



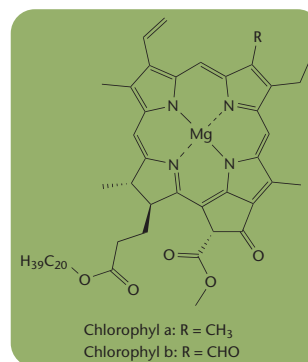
## TLC af peberfrugter

Peberfrugter findes i mange farvenuancer. Farvestoffet chlorophyll giver umodne peberfrugter deres grønne farve. I takt med at frugten modnes, nedbrydes chlorophyll, og forskellige carotenoider fremkommer, bl.a. lutein, violaxanthin og  $\beta$ -caroten, som giver gule og orange nuancer. Evt. fremkommer også røde carotenoider som capsanthin og capsorubin, se figur 1. De røde carotenoider findes stort set kun i peberfrugter.

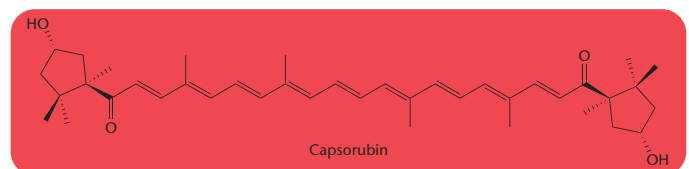
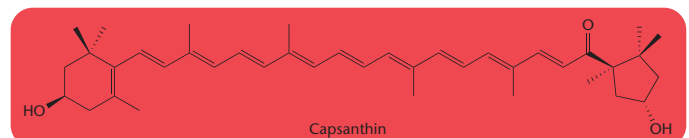
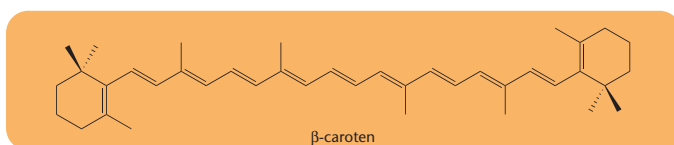
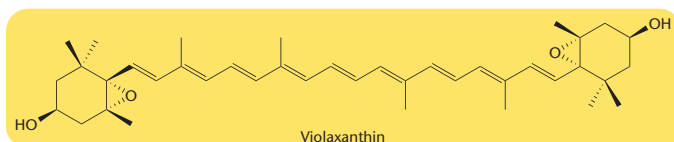
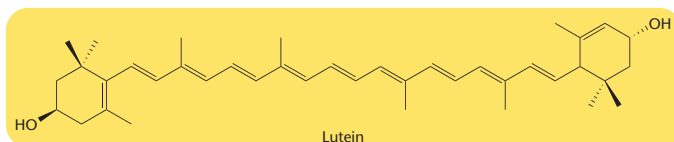
a



b



c



Figur 1. a. Peberfrugter. b. Strukturformel for chlorophyll. c. Strukturformler for gule, orange og røde carotenoider.

Formålet med dette eksperiment er at adskille pigmenterne i peberfrugter ved hjælp af tyndtlagskromatografi (TLC). Metoden adskiller kemiske forbindelser efter deres polaritet, og de mest upolære stoffer vil vandre længst på en TLC-plade. Læs mere om tyndtlagskromatografi i bogen side 196-200.

De enkelte pigmenters  $R_f$ -værdier afhænger af løbevæskens sammensætning. I figur 2 er der vist  $R_f$ -værdier for carotenoiderne (vist i figur 1) fra et tidligere eksperiment med den samme løbevæske som anvendes i dette eksperiment.



Carotenoider	Farve på bånd	$R_f$
$\beta$ -caroten	Orange	0,98
Capsanthin	Rød	0,91
Violaxanthin	Gul	0,80
Lutein	Gul	0,47
Capsorubin	Rød	0,34

Figur 2.  $R_f$ -værdier for fem carotenoider med løbevæske bestående af hexan:petroleumsether:acetone (1:2:1).

### Materialer

- Grønne, røde, orange og gule peberfrugter
- Løbevæske – hexan:petroleumsether:acetone (1:2:1)
- Kniv + skærebræt
- Blyant + lineal + saks
- TLC-plade med kiselgel
- Kromatografikar med tilhørende låg
- Filtrepapir
- Smeltepunktsrør eller spidser til mikropipetter
- Korte reagensglas med prop
- Morter med pistil
- Vægt

### Risici og sikkerhed

Løbevæsken danner sundhedsskadelige dampe, hvorfor forsøget skal foregå i stinkskaab. Undersøg H- og P-sætninger for de anvendte stoffer.

### Fremgangsmåde

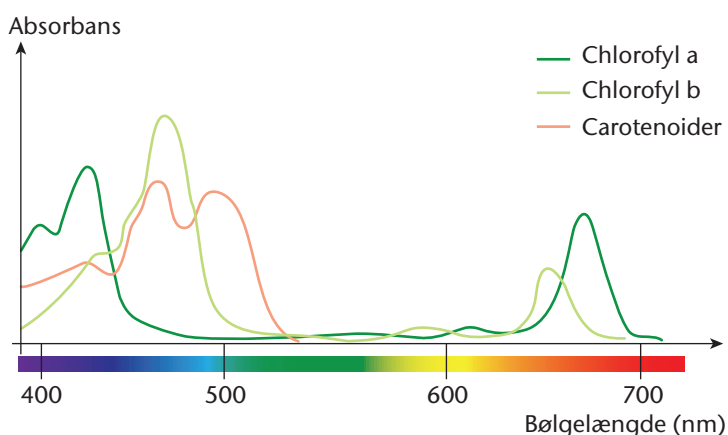
1. Forbered et kromatografikar ved at fore det på én af siderne med filtrepapir fra top til bund. Papiret skal være lidt længere end karret.
2. Hæld derefter ca. 0,5 cm løbevæske i karret.
3. Luk karret, så filtrepapiret sidder i klemme ved låget, og så det fugtes af løbevæsken i bunden. Lad det stå mens resten forberedes.
4. Fordel forskellige peberfrugter mellem holdene. Hvert hold afvejer 2 g peberfrugt uden stilk og kerner.
5. Skær peberfrugten i småstykker, og overfør til en morter der anbringes i stinkskaabet.
6. Tilsæt op til 10 mL af løbevæsken til morteren, og knus de små stykker peberfrugt med pistillen, så farvestoffer ekstraheres over i væsken.
7. Hæld derefter hurtigt ekstraktet over i et reagensglas med prop, og lad rester af den knuste peberfrugt bundfælde i reagensglasset.
8. Klip en TLC-plade så den passer til det anvendte kromatografikar.
9. Tegn en linje med en blyant ca. 1,5 cm fra bunden af pladen. Undlad at ødelægge kiselgelen.



- Opsug vha. udtrukne smeltepunktsrør eller spidser til mikropipetter et lille volumen af ekstraktet fra en peberfrugt, og anbring det i en plet på blyantstregen. Gentag evt.
- Anbring pletter for hver farve af peberfrugt der findes opløsninger af. Pletter skal være mindst 1 cm fra hinanden. De yderste pletter skal også være mindst 1 cm fra kanten.
- Notér hvilke peberfrugter der er anbragt hvor på pladen. Tag evt. et billede af pladen.
- Sæt TLC-pladen ned i kromatografkarret, så pletterne er foruden UDEN at de rører ved løbevæsken. Luk låget.
- Løbevæsken vil nu trække op ad pladen.
- Lad kromatografien løbe ca. 30 minutter eller indtil væskefronten nærmer sig toppen af pladen (den må max være 1 cm fra toppen). Imens kromatografien løber, kan der evt. begyndes på efterbehandlingen.
- Fjern TLC-pladen fra kromatografkarret, og tegn hurtigt (inden løbevæsken fordamper) en linje med blyant, der markerer hvor væskefronten er.
- Læg pladen til tørre i stinkskalet, men fotografér den med det samme.
- Anvend fotoet til at opmåle vandringsslængder, og beregn på det grundlag udvalgte båndes  $R_f$ -værdier.

### Efterbehandling

- Bestem antallet af farvede bånd i de forskellige peberfrugter.
- Beregn  $R_f$ -værdier for båndene, og identificer de fem carotenoider vist i figur 1, hvis det er muligt.
- Forklar sammenhængen mellem strukturformlerne af de fem carotenoider vist i figur 1, og deres  $R_f$ -værdier vist i figur 2.
- Sammenlign bånd mellem de forskellige peberfrugter. Hvilke ligheder og forskelle er der?
- Sammenlign  $R_f$ -værdier for de samme peberfrugter med andre hold, og diskuter årsager til afvigende værdier.
- Forklar ud fra absorptionsspektrene af hhv.  $\beta$ -caroten og chlorophyl a og b, vist i figur 3, samt farvecirklen vist i figur 7 side 13 i Videre med kemi hvorfor chlorophyller er grønne, og carotenoider gule, orange og røde.



Figur 3. Absorptionsspektre for forskellige plantepigmenter.  
Kilde: Elin Steffensen, Griffle

- Diskutér forsøgets fejlkilder.
- Lav en konklusion, hvor der tages stilling til om eksperimentets formål er opfyldt.