6. laboratorijska vaja

PAPIRNA KROMATOGRAFIJA-BARVILA V ZELENIH LISTIH

Gimnazija Jesenice

UVOD

Za potek fotosinteze, s katero si rastlina sama proizvede hrano, so nujno potrebni fotosintetski pigmenti, saj celoten proces fotosinteze poteka v kloroplastih, v le-teh pa so tilakoidne membrane, v katerih so fotosintetska barvila – pigmenti razporejeni v posebnih skupkih, ki jih imenujemo fotosintetske enote. Znanih je več vrst klorofilov, ki jih označujemo s črkami in imajo podobno strukturo. V kloroplastih zelenih alg in višjih rastlin sta **klorofil a** – modrozelen in **klorofil b** – rumenozelen, pri nekaterih algah pa je poleg klorofila a prisoten še klorofil c in/ali d. Glavno fotosintetsko barvilo je klorofil a. Najpogostejše razmerje vsebnosti klorofila a in b je okoli 3:1. Pri fotosintezi pa sodelujejo tudi nekatera druga barvila – pigmenti, ki pa se tudi nahajajo v tilakoidnih membranah.To so oranžni **karoteni**, rumeni **ksantofili**, v rdečih algah in modrozelenih cepljivkah pa najdemo tudi fikoeritrin – rdeč pigment in fikocianin – moder pigment. To so pomožni ali antenski pigmenti, ki absorbirajo svetlobo različnih valovnih dolžin in jo prenašajo h glavnemu pigmentu, s tem pa je svetlobni spekter bolje izkoriščen.

Klorofil a absorbira največ rdeče pa tudi vijolične svetlobe, klorofil b absorbira največ modrega dela svetlobnega spektra. Za fotosintezo so pomembni predvsem fotoni rdeče in modre svetlobe. Klorofil a in b povzročata tudi zeleno barvo listov, kajti klorofili ne absorbirajo zelene svetlobe – jo odbijajo.

Vsak od navedenih pigmentov ima več oblik. Od klorofilov a sta najpomembnejša klorofil a_{700} ali klorofil a_{I} in klorofil a_{680} ali klorofil a_{II}, ki absorbirano energijo direktno porabita za fotokemijsko delo – svetlobno energijo pretvarjata v kemijsko energijo.

Pri tem latorijskem delu smo s pomočjo **papirne kromatografije** ugotavljali ali daje barvo zelenemu listu le eno barvilo ali je teh barvil več. Papirno kromatografijo smo izvajali na traku. Različne snovi so različno topne v topilu. Snovi, ki se v topilu bolje topijo, odnaša topilo hitreje. Tiste snovi, ki pa se topijo slabše, pa počasneje. Topilo gre po filtrirnem papirju zaradi kapilarnosti - s seboj odnaša raztopljene snovi, ki se na filtrirnem papirju ločijo tako, da lahko opazujemo posamezne sestavine. V našem primeru so se po tem papirju prenašala barvila in smo jih lahko ločili s prostim očesom. Če pa bi kromatografijo opravljali z neobarvanimi snovmi, bi si pomagali z različnimi detektorji (UV svetloba, indikatorji,...).

CILJI

- osvojiti metodo papirne kromatografije
- dokazati, da je v zelenih listih več barvil
- znati določiti posamezno barvilo v ekstraktu na osnovi Rf vrednosti

- znati izračunati Rf vrednost (hitrost, s katero se snov giblje po kromatografskem papirju, v primerjavi s hitrostjo, s katero se giblje topilo) = retencijski faktor, ki ima vedno vrednost 0-1
- znati razviti kromatogram s pomočjo topil
- spoznati razloge za spremembo barve listov jeseni
- spoznati vlogo barvil – fotosintetskih pigmentov
- razumeti povezavo med fotosintetskimi pigmenti

MATERIAL

- zeleni listi (meta)
- alkohol (etanol)
- škarje
- topilo (8 % acetona, 92 % petroletra)
- epruvete
- vroča vodna kopel
- pipeta
- velika epruveta ali stekleni valj z zamaškom
- petrijevka
- okrogli filtrirni papir
- kuhalnik
- držalo za epruvete
- stojalo za epruvete
- urno steklo
- kosem vate
- kremenčev pesek

METODA DELA

PAPIRNA KROMATOGRAFIJA NA TRAKU

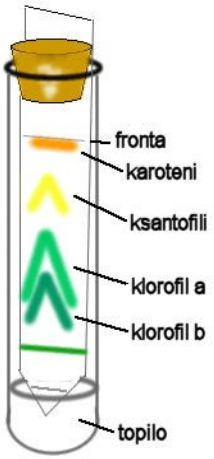
- Trak filtrirnega papirja pritrdimo na zamašek. Trak mora viseti navpično v epruveti, tako da se skoraj dotika dna, ne sme pa se dotikati sten epruvete. Pri delu se površine traku ne dotikamo, premikamo pa ga samo s pinceto.
- Odstranimo zamašek s trakom filtrirnega papirja. V epruveto nalijemo topilo, tako da bo trak filtrirnega papirja segal v tekočino, ko bomo epruveto spet zamašili.
- S svinčnikom (ne s črnilom) naredimo 2 črti na papirnat trak. Prvo približno 2 cm od spodnjega roba, drugo pa približno 2 cm pod zgornjim robom. Na spodnjo črto nanesemo z drobno pipeto ali s stekleno palčko kapljico pigmentnega izvlečka!. Papir se mora dobro osušiti, nato postopek še nekajkrat ponovimo.
- **Trak z barvno črto postavimo v epruveto. Prepričamo se, da konec traku res sega v topil ter hkrati pazimo, da se trak ne dotika sten posode. Kromatografija je končana takrat, ko se topilo dvigne skoraj do vrha papirnega traku.**

REZULTATI

:

PAPIRNA KROMATOGRAFIJA NA TRAKU

Rezultate, ki smo jih dobili prikazuje slika na desni. Na sliki so prikazani tudi karoteni, ki pa jih naša rastlina ni vsebovala, a so bolj topni od ostalih barvil. Najslabše topen je klorofil b, ki je temno zelen, sledi klorofil a, ki je svetlo zelen, najbolj topni pa so ksantofili.



RETENCIJSKI FAKTOR

Za vsako barvilo smo izračunali Rf (retencijski faktor), ki so prikazani v tabeli.

IME PIGMENTA	BARVA	RETENCIJSKI FAKTOR
klorofil b	rumenozelena	0.61
klorofil a	modrozelena	0.75
ksantofil	rumena	0.79

RAZPRAVA

Na razvitem kromatogramu smo lahko razločili več barv. Iz tega smo ugotovili, da zeleni listi ne vsebujejo le enega barvila, temveč več. Od starta proti fronti so si sledile rumenozelena, modrozelena, rumena in

oranžna barva. Vsaka barvna lisa pripada določenemu barvilu. Imena posameznih barvil lahko prepoznamo po specifični barvi, prav tako pa bi ime lahko ugotovili po specifični absorbirani svetlobi. Tako smo spoznali, da si od starta proti fronti sledijo klorofil b, klorofil a, ksantofil in karoten.

S pomočjo retencijskega faktorja ločujemo različno topne snovi iz ekstrakta. Retencijski faktor je torej hitrost, s katero se določena snov giblje po kromatografskem papirju, v primerjavi s hitrostjo, s katero se giblje topilo. Polarno topilo se zaradi kapilarnosti širi po kromatografskem papirju in povzroči razvoj kromatograma.

Za vedno enako dobljene vrednosti retencijskega faktorja moramo zadostiti nekaterim pogojem. Vedno moramo uporabiti ekstrakt iste rastline, saj le tako zagotovimo, da je količina posameznega barvila vedno enaka. Razvoj kromatograma mora potekati na istem papirju in z istim topilom. Na vse to pa vpliva tudi temperatura, zato moramo poskrbeti, da je le-ta vedno enaka. Pomembno vlogo pri kromatografiji ima pa tudi vedno isto nanašanje ekstrakta na kromatografski papir.

Pri tem laboratorijskem delu pa smo dobili tudi podatke za odgovor na vprašanje o tem, kako se barva listov jeseni spreminja. To lahko razložimo s tem, da večino leta kljub temu, da rastlina vsebuje več barvil, v ospredje sili le zeleno barvilo, ki je nujno potrebno za fotosintezo. Pozimi rastlina ne potrebuje fotosinteze in prav tako tudi fotosintetskih barvil ne, zato se le-ta razgradi, jeseni, pa pridejo v ospredje tudi druga barvila, kot so karoteni in ksantofili. Prav zaradi tega lahko jeseni spremljamo celo paleto barvnih odtenkov, ki jih povzroča počasen razpad določenih fotosintetskih barvil.

Pri tem laboratorijskem delu pa lahko naletimo tudi na nepravilno razvite kromatograme. Na to predvsem vliva nenatančno ali napačno nanašanje ekstrakta na papir. Prav tako, pa smo morali paziti, da se kromatografskega papirja nismo preveč dotikali, saj bi s tem vplivali na kasnejše nepravilno potovanje topila. Težave nam lahko povzroča tudi nepravilno izdelan ekstrakt iz listov.

ZAKLJUČEK

Pri laboratorijskem delu smo se srečali z metodo papirne kromatografije, ki temelji na različni topnosti snovi v topilu in posledični različno hitrem prehajanju po kromatografkem papirju. Z razvitjem kromatograma smo ugotovili, da rastline vsebujejo več različnih fotosintetskih barvil in ne le enega in vsak ima svoj Rf (retencijski faktor, ki je hitrost, s katero se snov giblje po kromatografskem papirju, v primerjavi s hitrostjo, s katero se giblje topilo). Pojasnili smo tudi spreminjanje barv jeseni, ko najprej razpade zeleni pigment in tako pridejo v ospredje še drugi pigmenti. Najpomembnejša sta torej klorofil a in b, ki absorbirata prvi rdeči del drugi pa modri del spektra svetlobe in ki svetlobno energijo direktno pretvarjata v kemijsko. Poznamo pa tudi pomožne pigmente, ki absorbirajo druge barve svetlobnega spektra, in jo prenašajo h glavnemu pigmentu in tako omogočajo, da je svetlobni spekter bolje izkoriščen.

LITERATURA

- S. Pevec: Biologija- Laboratorijsko delo, DZS, 2001;
- S. Pevec: Biologija- Navodila za laboratorijsko delo, DZS, 2001;
- PIK stran 45/46