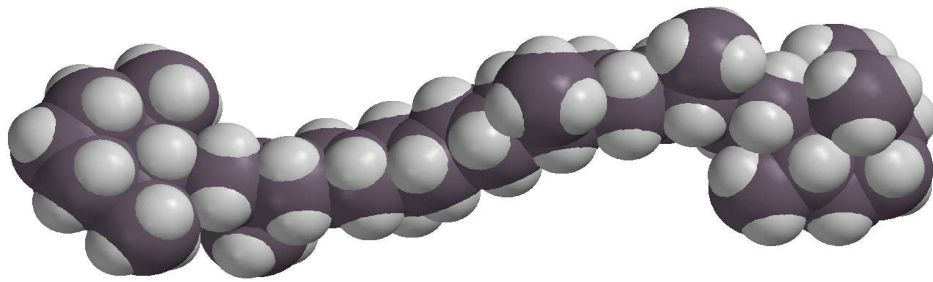


# KAROTENOIDIEN ERISTYS JA MALLINTAMINEN



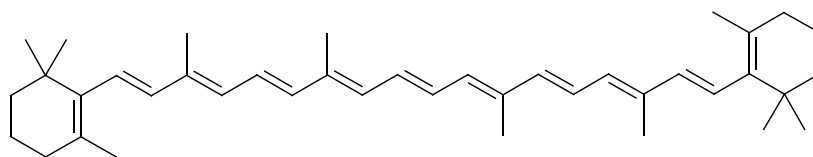
## SISÄLLYSLUETTELO

JOHDANTO .....	2
TARVIKKEET JA REAGENSIT .....	3
LABORATORIO-OSUUS .....	4
MALLINNUS .....	5
OPETTAJALLE .....	7
OPS-YHTEYS .....	9
LÄHTEET	

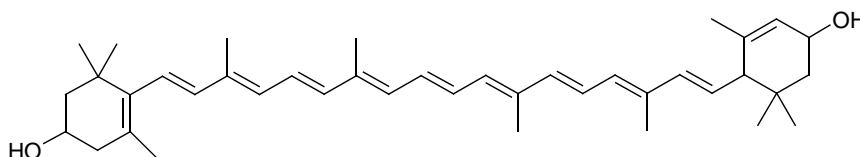
## JOHDANTO

Hyönteismaailman värien monimuotoisuus on aina kiehtonut luonnontieteilijöitä, mutta vasta 1900-luvun alkupuolella alettiin ymmärtää pigmentteihin liittyvää kemiaa. Syynä tähän oli tarkoitukseen sopimattomat laboratoriovälineet ja menetelmät. Pigmentit esiintyvät luonnon materiaaleissa niin pieninä ainemäärinä, 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 hyönteisiä. Vasta kromatografian kehittyminen antoi työkalut pigmenttien käsittelyyn laboratoriossa.

Hyönteisissä on sekä rasva- että vesiliukoisia pigmenttejä. Hyönteisten elimistöön pigmentit tulevat ravinnon kautta. Hyönteisissä olevat rasvaliukoiset pigmentit ovat karotenoideja. Karotenoidit voidaan jakaa karoteeneihin ja ksantofylleihin. Karoteenit (kuva 1) ja ksantofyllit ovat molemmat rakenteeltaan samankaltaisia, isokokoisia isopreenihiilivetyjä, mutta ksantofyllien rakenteet sisältävät happea (kuva 2). Karoteenit ja ksantofyllit ovat pääosin keltaisia pigmenttejä,  $\beta$ -karoteeni on oranssinkeltainen ja ksantofylli luteiini on keltainen, mutta ne ilmenevät usein hyönteisissä vihreänä värinä.  $\beta$ -karoteeni- ja luteiinimolekyylit muodostavat hyönteisten elimistössä proteiinien kanssa vesiliukoisia komplekseja.

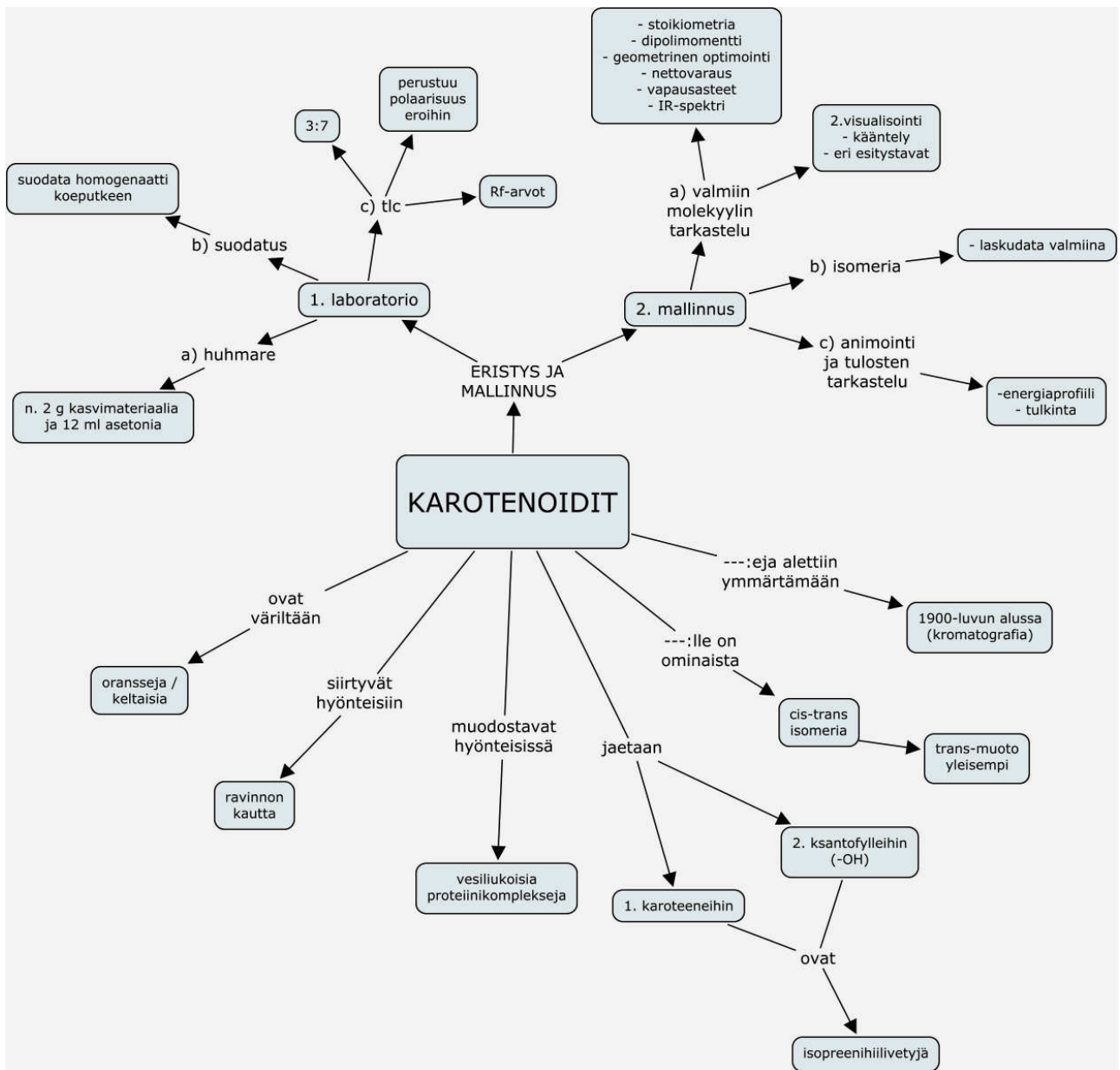


Kuva 1.  $\beta$ -karoteenin rakennekaava.



Kuva 2. Luteiinin rakennekaava.

Pigmenttien eristys ohutkerroskromatografialla perustuu molekyylien polaarisuus eroon, jolloin ne liikkuvat levyllä eri nopeudella. Ohutkerroskromatografialevyssä on polaarista piihappogeeliä, jolloin polaariset molekyylit liikkuvat levyä pitkin hitaammin kuin poolittomat.  $\beta$ -karoteenin nousee levyllä korkeammalle kuin luteiini, koska luteiinissa olevat hydroksyyliiryhmät tekevät siitä  $\beta$ -karoteenia polaarisemman.



Kuva 3. Graafinen esitys työn suorituksesta ja teoriasta.

### TARVIKKEET JA REAGENSIT

- asetonia 3 x 12 ml
- dietyylieetteriä
- n-heksaania
- kolmen eri kasvin lehtiä (kuva 4)
- ohutkerroskromatografia levyjä ja ajoastia
- mittapipetti 10 ml
- suodatin paperia
- suppilo
- huumare ja survin



Kuva 4. Kasvien lehtiä

## LABORATORIO-OSUUS

### 1. Kasvimateriaalin hienontaminen (1 h)

Työskentelyn aikana näytteet on suojattava valolta mahdollisimman hyvin karotenoidien hajoamisen estämiseksi. Punnitse noin 2 g kasvin lehtiä, silppua ne saksilla huumareeseen ja hienonna (kuva5) 12 ml:ssa 100 % asetonia. Valmista kolme näytettä.



Kuva 5. Hienonnus

### 2. Suodatus (10 min)

Suodata homogenaatit petrialjoille.

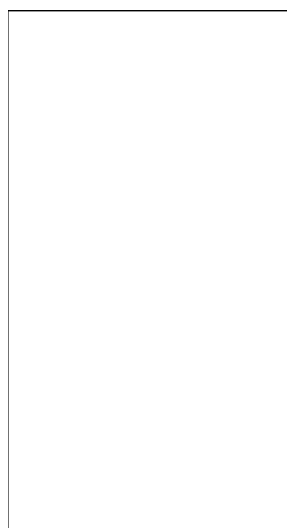
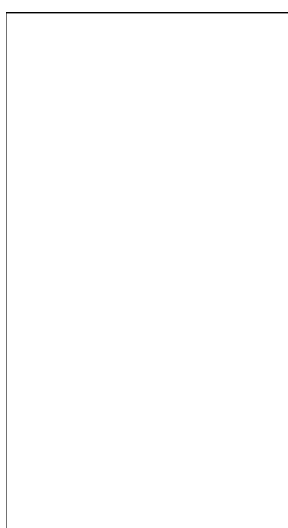
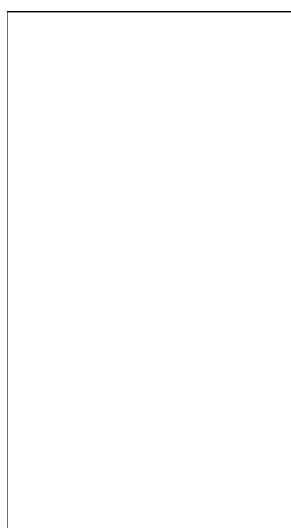
### 3. Ohutkerroskromatografia (20 min)

Karotenoidit eristetään näytteestä ohutkerroskromatografian (kuva 6) avulla. Valmista kromatografian ajoliuos sekoittamalla n-heksaania ja dietyylieetteriä 0,5 cm ajoastiaan suhteessa 3:7. Anna ajoliuoksen kaasuuntua astiassa 5 minuuttia. Leikkaa kaasuuntumisen aikana ajoastiaan sopivat palat ohutkerroslevystä. Kasta levyn alapää näytteeseen ja anna imeytyä 1 cm verran, toista imeytys viisi kertaa. Suorita ajo ja anna liuotin rajan nousta noin 0,5 cm päähän levyn yläreunasta. Ajon jälkeen anna levyn kuivua hyvin. Piirrä ja merkitse vyöhykkeet ja laske värijuovien R<sub>f</sub>-arvot kuvaan 7. Yhdisteiden R<sub>f</sub>-arvot riippuvat ajo-olosuhteista, mutta liuottimesta ja kromatografiasta huolimatta karotenoidit asettuvat seuraavaan järjestykseen.



Työssä käytettävät reagenssit ovat haihtuvia ja herkästi syttyviä, joten niitä täytyy käsitellä vetokaapissa.

Kuva 6. Ohutkerroskromatografia



β-karoteeni (oranssi tai keltainen)

feofytiini (harmaanvihreä)

klorofylli a (sinivihreä tai oliivinvihreä)

klorofylli b (harmaanvihreä tai kirkkaanvihreä)

violaksantaani, neoksantaani ja kryproksantaani (keltainen)

kseaksantaani (ruskean keltainen)

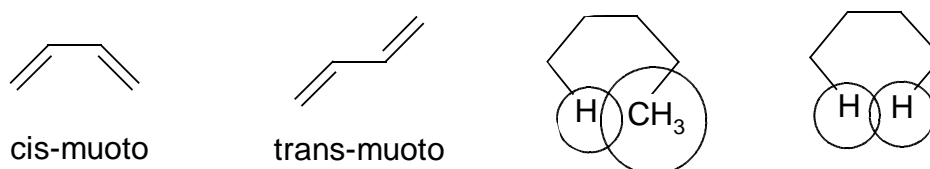
luteiini (keltainen)

Kuva 7. Piirrä laatikoihin levyjen 1, 2 ja 3 kuvat ja vertaile toisiinsa

## MALLINNUS

Kaksoissidosten suuren lukumäärän myötä karotenoideille on ominaista monipuolinen isomerian esiintyminen, useimmiten cis-trans isomeriaa. Kuitenkin luonnossa esiintyvistä isomeereistä suurin osa on trans-muodossa ja vain pieni osa cis-muodossa, koska cis-isomeeri aiheuttaa suuremman steerisen esteen vetyatomien tai/ja metyyliryhmien välille (kuvat 8, 11 ja 12). Cis-muoto on yleensä termodynaamisesti epästabiilimpi ja energettisesti korkeampi, kuin trans-muoto mikä johtuu cis-muodon elektronien epäedullisemmasta sijoittumisesta molekyylissä.

Tehtävän mallinnusosa koostuu kahdesta osiosta. Ensimmäisessä osassa tutkitaan valmista  $\beta$ -karoteeni molekyylä. Toisessa osiossa tarkastellaan cis-trans isomeriaa pelkistetyin mallin avulla. Mallinnusosa on tehty Spartan 04 student versiolla.

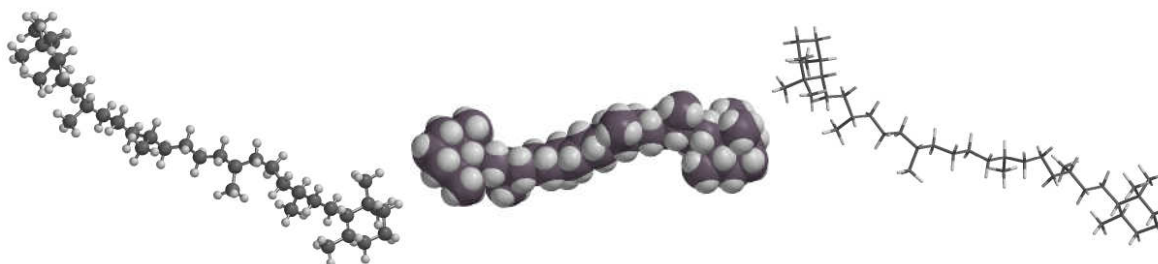


Kuva 8. Cis-trans isomeria

## TYÖN SUORITUS

### 1. Tarkastellaan valmista beta-karoteeni molekyylä

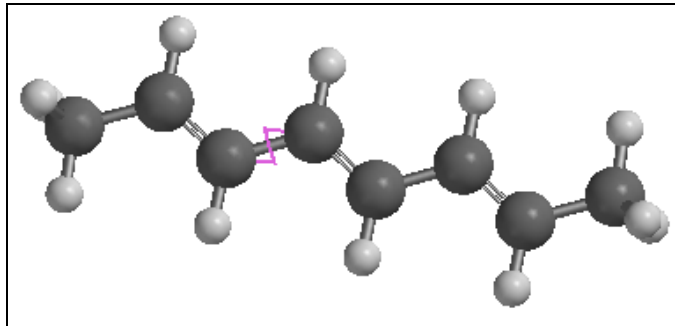
- Kerrataan molekyylin liikuttelu
  - o Käännä molekyylä – hiiren vasen näppäin pohjassa
  - o Liikuta molekyylä työtasolla – hiiren oikea näppäin pohjassa
  - o Suurena, pienennä molekyylä – shift + hiiren oikea näppäin pohjassa
  - o Käännä molekyylä työtasossa – shift + hiiren vasen näppäin pohjassa
- Visualisoidaan molekyylä eri esitystavoilla (kuva 9), "Model"
- Tarkastellaan molekyylimekaniikkaa. "Display" → "Output"
- Tutkitaan molekyylä IR-spektriä ja värähtelyjä, "Display" → "Spectra" → "Draw IR spectrum"



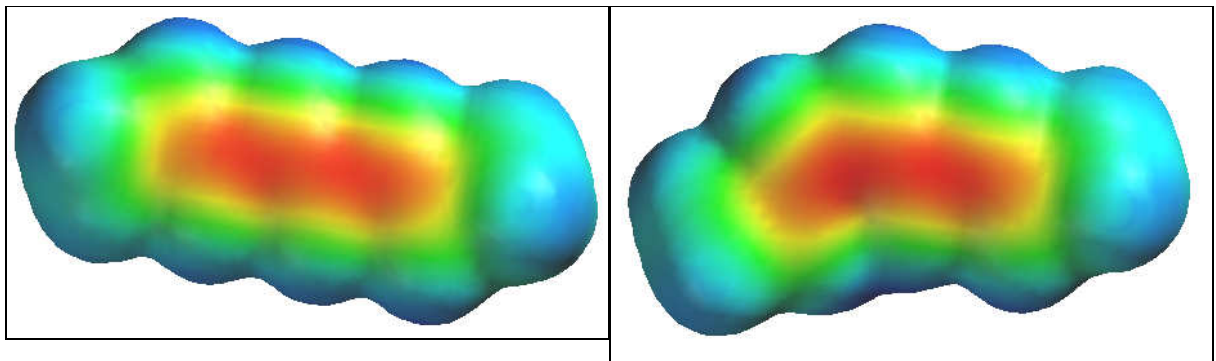
Kuva 9. Pallo-tikku, kalotti ja putkimalli

## 2. Cis-trans isomeria

- Suljetaan "beta-karoteeni.spartan" ja avataan "beta-karoteeni\_cis-trans \_malli\_Profile1.spartan"
- Näytölle avautuu pelkistetty malli beta-karoteenin hiiliketjusta (kuva 10).
- Molekyylistä on laskettu potentiaalienergiapinta kiertäen 360 astetta merkittyä sidosta → vasemmalta alhaalta voit klikata animaation käytiin.
- Potentiaalipinta-animaation voi tallentaa "Save as" komennolla .avi-tiedostoksi.
- Visualisoi myös elektronitiheydet → "Display" → "Surfaces"
- Klikkaa keltaista laatikkoa, jolloin pinta näkyy
- Klikkaa pintaa hiiren vasemmalla näppäimellä, jolloin oikealta alhaalta voit muuttaa pinnan esitystapaa



Kuva 10. Pelkistetty malli betakaroteenin hiiliketjusta.



Kuva 11. Trans-muodon malli

Kuva 12. Cis-muodon malli

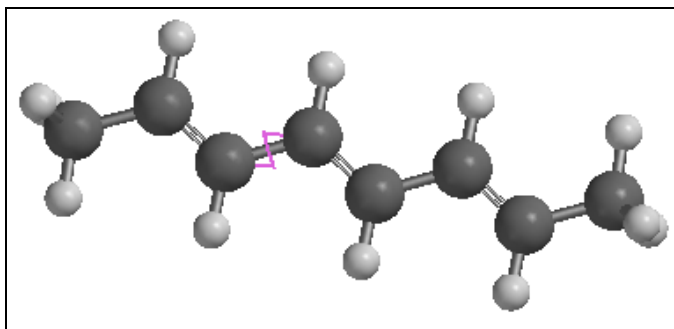
OPETTAJALLE (näin rakennat valmiit molekyylit oppilaiden tarkasteltavaksi)

## 1. Rakennetaan $\beta$ -karoteeni molekyyli

- Lisää sykloheksaani
- Lisää 18  $sp^2$ -hiiltä
- Lisää sykloheksaani
- Lisää molempiin renkasiin kolme  $sp^3$ -hiiltä ja ketjuun neljä 3  $sp^3$ -hiiltä
- Lisää kaksoissidokset molempiin renkasiin
- Poista ylimääräiset valenssit
- Oikealla alhaalla lukee nyt beta-carotene
- Putsaa steeriset esteet
- Siirry mallinnuspuolelle visualisoimaan
- Tarkastellaan eri esitys tapoja (kuva 9)
  
- Calculate: Equilibrium geometry  
Molecular mechanics
- Laita ruksi IR-laatikkoon
  
- Spartanin opiskelijaversio pystyy laskemaan betakaroteenia pelkästään molekyylimekaniikka laskutasolla suuren kokonsa vuoksi.
  
- Tallenna tiedosto

## 2. Avaa uusi sivu

- Rakennetaan malli, jonka avulla visualisoidaan cis-trans-isomeria (kuva 13)
- Lisää kahdeksan  $sp^3$ -hiiltä
- Lisää kolme kaksoissidosta
- Poista ylimääräiset valenssit
- Putsaa steeriset esteet
- Oikealla alhaalla lukee nyt (2E, 4E, 6E)-octatriene



Kuva 13. Malli



### 3. Mallinnetaan molekyylin potentiaalienergia

- Valitse Geometry → Constrain Dihedral

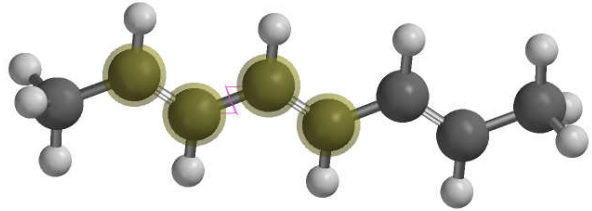
- Klikkaa hiiliatomeja, joiden suhteen tapahtuvaa torsioliikettä tarkastellaan (kuva 14) valitut molekyylit muuttuvat keltaiseksi

- Seuraavaksi klikkaa ikkunan oikeassa alakulmassa aktivoitunutta vaaleanpunaista lukonkuvaa → lukko sulkeutuu ja ohjelma ilmoittaa sen hetkisen torsiokulman arvon. Tämä määrittelee torsiokulman, jonka suhteen tapahtuvaa kiertoa tarkastellaan.

- Valitse Display → Properties, jonka jälkeen klikkaa molekyylissä esiintyvää vaaleanpunaista torsiokulman merkkiä

- Rastita Dynamic laatikko

- Vaihda uudet arvot 180 – (-180) ja 40 (paina enteriä niin arvo muuttuu)



Kuva 14. Hiiliatomien valitseminen

### 4. Potentiaalienergian laskeminen

- Lasketaan molekyylin energiaprofiili

- Setup → Calculations, josta valitse → Calculate: Energy profile  
Semi Empirical

- Tallenna alkutilanne → file → Save as → beta-karoteeni\_cis-trans\_malli "Save"

- Laskun loputtua sulje alkuperäinen tiedosto ja avaa uusi tiedosto " beta-karoteeni\_cis-trans\_malli.Profile1.spartan ", joka sisältää energiaprofiililaskun tulokset

- Laske molekyylille myös elektronitiheydet

- Tarkastellaan elektronien jakautumista molekyylissä
- Valitse "Setup" → "Surfaces"  
Surface: Density  
Property: Potential  
Valitse lopuksi "OK"

- Valitse "Setup" → "Submit", jolla haluttu pinta lasketaan (Keltainen laatikko "Surfaces"-ikkunassa kertoo lasketusta pinnasta)
- Klikkaa keltaista laatikkoa, jolloin pinta näkyy
- Klikkaa pintaa hiiren oikealla näppäimellä, jolloin oikealta alhaalta voit muuttaa pinnan esitystapaa

## 5. Cis-trans muotojen visualisointi

- Visualisoidaan mallin energiaprofiili:

Display → Spreadsheet (Add / Rel. E / Apply)

Display → Plots

XY-plot: X-axis: molecule

Y-axis: Rel. E (kcal/mol) (suhteellinen energia)

- Molekyylimallin viereen avautuu kuvaaja, joka toimii siirrettävänä objektina, kuten molekyylimallikin

- Spartan-ohjelman ikkunan vasemmasta alakulmasta löytyy "liukuri", jonka avulla voit tutkia eri rakenteiden sijoittumista energiapinnalle

- Potentiaalipinta-animaation voi tallentaa "Save as" komennolla .avi-tiedostoksi.

## OPS-YHTEYS JA POHDINTAA

Työ on teoreettiselta vaatimustasoltaan lukiolaisten työ. Sisältönsä puolesta työn voi sijoittaa useampaankin kurssiin: Kokeellisen osion orgaanisten aineiden erottaminen kuuluu KE1-kurssin tavoitteisiin, kun taas mallinnusosuuden isomeria kuuluu KE2-kurssin keskeisiin sisältöihin.

Työn kokeellinen-osuus on mahdollisimman pelkistetty. Tarkoituksena on, että työ pystytään suorittamaan mahdollisimman yksinkertaisilla välineillä ja reagensseilla. Mallinnusosuus on haastava, mutta lopputulos on oppilasta motivoiva, koska siinä kootaan kokeellisen työn tulokset ja päästään tutkimaan eristettyä molekyyliä omin silmin.

Työn voi suorittaa esimerkiksi ensin tutustumalla beta-karoteeni molekyyliin mallinnuksen avulla, sen jälkeen suorittaa työn kokeellinen osuus ja lopuksi tarkastella isomerian mallinnusta

Työn kokeelliseen osuuden suorittamiseen kuluu aikaa noin 90 minuuttia. Mallinnusosuuden voi ottaa osaksi oppituntia, esim. suorittamalla opettajaohjeiden mukaisesti mallinnukset etukäteen, jolloin valmiit molekyylit voi heijastaa esim. vaikka videotykillä kaikkien nähtäväksi.

## LÄHTEET

Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb Journal* 9,1551-1558.

Cromartie, R.I.T. 1959. Insect pigments<sup>1,2</sup>. *Annual Review of Entomology* 4, 59-76.

Fagerstedt, K., Kärkönen, A., Niini, S., Ahlfors, R., Santanen, A. & Simola, L. 2007. *Kasvifysiologian harjoitustyöt - 52071*. Helsinki : yliopistopaino, 24-27.

Goodwin, T.W. ED. 1976. *Chemistry and Biochemistry of plant Pigments - second edition, volume 2*. London : Academic Press London New York San Francisco, 38-58.

Lundell, J. & Aksela, M. 2004. Molekyylimallinnus ja sen energia. *Dimensio* 1, 53-54.

Opetushallitus 2003. *Lukion opetussuunnitelman perusteet 2003*. Helsinki: Opetushallitus.

Pennington, J. & Hall, J. K., 2003. Plant and Insect Pigments – Middle and High School Activity. Department of biochemistry and Molecular Biophysics, University of Arizona. <http://insected.arizona.edu/manduca/PDFs/Chromatography.pdf>, luettu 20.04.2007.