آزمایشگاه آموزشی
بیست‌ودومین المپیاد
زیست‌شناسی ایران

فیزیولوژی گیاهی

تهیه عصاره. جداسازی رنگیزه‌ها. TLC

روز دوم
۹۸/۴/۲۷

اهداف آزمایش:

۱. آشنایی با رنگیزه‌های فتوسنتزی و ویژگی‌های فیزیکی آن‌ها

۲. یادگیری استفاده از هاون برای تهیه عصاره گیاهی

۳. یادگیری طرز استفاده از دکانتور

۴. یادگیری اصول روش TLC

زمان آزمایش: ۹۰ دقیقه

این فایل به منظور آموزش عملی دانش پژوهان المپیاد زیست شناسی ایران گردآوری شده است.

آشنایی با رنگیزه‌های فتوسنتزی | تهیه عصاره گیاهی | جداسازی رنگیزه با دکانتور | جداسازی رنگیزه‌های گیاه با استفاده از کاغذ TLC

- دانش‌زمان را مدیریت کنید تا فرصت کنید تمام بخش ها را انجام دهید!
- از مواد و وسایل خود به درستی اضافه کنید. به هیچ وجه مواد یا وسایل اضافه به شما داده نخواهد شد.
- در صورت داشتن هر مشکل یا سوال، sign قرمز را بالا ببرید.

لیست مواد و وسایل

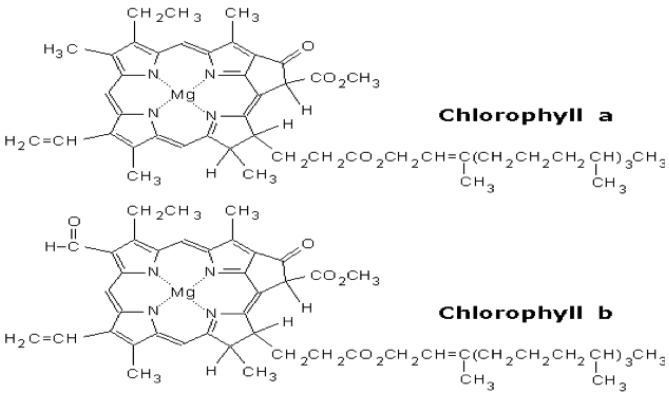
۱. (A فالکون) استون
۲. (E فالکون) اترنفت
۳. (M فالکون) متانول
۴. (P فالکون) پتاس متانولی
۵. (D فالکون)دی اتیل اتر
۶. فالکون خالی
۷. برگ گیاه
۸. قیچی
۹. هاون و دسته هاون
۱۰. کاغذ صافی
۱۱. قیف
۱۲. عدد فویل آلومینیومی ۲
۱۳. پیپت ۱۰ میلی لیتری
۱۴. پیپت فیلر
۱۵. ارلن مایر
۱۶. دکانتور
۱۷. پایه و گیره
۱۸. بشر کوچک ۲
۱۹. تکه پارافیلم ۴
۲۰. لوله آزمایش ۴
۲۱. رک لوله آزمایش
۲۲. کووت ۴
۲۳. بزرگ TLC کاغذ ۲
۲۴. کوچک TLC کاغذ ۲
۲۵. سرسمپلر زرد ۲
۲۶. تانک کروماتوگرافی
۲۷. پنس
۲۸. سمپلر ۱۰۰۰-۱۰۰
۲۹. رک سرسمپلر آبی
۳۰. خط کش
۳۱. مداد
۳۲. دستکش
۳۳. ماسک
۳۴. پیست استون شستشو
۳۵. پیست آب مقطر
۳۶. تر(بشر بزرگ) waste ظرف
۳۷. مارکر
۳۸. ساین زرد
۳۹. ساین سبز
۴۰. ساین قرمز

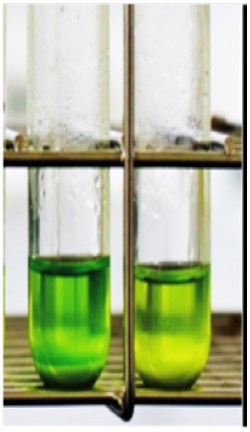
رنگیزه‌های فتوسنتزی

فرایند فتوسنتز وابسته به حضور رنگیزه ها به عنوان جذب کننده ی انرژی فوتون ها است. رنگیزه ها انرژی را دریافت کرده و به رنگیزه های مجاور انتقال می دهند. رنگیزه های اصلی گیاهان کلروفیل a ، کلروفیل b ، کاروتن و گزانتوفیل می باشند. هر کدام از این رنگیزه ها دارای ویژگی های خاصی می باشد:

کلروفیل: رنگیزه اصلی در فرایند فتوسنتز است. نور قرمز و آبی را جذب کرده و نور سبز را بازتاب می کند. ساختار اصلی آن از حلقه پورفیرین (تترا پیرول) ، یون منیزیم و زنجیره فیتولی تشکیل شده است. انواع مختلفی کلروفیل وجود دارد که نوع a و b آن در گیاهان دیده می شود.

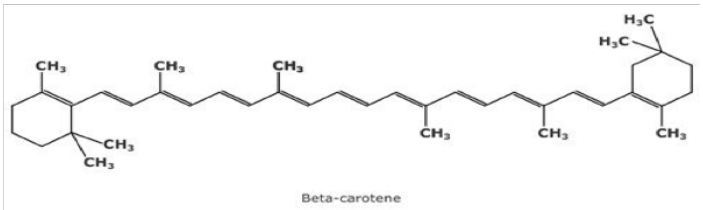
- کلروفیل a : رنگیزه فتوسنتزی اصلی است که در همه ی فتوتروف ها به جز باکتری ها یافت می شود. محلول خالص آن به رنگ سبزآبی است. به علت حضور گروه متیل نسبت به کلروفیل b ناقطبی تر است.
- کلروفیل b : رنگیزه فتوسنتزی فرعی است که در همه ی فتوتروف ها به جز دیاتوم ها ، سیانوباکتری ها و جلبک های قرمز و قهوه ای یافت می شود. محلول خالص آن به رنگ سبز زیتونی است. به علت حضور گروه آلدئید نسبت به کلروفیل a قطبی تر است.



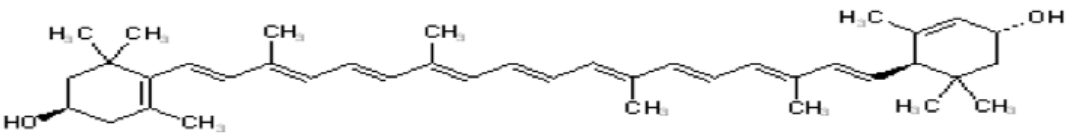


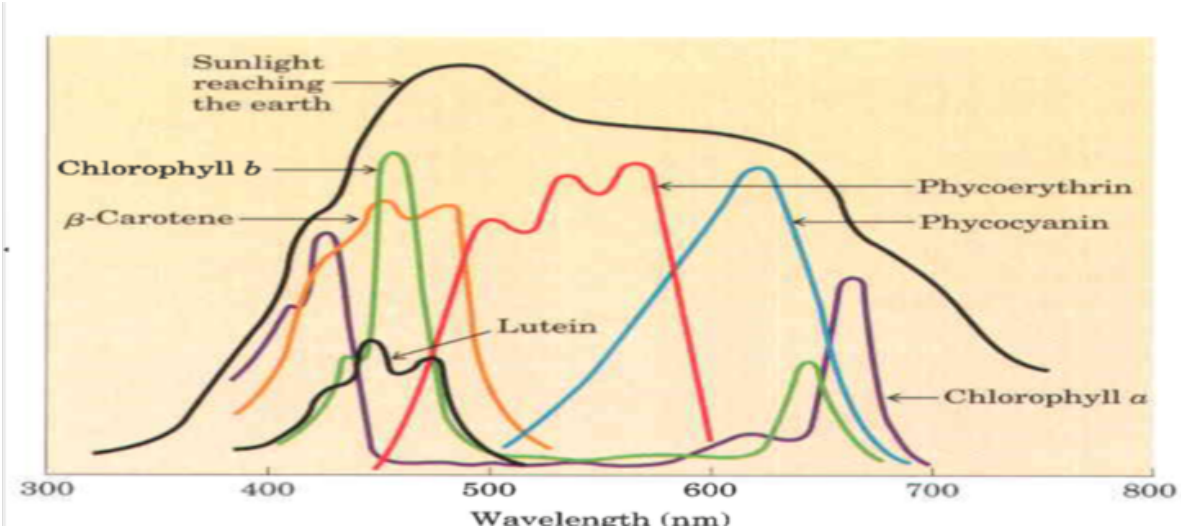
کاروتنوئید ها:رنگیزه های کمکی که کاروتن ها و گزانتوفیل ها مهم ترین آن ها هستند.

- کاروتن ها : نور آبی، بنفش و سبز را جذب و نور های زرد، نارنجی و قرمز را بازتاب می کنند. ساختار بسیار ناقطبی دارند و فقط در حلال های ناقطبی حل می شوند.



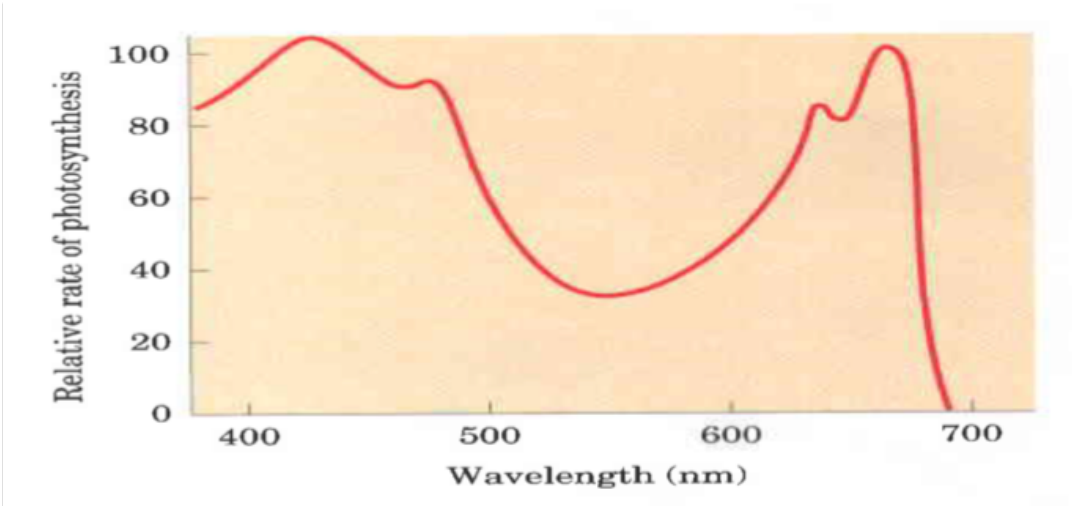
- گزانتوفیل‌ها: همانند کاروت ها نور آبی، بنفش و سبز را جذب و نورهای زرد، نارنجی و قرمز را بازتاب می‌کنند. انواع مختلفی دارند. ساختار آن به علت حضور گروه‌های هیدروکسیل نسبت به کاروتن‌ها قطب تر بوده و در حلال‌های قطبی حل می شوند.





طیف جذبی زیر نشان دهنده ی میزان جذب نوری رنگیزه های گوناگون در طول موج های مختلف است.

نمودار زیر که طیف عمل نام دارد، شدت فتوسنتز را در طول موج های مختلف نشان می دهد. همانطور که می بینید بیشتر میزان فتوسنتز مربوط به کلروفیل a می باشد.



تهیه عصاره گیاهی

در این بخش شما با استفاده از گیاهی که به شما داده شده است، عصاره گیاهی(محلول در استون) تهیه می کنید.

۱. مقداری از برگ را با قیچی تکه تکه کنید. سپس آن را در هاون ریخته و روی آن ۱۰ میلی لیتر استون بریزید.

۲. با دسته هاون روی برگ فشار دهید و آن را با حرکات دورانی له کنید.(نیازی به ضربه زدن و ایجاد سر و صدا نیست. تنها باید با اعمال فشار عصاره تهیه کنید)

۳. ۳ بار دیگر در هاون استون بریزید و به له کردن برگ ادامه دهید(هر بار ۱۰ میلی لیتر) تا محلول سبز پررنگی به دست بیاید.

۴. کاغذ صافی را دو بار تا کنید. یک لایه را از سه لایه دیگر جدا کنید تا شکل قیف مانندی ایجاد شود(همان گونه که مسئول آزمایشگاه به شما نشان می دهد)

۵. سپس عصاره گیاهی را با استفاده از کاغذ صافی و قیف ، از ته مانده های برگ جدا کنید و در فالکون خالی بریزید(دقت کنید که عصاره گیاهی به نور حساس است. پس دور آن را با فویل آلومینیومی بپوشانید)

سوال ۱. برای تهیه عصاره گیاهی بهتر، باید همراه با برگ، مقداری شن نیز با هاون کوبید. به نظر شما دلیل آن چیست؟

سوال ۲. یکی از دانش آموزان ایرانی در مسابقات جهانی المپیاد زیست شناسی، با استفاده از ۷۰ میلی لیتر استون، از برگ کلم! عصاره تهیه می کرد اما در کمال تعجب، متوجه شد که تنها ۵۳ میلی لیتر عصاره تهیه کرده است. به نظر شما این اتفاق می تواند چه چیزی را ثابت کند؟

جداسازی رنگیزه با دکانتور

شما باید بر اساس حلالیت متفاوت رنگیزه ها در حلال های مختلف، آن ها را از هم جدا کنید.

قبل از شروع آزمایش به نکات زیر توجه کنید:

- لازم است تا ظروف خود را بین مراحل بشویید. بدین منظور از پیست استون که در اختیار شما قرار دارد استفاده کنید.
- در آخر آزمایش همه ظروف خود را بشویید.

مراحل زیر را به ترتیب انجام دهید:

۱. ابتدا ۲۵ میلی لیتر از عصاره گیاهی تهیه شده را درون ارلن بریزید.

۲. به عصاره حاوی رنگیزه که محلول در استون(چگالی=۰.۷۹۱g/ml) است، ۲۵ میلی لیتر اترنفت (چگالی= ۰.۶۵۳g/ml) اضافه کنید. محلول را خوب هم زده و سپس با استفاده از دکانتور فاز بالایی را از فاز پایینی جدا کنید.

۳. فاز پایینی را دور ریخته و به فاز بالایی ۲۵ میلی لیتر متانول (چگالی=۰.۷۹۲g/ml) اضافه کنید. درون ارلن آن را به خوبی هم زده و پس از دو فاز شدن آن را به دکانتور منتقل کنید و هر دو فاز رویی و زیری را جمع آوری کنید. در صورتی که دو فاز به راحتی قابل مشاهده نبودند، ۳ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه کنید و مجددا هم بزنید. فاز بالایی را A و فاز پایینی را B بنامید.

۴. به محلول A به اندازه خودش پتاس متانولی اضافه کنید. درون ارلن محلول را به خوبی هم زده و سپس آن را به دکانتور منتقل کنید. فاز بالایی را C و فاز پایینی را D بنامید، آن ها را درون لوله های آزمایش کوچک جداگانه ریخته و روی آن ها پارافیلم بکشید و آن ها را نام گذاری کنید.

۵.روی محلول B ۲۵ میلی لیتر دی اتیل اتر (چگالی=۰.۷۱۳g/ml) ریخته و به خوبی هم بزنید. سپس در ۳ مرحله و در هر مرحله ۵ میلی لیتر آب به محلول اضافه کنید. بین هر دو مرحله اضافه کردن آب نمونه را به آرامی هم بزنید. قبل از اضافه کردن مرحله سوم آب، نمونه را به دکانتور منتقل کرده و سپس آب را اضافه کنید. دو فاز را از یکدیگر جدا کرده، فاز پایینی را دور بریزید و فاز بالایی را نگه دارید.

۶.به فاز بالایی مرحله قبل، ۱۰ میلی لیتر پتاس متانولی اضافه کنید و آن را به خوبی درون ارلن هم بزنید. همچون مرحله قبل، در ۳ مرحله و در هر مرحله ۵ میلی لیتر آب به محلول اضافه کرده و قبل ازاضافه کردن سری سوم آب، محلول را به دکانتور منتقل کرده و مرحله آخر اضافه کردن آب را انجام دهید. سپس دو فاز را از یک دیگر جدا کنید. فاز بالایی را E و فاز پایینی را F بنامید ، آن ها را درون لوله های آزمایش کوچک جداگانه ریخته و روی آن ها پارافیلم بکشید و آن ها را نام گذاری کنید.

۷. جذب محلول های D و F را در طول موج های ۴۶۰ و ۶۸۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر اندازه گرفته و در کادر زیر یادداشت کنید. ساخت محلول blank برعهده شماست. بعد از آماده شدن محلول های blank ، F و D با بالا بردن sign زرد و با اجازه مسئول آزمایشگاه از دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده کنید. دقت کنید که تنها ۴ دقیقه وقت دارید!

سوال ۳. محتوای محلول بلانک و جذب های به دست آمده را در جدول زیر بنویسید.

	جذب در ۶۸۰nm	جذب در ۴۶۰nm	محتوای محلول blank
محلول F			
محلول D			

سوال ۴. با توجه به ساختار رنگیزه‌های گیاهی (که در مقدمه توضیح داده شده است) و چگالی حلال های استفاده شده، هرکدام از محلول های زیر از کدام حلال و رنگیزه(ها) تشکیل شده است؟

	A	B	C	D	E	F
حلال						
رنگیزه(ها)						

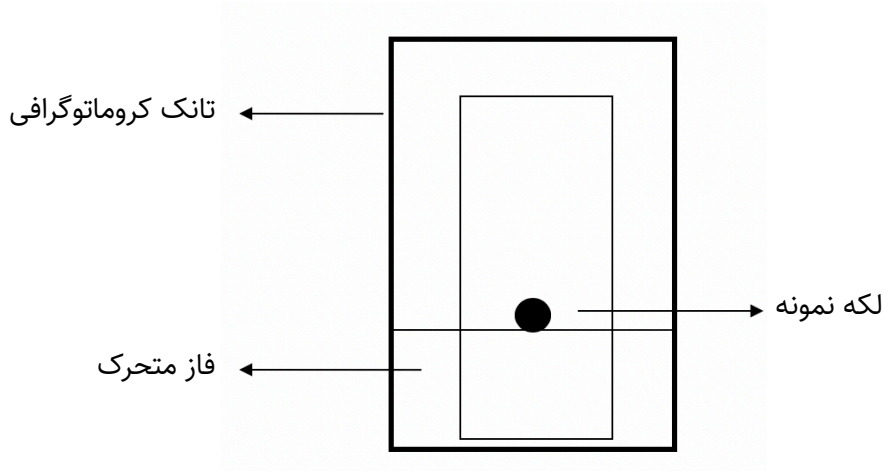
سوال ۵. چرا برای دو فاز شدن محلول های دارای متانول یا پتاس متانولی می توان به آن آب اضافه کرد؟

سوال ۶. چرا در مرحله ۵ به فاز B دی اتیل اتر اضافه می کنیم؟

جداسازی رنگیزه های گیاه با استفاده از کاغذ TLC

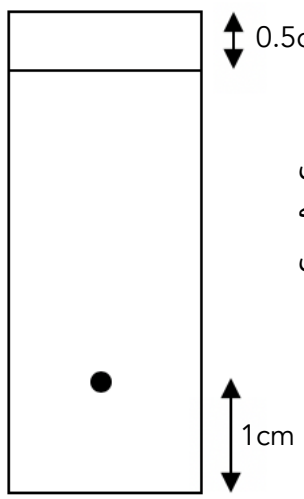
یکی از روش های مرسوم برای جداسازی مولکول های مختلف از یک دیگر کروماتوگرافی می‌باشد.کروماتوگرافی لایه نازک(TLC) یکی از انواع رایج کروماتوگرافی می‌باشد که با استفاده از تفاوت تمایل مولکول ها به حل شدن در حلال ، آن ها را از یک دیگر جدا می کند. در این روش دو فاز ثابت و متحرک وجود دارد که فاز ثابت معمولا موادی مانند سیلیکاژل، سلولز یا آلومینیوم اکسید (با خاصیت قطبی) بوده که به صورت لایه ای نازک روی بستری از آلومینیوم یا شیشه قرار داده شده است.

در این روش نمونه ی حاوی مولکول های مختلف را رو یک انتهای کاغذ قرار داده و کاغذ را به صورت عمودی در تانک کروماتوگرافی که حاوی محلول فاز متحرک می باشد، قرار می دهیم (به صورتیکه سطح مایع پایین تر از منطقه ی نقطه گذاری باشد) تا خاصیت مویینگی باعث شود فاز مایع در طول کاغذ بالا برود و مولکول های مختلف را بر اساس میزان انحلال پذیریشان در فاز مایع و تمایل آن ها به فاز ثابت، تا ارتفاع معینی بالا برده و آن ها را به شکل باند هایی از یک دیگر جدا سازد. در صورت رنگی بودن مواد، باند های رنگی بر روی کاغذ TLC ایجاد شده و قابل مشاهده خواهد بود. در صورت بی رنگ بودن مواد نیز می‌توان با روش هایی مانند رنگ آمیزی مولکول ها و یا تاباندن اشعه هایی مانند UV باند ها را به صورت قابل مشاهده در آورد.



روش کار با TLC:

۱. ابتدا یکی از کاغذ های TLC خودرا با مدادی که در اختیار دارید علامت گذاری کنید. بدین صورت که به فاصله ۱ سانتی متر از یک لبه آن یک نقطه در وسط کاغذ و به فاصله ۰.۵ سانتی متر از لبه ی دیگر آن یک خط بکشید.



۲. با استفاده از سرسمپلر از محلولی که قصد run کردن آن را دارید، بردارید.

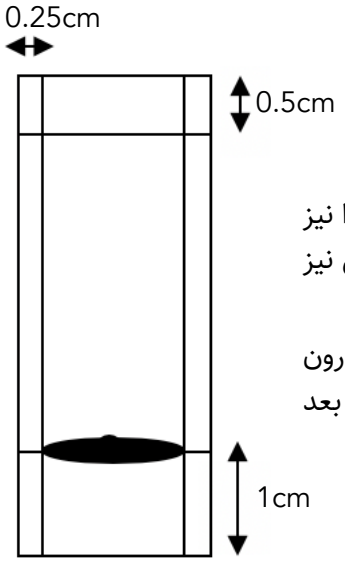
۳. در این قسمت ابتدا روی یکی از کاغذ های TLC کوچکی که در اختیار دارید لکه‌گذاری را تمرین کنید. سرسمپلر را نزدیک کاغذ TLC برده و به آرامی و سریع با آن تماس دهید، به طوری که دایره ایجاد شده قطری حدود ۰.۷۵ تا ۱.۲۵ سانتی متر داشته باشد. صبر کنید تا دایره ی ایجاد شده خشک شود و بعد از آن قطره ی دیگری با روش فوق بر روی همان مرکز قرار دهید.

- نقطه ی شما باید دارای اندازه ی مناسب باشد و همچنین شکل آن باید دایره باشد. همچنین دایره های ایجاد شده باید متحدالمرکز باشند.
- بسته به غلظت نمونه نیاز به لکه گذاری بین ۵ تا ۱۵ قطره دارید.(متوسط ۸ قطره)

- دقت کنید که آسیبی به کاغذ TLC نزنید و سطح آن را خراش ندهید.
- بعد از هر نقطه گذاری صبر کنید تا قطره ی شما خشک شود. اگر دو قطره را با فاصله زمانی بسیار کمی بدون خشک شدن لکه ی قبلی قرار دهید، لکه ی شما بزرگتر از حالت قبلی می شود.

۴. حال با دقت زیاد روی یک کاغذ TLC لکه گذاری کنید.

۵. روی کاغذ TLC دیگر نیز با مداد علامت گذاری کنید. به این صورت که به فاصله ۱ سانتی متر از لبه پایینی یک خط بکشیدو به فاصله ۰.۵ سانتی متر از لبه ی دیگر آن یک خط بکشید. دو خط به فاصله ۰.۲۵ سانتی متر از طرفین بکشید. محل لکه گذاری خطی در شکل روبرو مشخص است.



۶. روی TLC کوچک دیگری که در اختیار دارید، لکه گذاری خطی را تمرین کنید و سپس لکه گذاری خطی را روی TLC اصلی انجام دهید.

۷. تانک کروماتوگرافی(بشر ۲۵۰ میلی لیتری) خود را با دستمال کاغذی خشک و تمیز کنید. با فویل آلومینیومی تکیه گاهی برای کاغذ TLC خود بسازید، به طوری که کاغذ بتواند به صورت عمودی درون تانک قرار بگیرد. دیواره های تانک را نیز با فویل بپوشانید تا نور رنگیزه ها را تجزیه نکند. (به پوشاندن درب تانک با فویل نیز دقت کنید)

۶. ۳ میلی لیتر استون و ۶ میلی لیتر اترنفت که همان فاز متحرک می باشند را درون تانک اضافه نمایید. از آن جا که درجه ی فراریت اترنفت و استون متفاوت است، بعد از ساختن تانک بلافاصله باید درب آن را ببندید. (هم چنین در هنگام ساخت تانک، محلول را از کنار درب نیمه باز تانک به سرعت وارد کنید)

۷. ۵ دقیقه صبر کنید تا فاز گازی و مایع به تعادل برسند.

- به هیچ عنوان به جز در مواقع ذکر شده در تانک را باز نکنید.

۸. درب تانک را باز کرده و نمونه نقطه گذاری شده خود را طوری که قسمت نقطه گذاری شده آن پایین باشد، سریعا به طور عمودی داخل تانک قرار دهید.(این مرحله در اصطلاح run کردن نمونه نام دارد)

۹. پس از قرار دادن نمونه درون تانک ، محلول از کاغذ بالا خواهد آمد و می توانید سطح آن را ببینید. محلول بعد از رسیدن به نقطه گذاشته شده، رنگیزه ها را نیز با خود بالا خواهد کشید.

۱۰. در موارد زیر درب تانک را باز کرده و نمونه خود را خارج نموده و با دمیدن به حلال آن را خشک کنید:

الف. سطح حلال به خط کشیده شده روی کاغذ TLC رسیده باشد.

ب. سطح حلال به هر دلیل دیگری بالاتر نرود، در این صورت بعد از خارج کردن نمونه از تانک و دمیدن به آن، باید میزان بالا آمدن آن را با مداد بر روی TLC مشخص کرد.

ج. حلال اصلا از کاغذ بالا نمی رود و حتی به رنگیزه نقطه گذاری شده نمی رسد. در این صورت بعد از خارج کردن نمونه از تانک و ساختن مجدد محلول تانک، نمونه را مجددا run کنید.

۱۱. بعد از خارج کردن کاغذ، sign سبز را بالا ببرید تا مسئول آزمایشگاه به شما نوار چسب بدهد. روی آن را با نوار چسب بپوشانید.(تا نمونه شما تخریب نشود) نام خود را پشت کاغذ نوشته و دوباره با بالا بردن sign سبز، به مسئول آزمایشگاه تحویل دهید.

سوال ۷. برای ساختن محلول عصاره ی کلروفیل خالص بهتر است مقداری $MgSO_4$ نیز به استون و نمونه برگ اضافه کنیم. دلیل استفاده از این ماده چیست؟

سوال ۸. R_f یا Retardation Factor برای هر مولکول برابر است با نسبت میزان حرکت آن مولکول به میزان حرکت فاز مایع بر روی کاغذ TLC (فاز ثابت). با توجه به نتیجه ای که از run کردن عصاره گیاهی گرفته اید، R_f باند های حاصل را حساب کنید و تا سه رقم اعشار در جدول زیر یادداشت کنید و مشخص کنید هر باند مربوط به کدام رنگیزه فتوستزی است؟(باند شماره یک بیشتر از همه بالا آمده است)

	میزان R_f در لکه‌گذاری نقطه‌ای	میزان R_f در لکه‌گذاری خطی	نام رنگیزه فتوسنتزی
۱			
۲			
۳			
۴			

سوال ۹. ممکن است در بین باند های ایجاد شده روی کاغذ TLC، یک یا دو باند خاکستری-آبی رنگ مشاهده شود. این دو باند مربوط به کدام رنگیزه است؟

سوال ۱۰. گاهی اوقات فاز ثابت را بر روی صفحات آلومینیومی و گاهی اوقات روی صفحات شیشه ای یا پلاستیکی تثبیت می نمایند. به نظر شما تفاوت کاربرد این دو نوع کاغذ TLC چیست؟

سوال۱۱. برای طول کاغذ مورد آزمایش در TLC اندازه اپتیممی در نظر گرفته می شود. فایده و مشکل اصلی برای طویل بودن کاغذ TLC چیست؟

سوال ۱۲. در صورت زیاد و کم بودن تعداد نقطه گذاری ها چه مشکلاتی ممکن است به وجود بیاید؟

سوال ۱۳. چنانچه بعد از اینکه فاز مایع را به تانک اضافه کردیم بلافاصله کاغذ TLC را run کنیم، چه مشکلی به وجود می آید؟

سوال ۱۴. چنانچه عصاره ی رنگیزه خام را با استفاده از فاز متحرک متانول (بر روی کاغذ TLC) run کنیم، الگوی باند های حاصل را رسم کرده و مشخص کنید هر باند مربوط به چه رنگیزه ای است؟

سوال ۱۵. یکی از دانش پژوهان دوره بیست و یکم المپیاد زیست شناسی با دیدن پاسخ سوال ۸ ، این فرضیه را مطرح کرد که شاید خطی بودن لکه گذاری، سبب تفاوت معنادار در R_f نسبت به حالت لکه گذاری نقطه ای می شود. (جداول و فرمول هایی که ممکن است به آنها نیاز پیدا کنید در انتها آمده اند)

الف. بهترین تست آماری برای آزمودن این فرضیه چیست؟

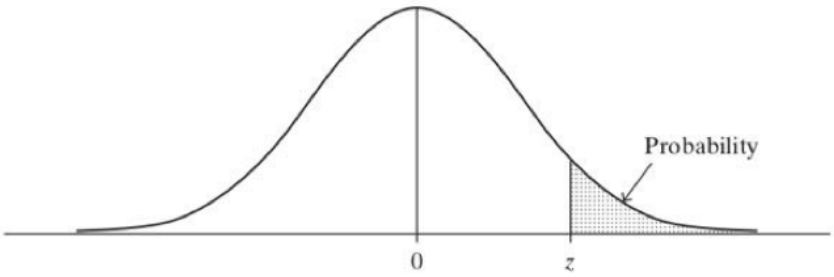
ب. مقدار آماره مناسب را محاسبه کرده و تا سه رقم اعشار وارد کنید.

ج. مقدار Df یا درجه آزادی چقدر است؟

د. با توجه به نتایج، آیا تفاوت بین R_f ها در لکه گذاری خطی و نقطه ای، معنادار است؟(بله/خیر)(با خطای ۵ درصد)

Name	Formula
z-transformation (using either μ or μ_0)	$z = \dfrac{\bar{x} - \mu_0}{\sigma/\sqrt{n}}$
t-transformation	$t = \dfrac{\bar{x} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$
Test statistic when sampling from a population that is not normally distributed	$z = \dfrac{\bar{x} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$
Test statistic when sampling from normally distributed populations: population variances known	$z = \dfrac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)_0}{\sqrt{\dfrac{\sigma_1^2}{n_1} + \dfrac{\sigma_2^2}{n_2}}}$
Sampling from populations that are not normally distributed	$z = \dfrac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)_0}{\sqrt{\dfrac{\sigma_1^2}{n_1} + \dfrac{\sigma_2^2}{n_2}}}$
Test statistic for paired differences when the population variance is unknown	$t = \dfrac{\bar{d} - \mu_{d_0}}{s_{\bar{d}}}$
Test statistic for paired differences when the population variance is known	$z = \dfrac{\bar{d} - \mu_d}{\sigma_d/\sqrt{n}}$

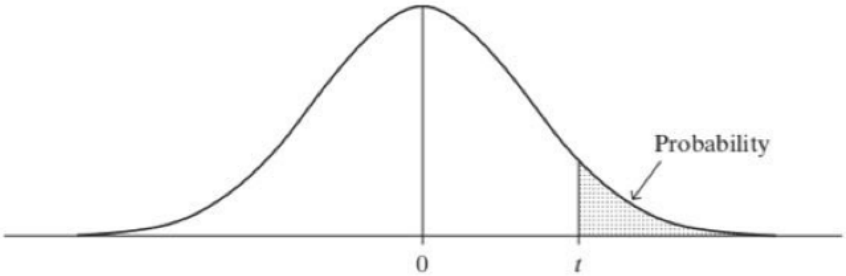
TABLE A: Normal curve tail probabilities. Standard normal probability in right-hand tail (for negative values of z, probabilities are found by symmetry).



	Second Decimal Place of z									
z	.00	.01	.02	.03	.04	.05	.06	.07	.08	.09
0.0	.5000	.4960	.4920	.4880	.4840	.4801	.4761	.4721	.4681	.4641
0.1	.4602	.4562	.4522	.4483	.4443	.4404	.4364	.4325	.4286	.4247
0.2	.4207	.4168	.4129	.4090	.4052	.4013	.3974	.3936	.3897	.3859
0.3	.3821	.3783	.3745	.3707	.3669	.3632	.3594	.3557	.3520	.3483
0.4	.3446	.3409	.3372	.3336	.3300	.3264	.3228	.3192	.3156	.3121
0.5	.3085	.3050	.3015	.2981	.2946	.2912	.2877	.2843	.2810	.2776
0.6	.2743	.2709	.2676	.2643	.2611	.2578	.2546	.2514	.2483	.2451
0.7	.2420	.2389	.2358	.2327	.2296	.2266	.2236	.2206	.2177	.2148
0.8	.2119	.2090	.2061	.2033	.2005	.1977	.1949	.1922	.1894	.1867
0.9	.1841	.1814	.1788	.1762	.1736	.1711	.1685	.1660	.1635	.1611
1.0	.1587	.1562	.1539	.1515	.1492	.1469	.1446	.1423	.1401	.1379
1.1	.1357	.1335	.1314	.1292	.1271	.1251	.1230	.1210	.1190	.1170
1.2	.1151	.1131	.1112	.1093	.1075	.1056	.1038	.1020	.1003	.0985
1.3	.0968	.0951	.0934	.0918	.0901	.0885	.0869	.0853	.0838	.0823
1.4	.0808	.0793	.0778	.0764	.0749	.0735	.0722	.0708	.0694	.0681
1.5	.0668	.0655	.0643	.0630	.0618	.0606	.0594	.0582	.0571	.0559
1.6	.0548	.0537	.0526	.0516	.0505	.0495	.0485	.0475	.0465	.0455
1.7	.0446	.0436	.0427	.0418	.0409	.0401	.0392	.0384	.0375	.0367
1.8	.0359	.0352	.0344	.0336	.0329	.0322	.0314	.0307	.0301	.0294
1.9	.0287	.0281	.0274	.0268	.0262	.0256	.0250	.0244	.0239	.0233
2.0	.0228	.0222	.0217	.0212	.0207	.0202	.0197	.0192	.0188	.0183
2.1	.0179	.0174	.0170	.0166	.0162	.0158	.0154	.0150	.0146	.0143
2.2	.0139	.0136	.0132	.0129	.0125	.0122	.0119	.0116	.0113	.0110
2.3	.0107	.0104	.0102	.0099	.0096	.0094	.0091	.0089	.0087	.0084
2.4	.0082	.0080	.0078	.0075	.0073	.0071	.0069	.0068	.0066	.0064
2.5	.0062	.0060	.0059	.0057	.0055	.0054	.0052	.0051	.0049	.0048
2.6	.0047	.0045	.0044	.0043	.0041	.0040	.0039	.0038	.0037	.0036
2.7	.0035	.0034	.0033	.0032	.0031	.0030	.0029	.0028	.0027	.0026
2.8	.0026	.0025	.0024	.0023	.0023	.0022	.0021	.0021	.0020	.0019
2.9	.0019	.0018	.0017	.0017	.0016	.0016	.0015	.0015	.0014	.0014
3.0	.00135									
3.5	.000233									
4.0	.0000317									
4.5	.00000340									
5.0	.000000287									

Source: R. E. Walpole, *Introduction to Statistics* (New York: Macmillan, 1968).

TABLE B: *t* Distribution Critical Values



	Confidence Level					
	80%	90%	95%	98%	99%	99.8%
	Right-Tail Probability					
df	$t_{.100}$	$t_{.050}$	$t_{.025}$	$t_{.010}$	$t_{.005}$	$t_{.001}$
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.656	318.289
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.328
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.214
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.894
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733
16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686
17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646
18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.611
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552
21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527
22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505
23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467
25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435
27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421
28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408
29	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396
30	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385
40	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307
50	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.261
60	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232
80	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195
100	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174
∞	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.091

Source: "Table of Percentage Points of the *t*-Distribution." Computed by Maxine Merrington, Biometrika, 32 (1941): 300. Reproduced by permission of the Biometrika trustees.