

LABORATORIJSKO DELO

Kromatografija

1. UVOD

Kromatografija je metoda, s katero ločujemo sestavine na principu, da so različne snovi različno topne v istem topilu. Zmes snovi nanesemo s kapilarno na nosilec in ga v isti točki namočimo v topilo. Le-to potuje po nosilcu zaradi kapilarnosti in za seboj vleče molekule iz zmesi. Tiste snovi, ki so v topilu bolj topne, prepotujejo večjo razdaljo kot težje topne, ki ostanejo na začetku papirja. Ker so sestavine barvila, jih lahko opazujemo s prostim očesom. Pri papirni kromatografiji lahko za posamezne sestavine določimo R_f vrednosti. Vsaka snov potuje v določenem topilu pri enaki temperaturi in po istem kromatografskem papirju enako visoko. To konstanto vrednosti izrazimo z retencijskim faktorjem **R_f -to je hitrost, s katero se določena snov giblje po kromatografskem papirju, v primerjavi s hitrostjo, s katero se giblje topilo.**

$$R_f = \frac{\text{pot komponente}}{\text{pot topila}}$$

Seveda moramo tu navesti še temperaturo in topilo, s katerim smo delali, ker v različnih topilih pri različnih temperaturah dobimo različne vrednosti R_f .

Namen dela je :

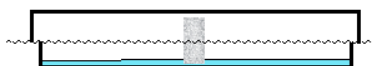
- spoznati in razumeti metode papirne kromatografije,
- **ugotoviti, da je v zelenih listih več različnih barvil,**
- znati določiti posamezno barvilo v ekstraktu na osnovi R_f vrednosti

2. MATERIALI:

- filtrirni papir
- kapilara
- ekstrakt (v etanolu prekuhani nasekljani listi črnega teloha)
- petrijevka
- topilo (92% petroleja in 8% acetona)

3. POSTOPEK DELA

Iz filtrirnega papirja smo izrezali krog in nanj na sredino s pomočjo kapilare nanesli ekstrakt. Medtem, ko smo čakali, da se posuši, smo iz koščka filtrirnega papirja naredili zvitek, ki smo ga vtaknili čez v sredini preluknjan nosilec. V petrijevko smo nalili topilo in nanjo položili nosilec tako, da je bil zvitek namočen v topilo. Vse skupaj smo pokrili, da ne bi izhlapevanje preveč motilo našega poskusa. Ko je topilo prišlo do roba papirja, smo papir vzeli ven in ga posušili. Potem smo izmerili razdaljo, ki jo je prepotovalo posamezno barvilo in jo delili z razdaljo, ki jo je prepotovalo topilo. Tako smo dobili retencijski faktor za posamezno barvilo.



slika 1: prečni prerez petrijevke, ko smo v njej izvajali poizkus

4. REZULTATI

Dobili smo zanimiv vzorec, ki je sestavljen iz štirih odtenkov: dveh zelenih in rumenega ter oranžnega. Zelena odtenka pripadata klorofilu A (temnejši) in klorofilu B (svetlejši). Rumenkasto-oranžen odtenek bližje obodu kroga pripada karotenom, rumenkast odtenek med klorofilom A ter karotenom pa pripada ksantofilom. Od središča do klorofila B smo dobili še nekaj različnih odtenkov, ki pa verjetno pripadajo raznim nečistotam. Ker pot nekaterih barvil ni povsem enakomerna, je treba pri računanju R_f vzeti povprečno vrednost poti. Ker je pot topila 4.8 cm, so vrednosti R_f za posamezno barvilo takšne:

Barvilo	R_f
Klorofil B	0.375
Klorofil A	0.625
Ksantofili	0.750
Karoteni	1.000

- Glej prilogo kromatogram

5. DISKUSIJA

Kapilarnost je delovanje površinske napetosti tekočin v ozkih cevkah (lasnice, kapilare). Kromatografski papir je zgrajen iz nešteto tankih cevk iz celuloze.

Iz debeline posameznega pasu lahko sklepamo o količini posameznega barvila v ekstraktu, ki smo ga uporabili. Najširši so pasovi zelenih barvil, pomeni, da je bilo v ekstraktu največ klorofila. Največ klorofila je v rastlinah spomladi in poleti, ko so listi rastlin zelene barve, jeseni klorofil razpade in se bolj izrazijo karotenoidi. Če bi izdelali ekstrakt iz porumenelih listov, bi dobili drugačne rezultate, verjetno bi bili pasovi zelene barve ožji.

Iz kromatograma je razvidno, da je klorofil b najmanj topen v našem topilu, karoten pa najbolj, saj je prvi prepotoval najmanjšo razdaljo, drugi pa največjo

Prav tako se da barvila dobro ločiti s prostim očesom, česar ne morem trditi za druge snovi, ki so pravgotovo še na papirju. Štiri barvila, ki smo jih dokazali, so različnih barv in absorbirajo v različnih delih vidnega spektra, da lahko optimalno izkoristijo sončno svetlobo.

- klorofili so zelena barvila. S kromatografijo so dokazali prisotnost dveh različnih klorofilov: klorofila a in klorofila b. obe vrsti absorbirata svetlobne žarke vidnega spektra, predvsem modre in rdeče barve. Svetlobo drugih valovnih dolžin zelene in rumene barve pa odbijata, zato vidimo rastline v zeleni barvi.
- karotenoidi absorbirajo predvsem zeleni spekter svetlobe odbijajo pa rumeno in rdečo svetlobo. Izrazijo se predvsem jeseni, ko klorofili razpadejo in ostanejo karotenoidi, kar da listom rumeno barvo.

Pri izračunu retencijskega faktorja je lahko prišlo tudi do napak oziroma odstopanj, saj je iz kromatograma težko razbrati mejo med podobnimi barvili. Ravno tako lahko do odstopanj pride zaradi neenakomernega nanašanja ekstrakta, nečistoč ali zaradi izhlapevanja topila. Natančnejše rezultate bi lahko dobili z več poskusi, ter nato izračunali aritmetično sredino dobljenih rezultatov.

6. ZAKLJUČEK

Ugotovili smo, da list črnega teloha, kljub temu, da je na pogled samo zelen, ne vsebuje samo zelenih barvil, ampak tudi rumenkasta in rdečkasta- karoten in ksantofil. Med zelenimi barvili smo dokazali dva, in sicer klorofil A (absorbira svetlobo z valovno dolžino 430nm in 660 nm) in B (z valovno dolžino 440nm in 640 nm), nismo pa uspeli dokazati še več različnih barvil nekateri so vidni samo pod UV-svetlobo. To bi lahko naredili z bolj natančnimi metodami.

Ugotovili smo tudi, da je najboljše topen karoten, sledi mu ksantofil, nato klorofil a, najslabše topen pa je klorofil b. Izračunali smo tudi retenzijski faktor, ki je odvisen od topnosti barvil; največji Rf ima karoten, najmanjšega pa klorofil b.

7. LITERATURA

- Andrej Podobnik, Peter Stušek, Nada Gogala, BIOLOGIJA 1 CELICA, DZS, d. d., izdaja 3. 1999

-NAVODILIA ZA LABORATORISKO DELO (avtorji Jože Drašler...- 1. izdaja, 5.natis. – Ljubljana: DZS, 2001)