



Kasvien piilotetut väriaineet

Kohderyhmä: Työ sopii lukioon kurssille KE2 poolisuuden yhteyteen tai KE1-kurssille ja yläkouluun erotusmenetelmien yhteyteen, jolloin poolisuuteen liittyviä tehtäviä ei käsitellä. (LOPS 2019 & POPS 2014)

Kesto: 60–75 min.

Motivaatio: Kasvien värit ovat mielenkiintoisia ja lähellä oppilaan arkipäivää, työ on erittäin havainnollinen ja herättää pohtimaan erilaisten kasvien väriaineita. Samalla nähdään sovelluskohde erotusmenetelmän käytöstä ja havainnollistetaan poolisuuden merkitystä.

Tavoite: Tavoitteena on oppia kromatografia erotusmenetelmänä, ymmärtää poolisuuden merkitys kromatografiassa ja pohtia luonnon väriaineita kestävän kemian näkökulmasta.

Tarvikkeet

ohutkerroskromatografialevy ja ajoastia
kapillaariputki
2 mittalasi 10 ml
huhmare ja survin
suodatinpaperi
suppilo
petrimalja
sakset

Reagenssit

noin 3 g kasvien lehtiä
noin 15 ml asetonia
3 ml n-heksaania
7 ml dietyylieetteriä

Työturvallisuus / Huomioita ohjaajalle

Työ suoritetaan vetokaapissa. Työtä tehdessä tulee käyttää suojarahkka, -laseja ja -hanskoja.

Työssä käytettävät reagenssit ovat haihtuvia, herkästi syttyviä ja voivat aiheuttaa huimausta. Asetoni ärsyttää silmiä. Heksaani ärsyttää ihoa ja on haitallista vesieläimille. Dietyylieetteri on haitallista nieltynä. Roiskeet silmistä ja iholta huuhdellaan runsaalla vedellä. Tarvittaessa lääkäriin!

Käytetyt lehdet hävitetään biojätteisiin. Liuokset hävitetään orgaaniseen liuotinjätteeseen tai pieniä määriä voidaan haihduttaa vetokaapissa. Ohutkerroskromatografialevyt pakataan erilliseen muovipussiin ja laitetaan sekajätteeseen.



Pohdittavaksi ennen työtä

Työtä ennen suositellaan toteuttamaan paperikromatografia (työohje *Lisätietoja*-osiossa) kromatografian toimintaperiaatteen hahmottamiseksi.

1. Mikä on paperikromatografiassa paikallaan pysyvä faasi? Entä liikkuva faasi?

Paperikromatografiassa paikallaan pysyvä eli stationäärifaasi on suodatinpaperi ja liikkuva faasi vesi.

2. Mistä ruska johtuu?

Lehdet vaihtavat väriä syksyllä, koska kasvit lakkaavat tuottamasta lehtivihreää eli klorofyllejä. Klorofyllit hajoavat ja lehtien muun väriaineet tulevat näkyviin.

3. Missä lehtien väriaineet sijaitsevat?

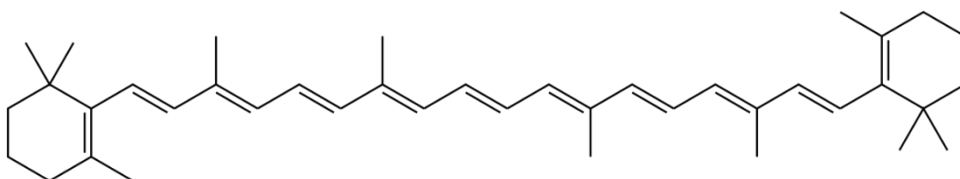
Väriaineet sijaitsevat suurimmaksi osaksi viherhiukkasissa eli kloroplastissa. Osa väriaineista sijaitsee solulimassa eli sytoplasmassa.

Tausta

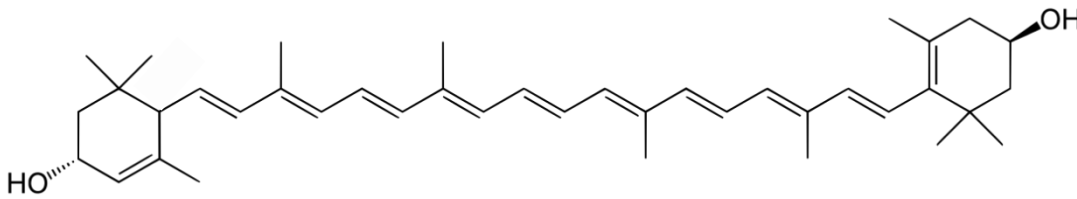
Värien monimuotoisuus on aina kiehtonut luonnontieteilijöitä, mutta vasta 1900-luvun alkupuolella alettiin ymmärtää kasvien väriaineisiin liittyvää kemiaa. Syynä tähän oli tarkoitukseen sopimattomat laboratoriovälineet ja menetelmät. Väriaineet esiintyvät luonnon materiaaleissa niin pieninä aine-määrinä, että niiden eristäminen oli vaikeaa ja vaikka eristäminen olisi onnistunut, puhtaita näytteitä ei kuitenkaan olisi pystytty analysoimaan käytössä olevilla menetelmillä riittävän tarkasti. Tarkkoihin määrittäisiin olisi tarvittu paljon näytteitä. Vasta kromatografian kehittyminen antoi työkalut kasvien väriaineiden käsittelyyn laboratoriossa.

Nykyisin teollisuudessa hyödynnetään suurimmaksi osaksi synteettisiä eli keinotekoisesti valmistet- tuja väriaineita. Perinteisten, luonnosta peräisin olevista yhdisteistä valmistettujen väriaineiden käyttö on vähäistä. Luonnon väriaineista on kiinnostuttu uudelleen niiden mahdollisen ekotehokkuu- den ja kiertotalouspotentiaalın takia. Myrkyttömät ja biohajoavat väriaineet voisivat mahdollistaa kes- tävämmät ratkaisut niin tekstiileissä, pakkauksissa kuin pinnoitteissakin.

Kasveissa on monia erilaisia väriaineita. Vihreän värin aiheuttaa lehtivihreä eli klorofylli. Keltaisen, oranssin ja punaisen värit johtuvat karotenoideista. Karotenoidit voidaan jakaa karoteeneihin ja ksantofylleihin. Karoteenit (kuva 1) ja ksantofyllit ovat molemmat rakenteeltaan samankaltaisia, iso- kokoisia kaksoissidoksia sisältäviä hiilivetyjä, mutta ksantofyllit sisältävät myös happea (kuva 2). Kuvan 1 beetakaroteeni on oranssinkeltainen ja kuvan 2 luteiini on keltainen. Kasvien siniset ja vio- letit värit aiheutuvat antosyaaneista.



Kuva 1. Beetakaroteenin rakennekaava



Kuva 2. Luteiinin rakennekaava

Työssä hyödynnetään kromatografiaa kasvin väriaineiden erottamiseen toisistaan. Kromatografia on yhdisteiden puhdistamiseen, eristämiseen ja analysointiin käytetty erotusmenetelmä. Menetelmä perustuu tutkittavan näytteen yhdisteiden vuorovaikutukseen kahden eri faasin kanssa. Faaseista toinen pysyy paikallaan (paikallaan pysyvä faasi) ja toinen liikkuu (liikkuva faasi) määrättyyn suuntaan. Tutkittavan näytteen yhdisteet kulkeutuvat liikkuvan faasin mukana paikallaan pysyvää faasia pitkin eri nopeudella riippuen yhdisteiden kemiallisista ominaisuuksista, kuten poolisuudesta. Liikkuva faasi voi olla neste tai kaasu. Paikallaan pysyvä faasi on joko kiinteä aine tai neste. Kromatografisia menetelmiä ovat muun muassa paperikromatografia ja ohutkerroskromatografia.

Ohutkerroskromatografiassa paikallaan pysyvänä faasina hyödynnetään ohutkerroskromatografialevyä, joka on pinnoitettu silikageelillä. Silikageeli on vettä sisältävää piioksidia ($\text{SiO}_2 \cdot X \text{H}_2\text{O}$). Silikageeli on nimestään huolimatta kiinteää ja kovaa. Silikageelirakenteen pinnalla on hydroksyyli-ryhmiä, joten aine on poolinen. Liikkuva faasi on neste, joka kutsutaan ajoliuokseksi. Ajoliuoksen valinnalla voidaan vaikuttaa näytteen yhdisteiden erottumiseen. Tässä työssä käytetään heksaanin ja dietyylieetterin seosta. Kyseinen ajoliuos on vähemmän poolinen kuin paikallaan pysyvänä faasina toimiva silikageeli. Tämän takia työssä poolittomammat yhdisteet liikkuvat liikkuvan faasin mukana pidemmälle kuin poolisemmat yhdisteet.



Kokeellinen osio / Työn suoritus

Punnitse noin 3 g kasvin lehtiä ja silppua ne saksilla huumareeseen.

Tee loput työvaiheista vetokaapissa. Lisää 10 ml asetonia ja hienonna lehtiä huumareessa noin 10–20 min. Asetoni haihtuu hienonnuksen aikana, joten lisää sitä tarvittaessa pienissä määrissä (noin 2 ml / lisäys).

Suodata seos suppilon ja suodatinpaperin avulla petrimaljalle. Ota suodos talteen.

Valmista kromatografian ajoliuos sekoittamalla 3 ml n-heksaania ja 7 ml dietyylieetteriä ajoastiassa. Sulje ajoastia kannella ja anna ajoliuoksen kaasuuntua 5 minuuttia.

Merkitse ohutkerroskromatografialevyyn pieni piste noin 1 cm alareunasta ja viiva 0,5 cm yläreunasta pehmeällä lyijykynällä. Pisteestä tulee valita siten, että ajon aikana pisteen kohdalle imeytetty näyte ei liukene ajoastian pohjalla olevaan ajoliuokseen. Huomaa, että imeytyksessä näyte leviää hieman pisteen alapuolelle. Merkitse yläreunaan tekijöiden nimikirjaimet 0,5 cm alueelle.

Siirrä näytettä kapillaariputkella petrimaljalta pienen pisteen päälle. Suorita imeytys yhteensä 10 kertaa. Jos näyte on ehtinyt kuivua, lisää siihen pieni määrä asetonia ja sekoita varovasti.

Siirrä levy ajoastiaan ja anna liuottimen nousta viivaan asti. Ajon jälkeen nosta levy ajoastiasta ja anna kuivua hyvin. Piirrä ja merkitse vyöhykkeet. Liuotin ja ajo-olosuhteet vaikuttavat väriaineiden erottuvuuteen, mutta väriaineet asettuvat alla olevaan järjestykseen.



uteeni (oranssi tai keltainen)

(harmaanvihreä)

a (sinivihreä tai oliivinvihreä)

o (harmaanvihreä tai kirkkaanvihreä)

taani, neoksantaani ja kryproksantaani (keltainen)

naani (ruskean keltainen)

eltainen)



Pohdinta työn jälkeen

Miksi kaikki työvaiheet lehtien silppuamista lukuun ottamatta tehtiin vetokaapissa?

Käytetyt liuottimet (asetoni, heksaani ja dietyylieetteri) ovat herkästi haihtuvia ja niiden hengittäminen on terveydelle haitallista. Vetokaapissa työskennellessä kaasut eivät päädy hengitysilmaan.

Mitä erotusmenetelmää hyödynnetään työvaiheessa, jossa lisätään asetonia? Miksi lehtiä hienonnettiin saksilla ja huhmareessa?

Erotusmenetelmä on uutto, sillä väriaineet liukenevat lehdistä asetoniin. Lehtiä hienonnettiin, jotta kasvisolut hajoavat ja lehtien pinta-ala kasvaa, jolloin uutto onnistuu paremmin. Kokonaisia lehtiä on vaikea hienontaa huhmareessa, joten niitä on hyvä esikäsitellä saksilla.

Miten luonnosta peräisin olevat väriaineet sopivat kestäväan kehitykseen ja kiertotalouteen?

Kasveista peräisin olevia väriaineita käytettäessä hyödynnetään uusiutuvista raaka-aineista peräisin olevia aineita, joka on yksi kestäväan kehityksen tavoitteista. Väriaineita voidaan erottaa kasvien osista, joita ei muuten hyödynnettäisi, jolloin muodostuu vähemmän jätettä, joka on kiertotalouden periaatteiden mukaista toimintaa.

Mihin käyttökohteisiin biohajoavia väriaineita voisi hyödyntää?

Biohajoavat väriaineet sopivat käytettävän biohajoaviksi suunnitelluissa materiaaleissa, esimerkiksi biohajoavissa kertakäyttötuotteissa tai muoveissa. Biohajoavat värit hajoaisivat tuotteen mukana eivätkä aiheuttaisi ympäristöhaittoja.

Valitse oikea vaihtoehto väittämään:

Koska työssä paikallaan pysyvä faasi (silikageeli) on poolisempaa kuin liikkuva faasi (asetonin ja heksaanin seos), poolisempi väriaine **nousee korkeammalle / jää alemmaksi** kuin poolittomampi väriaine.

Vinkki: Samanlainen vetää puoleensa samanlaista.

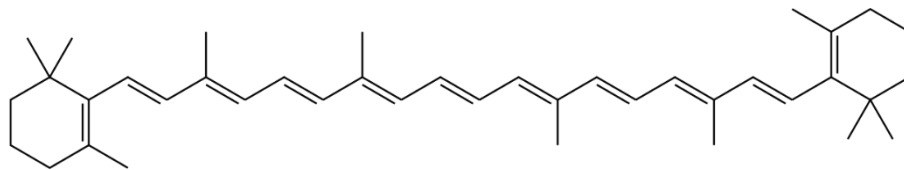
Poolisempi väriaine jää alemmaksi kuin poolittomampi väriaine, koska poolisempi väriaine vuorovaikuttaa enemmän silikageelin kanssa kuin poolittomampi väriaine eikä siten kulkeudu yhtä helposti ajoliuksen mukana.



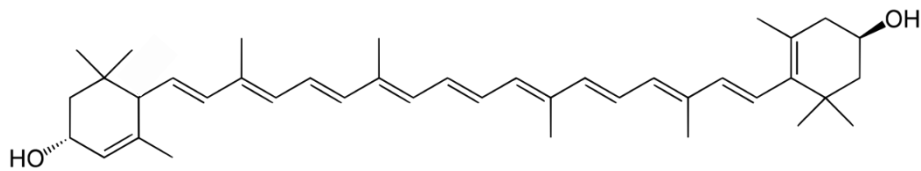
Tutki alla olevia väriaineiden rakennekaavoja ja päätele niiden perusteella kumpi parin vaihtoehdoista nousi ajon aikana korkeammalle ohutkerroskromatografialevyllä.

Korkeammalle nousi:

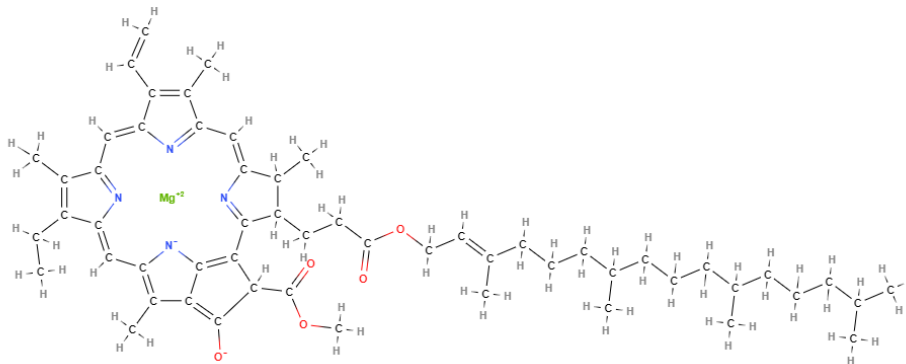
- **Beetakaroteeni** / luteiini
- **Klorofylli a** / klorofylli b



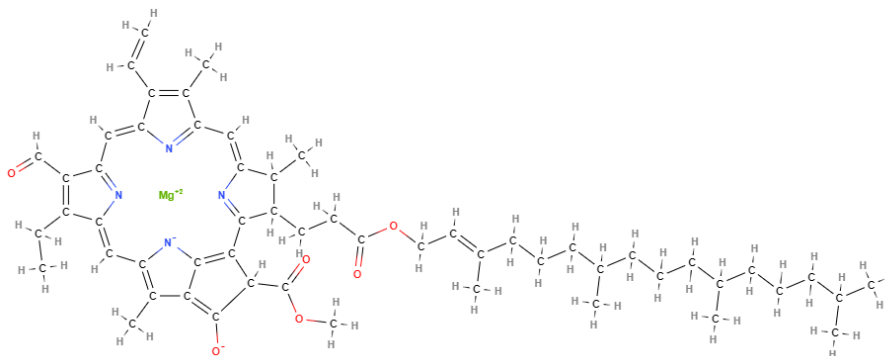
beetakaroteiini



luteiini



klorofylli a



klorofylli b



Toistat työohjeen mukaisen tutkimuksen punakaalille, jonka violetti väri johtuu antosyaaneista. Ajon jälkeen huomaat, että ohutkerroskromatografialevyyn imeytetty näyte ei ole liikkunut lainkaan. Mitä voit päätellä antosyaanien ominaisuuksista? Mitä sinun tulee tehdä, että ajo onnistuisi?

Antosyaanit ovat poolisempia kuin klorofyllit ja karotenoidit. Käytetty ajoliuos on liian pooliton antosyaaniyhdisteiden liuottamiseen, joten tulee valita poolisempi liuotin ajoliuokseksi. Vaihtoehtoisesti siilikageelin tilalla voisi hyödyntää toista vähemmän poolista kiinteää faasia.

Lisätietoja

Animaatio työhön liittyen

Englanninkielinen animaatio, jossa havainnollistetaan polaaritoman (beetakaroteeni) ja polaarisen (luteiini) molekyylin kulkeutumista ohutkalvokromatografialevyllä. Animaation voi näyttää esimerkiksi aiheeseen liittyvän tehtävän jälkeen.

Johannes Pernaa, Thin layer chromatography animation (YouTube-video).

Linkki: <https://www.youtube.com/watch?v=Mer8RFcGDvk>

Paperikromatografian työohje

Tarvikkeet:

- Keitinlasi tai vesilasi
- Vesiliukoinen tussi, joka sisältää eri värisiä väriaineita
- Valkaistu suodatinpaperi
- Vettä

Leikkaa suodatinpaperista keitinlasiin sopiva suorakulmion muotoinen pala ja merkitse siihen noin 1 cm päähän alareunasta piste tussilla. Lisää keitinlasin pohjalle noin 0,5 cm vettä (mustepiste ei saa osua veteen, kun suodatinpaperipala laitetaan keitinlasiin). Laita suodatinpaperin pala keitinlasiin ja anna veden nousta noin 0,5 cm päähän paperin yläreunasta. Nosta pala pois keitinlasista ja anna kuivua. Paperikromatografia perustuu näytteiden vesiliukoisuuteen. Vesiliukoiset yhdisteet kulkeutuvat veden mukana. Mitä vesiliukoisempi yhdiste on, sitä korkeammalle se kulkeutuu suodatinpaperissa.

Kapillaariputken valmistus lasisesta pipetistä

Opettaja voi tarvittaessa itse valmistaa kapillaariputkia lasisista pipeteistä bunsenpolttimen avulla. Syytä bunsenpoltin ja kuumenna lasipipetin keskikohtaa liekissä. Pyörittele pipettiä, jotta kaikki kuumenuskohdan reunat kuumenevat tasaisesti. Kun pipetin lasi alkaa sulamaan, nosta pipetti pois liekistä ja vedä rauhallisesti lasipipetin molemmista päistä. Katkaise muodostunut ohut kapillaariputki pienempiin osiin varovasti esimerkiksi kostean käsipyyhkeen sisällä lasin sirujen lentelyn välttämiseksi. Varmista, että valmistetun kapillaariputken reunat eivät ole terävät.



Kemianluokka
Gadolin