

# Eesti koolinoorte 46. bioloogiaolümpiaad

## Praktiline töö – taimefüsioloogia

---



Eesnimi: .....

Perekonnanimi:.....

Kool: .....

Klass: .....

Õpetaja:.....

Teie ees on praktilise töö juhend koos küsimustega. Täitke töö käigus tabel ning vastake seejärel küsimustele. Vastused kirjutage juhendisse, küsimuste juurde jäetud lünkadesse.

NB! Mõned küsimused nõuavad jah-ei vastust, mõne puhul tuleb oma otsust põhjendada.

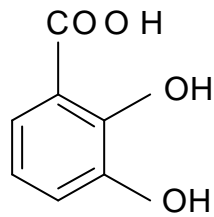
**Jõudu tööle!**

---

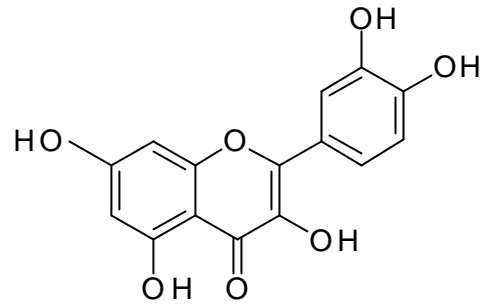
### FLUORESTSEERUVAD ÜHENDID TAIMEDES

Aine fluorestsentsiks nimetatakse neeldunud valguse uuesti väljakiirgumist aimest. Fluorestseeruvad ühendid taimedes kuuluvad põhiliselt nn. sekundaarainevahetuse produktide ja fotosünteesi pigmentide hulka. Sekundaarainevahetusena mõistetakse ainevahetusradasid, mis ei ole iseloomulikud kõikidele organismidele, vaid ainult teatud organismide rühmadele. Taimedes on üheks oluliseks sekundaarainevahetuse valdkonnaks fenoolsete ühendite ainevahetus. Fenoolsete ühendite hulka kuuluvateks loetakse aineid, mis sisaldavad molekulis ühe või mitme hüdroksiülrühmaga seotud benseeniringi. Fenoolsete ühendite laialdase leviku põhjuseks taimedes on nende osalemine mitmesugustes erinevates biokeemilistes ja füsioloogilistes protsessides, näiteks: puitaine biosünteesis; taimeosade värvuse määramisel (flavonoidid); kasvu ja arengu regulatsioonis; kaitses haigustekitajate, hapniku aktiivühendite ja ultraviolettkiirguse vastu.

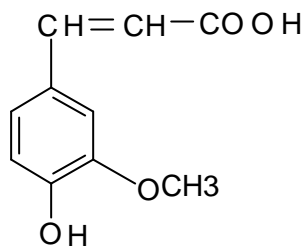
Ligniin on taimede rakkestadesse ladestuv suurt hulka benseenituumi sisaldav polümeerne puitaine, mis tekib p-kumaar-, feerula- ja sinaaphappe redutseerumisel moodustunud p-kumarüül-, koniferüül- ja sinapüülalkoholide polümeriseerumisel. Ligniin ei ladestu kõikide rakkude seintesse. Põhiliselt esineb ta sekundaarseina omavates juhtkudede ja tugikudede rakkudes. Kaitsereaktsioonides olulised fenoolsed ühendid paiknevad peamiselt epidermi ja epidermi aluste rakkude vakuoolides.



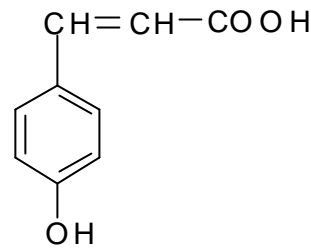
gentisiinhape



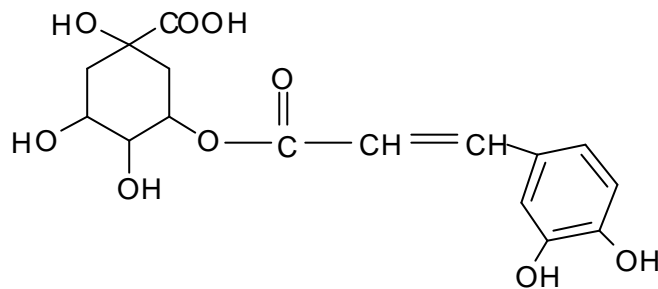
kvartsetiin (flavonoid)



feerulahape



p-kumaarhape



klorogeenhape

Enamik fenoolsetest ühenditest fluorestseerub ultravioletse (UV) valguse toimel, sest benseenituuma neeldumismaksimum paikneb ultravioletses piirkonnas (~280 nm). Seega need ühendid neelavad silmale nähtamatut UV kiirgust ja seejärel kiirgavad silmale nähtavat fluorestsentsvalgust. Fluorestsentsvalguse lainepikkus (värv) sõltub valgust neelava ühendi keemilisest ehitusest. Enamiku fenoolsete ühendite fluorestsentsvalgus on lillakassinine (aga esineb ka kollaselt, roheliselt ja punaselt fluorestseeruvaid ühendeid). Ka rakkestadesse ladestuva puitaine e. ligniini fluorestsents on lilla ligniini koostises olevate monomeeride värvuse tõttu. Klorofüll fluorestseerub punaselt.

Võime tõttu neelata UV kiirgust kasutatakse fenoolsete ühendite lokaliseerimise ja kontsentratsiooni määramisel taimekudedes sageli fluorestsentsmikroskoopi. Fluorestsentsmikroskoobi ehitus on samasugune kui tavalisel valgusmikroskoobil, kuid valgusallikana kasutatakse ultravioletsete kiirte allikat, tavaliselt elavhõbedalampi ja läätsed peavad olema valmistatud ultravioletti läbilaskvast kvartsist. Fluorestsentsmikroskoopi UV valguse toimel kasutatakse ka taimest eraldatud fenoolsete ühendite identifitseerimisel ja kontsentratsiooni määramisel kromatograafias.

## Kromatograafia alused

Kromatograafiat kasutatakse individuaalsete komponentide eraldamiseks ainete segust. Eraldamismeetodid baseeruvad erinevustel üksikute ainete füüsikaliskemilistes omadustes nagu molekulmass, molekulide kuju ja laeng, lahustuvus, absorptsioon jne. Igasuguse kromatograafilise süsteemi vältimatud komponendid on:

- Statsionaarne liikumatu faas – tahke aine või geel või vedelik, mis hoitakse kinni tahkel matriitsil.
- Statsionaarse faasi pakend – statsionaarne faas võib paikneda klaasist või metallist kolonnis, asuda õhukese kihina klaasist või plastmassist plaadil või olla adsorbeerunud tselluloosi kiududel (paber).
- Liikuv faas, kas vedelik või gaas, mis lahustina kannab proovis olevad ained läbi statsionaarse faasi ja elueerib need erinevatesse fraktsioonidesse.
- Erinevate ainete detekteerimise süsteem.

Õhukesekihilise kromatograafia rakendamisel kantakse ainete segu plaadile kapillaari abil. Laik kuivatatakse ventilaatoriga ja plaat asetatakse liikuvat faasi ehk voolutit sisaldavasse voolutusnõusse. Vooluti koosneb sageli orgaaniliste hapete ja alkoholide vesilahustest mitmesugustes proportsioonides. Voolutil lastakse tõusta 80 – 90% kogu plaadi pikkusest, plaat võetakse seejärel voolutusnõust välja ja kuivatatakse.

Individuaalse aine liikumist on võimalik väljendada nn.  $R_f$  (relative frontal mobility) abil.  $R_f$  = aine poolt läbitud tee pikkus jagatud vooluti frondi poolt läbitud tee pikkus.  $R_f$  on standardtingimustes konstantne kindla aine ja voolutisüsteemi jaoks ja iseloomustab aine jaotuvust statsionaarse faasi (ränioksiidil adsorbeerunud vesi) ja liikuva faasi (vooluti) vahel. On olemas  $R_f$  tabelid kindlate ainete jaoks kindlates voolutisüsteemides, kuid tavaliselt ainete segu komponentide identifitseerimisel samale kromatogrammile kantakse ka oletatavad testained.

## Tööülesanded

1. Õhukesekihilise kromatograafia abil eraldada üksteisest segus esinevad fenoolsed ühendid
2. Testainete abil teha kindlaks, millised konkreetset ühendid segus esinevad.

**Töövahendid:** ultrakemiskoop, õhukese kihi plaadid, voolutuskamber, kapillaarpipetid, vooluti, fenoolsete ühendite 0.01%-lised etanoolilahused (kohvhape, gentisiinhape, kloroogeenhape, feerulahape, kvvertsetiin), tundmatute ainete segu.

## Töö läbiviimine

Õhukesekihilise plaadi (10x10 cm) alumisest servast 2 cm kaugusele tõmmatakse hariliku pliatsiga joon. Kapillaarpipettidega kantakse sellele joonele 1 cm pikkuste ribadena ühe tõmbega testainetena kasutatavaid fenoolseid ühendeid, kloroogeen-, kohv-, feerula-, gentisiinhapet ja kvvertsetiini, samuti tundmatute ainete segu. Laikude vahele jäetakse 1 – 1.5 cm pikkused vahemikud. Alati enne järjekordse koguse pealekandmist lastakse laikudel kuivada. Igat ainet kanda plaadile viie tõmbega. Ainete segu lahutuvus voolutis on seda parem mida kitsama ribana on laik peale kantud. Tuleb jälgida, et lahutav kiht plaadil pealekandmise kohal ei saaks vigastada, sest see takistab vooluti ja ainete liikumist.

Voolutuskambrisse valatakse 2 cm kiht voolutit (etüülatsetaat/ sipelgahape/ vesi 8:1:1 V/V) ja lastakse kambrisse vooluti aurudega küllastuda. Pärast testainete ja ainete segu paberile kandmist asetatakse õhukesekihiline plaat voolutisse vertikaalasendis, nii et ühendite laigud oleksid vooluti tasemest natuke kõrgemal. Voolutamine lõpetatakse, kui vooluti front on plaadi ülemisest äärest 1-2 cm kaugusel. Pärast voolutamist plaat kuivatatakse ja vaadeldakse ultravioletvalguses ultrakemiskoobiga. Pliatsiga tähistatakse laikude piirjooned ja värvus, samuti vooluti liikumise kõrgus. Seejärel vaadeldakse kromatogrammi ammoniiaagi aurudes ja registreeritakse, kas ainete fluorestsentsvalgus muutus või mitte. Värvuse muutus on põhjustatud benseenituumaga seotud hüdroksüülrühmade dissotsiatsiooniastme muutumisest ammooniumhüdroksiidi aluselises keskkonnas.

## Tulemused ja vormistus

| Testaine või ühend taime ekstraktist | R <sub>f</sub> | Värvus UV-s       |                   |
|--------------------------------------|----------------|-------------------|-------------------|
|                                      |                | - NH <sub>3</sub> | + NH <sub>3</sub> |
| Gentisiinhape                        |                |                   |                   |
| Feerulahape                          |                |                   |                   |
| Kohvhape                             |                |                   |                   |
| Kloroogeenhape                       |                |                   |                   |
| Kvvertsetiin                         |                |                   |                   |
| Tundmatu segu:                       |                |                   |                   |
| 1.....                               |                |                   |                   |
| 2.....                               |                |                   |                   |
| 3.....                               |                |                   |                   |

Tabeli andmete alusel otsustatakse, millised testainetena kasutatud ühendid tundmatute ainete segus esinevad (kokkulangev  $R_f$ , värvus, värvuse muutus ammoniaagi aurudes). Kirjuta nende ühendite nimed tabelisse. Põhjendus kirjuta tabelile järgnevatele tühjadele ridadele.

**Põhjendus:**

### Küsimused

1. Millised keemilise struktuuri iseärasused on iseloomulikud fenoolsetele ühenditele?
2. Millel põhineb õhukesekihikromatograafias ainete segu lahutamise üksikkomponentideks?
3. Mis on  $R_f$  ja miks seda kasutatakse?
4. Miks ei ole  $R_f$  samade ainete puhul sama kui lahutamiseks kasutatakse erinevat voolutisüsteemi?
5. Miks ainest väljakiiratud fluorestsentsvalgus on silmale nähtav, samal ajal kui aine poolt neelatav UV valgus pole?
6. Miks on fenoolsed ühendid heaks kaitseks UV kiirguse eest?