Chemie – úloha č. 19

Autor: Tomáš Feltl

Studium rostlinných barviv

Cíle

Rozdělení a identifikace rostlinných barviv s využitím tenkovrstvé chromatografie a spektrofotometrie.

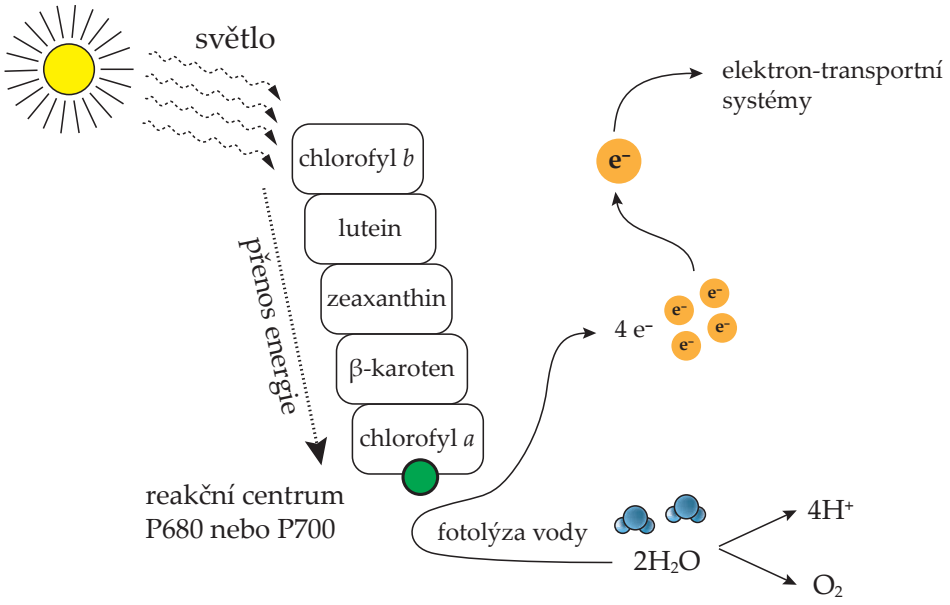
Zadání úlohy

Z donesených listů extrahujte směs barviv. Barviva následně oddělte s využitím TLC (chromatografie na tenké vrstvě). Jednotlivé proužky (skvrny) vystříhněte a oddělená barviva znovu extrahujte.
S využitím spektrofotometru zjistěte, jaká barviva získané extrakty obsahují.

Pomůcky

spektrofotometr Amadeus (PASCO SE-7183) s příslušenstvím, počítač se SW Quantum, popř. datalogger PASCO SPARK či Xplorer GLX (s instalovaným klíčem pro použití s PASCO Amadeus), odměrný válec 25 ml, odměrný válec 50 ml, kádinka 50 ml, kádinka 400 ml, 6 zkumavek (stojánek na zkumavky), filtrační nálevka, stojan a filtrační kruh, smotek vaty, mikropipeta 200 µl, navažovací lodička, váhy, třecí miska s tloučkem, lab. lžička, střička s destilovanou vodou, jemný písek (mletý oxid křemičitý), nůžky, Silufol, alobal, chemikálie (dest. voda, $CaCO_3$, aceton, benzin, propan-2-ol), biologický materiál – listy břečťanu, popisovač (lihový fix), pracovní návod, pracovní list

Teoretický úvod



Obr. 1: Fotosyntetický antenní systém se schematickým znázorněním zastoupených barviv – chlorofyl *b*, lutein, zeaxanthin, beta karoten, chlorofyl *a*

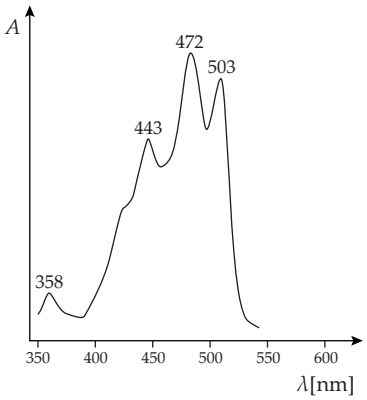
evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tyto materiály vznikly v rámci OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost č. CZ.1.07/1.3.12/04.0020.

Rostliny obsahují celou řadu zajímavých chemických sloučenin. Jednou ze skupin těchto látek jsou **rostlinná barviva**. Jedná se o organické látky, jejichž **struktura** i **fukce** je velmi různorodá – dávají zbarvení listům, květům, plodům, úzce souvisí také s **fotosyntézou**, fungují jako antioxidanty, lákají opylovače, apod.

V naší práci se zaměříme na barviva obsažená v **zelených listech**. Většina těchto barviv nějakým způsobem souvisí s fotosyntézou. Celou řadu barviv najdeme v tzv. **anténních systémech**, které zachycují světelnou energii. Následující obrázek (obr. 1) znázorňuje právě takovýto anténní systém.

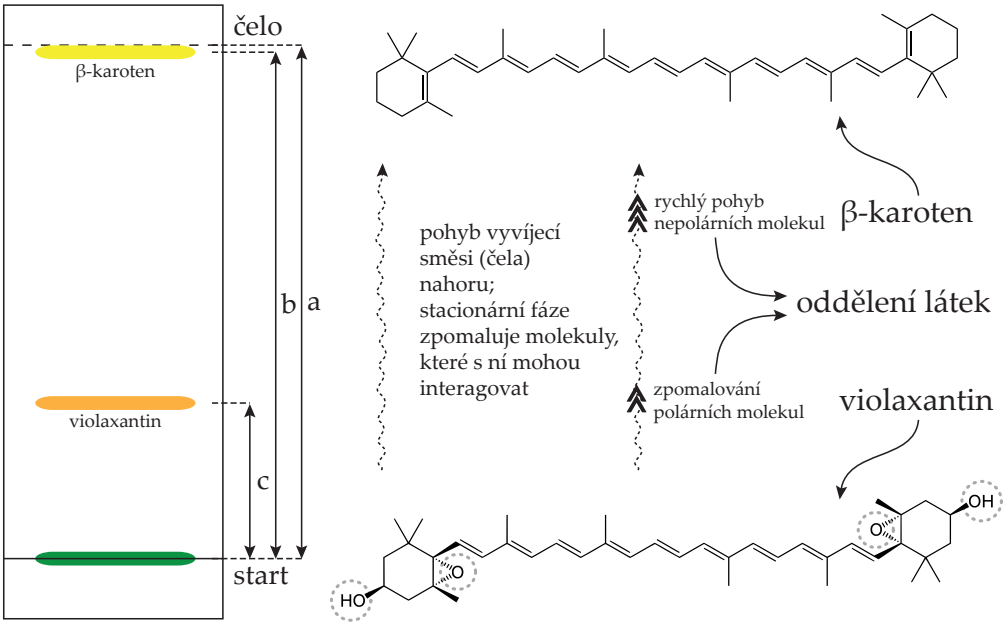
Pokud budeme sledovat, které vlnové délky určité barvivo absorbuje, získáme jeho tzv. **absorpční spektrum**. Toto spektrum vykazuje jistá maxima (tzv. **píky**), která jsou typická pro danou látku. Ideální je sledování abs. spektra v **UV-VIZ** oblasti. Naše zařízení, spektrofotometr Amadeus, umožňuje rozumným způsobem sledovat absorpční spektrum v rozsahu zhruba od 350 nm do 800 nm (VIZ). I to je ale dostatečné pro identifikaci několika barviv obsažených v listech. Ukázka absorpčního spektra barviva lykopenu, které znáte např. z rajčat, je na obrázku č. 2.



Obr. 2: Absorpční spektrum rostlinného barviva lykopenu

K oddělení barviv využijeme tenkovrstevnou chromatografii – **TLC** (z anglického **T**hin **L**ayer **C**hromatography – **chromatografie na tenké vrstvě**). Jedná se o chromatografickou metodu, kde **stacionární fázi** tvoří fólie (často hliníková) s nanesenou látkou – **sorbentem** (silikagel, oxid hlinitý, aj.). **Mobilní fáze** unáší extrahované látky postupně sorbentem, kde dochází ke vzájemným interakcím mezi molekulami barviv, rozpouštědla, sorbentu. V našem uspořádání bude docházet k oddělení extrahovaných barviv na základě jejich **polarity**. Nepolární látky se budou pohybovat rychleji než látky polární, čímž dojde k jejich oddělení.

Princip chromatografického **dělení** v našem experimentu je znázorněný na obrázku č. 3.



Obr. 3: Princip chromatografického dělení dvou barviv s odlišnou polaritou

Abychom mohli výsledky v rámci jednotlivých skupin porovnat, je třeba nějakým jednoznačným způsobem definovat pozice jednotlivých skvrn. Protože délka fólie může být různá, budeme jednotlivé skvrny definovat tzv. ***retardačním faktorem***. Ten vypočítáme pro každou skvrnu podle vzorce č. 1.

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tyto materiály vznikly v rámci OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost č. CZ.1.07/1.3.12/04.0020.

$$R_F = \frac{b}{a}, \qquad (1)$$

kde ***a*** je vzdálenost čela od startu a ***b*** je vzdálenost té které konkrétní skvrny od startu (jak je schamaticky znázorněno na obr. 3). Hodnota retardačního faktoru je pro určitou látku, při použití stejného systému mobilní a stacionární fáze, typická. Tím pádem můžeme naše výsledky s ostatními snadno porovnat.

Bezpečnost práce

Pracujte pečlivě a v souladu s pracovním návodem. Většina chemikálií v tomto praktickém cvičení je vysoce hořlavá. Dbejte zvýšené opatrnosti a s chemikáliemi zacházejte vždy v souladu s instrukcemi na obalu. Nikdy nepipetujte ústy. V laboratoři používejte ochranné brýle, plášť a případně další pomůcky v souladu se správnou laboratorní praxí.
aceton (F, Xi, R 11-36-66-67, S 9-16-26)
benzín (F, Xn, N, R 11-38-50/53-65-67, S 9-16-29-33-60-61-62)
propan-2-ol (F, Xi, R 11-36-67, S 7-16-24-25-26)

Příprava úlohy

Spektrofotometr je citlivé zařízení vyžadující odpovídající zacházení. Je nezbytné chovat se k němu šetrně – vyvarovat se zbytečných otřesů, přílišného ohýbání světlovodičů (nebezpečí zlomení světlovodného vlákna), znečištění měřicí cely (vyteklým roztokem, krystalky látky, atd.).
Úloha umožňuje pracovat paralelně na několika částech. Ideální jsou tříčlenné pracovní skupiny. První žák pracuje na bodu č. 1 – **Příprava vyvíjecí soustavy** a naváže bodem č. 3 – **Příprava TLC desky**. Druhý žák zpracovává listy – bod č. 2 – **Extrakce rostlinných barviv ze zelených listů** a pokračuje bodem č. 4 – **Nanesení vzorku a vlastní chromatografické dělení**. Třetí žák se věnuje problematice **zapojení HW a nastavení SW** souvisejícího se spektrofotometrem PASCO Amadeus.

Postup práce

Obr. 4: Připravené pracovní místo pro homogenizaci, extrakci a filtraci

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tyto materiály vznikly v rámci OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost č. CZ.1.07/1.3.12/04.0020.

Úlohu můžeme rozdělit do několika kroků:

1) **Příprava vyvíjecí soustavy** (vyvíjecí komory, mobilní fáze, …)
   a) Ve vyšší 400 ml kádince postupně smíchejte 50 ml benzínu, 5 ml propan-2-olu a 200 μl vody. Takto vzniklou směs promíchejte několika krouživými pohyby kádinkou.
   b) Kádinku uzavřete alobalovou fólií a ponechte stát stranou.
2) **Extrakce rostlinných barviv ze zelených listů** (souhrnný postup pro pět pracovních skupin)
   a) Asi deset břečťanových listů jemně nastříhejte do třecí misky – čím menší kousky, tím lépe se vám bude homogenizovat.
   b) Přímo do misky přidejte malé množství (polovinu malé laboratorní lžičky) $CaCO_3$, který zabrání nežádoucímu snižování pH v průběhu homogenizace.
   c) Extrakčním médiem bude aceton. Před započetím homogenizace přidejte 5 ml acetonu a několik minut intenzivně roztírejte v třecí misce. Jakmile z listů vznikne jemná kaše, přidejte ještě dalších 10–15 ml acetonu a znovu, tentokráte již jemně, třete.
   d) Takto vzniklý homogenát přefiltrujte přes malý smotek vaty. Získáte tím temně zelený acetonový extrakt látek z vašich listů.
3) **Příprava TLC desky** (fólie)
   a) Jako chromatografickou desku použijte Silufol. Je to tenká hliníková fólie potažená silikagelem. Silikagel je stěžejní částí, tzv. stacionární fází, na níž bude docházet k dělení barviv vašeho extraktu. Bílou silikagelovou vrstvu nesmíte poškodit!
   b) Z větší desky odstřihněte pruh, který jde volně vložit do vaší kádinky – chromatografické vyvíjecí komory. Nesmí přitom přesahovat horní okraj kádinky. Destička by měla končit asi 1 cm pod okrajem kádinky. Při měření velikosti zbytečně již připravenou komoru neotvírejte.
   c) Asi 2 cm od dolního okraje si opatrně nakreslete obyčejnou tužkou čáru – START. Nesmíte přitom ale porušit silikagelovou vrstvu.
   d) Na každé straně udělejte ve vzdálenosti alespoň půl centimetru od svislých okrajů dva vrypy až na hliníkovou fólii. Tím zmenšíte nepravidelnosti při dělení, které jsou výrazné především na krajích desky.
4) **Nanesení vzorku a vlastní chromatografické dělení**
   a) Na vaši startovní čáru – START – naneste připravený extrakt. Nanášení proveďte postupně několikrát. Po každém nanesení vyčkejte zaschnutí. *(K nanášení je vhodné použít např. kapiláru. Vzhledem k tomu, že takovéto nanášení je časově náročné, můžete celý proces urychlit např. nanášením kapátkem nebo běžnou mikropipetou, kdy nanesete alespoň 4× po sobě 100 μl extraktu. Pozor, extrakt má tendenci se „rozpíjet do silikagelu". Proužek by neměl po dokončení nanášení zasahovat od startu dále jak 3 mm nahoru/dolů. Nanášení provádějte dostatečně pomalu!)*
   b) Po nanesení vzorku rychle vložte desku do vyvíjecí komory. Komoru pečlivě uzavřete.
   c) Jakmile se horní linie vzlínající mobilní fáze, tzv. čelo, přiblíží asi 1 cm od horního okraje desky, vyjměte desku z komory a tím ukončete dělení.
   d) Na chromatogramu byste měli jasně rozlišit několik barevných skvrn (proužků). Zakreslete si je, změřte vzdálenosti ***a***, ***b*** a vypočítejte retardační faktory (viz Teoretický úvod, obr. č. 3, vzorec 1). Zjištěné údaje, včetně barevnosti, zaneste do připravené tabulky.
5) **Rozstříhání fólie a extrakce rozdělených barviv**
   a) Rozstříhejte desku na proužky tak, abyste jednotlivé barevné skvrny pokud možno zcela oddělili.
   b) Proužky vložte do připravených zkumavek a přidejte do každé 2 ml acetonu.
   c) Zkumavky zazátkujte a protřepejte.
6) **Proměření absorpčních spekter získaných vzorků** je podrobně popsáno v následujících kapitolách Příprava měření a Vlastní měření a záznam dat. (Této části předchází Nastavení HW a SW.)

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tyto materiály vznikly v rámci OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost č. CZ.1.07/1.3.12/04.0020.

7) **Identifikace rozdělených barviv**
(Tato část je popsána v následující kapitole Analýza naměřených dat.)

Nastavení HW a SW

1) K vašemu počítači (netbooku) připojte USB kabel (konektor A) dodávaný se spektrofotometrem Amadeus. Druhý konec kabelu připojte ke spektrofotometru (konektor B).
2) Dále propojte světlovodičem analyzátor se zdrojem s měřicí celou. Dbejte na to, abyste propojovací místa neznečistili.
3) Pomocí přiloženého adaptéru připojte zdroj elektrického napětí k měřicí cele se světelným zdrojem. Pokud je vše v pořádku, je šachtou měřicí cely vidět rozsvícené světlo.

Výše popsané úkony ilustruje obrázek č. 5.

Obr. 5: Zapojený spektrofotometr

Příprava měření

1) Na počítači spusťte program Quantum.
2) Klikněte na tlačítko s písmenem A, budete měřit absorpční spektrum.
3) Automaticky se spustí průvodce nastavením měření.
4) V dialogu *Integration time* klikněte na tlačítko *Set Automatically*.
5) Hodnotu *Pixel Smoothing* nastavte na 3, hodnotu *Average Scans* na 30.
6) Klikněte na tlačítko *Next*.
7) Pro základní nastavení spektrofotometru potřebujete nyní „zhasnout“. To uděláte vložením černého hranolku, který je součástí příslušenství, do měřicí cely.
8) V následujícím dialogu klikněte na *tlačítko* se symbolem *zhasnuté žárovky*. Tím si uložíte tzv. „temné spektrum“.
9) Klikněte na tlačítko *Next*.
10) Nyní černý hranolek z měřicí cely vyjměte a klikněte na *tlačítko* se symbolem *rozsvícené žárovky*. Tím jste si uložili referenční spektrum vašeho světelného zdroje.
11) Klikněte na tlačítko *Finish*.
12) Nyní můžete začít proměřovat spektra extrahovaných barviv.

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tyto materiály vznikly v rámci OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost č. CZ.1.07/1.3.12/04.0020.

Vlastní měření a záznam dat

1) Do spektrofotometrické kyvety napipetujte vždy kolem 1 ml extraktu.
2) Vložte kyvetu do měřicí cely a proměřte absorpční spektrum.
3) Jakmile se zobrazené spektrum ustálí, klikněte na tlačítko s fotoaparátem. Tím si „zmrazíte“ změřené absorpční spektrum.
4) Na jednotlivé vrcholy (píky) postupně klikněte myší – tím umístíte „záměrný kříž“ a v pravém dolním rohu odečtěte hodnotu *vlnové délky* a *absorbance*. Tyto hodnoty zapište do tabulky v pracovním listu.
5) Promyjte kyvetu malým množstvím acetonu a postup opakujte s dalším vzorkem.

Analýza naměřených dat

Získaná absorpční maxima vašich extraktů porovnejte s referenčními spektry známých barviv, která najdete v rámci svého pracovního listu. Na základě srovnání těchto hodnot doplňte do tabulky, jaké barvivo bylo v tom kterém proužku pravděpodobně obsaženo.

Informační zdroje

- http://cs.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrie
- http://cs.wikipedia.org/wiki/TLC
- Lichtenthaler H.K.: *Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes*. Methods in Enzymology, 148, 350–382 (1987)
- Rodriguez-Amaya, Della B.: *A guide to carotenoid*. Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. ISBN 15-788-1072-8
- http://en.wikipedia.org/wiki/Photosynthetic_Pigments

evropský sociální fond v ČR | EVROPSKÁ UNIE | MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY | OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tyto materiály vznikly v rámci OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost č. CZ.1.07/1.3.12/04.0020.