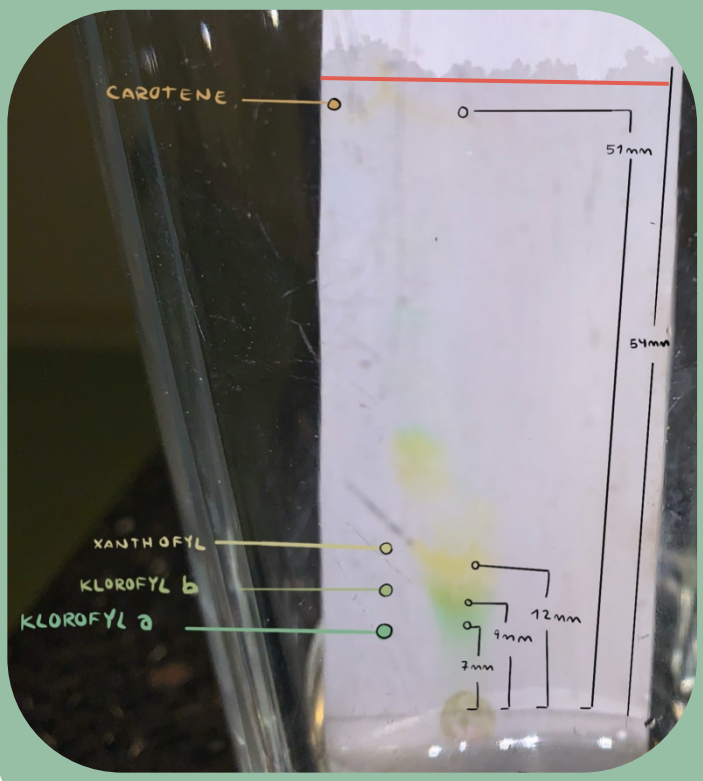
Hvert pigment har sin egen $R_f$-værdi, som kan bruge identificering. Disse vil vi bruge til sammenligning ved siden af vores kvalitativt bestemte pigmenter

## Beregnet afstand for papir A




| Pigment | Rf-værdi | Beregnet Rf-værdi | Forskel i % |
|---|---|---|---|
| Klorofyl a | 0,46 | $\frac{5}{51} \approx 0{,}09803922$ | $\frac{0{,}46-0{,}098}{0{,}46} \cdot 100 \approx 78{,}69565\%$ |
| Klorofyl b | 0,42 | $\frac{7}{51} \approx 0{,}1372549$ | $\frac{0{,}41-0{,}1372}{0{,}1372} \cdot 100 \approx 198{,}8338\%$ |
| β-karoten | 0,93 | $\frac{47}{51} \approx 0{,}9215686$ | $\frac{0{,}93-0{,}9215}{0{,}9215} \cdot 100 \approx 0{,}9224091\%$ |
| Xantofyl | 0,17 / 0,31 / 0,41 | $\frac{12}{51} = \frac{4}{17} \approx 0{,}2352941$ | $\frac{0{,}17-0{,}2352}{0{,}2352} \cdot 100 \approx -27{,}72109\%$ |

## Beregnet afstand for papir B




| Pigment | Rf-værdi | Beregnet Rf-værdi | Forskel i % |
|---|---|---|---|
| Klorofyl a | 0,46 | $\frac{7}{54} \approx 0{,}1296296$ | $\frac{0{,}46-0{,}129}{0{,}129} \cdot 100 \approx 256{,}5891\%$ |
| Klorofyl b | 0,42 | $\frac{9}{54} = \frac{1}{6} \approx 0{,}1666667$ | $\frac{0{,}42-0{,}166}{0{,}166} \cdot 100\% \approx 153{,}012\%$ |
| β-karoten | 0,93 | $\frac{51}{54} = \frac{17}{18} \approx 0{,}9444444$ | $\frac{0{,}93-0{,}944}{0{,}944} \cdot 100 \approx -1{,}483051\%$ |
| Xantofyl | 0,17 / 0,31 / 0,41 | $\frac{12}{54} = \frac{2}{9} \approx 0{,}2222222$ | $\frac{0{,}17-0{,}22}{0{,}22} \cdot 100 \approx -22{,}72727\%$ |

**PAPIRETS USIKKERHEDER**

På baggrund af resultaterne kan vi se at der ikke er overensstemmelse mellem den udregnede Rf-værdi, og pigmenternes registrerede Rf-værdi. Vi kan dog se at denne store forskel mellem den beregnede og den registrerede Rf-værdi går igen i både papir A og papir B.

Her ses den udregnede forskel mellem papir A, og papir B's beregnede Rf-værdier. Disse forskelle er betydeligt mindre end dem, mellem de udregnede/registrerede Rf-værdier.

| Beregninger for papir A | Beregninger for papir B | Forskel i %- |
|---|---|---|
| $\frac{5}{51} \approx 0{,}09803922$ | $\frac{7}{54} \approx 0{,}1296296$ | $\frac{0{,}13 - 0{,}098}{0{,}098} \cdot 100$ $\approx 32{,}65306\%$ |
| $\frac{7}{51} \approx 0{,}1372549$ | $\frac{9}{54} = \frac{1}{6} \approx 0{,}1666667$ | $\frac{0{,}1666 - 0{,}137}{0{,}137} \cdot 100$ $\approx 21{,}60584\%$ |
| $\frac{47}{51} \approx 0{,}9215686$ | $\frac{51}{54} = \frac{17}{18} \approx 0{,}9444444$ | $\frac{0{,}9444 - 0{,}921}{0{,}9444} \cdot 100$ $\approx 2{,}477764\%$ |
| $\frac{12}{51} = \frac{4}{17} \approx 0{,}2352941$ | $\frac{12}{54} = \frac{2}{9} \approx 0{,}2222222$ | $\frac{0{,}222 - 0{,}235}{0{,}235} \cdot 100$ $\approx -5{,}531915\%$ |

Fordi vi ved at papir A og B var under præcis samme forhold, samt fik resultater der var tilfredsstillende tæt på hinanden, må der menes ikke at være fejl i metoden, men i større grad med materialet. Derudover skal enheden hvori der var målt tages i betragtning. Da det var på så lille en skala, betød små usikkerhed meget for resultatet. Men vi har dog fundet ud af, at et A4-ark ikke virker lige så godt som kromatografi-papir der bruges i laboratoriet. Hvilken betydning har dette for forsøget?

**KAN FORSØGET BRUGES?**

Vi kan konkludere at forsøget kun kan bruges som kvalitativ vurdering af pigmenter ved separationen af disse - men ikke til kvantitativ udregning af Rf-værdier, da forskellen var alt for stor mellem den beregnede og officielle Rf-værdi. Derudover kan vi også konkludere at forsøget ikke følger den naturvidenskabelige metode, da man ved gentagelse af forsøget ikke får samme resultat. Forsøget kan dog i den grad bruges til separation af de forskellige pigmenter, da man forholdsvis tydeligt kunne se de forskellige farver fra pigmenterne. Så hvis man ikke er til de helt store udregninger, men gerne vil finde de "gemte" pigmenter i spinat, er dette et perfekt forsøg at lave derhjemme!