

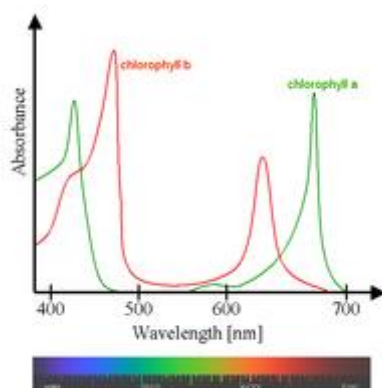
Ekstrakcja i rozdział barwników roślinnych-pomiar i analiza widm absorpcji UV-Vis

Cel ćwiczenia: Zapoznanie się z metodą analizy jakościowej oraz własnościami fizykochemicznymi barwników fotosyntetycznych (ocena właściwości chlorofili w zależności od środowiska (czynników stresowych)).

1. Wprowadzenie

Barwniki fotosyntetyczne (asymilacyjne) to barwne związki chemiczne odgrywające kluczową rolę w procesie fotosyntezy i nadające barwę liściom. Wszystkie organizmy fotosyntezujące posiadają barwniki odpowiedzialne za absorpcję światła. Różnią się one budową, zakresami światła widzialnego, które mogą pochłaniać, właściwościami i pełnionymi funkcjami. Wspólną ich cechą, pozwalającą na absorpcję promieniowania jest obecność w budowie układu wiązań sprzężonych. Skład oraz zawartość barwników zmienia się wraz z rozwojem rośliny oraz zależy od natężenia i widma światła oraz dostępności składników mineralnych. Wyróżnia się trzy grupy barwników: **chlorofile, karotenoidy i fikobiliny**. U roślin wyższych występują dwa, różniące się nieznacznie budową chlorofile, niebieskozielony chlorofil a i żółtozielony chlorofil b, przy czym ilość chlorofilu b jest 2-3 krotnie mniejsza niż chlorofilu a. Inne, jak chlorofile c i d występują jedynie u części glonów. Karotenoidy (żółtopomarańczowe barwniki pomocnicze) występują w ilościach 2-6 razy mniejszych niż chlorofile. W skład karotenoidów wchodzi głównie ksantofile (m.in. luteina, wiolaksantyna, neoksantyna) oraz karoteny (w tym β -karoten). Każdy organizm fotosyntezujący ma charakterystyczny zestaw barwników, przy czym u wszystkich obecny jest chlorofil a. Fikobiliny (fikoerytryna, fikocyjanina i allofikocyjanina) to dominujące barwniki pomocnicze u krasnorostów i sinic.

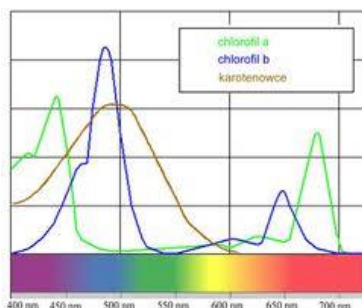
- **Chlorofile** - należą do barwników porfiryńowych. Zawierają cztery połączone ze sobą pierścienie pirolowe, które łączy centralnie ułożony atom Mg. Podstawowy układ jest podstawiony grupami metylowymi, etylowymi, etylenowymi lub resztami kwasu propionowego. Ponadto, chlorofile zawierają w pozycji 7, związany estrowo, fitol (alkohol), będący pochodną, izo-pentanolu. Ma on charakter hydrofobowy, dzięki czemu chlorofile łatwo rozpuszczają się w tłuszczach i rozpuszczalnikach tłuszczowych, zaś słabo - w wodzie. Chlorofile absorbują światło o długości fali poniżej 480 nm i pomiędzy 550-700 nm, stąd w widmie chlorofili, zarówno a i b, obecne są dwa maksyma absorpcji (Rys. 1). Maksima te, w zależności od użytego rozpuszczalnika, mogą się przesuwać w kierunku fal dłuższych lub krótszych. Niebieskozielony chlorofil a, absorbuje głównie światło fioletowe i czerwone, żółtozielony chlorofil b, absorbuje głównie światło niebieskie i pomarańczowe. Światło o długości fali pomiędzy 480 a 550 nm (zielone) jest odbijane, stąd obserwujemy zieloną barwę roślin.



Rys.1. Widmo absorpcyjne chlorofili.

Chlorofile są nietrwałe - uważane są za najmniej trwałe barwniki roślinne. Zniszczenie żywej tkanki roślinnej oraz struktury chlorofili (np. w wyniku ogrzewania, działania światła, tlenu, pH, kontaktu z rozpuszczalnikami, enzymami (np. chlorofilaza)) prowadzi do przemian chlorofili i zmiany barwy, przy czym produkty degradacji są różne. Przebieg przemian chlorofilu zależy w dużej mierze od pH środowiska. W środowisku kwaśnym (rozcieńczone kwasy) następuje zastąpienie jonu Mg przez dwa jony wodoru, w wyniku czego powstaje feofityna (brunatna/oliwkowozielona barwa). W silnie kwaśnym środowisku dochodzi do usunięcia jonu Mg oraz fitolu, w wyniku czego powstaje brunatny feoforbid. Feofityna tworzy się podczas ekstrakcji barwników pod wpływem endogennych kwasów organicznych, czemu zapobiega się dodając substancje neutralizujące. Niewielkie ilości feofityny występują zawsze w ekstraktach barwników roślinnych oraz w nieuszkodzonych komórkach roślinnych zdolnych do fotosyntezy tlenowej. Jej ilość rośnie z wiekiem organizmu. Stężenie feofityny może być także wskaźnikiem stopnia uszkodzenia roślin zielonych przez czynniki środowiskowe (światło, temperatura, zanieczyszczenia). W środowisku zasadowym następuje hydroliza wiązań estrowych powodując powstanie chlorofilin (barwa zielona); wzrasta również aktywność chlorofilazy w wyniku czego powstają chlorofilidy (barwa zielona). Chlorofile wykazują też zdolność do wymiany jonów Mg na jony metali dwuwartościowych. Przykładowo, obecność Cu(II) czy Zn(II) zwiększa stabilność zielonej barwy, z uwagi na tworzenie się trwałych kompleksów chlorofili z jonami Cu i Zn.

- **Karotenoidy** – należą do grupy tetraterpenów. Zbudowane są z ośmiu jednostek izoprenowych (40 atomów węgla). Absorbują energię świetlną w zakresie, w jakim nie mogą tego robić chlorofile. Karotenoidy występują w liściach, lecz ich żółto-pomarańczowa jest zwykle maskowana przez intensywną zieloną barwę chlorofilu. Widmo absorpcji chlorofilu a i b oraz karotenowców przedstawiono na Rys. 2.

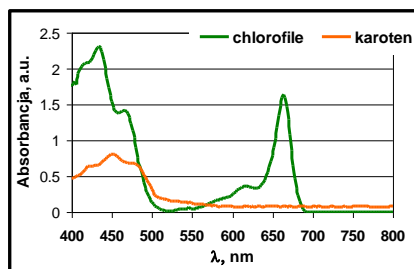


Rys.2. Widmo absorpcyjne chlorofilu i karotenowców.

W porównaniu do chlorofilu, barwniki te są dość trwałe (stabilne).

- Fikobiliny - wydajnie absorbują światło czerwone, pomarańczowe, żółte i zielone, czyli w zakresie długości fali częściowo nieabsorbowanym przez chlorofile.

Barwniki asymilacyjne źle rozpuszczają się w wodzie, stąd do ekstrakcji ich stosuje się rozpuszczalniki organiczne (np. etanol, eter, aceton). Ze względu na charakter budowy i długość łańcuchów węglowych w cząsteczce różnią się one w znaczny sposób polarnością, dzięki czemu możliwe jest rozdzielanie ich w układzie różniących się polarnością rozpuszczalników za pomocą chromatografii cienkowarstwowej, bądź selektywnej ekstrakcji. Z kolei, z uwagi na wysokie molowe współczynniki absorpcji chlorofilu i karotenowców, do ilościowego ich oznaczenia wykorzystuje się metody spektrofotometryczne. Przykładowe widmo barwników wyekstrahowanych z liści lipy przedstawiono na Rys. 3.



Rys.3. Widmo po rozdziale chromatograficznym chlorofili i karotenu w ekstrakcie etanolem otrzymanym z liści lipy.

2. Wykonanie ćwiczenia

Uwaga!: Ze względu na pracę z rozpuszczalnikami organicznymi podczas wykonywania ćwiczeń należy zachować szczególną ostrożność.

Materiał roślinny (liście) pociąć na małe fragmenty. Odważyć około 0,25 g przenieść do suchego moździerza porcelanowego i dodać 2-3 cm³ eteru naftowego. Rozcierać energicznie tłuczkiem. Eterowy ekstrakt przelać do czystej zlewki (zostawić do dalszej analizy). Dodać kolejną porcję eteru i dalej rozcierać. Czynność powtórzyć kilkakrotnie (do zaniku żółtego zabarwienia ekstraktu). Do pozostałości w moździerzu dodawać po 2-3 cm³ etanolu, rozcierać tłuczkiem i zawieszinę alkoholową przesączyć (miękki sączek) do pojemniczka polietylowego. Porcją 2-3 cm³ etanolu przemyć moździerz i tłuczek, przenosząc popłuczyny do pojemniczka. Na koniec, dodać tyle etanolu by suma roztworu zawarta w pojemniczku wynosiła 15 cm³. Pojemniczek zakręcić i wymieszać zawartość. Otrzymany ekstrakt chlorofilowy rozdzielić równomiernie (2 cm³) do sześciu ponumerowanych probówek (0-5). Do pierwszej (0) dodać 2 cm³ etanolu (próbka odniesienia). Do pozostałych pięciu dodać (2 cm³) nieznanymi roztworami z pojemniczków (1-5). **Porównać barwy roztworów w poszczególnych probówkach z barwą pierwotnego ekstraktu (próbka odniesienia).** Zarejestrować widma absorpcji (400-700 nm) ekstraktów z probówek. **Wyznaczyć położenia maksimów absorpcji. Zinterpretować wynik i na tej podstawie oraz wiedząc, że dodawanymi roztworami są: woda, mocna zasada, mocny kwas oraz dwie różne sole cynku przypisać je pod konkretne numery (1-5).** Wyciągnąć wnioski (wpływ środowiska na trwałość chlorofili). Dodatkowo zarejestrować i zinterpretować widmo ekstraktu z wyizolowanymi na etapie ekstrakcji karotenoidami.

3. Sprawozdanie

Sprawozdanie powinno zawierać:

- cel ćwiczenia i bardzo krótki opis stosowanej metody oznaczenia oraz opis przygotowania próbki do pomiaru
- identyfikację wyizolowanych z materiału roślinnego barwników asymilacyjnych
- analizę widm absorpcyjnych, tj. opisane pasma absorpcji charakterystyczne dla barwników roślinnych wraz z interpretacją
- ocenę właściwości chlorofili (wpływ czynników stresowych na ich trwałość)

Zagadnienia do kartkówki:

- barwniki asymilacyjne, właściwości fizyko-chemiczne; izolacja barwników z materiału roślinnego
- zasada oznaczeń spektrofotometrycznych
- widmo absorpcyjne, interpretacja widm

Literatura:

- Leo M.L. Nollet, Handbook of Food Analysis, Second Edition, Volume 1: Physical Characterization and Nutrient Analysis, Marcel Dekker, Inc., USA 2004.
- P. Kafarski, P. Wieczorek, skrypt: „Ćwiczenia laboratoryjne z chemii bioorganicznej” 1997.
- A. Cygański, Metody spektroskopowe w chemii analitycznej, WNT, Warszawa 1997.
- Z. Marczenko, M. Balcerzak, Spektrofotometryczne metody w analizie nieorganicznej, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
- Z.S. Szmaj, T. Lipec, Chemia analityczna z elementami analiz instrumentalnej, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1996

OPRACOWANIE WYNIKÓW (propozycja rozwiązania)

Właściwości chlorofili

Nr próbówki	Barwa (ekstrakt+ r-r)	Maksima absorpcji	Dodany roztwór
0 (kontrolna)			
1			
2			
3			
4			
5			

ZAŁĄCZNIK

Tabela 1 Maksima absorpcji w acetonie podstawowych barwników

Barwnik	Maksima absorpcji [nm]		A ₁ /A ₂
	λ ₁	λ ₂	
chlorofil a	430	662	1.22
chlorofil b	456	645	2.81
feofityna a	418	653	4.25
β-karoten	450	477	—
luteina	447	475	—
wiolaksantyna	442	473	—