

laboratorijsko delo 9

BARVILA V ZELENIH LISTIH

1. CILJI VAJE

- spoznati in razumeti metodo papirne kromatografije
- ugotoviti, da je v zelenih listih več različnih barvil
- na osnovi Rf vrednosti določiti posamezno barvilo
- poglobitev znanja o fotosintezi

2. UVOD

V tem laboratorijskem dlu se seznanimo s papirno kromatografijo. S to laboratorijsko tehniko lahko ugotovimo in ločimo med seboj različna barvila v listih – klorofile, ksantofile, karatenoide, ...

3. MATERIAL

- pripravljen listni ekstrakt špinače
- epruveta (stekleni valj)
- zamašek s kavljem iz žice
- topilo (92 % petroletra in 8 % acetona)
- pipeta s tanko konico (steklena paličica)
- trak filter papirja
- svinčnik
- pinceta

4. METODE DELA

A) Kromatogram – papirna kromatografija na traku

1. S svinčnikom narišite 2 črti an papirbat trak: prvo 2 cm od spodnjega roba (start), drugo pa 15 cm višje (fronta). Na spodnjo črto z drobno pipeto ali s stekleno paličico nanosite kaplico pigmentnega izvlečka. Papir naj se dobro osuši. Ta postopek poanvljajte tako dolgo, da bo na kromatografskem traku temna črta rastlinskega izvlečka (6 nanosov).

2. Trak filter papirja pritrdite na zamašek tako, da ga obesite na kavelj iz žice v zamašku. Trak mora v epruveti (valju) viseti navpično, ne sme se dotikati sten. Pri delu s skušajte s prsti čim manj dotikati površine papirja. Papir prijemajte s pinceto.

3. V epruveto (valj) nalijte topilo, tako da bo trak filter papirja segal v tekočino, ko boste epruveto zamašili. Kromatografija je končana takrat, ko se topilo dvigne do druge označene črte (fronte).

B) Določanje retencijskega faktorja (Rf)

Retencijski faktor je hitrost, s katero se določena snov giblje po kromatografskem papirju, v primerjavi s hitrostjo, s katero se giblje topilo. Retencijski faktor ima vrednost 1 ali je manjši od 1.

$$R_f = \text{pot barvila} / \text{pot topila}$$

Pot barvila je razdalja, ki jo preide snov - razdalja od startnega mesta (spodnje črte na traku) do sredine določene barvne lise.

Pot topila je razdalja, ki jo preide topilo –od starta do fronte in smo jo v našem primeru določili (= 15 cm).

5. REZULTATI

Papirna kromatografija na traku
Glej prilogo 1.

Tabela 1 – Retencijski faktorji barvil

skupina	karoten	ksantofil	klorofil a	klorofil b
1	1	0,19	0,12	0,09
2	1	0,2	0,12	0,11
3	1	0,26	0,21	0,19
4	1	0,26	0,17	0,16
5	1	0,3	0,21	0,18
6	1	0,3	0,23	0,21
7	1	0,24	0,16	0,15
povprečne vr.	1	0,25	0,17	0,16

6. DISKUSIJA

Papirno kromatografijo smo izvedli na traku. Osnovi princip je, da so različne snovi različno topne v topilu. Tiste snovi, ki se v topilu bolje topijo, odnaša topilo hitreje (in zato dlje), tiste, ki se topijo slabše, pa počasneje (in zato opravijo manjšo pot). Topilo se dviguje po filtrirnem papirju zaradi kapilarnosti – s seboj odnaša raztopljene snovi, ki se na filtrirnem papirju ločijo tako, da lahko opazujemo posamezne sestavine. Barvila lahko opazujemo s prostim očesom.

Iz debeline posameznega pasu na papirnem traku lahko sklepamo o količini posameznega barvila v ekstraktu, ki smo ga uporabili. Najširši je pas zelenih barvil, to pomeni, da je bilo v ekstraktu največ klorofila.

Klorofili so zelena fotosintetska barvila, v našem ekstraktu sta bila prisotna klorofila A in klorofil B. Klorofili absorbirajo svetlobo podobnih valovnih dolžin – predvsem modro in rdečo. Ker odbijata svetlobo iz rumenega in predvsem zelenega spektra, liste, ki vsebujejo največ klorofila, vidimo zelene barve.

Največ klorofila je v rastlinah spomladi in poleti, ko so listi rastlin zelene barve. Jeseni, ko klorofil razpade (da rastlina varčuje z magnezijem) se bolj izrazijo druga barvila. Če bi izdelali ekstrakt iz porumenelih listov ali listov druge rastline, bi dobili drugačne rezultate, verjetno bi bili pasovi zelene barve ožji.

Karoteni absorbirajo predvsem svetlobo vijoličnega spektra, odbijajo pa rumeno in rdečo, zato jih vidimo rumenkaste in rdeče barve. Ksantofili odbijajo svetlobo iz rumenega spektra, zato jih vidimo kot rumena barvila.

S tem, ko rastlina vsebuje različna fotosintetska barvila, bolje izkoristi cel svetlobni spekter, kot če bi vsebovala le barvila ene vrste.

Problem metode, ki smo jo izbrali, je da gre za kvalitativno metodo in zato so rezultati močno odvisni od naše interpretacije. Predvsem se je to pokazalo pri računanju retencijskih faktorjev, kjer je bilo možnosti za napako največ. Rezultati so sicer natančnejši, ker smo primerjali delo večih skupin.

7. ZAKLJUČEK

Dokazali smo, da so v listih špinače prisotna različna barvila. Poleg zelenih (klorofil A in B), ki jih vidimo že na prvi pogled, najdemo v listu špinače še ksantofile – rumena in karotene rdečkasta barvila. Z metodo kromatografije smo ta barvila tudi ločiti. Tako smo dokazali, da so karoteni najbolj topni, precej manj so topni ksantofili, še manj pa klorofila A in B. Slednji je najmanj topen.

8. LITERATURA

Jože Drašler, Nada Gogala, Meta Povž, Franc Sušnik, Tatjana Verčkovnik in Branko Vesel, BIOLOGIJA - Navodila za laboratorijsko delo. DZS, Ljubljana. 2005.

W. R. Pickering, Biologija. Shematski pregledi. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana. 1996.

Andrej Podobnik in Dušan Devetak, Biologija: Raznolikost živih bitij. DZS, Ljubljana. 2005.

Peter Stušek, Andrej Podobnik in Nada Gogala, Biologija 1, Celica. DZS, Ljubljana. 1998.