

POLITECHNIKA ŚLĄSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY

KATEDRA FIZYKOCHEMII I TECHNOLOGII
POLIMERÓW

LABORATORIUM Z FIZYKI
I BIOFIZYKI

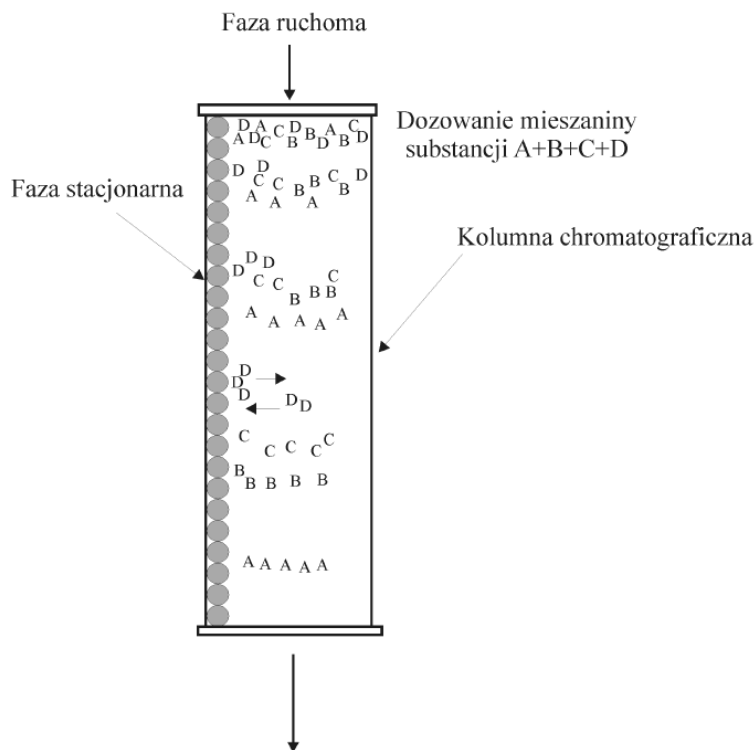
Oznaczanie barwników roślinnych
metodą chromatograficzną

12.1. Chromatografia

Chromatografia należy do metod rozdzielania mieszanin, polegających na zróżnicowaniu szybkości migracji cząsteczek poszczególnych jej składników. Każdy układ chromatograficzny składa się z trzech części (rys.1):

- fazy ruchomej,
- fazy nieruchomej,
- chromatografowanych substancji.

W trakcie procesu chromatograficznego badana substancja dzieli się pomiędzy dwie fazy – ruchomą i nieruchomą.



Rys. 1. Schemat rozdzielania badanej substancji pomiędzy dwie fazy.

W zależności od rodzaju eluentu, czyli substancji, w której rozpuszcza się badaną mieszaninę rozróżnia się następujące techniki chromatograficzne:

- a) chromatografia cieczowa - w której eluentem jest ciekły rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników
- b) chromatografia gazowa - w której eluentem jest gaz (zwykle hel, argon lub wodór, czasem azot).

- c) chromatografia nadkrytyczna - w której eluentem jest gaz w stanie nadkrytycznym.

Biorąc pod uwagę mechanizm procesu podziału substancji pomiędzy fazę ruchomą, a nieruchomą można wyodrębnić następujące rodzaje chromatografii:

- a) chromatografia adsorpcyjna
- b) chromatografia rozdzielcza
- c) chromatografia jonowymienna
- d) chromatografia osadowa

Biorąc pod uwagę sposób przeprowadzenia procesu chromatograficznego można wyróżnić cztery następujące metody:

- 1) wymywania
- 2) czołowa
- 3) rugowania
- 4) rozsuwania pasm

12.1.1. Chromatografia adsorpcyjna

Chromatografia adsorpcyjna jest metodą rozdzielania, w której wykorzystuje się niejednakową zdolność składników mieszaniny do adsorbowania się na powierzchni ciała stałego. Rozdział substancji na kolumnie chromatograficznej zależy od powinowactwa adsorpcyjnego rozdzielanych substancji w danym układzie adsorpcyjnym. Metoda ta znalazła zastosowanie do rozdziału i analizy związków organicznych i nieorganicznych.

12.1.2. Chromatografia rozdzielcza

Chromatografia rozdzielcza oparta jest na różnicy we współczynnikach podziału składników mieszaniny rozdzielających się pomiędzy dwie fazy ciekłe (niemieszające się ze sobą).

Faza nieruchoma osadzona jest na nośniku – nieaktywnej substancji stałej, natomiast faza ruchoma przepływa przez kolumnę. Badane substancje dzielą się pomiędzy fazę ruchomą i nieruchomą zgodnie z ich rozpuszczalnością w tych fazach. Substancje, które lepiej

rozpuszczają się w fazie nieruchomej migrują wolniej niż substancje rozpuszczające się lepiej w fazie ruchomej. Prowadzi to do rozdziału substancji badanej.

W chromatografii rozdzielczej dużą rolę odgrywają nośniki fazy ciekłej. Pożądane jest, aby nośnik nie wykazywał własności adsorpcyjnych oraz nie reagował z substancjami rozdzielanymi. Z obecnie stosowanych nośników zadawalające własności wykazują: żel krzemionkowy, celuloza, ziemia okrzemkowa oraz skrobia.

Metoda chromatografii podziałowej znalazła szerokie zastosowanie do rozdziału, identyfikacji oraz ilościowego oznaczania wielu związków organicznych.

12.1.3. Chromatografia jonowymienna

Chromatografia jonowymienna jest metodą polegającą na wymianie jonów na jonitach. Jonity są to nierozpuszczalne ciała stałe, zawierające zdolne do wymiany jony – kationy lub aniony. W zetknięciu z roztworem elektrolitu jony te mogą być wymieniane w stosunku stechiometrycznie równoważnym na jony początkowo obecne w roztworze. Wymieniacze kationów nazywa się kationitami, natomiast anionów – anionitami.

Reakcje wymiany jonowej prowadzi się najczęściej w kolumnach. Kolumny jonitowe mogą służyć zarówno do przeprowadzenia prostej operacji usuwania jednego lub kilku jonów z roztworu i zastępowania ich innym jonem znajdującym się początkowo w jonicie, jak też do rozdzielania mieszanin wielu jonów, co jest przedmiotem chromatografii jonowymiennej.

Metoda chromatografii jonowymiennej znalazła zastosowanie między innymi do demineralizacji wody, oznaczania całkowitego stężenia soli, zagęszczania składników śladowych, oczyszczania i odzyskiwania odczynników.

12.1.4. Chromatografia osadowa

Chromatografia osadowa oparta jest na różnicy w szybkości reagowania poszczególnych składników z fazą stałą kolumny oraz na różnicach rozpuszczalności powstających związków w danym rozpuszczalniku. Metoda ta powoduje wytrącanie się na kolumnie kolejnych składników w postaci oddzielnych pasm chromatograficznych. Przez odpowiedni dobór pH roztworu przemywającego można uzyskać warunki, w których zachodzi wymywanie osadu jednej substancji, podczas gdy inne zostają na kolumnie.

Metoda chromatografii osadowej znalazła zastosowanie do rozdziału elektrolitów kationów lub anionów nieorganicznych.

12.1.5. Metoda wymywania

Metoda wymywania polega na wprowadzeniu niewielkiej ilości mieszaniny związków na wierzchołek kolumny chromatograficznej. Kolumnę przemywa się czystym rozpuszczalnikiem tak długo, aż dolne pasmo adsorpcyjne przejdzie do przesączu, a następnie ulegną kolejno wymyciu pasma wyżej położone. Zmieniając odbieralnik uzyskuje się kolejno frakcje wycieku zawierające poszczególne substancje oddzielone od siebie.

Metoda wymywania to najbardziej efektywna technika rozdziału mieszaniny na składniki. Jest ona podstawowym sposobem przeprowadzenia chromatografii rozdzielczej oraz znajduje powszechne zastosowanie w chromatografii adsorpcyjnej i jonowymiennej.

12.1.6. Metoda czołowa

Metoda analizy czołowej polega na przesączaniu badanego roztworu w sposób ciągły przez kolumnę. W wyniku różnic w zdolnościach adsorbowania się składników na adsorbencie kolumny, następuje zróżnicowanie prędkości wędrowania poszczególnych składników. Składnik wykazujący najmniejsze powinowactwo do fazy nieruchomej porusza się najszybciej i oddziela się częściowo od mieszaniny w postaci pasma wędrującego z przodu.

Metoda czołowa nadaje się przede wszystkim do celów preparatywnych.

12.1.7. Metoda rugowania

Metoda rugowania polega na wprowadzeniu niewielkiej objętości roztworu na wierzchołek kolumny chromatograficznej. Kolumnę przemywa się roztworem zawierającym substancję rugującą o większym powinowactwie adsorpcyjnym niż składniki rozdzielane. Wskutek większego powinowactwa ciecz przemywająca wypiera z powierzchni adsorbentu pierwszy składnik mieszaniny o nieco mniejszym powinowactwie, ten zaś z kolei ruguje drugi składnik o jeszcze mniejszym powinowactwie itd.

12.1.8. Metoda rozsuwania pasm

Metoda rozsuwania pasm polega na wprowadzeniu niewielkiej ilości mieszaniny związków na wierzchołek kolumny chromatograficznej. Kolumnę przemywa się roztworem zawierającym kilka składników wykazujących zdolności adsorpcyjne odmienne niż substancje rozdzielane. Podczas przemywania kolumny z zaadsorbowanymi na niej uprzednio substancjami, składniki te w zależności od swych zdolności adsorpcyjnych rozmieszczają się między warstwami poszczególnych związków. Wskutek tego następuje rozsunięcie pasm chromatografowanych, a luki między nimi wypełniają substancje rugujące. Przy ciągłym przepływie roztworu rugującego całość wędruje w dół kolumny, przy czym rozsunięcie warstw zwiększa się coraz bardziej. Każdy składnik rozdzielanej mieszaniny może być zebrany w postaci oddzielnej frakcji.

12.2 Barwniki roślinne

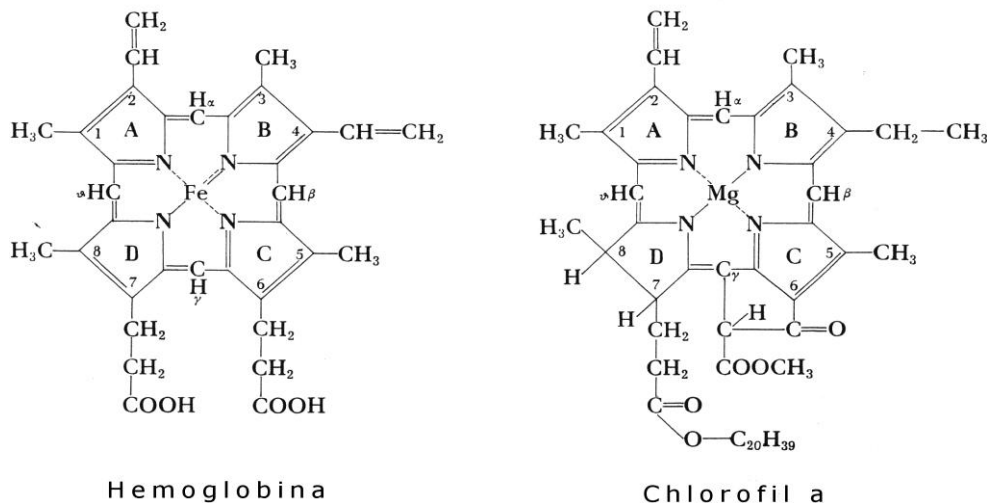
Barwniki roślinne, ze względu na ich lokalizację w komórce, dzieli się na barwniki występujące w:

- a) plastydach (chloroplastach i chromoplastach) - chlorofile (a i b) oraz karotenoidy
- b) soku komórkowym wodniczki – antocyjany oraz flawonole

12.2.1. Chlorofil a

Wychwytywanie energii świetlnej jest podstawową reakcją fotosyntezy. Pierwszy etap tej reakcji związany jest z procesem absorpcji światła przez cząsteczkę fotoreceptora. Głównym fotoreceptorem w chloroplastach większości roślin zielonych jest *chlorofil a*, pochodna tetrapiolu (rys. 2).

Cztery atomy azotu pierścieni pirolowych tworzących chlorofil są związane z jonem magnezu. W przeciwieństwie do porfiryny, takiej jak hem, w chlorofilu jeden pierścień pirolowy jest zredukowany, a do drugiego pierścienia pirolowego przyłączony jest dodatkowy 5-węglowy pierścień.



Rys. 2 Przykłady naturalnych porfiryn

Chlorofile są bardzo wydajnymi fotoreceptorami, ponieważ mają układ wiązań pojedynczych i podwójnych występujących na przemian (polieny). Wykazują one bardzo silną absorpcję w zakresie światła widzialnego, stanowiącego największą część promieniowania słonecznego docierającego do Ziemi. Maksimum molowego współczynnika absorpcji chlorofilu a wynosi ponad $10^5 \left[\frac{1}{M \cdot cm} \right]$ (jest to największa wartość molowego współczynnika absorpcji wyznaczona dla związków organicznych).

Kompleks zbierający światło, który opierałby się tylko na cząsteczkach chlorofilu a, byłby raczej niewydajny z dwóch powodów:

- 1) Cząsteczka chlorofilu a absorbuje światło tylko określonej długości fali. Światło o długości około 450 – 650 nm nie jest absorbowane przez chlorofil a. Rejon ten odpowiada szczytowi widma słonecznego. Brak korzystania ze światła o takiej długości byłby dla rośliny marnotrawstwem energii.
- 2) Nawet w tej części widma, w której chlorofil a absorbuje światło, wiele fotonów może przez niego przechodzić i nie zostać zaabsorbowane. Wynika to ze stosunkowo niewielkiej ilości cząsteczek chlorofilu a znajdujących się w centrum reakcji.

12.2.2. Chlorofil b i karotenoidy

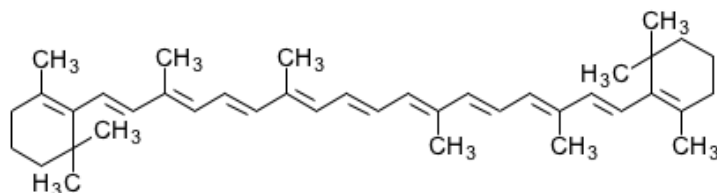
Chlorofil b i *karotenoidy* są ważnymi cząsteczkami zbierającymi światło, kierującymi energię do centrum reakcji.

Chlorofil b różni się od chlorofilu a tym, że zawiera grupę formylową w miejscu grupy metylowej. Ta niewielka różnica powoduje przesunięcie dwóch głównych maksimów absorpcji w kierunku środkowej części widma światła widzialnego. W szczególności chlorofil b absorbuje wydajnie światło o długości fali między 450 a 500 nm.

Karotenoidy są złożonymi polienami, które absorbują światło o długości fali 450 – 500 nm. Odpowiadają za żółty i czerwony kolor owoców oraz kwiatów, jak również nadają piękne barwy jesiennym liściom (wówczas cząsteczki chlorofilu ulegają degradacji).

Oprócz roli, jaką odgrywają w przenoszeniu energii do centrum reakcji, karotenoidy pełnią funkcje obronne: zmniejszają szkodliwe skutki reakcji fotochemicznych, zwłaszcza tych z udziałem tlenu. Ochrona ta jest szczególnie ważna jesienią, gdy główny barwnik, jakim jest chlorofil, ulega degradacji i nie może absorbować energii świetlnej. Rośliny, które nie zawierają karotenoidów szybko ulegają zniszczeniu przez ekspozycję na światło i tlen.

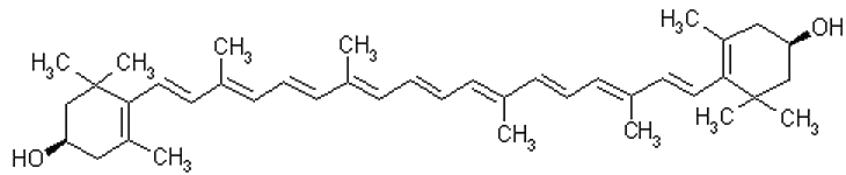
Do grupy karotenoidów zalicza się karoteny i ksantofile. *Karoten* to barwnik o kolorze pomarańczowym. Na największą uwagę zasługuje tzw. *beta – karoten* (rys.3), stanowiący 80% wszystkich karotenów roślin wyższych. Szczególnie obficie występuje on w korzeniu marchwi.



Rys. 3 Beta – karoten

Ksantofile to pochodne tlenowe karotenów (rys.4). Dzięki wielu sprzężonym wiązaniom podwójnym nadają żółtą, pomarańczową lub czerwoną barwę kwiatom, owocom a także

żółtku jaj (luteina). Powstają one przy utlenianiu karotenów przy pomocy enzymów - tzw. oksydaz mieszanych.

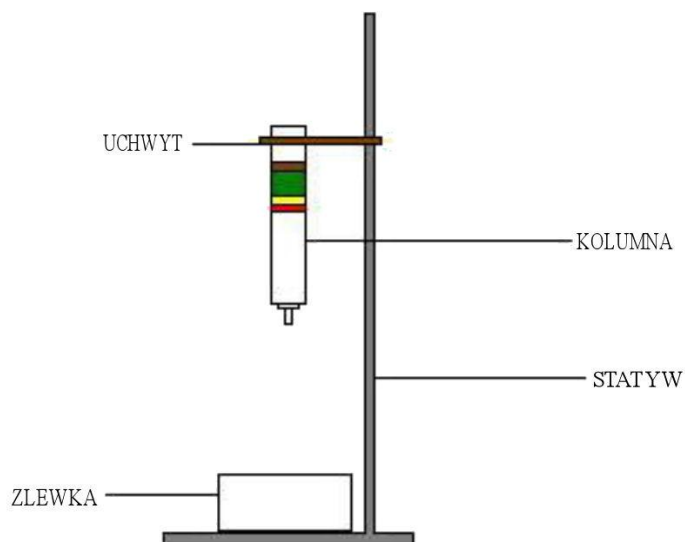


Rys. 4 Luteina

12.3. Pomiary

Do oznaczanie barwników roślinnych metodą chromatograficzną można użyć zestaw przedstawiony na rys. 5. Składa się on z następujących elementów:

- statywu
- uchwytu do mocowania kolumny
- kolumny chromatograficznej
- zlewki



Rys. 5. Schemat zestawu pomiarowego.

12.2.1 Ekstrakcja barwników z liści

W moździerzu utrzeć 4 - 5 g rozdrobnionych świeżych liści (rys. 6). Dodać 5 ml mieszaniny eter naftowy: etanol (stosunek wagowy: 10:1). Mieszaninę przesączyć przez zwilżoną eterem naftowym bibułę filtracyjną do suchej probówki.



Rys.6 Przygotowanie liści do ekstrakcji barwników roślinnych.

12.2.2 Przygotowanie kolumny

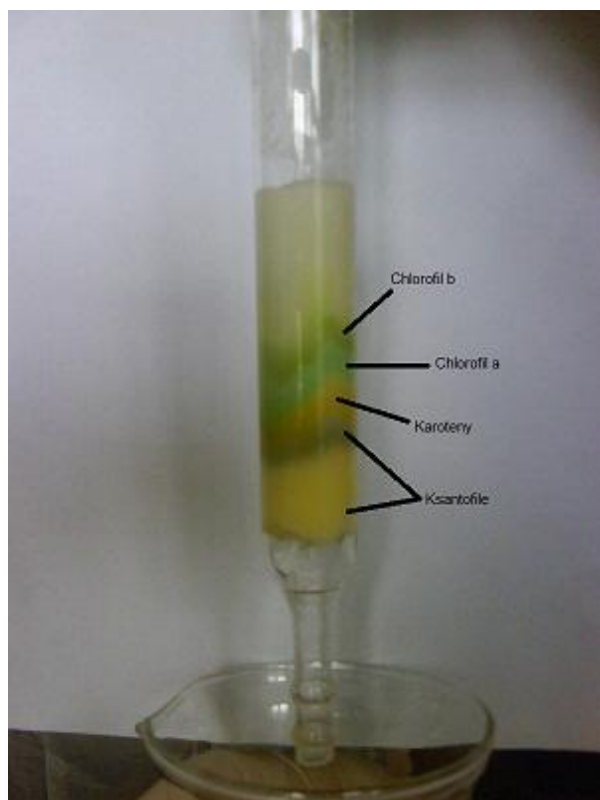
Kolumnę chromatograficzną umieścić pionowo w statywie. Na dno kolumny nałożyć odpowiednio dopasowany krążek bibuły. Wsypać małymi porcjami skrobię, lekko ubijając przez potrząsanie kolumną (wysokość warstwy nieruchomej – 1/2 wysokości kolumny). Na górnej powierzchni umieścić kolejny krążek bibuły. Wypełnić kolumnę około 10 ml eteru naftowego tak, żeby nie wzburzyć górnej powierzchni skrobi i aby warstwa cieczy nad powierzchnią skrobi stale wynosiła 0,5 cm. Przemycanie kolumny zakończyć z chwilą, gdy nadmiar rozpuszczalnika pojawi się w wypływie. Złoże kolumny (skrobi) nie może się zapowietrzyć.

12.2.3 Rozwijanie chromatografu

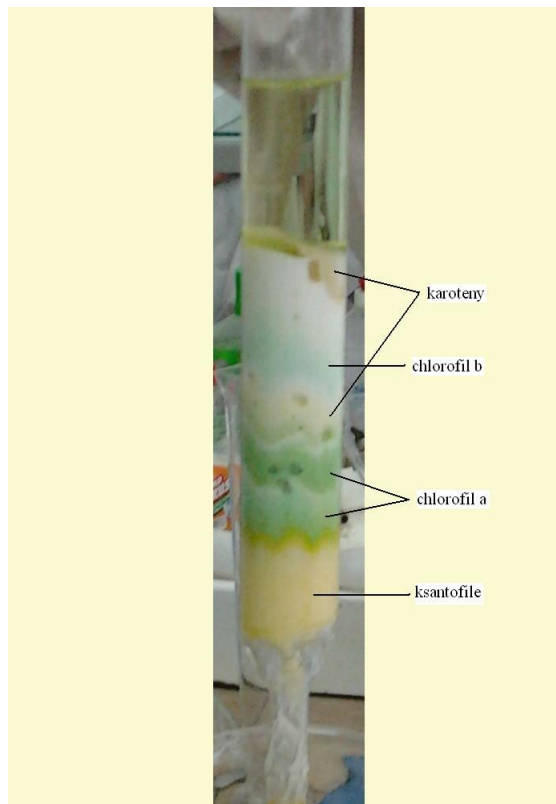
Przed przeprowadzeniem chromatografii barwników roślinnych należy przygotować rozwijacz chromatograficzny. W tym celu przygotowuje się 10 ml mieszaniny eter naftowy: etanol: eter etylowy w stosunku 100:2:5.

2 ml ekstraktu barwników roślinnych nanieść na czoło kolumny i uruchomić stoper. Po zaadsorbowaniu wyciągu na złożu ostrożnie dodać 4-5 ml rozwijacza chromatograficznego. Obserwować uważnie proces chromatografii i mierzyć czas

pojawienia się na złożu barwnych pasm poszczególnych barwników oraz czas przepływu fazy ruchomej przez kolumnę (rys.7).



Pelargonium pascuense



Wilczomlecza nadobnego

Rys.7 Chromatografia barwników roślinnych pelargonii pasiastej oraz wilczomlecza nadobnego

12.3 Wyniki, obliczenia i niepewność pomiaru

1. Sporządzić charakterystykę przygotowanych liści (gatunek, wygląd, kształt itp.)
2. Określić rodzaj barwników występujących w roślinie na podstawie barw otrzymanych na złożu kolumny.
3. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczyć wartości R_f analizowanych barwników:

$$R_f = \frac{t_s}{t_R} \quad (12.1)$$

gdzie:

t_s – czas pojawienia się na złożu barwy poszczególnych barwników

t_R – czas przejścia przez kolumnę chromatograficzną fazy ruchomej

4. Obliczyć wartości współczynników retencji k poszczególnych barwników z następującej zależności:

$$k = \frac{1 - R_f}{R_f} \quad (12.2)$$

5. Wyznaczyć współczynnik rozdzielania α wyrażający stosunek wartości współczynników retencji (k) substancji dających sąsiadujące ze sobą barwy na złożu kolumny:

$$\alpha_m = \frac{k_{n+1}}{k_n} \quad (12.3)$$

gdzie:

k_{n+1} – współczynnik retencji barwnika później eluowanego

k_n – współczynnik retencji barwnika wcześniej eluowanego

6. Przeprowadzić analizę błędów metodą obliczenia niepewności. Końcowe wyniki przedstawić w formie:

$$\alpha = \bar{\alpha} \pm d\alpha \quad (12.4)$$

7. W sprawozdaniu umieść odpowiednie rysunki.

12.4 Pytania

1. Omów proces fotosyntezy.
2. Omów rodzaje barwników roślinnych.
3. Podaj barwnik, który odgrywa kluczową rolę w procesie fotosyntezy oraz omów tą rolę?
4. W jakich komórkach i w jakich przedziałach komórkowych zlokalizowane są barwniki fotosyntetyczne?
5. Jaką rolę pełnią w roślinach karotenoidy?
6. Jakie jest ewolucyjne pochodzenie chloroplastów?
7. Podaj definicję chromatografii.

8. Omów kryteria klasyfikacji metod chromatograficznych.
9. Omów podstawy fizykochemiczne procesu adsorpcji.
10. Omów podstawy fizykochemiczne procesu podziału.

12.5. Literatura

1. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., Biochemia, PWN, 2009.
2. Gregorowicz Z., Wybrane działy analizy instrumentalnej, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 1992.
3. Kamiński M., Chromatografia cieczowa, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk, 2004.
4. Kopcewicz J., Lewak S., Fizjologia roślin, PWN, Warszawa, 2007.
5. Lack A. J., Evans D. E., Biologia roślin. Krótkie wykłady, PWN, Warszawa, 2005.
6. Minczewski J., Marzenko Z., Chemia analityczna, PWN, Warszawa, 2009.
7. Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej, PWN, Warszawa, 1996.
8. Witkiewicz Z., Podstawy chromatografii, WNT, Warszawa, 2005.