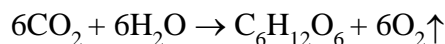


5. Izolacja i analiza spektroskopowa chlorofilu

Chlorofil jest zielonym barwnikiem występującym u organizmów zdolnych do przeprowadzenia procesu fotosyntezy np. rośliny wyższe, glony, cyjanobakterie. Chlorofil, w procesie fotosyntezy, bierze udział w zamianie energii świetlnej w energię chemiczną, gdzie z dwutlenku węgla i wody powstaje glukoza i tlen uwalniany do atmosfery:



Chlorofil zawiera cztery połączone ze sobą pierścienie pirolowe, które łączy centralnie ułożony atom magnezu. W układzie porfirynowym występują naprzemienne wiązania pojedyncze i podwójne, które tworzą układ rezonansowy.

Istnieje kilka rodzajów chlorofilu: chlorofil *a*, *b*, *c*, *d* i *e*. Wszystkie fotosyntetyzujące organizmy posiadają chlorofil *a*, który absorbuje światło czerwone o długości fali około 680 nm i światło fioletowe o długości fali 440 nm. Chlorofil *b* najintensywniej absorbuje światło pomarańczowo-czerwone i światło niebieskie.

Intensywny zielony kolor chlorofilu powoduje, iż wykorzystywany jest on jako pigment w przemyśle np. chlorofil *a* używany jest do barwienia mydła, oliwy, wosków, tkanin i kosmetyków. Komercyjnie dostępne pigmenty o strukturze chemicznej podobnej do chlorofilu wytwarzane są w szerokiej gamie barw np. poprzez zastąpienie atomu magnezu atomem miedzi uzyskuje się pigment o barwie jasno niebieskiej.

Odczynniki i sprzęt:

1. Świeże zielone liście
2. Żel krzemionkowy Silica Gel 60 (Merck)
3. Mieszanina aceton : eter naftowy (22 : 3; v/v)
4. Mieszanina eter naftowy : aceton (7 : 3; v/v)
5. 10% wodny roztwór NaCl
6. CaCO₃
7. Bezwodny Na₂SO₄ (lub MgSO₄)
8. Szkło laboratoryjne: moździerz, rozdzielacz o pojemności 100 mL, lejek zwykły, kolby stożkowe i okrągłodenne, zlewki, probówki, pipety miarowe, cylindry miarowe
9. Zestaw do chromatografii kolumnowej
10. Bibuła filtracyjna
11. Wyparka rotacyjna próżniowa

Wykonanie doświadczenia:

A. Ekstrakcja barwników z liści

W moździerzu utrzeć 1 g rozdrobnionych świeżych liści w 20 mL mieszaniny aceton : eter naftowy (22 : 3; v/v). W trakcie rozcierania dodać niewielką ilość CaCO₃ (pełna łyżeczka dentystyczna). Mieszaninę przesączyć do rozdzielacza przez sączek z bibuły. Do ekstraktu dodać 20 mL eteru naftowego i 20 mL 10% roztworu NaCl. Wyrząsać 2-3 min. Po rozdzieleniu się warstw, usunąć dolną warstwę wodną, a górną warstwę organiczną przemyć wodą destylowaną (3×5 mL). Przemyty ekstrakt wysuszyć w kolbie płaskodennej za pomocą bezwodnego Na₂SO₄ (lub MgSO₄). Po wysuszeniu, roztwór przesączyć do kolbki okrągłodennej i zagęścić do 20-30% początkowej objętości.

B. Przygotowanie kolumny

Kolumnę chromatograficzną umieścić pionowo w statywie, zamknąć jej wylot zaciskaczem i wypełnić ją około 10 mL mieszaniny eter naftowy : aceton (7 : 3; v/v). Następnie przy pomocy

bagietki umieścić na dnie kolumny tamponik z waty szklanej uważając, aby nie powstały pęcherzyki powietrza. Ostrożnie wlać (po bagietce) do kolumny zamieszana uprzednio zawiesinę żelu krzemionkowego Silica Gel 60 (Merck). Zawiesina w zlewce powinna być przygotowana tak, aby 2/3 jej objętości stanowił żel, a 1/3 mieszanina eter naftowy : aceton (7 : 3; v/v). Następnie odczekać, aż na dnie kolumny uformuje się warstwa żelu 3-5 cm, po czym ostrożnie otworzyć zacisk kolumny. Roztwór powinien wypływać z szybkością 1 kropli/sek. Wysokość uformowanego żelu powinna wynosić 20 cm. Następnie na szczycie kolumny ostrożnie umieścić krążek z bibuły filtracyjnej i zamknąć wylot kolumny, pozostawiając nad powierzchnią co najmniej 2 cm roztworu.

C. Równoważenie kolumny

Kolumnę z uformowanym żelem krzemionkowym połączyć ze zbiornikiem zawierającym 500 mL mieszaniny eter naftowy : aceton (7 : 3; v/v), otworzyć zacisk u dołu kolumny i przepuścić przez nią około 60 mL roztworu. Szybkość przepływu powinna wynosić około 1 mL/min. Szybkość tę reguluje się poprzez zmianę położenia zbiornika w stosunku do kolumny.

D. Chromatografia barwników roślinnych

2 mL zatężonego ekstraktu barwników roślinnych nanieść na czoło kolumny. Po wsiąknięciu w żel ostrożnie dodać 4-5 mL eluentu i podłączyć rezerwuar z eluentem. Otworzyć wylot na dole kolumny i rozpocząć elucję barwników. Eluat zbierać do probówek, do każdej po 3 mL. Zaobserwować pojawianie się różnokolorowych stref w trakcie rozdzielania. Eluent zawierający chlorofil i feofitynę wykazuje czerwonawą fluorescencję. Zanotować kolejność elucji poszczególnych barwników. Na podstawie barwy, fluorescencji i widma UV (maksimum absorpcji dla chlorofilu znajduje się przy długościach fal 420-440 i 680 nm) zidentyfikować próbki z chlorofilem. (poprzez obserwację zabarwienia zawartości zebranych frakcji pod lampą UV). W tabeli poniżej przedstawiono kolory dla poszczególnych barwników roślinnych.

barwnik	kolor
karoten	żółty
feofityna	oliwkowozielony
chlorofil a	niebiesko-zielony
chlorofil b	żółto-zielony
luteina	żółty
ksantofile	żółty

Zakres materiału:

Zasada rozdzielania w chromatografii cieczowej, właściwości barwników roślinnych i ich funkcja biologiczna, antocyjany, flawonoidy, karotenoidy; budowa chlorofilu (rdzeń porfirynowy, chlorofil a i b), postrzeganie barw, fotosynteza.