

## Scheiding van bladpigmenten met dunnelaagchromatografie

In dit experiment ga je een extract van klimopbladeren (*Hedera helix*) maken en de pigmenten in dit extract scheiden m.b.v. dunnelaagchromatografie (= Thin Layer Chromatography (TLC)). De extractie is snel en eenvoudig. Na de scheiding zijn de verschillende apolaire pigmenten zichtbaar zonder hulpmiddelen. In klimop komen de onderstaande apolaire bladpigmenten voor: chlorofyl a, chlorofyl b, carotenoïden. Carotenoïden bestaan uit twee klassen namelijk carotenen en xanthofylen. In bladeren bevinden alle pigmenten zich in de chloro- en chromoplasten en zijn direct of indirect betrokken bij het fotosyntheseproces.

Een andere groep van bladpigmenten zijn de anthocyanen. In bomen en struiken worden deze veelal in de herfst geproduceerd. Deze pigmenten bevinden zich in de vacuole van de plantencel en hebben een polair karakter. Vandaar dat ze niet m.b.v. onderstaande chromatografie methode worden gescheiden.

### Vorbereiding

- Lees het proefvoorschrift door.
- Bestudeer de veiligheidsinformatiebladen (MSDS = Material Safety Data Sheets) van de gebruikte stoffen. Noteer de juiste voorzorgsmaatregelen. Vermeld ook welke stoffen door de gootsteen mogen en welke apart moeten worden afgevoerd. Indien apart afgevoerd dan tevens aangeven bij welke categorie.

### Uitvoering

#### Benodigdheden

- handschoenen
- tafelpapier met plastic onderlaag
- tissue
- *Hedera helix* (= klimop) zonder steel
- zilverzand
- mortier en stamper
- 50 mL buizen
- spuit 20 mL (met Luer lock) en afsluitdop
- aceton
- aceton/petroleumether (40-60), 1:1
- aceton/petroleumether (40-60), 1:2
- verzadigde NaCl-oplossing
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- silica plaatje (1,3x8cm);  
(0,20 mm silica gel 60/UV<sub>254</sub> indicator, 4x8cm)
- capillair
- potlood en liniaal
- pincet (stompe punt)
- plastic pasteurpipet (3 mL)
- glazen cultuurbuis vlakke bodem  
(h 10 cm, binnen diameter 2,1 cm)  
met rubber stop
- reageerbuis + rubber stop + rek
- reactievaasje (1,5 mL) en rekje
- Gelamineerd wit vel

#### Werkwijze: Deel 1: Extractie en filtratie

1. Leg tafelpapier op tafel
2. Scheur boven een mortier 2 middelgrootte klimopbladen (ca. 2 g) in kleine stukjes van ongeveer 1 cm<sup>2</sup>.
3. Voeg een spatelpunt zilverzand toe.
4. Kneus m.b.v. de stamper de stukje blad totdat ze vochtig en donkergroen zijn.
5. Trek de spuit uiteen en breng de stukjes blad met de pincet over in de spuit.
6. Plaats de plunjer terug in de spuit en duw deze in tot een volume van ca. 5 mL.  
*Trek handschoenen aan en zorg voor goede ventilatie in de werkruimte!*
7. Zuig ca. 5 mL aceton op in de spuit. Keer de spuit om. Droog met tissue de bovenkant van de spuit. *N.B. aceton is een vluchtige stof en 'lekt' snel uit de spuit, dus werk boven het tafelpapier en draai de spuit na opzuigen snel om.*
8. Sluit de spuit af met het afsluitdopje.
9. Schud de spuit krachtig en ontlucht door dopje los te draaien. Herhaal dit een aantal keer.  
*Let op: er ontstaat overdruk waardoor druppels aceton uit de spuit kunnen komen.*
10. Hou de spuit omhoog en druk voorzichtig de meeste lucht uit de spuit en sluit deze weer af met afsluitdopje.
11. Leg de spuit in een donkere ruimte en wacht minimaal 5 minuten.

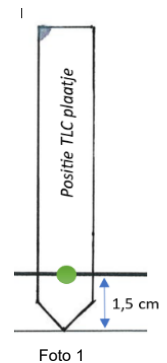
*Begin vast met deel 2.*

### Deel 2: uitzouten, scheiden en watervrij maken met $\text{Na}_2\text{SO}_4$

12. Vul reageerbuis met ca. 2,0 mL verz. NaCl-oplossing en 2,0 mL aceton/petroleumether 1:1.
13. Spuit het bladextract erbij (niet uitpersen!).
14. Meng de inhoud van de reageerbuis door te 'kwispelen' of een vortex te gebruiken.
15. Plaats een stop op de buis, schud eenmaal en ontlucht (stop eraf halen). Herhaal deze stap een aantal keer. *Let op: er ontstaat overdruk in de buis waardoor de stop eraf kan gaan en de inhoud eruit kan komen. Voorkom verwarming van de buis via je hand.*
16. Zet de buis daarna in een rek in het donker en laat het mengsel scheiden in 2 lagen. Wacht minimaal 5 minuten. *Ruim alvast wat op en start met voorbereiden van deel 3.*
17. Breng met een pasteurpipet (ca. 0,5 mL) van de organische/apolaire laag voorzichtig over in een reactievaatje (epje). *Let op dat de onderste waterlaag niet meekomt!*
18. Voeg een spatelpunt watervrij  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  toe en meng voorzichtig.

### Deel 3: Dunne laag chromatografie

19. Zet de cultuurbuis in het rek en voeg ca. 1,5 mL loopvloeistof aceton/petroleumether 1:2 toe. Sluit de buis af met een rubber stop.
20. Pak een TLC-plaatje. De TLC platen zijn lichtgevoelig dus doosje na gebruik gelijk afsluiten. De witte laag is zeer kwetsbaar, raak de laag zo min mogelijk aan.
21. Leg het TLC-plaatje op de positie van het gelamineerd witte papier (zie foto 1) met de gladde kant naar beneden.
22. Breng m.b.v. een capillair het extract uit het reactievaatje voorzichtig op het TLC-plaatje (zie groene stip figuur 1). Herhaal dit ca. 15x. Meerdere malen aanstippen zorgt voor een hogere concentratie van het monster. Zorg voor een zo klein mogelijk monsteroppervlak, dit bereik je door heel kort het TLC plaatje met de capillair aan te stippen en door de aangebrachte stip telkens goed te laten drogen.
23. Haal de stop van de cultuurbuis en laat het TLC-plaatje m.b.v. een pincet voorzichtig in de cultuurbuis met loopvloeistof zakken. Doe de stop voorzichtig op de buis en raak de buis verder zo min mogelijk aan.
24. Haal TLC-plaatje met pincet uit de buis wanneer de loopvloeistof tot ca. 0,5 cm van de bovenkant van TLC-plaatje is gekomen. Leg het plaatje op het tafelpapier en markeer het maximale niveau van loopvloeistof met potlood. Laat het TLC-plaatje drogen aan de lucht.
25. Maak een foto. Markeer de verkregen pigmentbanden voorzichtig met een potlood.  
*De pigmenten zijn lichtgevoelig met als gevolg dat de kleurintensiteit van de pigmenten onder invloed van licht zullen afnemen.*



## Reflectievragen en opdrachten

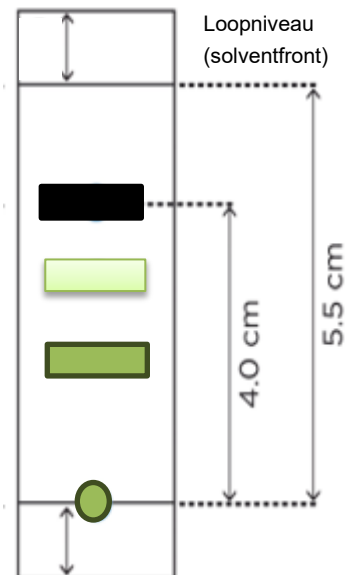
Het resultaat van dunnelaagchromatografie wordt uitgedrukt in de Rf-waarde (rate of flow). Deze Rf-waarde geeft de verhouding van de loopsnelheden van het onderzochte pigmenten in het monster t.o.v. loopvloeistof aan. Aan de hand van deze Rf-waarde kunnen pigmenten in goed gestandaardiseerde systemen worden geïdentificeerd.

De Rf-waarde wordt als volgt berekend:

$$R_f = \frac{\text{afstand afgelegd door het product}}{\text{afstand afgelegd door het solventfront}}$$

De waarde van Rf ligt tussen de 0 en 1. Aan de hand van deze Rf waarden kan geconcludeerd worden welke band welk pigment is. N.B. de Rf-waarden zijn afhankelijk van de gebruikte loopvloeistof en dragermateriaal etc.

De banden met pigmenten kunnen worden uitgeknipt, en pigment worden opgelost en ingedampt. Zo verkrijgt men de gescheiden bestanddelen van het mengsel.



**Opdracht 1:** Bereken de Rf-waarden voor elke pigmentband en verwerk de waarden in een tabel. Vermeld hierbij ook de kleur van de band.

Rf-waarden	Kleur pigment	Bladpigment

**Opdracht 2:** Zoek m.b.v. van tabel 1 bij berekende Rf-waarden de corresponderende Rf-waarden uit tabel 1 en noteer de overeenkomstige naam van het bladpigment in de tabel.

**Opdracht 3:** Kan je met behulp van de door jou opgezochte molecuulformules verklaren welke positie de verschillende pigmenten gekomen zijn? Daarvoor is het goed om te weten dat silicagel (SiO<sub>2</sub>) een polaire stof is.

Bladpigment	Rf-waarden	Kleur pigment
beta-Caroteen (C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> )	0,94	oranje/geel
Pheophytin (= Chl – Mg <sup>2+</sup> )	0,66	grijs
Chlorofyl a	0,53	Felgroen
Chlorofyl b	0,47	Donkergroen
Lutein (C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub> )	0,43	Geel
Xanthofyls (C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>x</sub> ) (zeaxanthin, antheraxanthin, neoxanthin, violaxanthin)	0,4 - 0,20	Geel

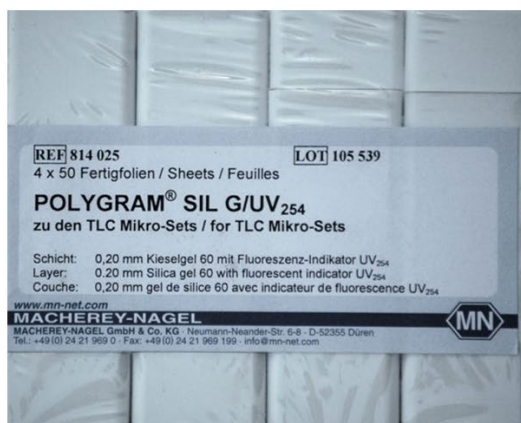
Tabel 1. Gemiddelde Rf-waarden bladpigmenten met silica (0,20 mm silica gel 60/UV<sub>254</sub> indicator) als dragermateriaal en loopvloeistof aceton/petroleumether (40-60) 1:2 uitgevoerd bij 20°C door de auteurs.

TLC plaatjes te bestellen bij Vosinstrumenten (<https://www.vosinstrumenten.nl/>)

0,73 euro per plaatje van 4x8 cm -> in drieën knippen -> 0,25 euro per strook van 1,3x8cm.

## M&N TLC PLATEN 40X80MM

Algemeen



PRIJS

€ 146,29  
excl. btw

Aantal

1

BESTEL DIT

### Specificaties:

Artikelnummer: 61242-814025

Merk: MACHEREY-NAGEL

### Omschrijving:

Polygram DC-folie SIL/G/UV 254, 40x80mm, 4x50 stuks. Silicagel dunne laag folie, klaar voor gebruik.