

Studium rostlinných barviv

pracovní návod s metodickým
komentářem pro učitele
připravil T. Feltl

chemie

19

úloha číslo

Cíle

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

Podrobnější rozbor cílů

- Zvládnout extrakci směsi rostlinných barviv z listů.
- Seznámit se s tenkovrstevnou chromatografií (TLC) jako metodou účinné separace látek.
- Opětovná extrakce barviv z chromatografické desky.
- Proměření absorpčních spekter jednotlivých extraktů.
- Identifikace obsažených barviv na základě srovnání s referenčními spektry.

Zadání úlohy

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

Technická úskalí, tipy a triky

Provedení celé úlohy je časově poměrně náročné. Pokud nemáte dostatek času, je možné úlohu ukončit po vlastním chromatografickém oddělení barviv, které jasně prokazuje přítomnost několika různých barviv v listech. V takovém případě není potřebný spektrofotometr a celá úloha je proveditelná jen se základním laboratorním vybavením.

Pro identifikaci barviv v získaných extraktech je třeba spektrofotometr schopný změřit absorpční spektrum v určitém rozsahu vlnových délek (ideálně i v UV oblasti). Použitý spektrofotometr PASCO Amadeus umožňuje získat absorpční spektrum zhruba od 350 do 800 nm. V oblasti kratších vlnových délek, tj. pod 450 nm, je při standardním nastavení vinou použitého světelného zdroje již značný šum. Pokud chceme šum úspěšně eliminovat, je velice kritické nastavení spektrofotometru před vlastním měřením.

Zařazení do výuky

Experiment je vhodné zařadit především v rámci učiva o fotosyntéze. Úloha najde své uplatnění také v oblasti analytické chemie (tenkovrstevná rozdělovací chromatografie) či organické chemie (polarita látek a jejich rozpustnost v různých rozpouštědlech). Úloha je použitelná také jako motivační v rámci témat se vztahem k principu barevnosti látek a problematiky organických barviv. ZŠ: demonstrace; SŠ: lab. cvičení, demonstrace

Časová náročnost

Dvě vyučovací hodiny (2 × 45 min).

Náročnost experimentů

Z hlediska použité metody – spektrofotometrie – je vhodné předem absolvovat některou ze základních spektrofotometrických úloh, např. úlohu č. 14 (Kolik železa spolýkáme).

Vhodné je také předem zařadit cvičení (demonstraci) č. 15 (Barevnost látek kolem nás a její změny v průběhu chemické reakce).

Mezipředmětové vztahy

biologie (metabolismus rostlin a fotosyntéza, rostlinná morfologie)

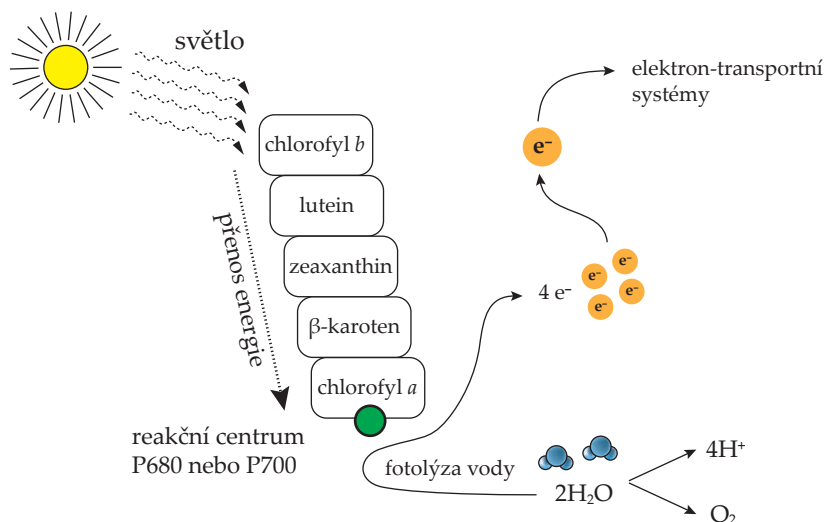
Pomůcky

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, stříčka s destilovanou vodou, jemný písek (mletý oxid křemičitý), nůžky, Silufol, alobal, chemikálie (dest. voda, CaCO₃, aceton, benzin, propan-2-ol), biologický materiál – listy břečťanu, popisovač (lihový fix), pracovní návod, pracovní list

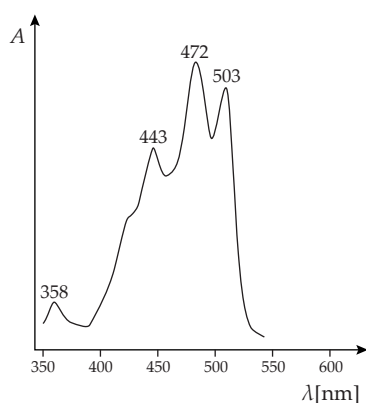
Teoretický úvod

Rostliny obsahují celou řadu zajímavých chemických sloučenin. Jednou ze skupin těchto látek jsou **rostlinná barviva**. Jedná se o organické látky, jejichž **struktura i funkce** 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.



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



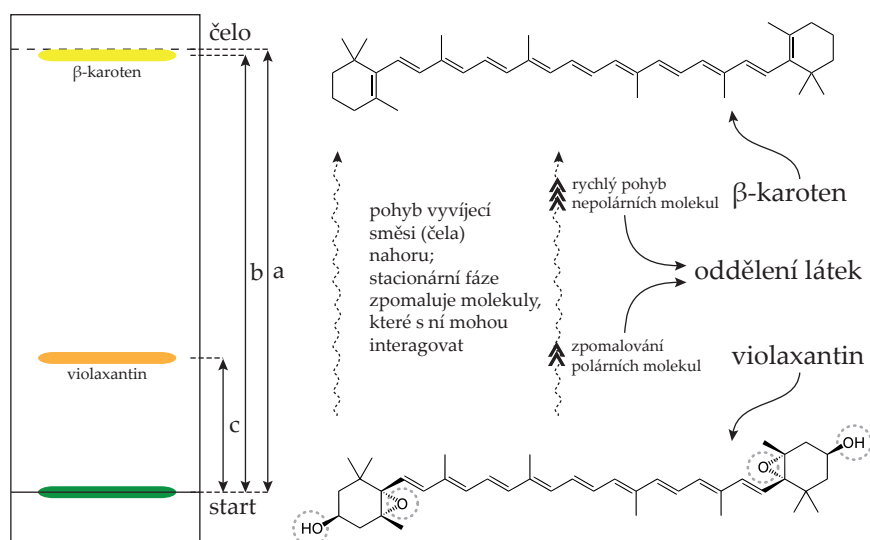
Obr. 2: Absorpční spektrum rostlinného barviva lykopenu

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.

K oddělení barviv využijeme tenkovrstevnou chromatografii – **TLC** (z anglického Thin Layer Chromatography – **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**. Nepochárny 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.

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.



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

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

kde a je vzdálenost čela od startu a b je vzdálenost té které konkrétní skvrny od startu (jak je schématicky 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.

Motivace

Na úvod můžeme provést jednoduchý „fyzikální“ experiment. Připravíme si malé kolečko z tvrdého papíru (cca 5 cm v průměru) a rozdělíme ho na čtvrtiny. Potom necháme žáky vybarvit jednotlivé čtvrtiny různými barvami (nejlépe fixkami – zelená, žlutá, modrá, červená). Potom propíchneme středem kolečka tužku a zeptáme se žáků, co se stane, když kolečko roztočíme. Poté experiment provedeme. Pohyb vede ke složení původních barev do barvy nové. Nyní začíná naše detektivní pátrání... Zeptáme se, z kolika a z jakých barev je asi složená listová zeleň. Nebo je to skutečně jen jedna zelená barva? Návrhy jednotlivých pracovních skupin můžeme zaznamenat a na závěr cvičení vyhodnotit.

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.

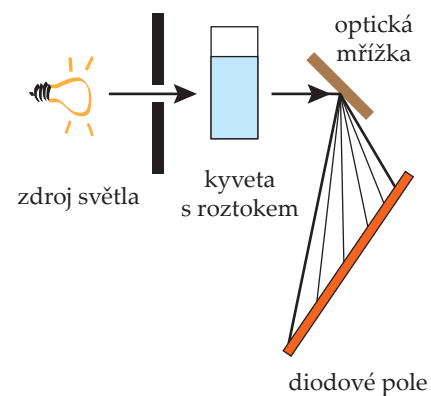
aceton (F, Xi, R 11-36-66-67, S 9-16-26)

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)

Diodové pole?

Spektrofotometr Amadeus disponuje detektorem typu diodového pole (diode array). Tím je umožněno současné sledování absorpance v rozsahu vlnových délek zhruba od 350 do 800 nm. Princip tohoto detektoru je na následujícím obrázku.



Videonávod

K této úloze je na adrese www.expoz.cz dostupný videonávod.

Vysoce hořlavé látky

Pozor! V úloze se pracuje s organickými rozpouštědly, která jsou klasifikována jako vysoce hořlavá (F+).

Pozor na světlovodiče

Při použití světlovodného kabelu je třeba dbát na ochranu jeho koncových částí i šroubovacích míst pro napojení na spektrofotometru a na měřicí cele (k ochraně slouží gumové čepičky).



Obr. 4: Připravené pomůcky

Úskalí homogenizace

Některá barviva se výrazně rychleji rozkládají v kyselém prostředí. Protože chceme tento rozklad minimalizovat, přidáváme již v průběhu homogenizace a extrakce uhličitan vápenatý.

Stabilita extraktu

Pokud nebudeme extrakt ihned používat, je vhodné obalit nádobku s ním alobalem, a tak zabránit přístupu světla. Pokud máme v laboratoři lednici, je dobré do ní extrakt dočasně uložit. Zpomalíme tak nechtěný rozklad extrahovaných barviv.

Příprava úlohy

Pro provedení tohoto experimentu je třeba zajistit dostatek biologického materiálu. Je vhodné, aby alespoň jedna skupina žáků donesla 10 břechtanových listů. Takové množství materiálu postačí pro několik pracovních skupin. Pokud má postup homogenizace a extrakce absolvovat každá skupina, je vhodné množství zpracovávaných listů, a tím pádem i extrakčních činidel, podělit mezi jednotlivé skupiny. V našem postupu je uvedeno typické celkové zpracovávané množství pro pět pracovních skupin.

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

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 μ l 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 břechtanových 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 započítím 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, tentokrát 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 odstříhnete 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**
- 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!*)
 - Po nanesení vzorku rychle vložte desku do vyvíjecí komory. Komoru pečlivě uzavřete.
 - 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.
 - 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, zanepte do připravené tabulky.
- 5) **Rozstříhání fólie a extrakce rozdělených barviv**
- Rozstříhejte desku na proužky tak, abyste jednotlivé barevné skvrny pokud možno zcela oddělili.
 - Proužky vložte do připravených zkumavek a přidejte do každé 2 ml acetonu.
 - 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.)
- 7) **Identifikace rozdělených barviv**
(Tato část je popsána v následující kapitole Analýza naměřených dat.)

Nastavení HW a SW

- K vašemu počítači (netbooku) připojte USB kabel (konektor A) dodávaný se spektrofotometrem Amadeus. Druhý konec kabelu připojte ke spektrofotometru (konektor B).
 - Dále propojte světlovodičem analyzátor se zdrojem s měřicí celou. Dbejte na to, abyste propojovací místa neznečistili.
 - 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.

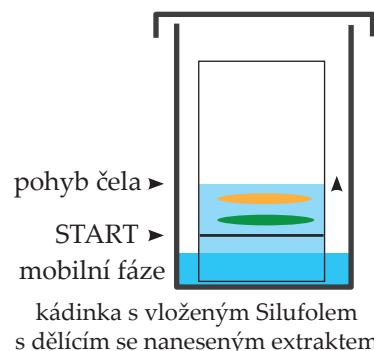
Příprava měření

- Na počítači spusťte program Quantum.
- Klikněte na tlačítko s písmenem A, budete měřit absorpční spektrum.
- Automaticky se spustí průvodce nastavením měření.
- V dialogu *Integration time* klikněte na tlačítko *Set Automatically*.
- Hodnotu *Pixel Smoothing* nastavte na 3, hodnotu *Average Scans* na 30.
- Klikněte na tlačítko *Next*.

Pěkný chromatogram

Pokud chcete docílit pěkných pravidelných proužků, není vhodné nanášet extrakt až do krajů desky. Pomoci si také můžete filtračním papírem, který postavíte ke stěně naproti vaší budoucí Silufolové desce ihned v závěru kroku č. 1. Komora tak bude lépe nasycena parami vyvíjecí směsi a dělení bude pravidelnější.

Průběh TLC ve vyvíjecí komoře



Obr. 5: Zapojený spektrofotometr

Nastavení spektrofotometru

Vyšší hodnota *Average Scans* má význam především pro snížení nežádoucího šumu v oblasti vlnových délek mezi 350–450 nm. A zrovna tuto oblast při studiu našich rozdělených rostlinných barviv potřebujeme nejvíce.

Nezhasínejte žárovku

Není vhodné odpojovat elektrický zdroj. Nejen že tím snižujete životnost žárovky, ale po zapnutí vždy nějakou dobu trvá, než se výkon žárovky ustálí.

Ukládání spekter

Pokud si chcete jednotlivá spektra zachovat pro pozdější analýzu, použijte tlačítko s disketou. Ukládá se vždy jen aktuální spektrum zachycené posledním stiskem tlačítka s fotoaparátem. Alternativním způsobem přímého exportu dat je využití tlačítka se dvěma sloupci (první zprava), kterým data zkopírujete do schránky a následně je musíte vložit do tabulkového kalkulátoru (např. MS Excelu).

Hodnocení výsledků

Popsaným postupem je možné na běžném Silikagelu získat nad linií startu 6 až 7 proužků. Identifikace nemusí být vždy zcela jednoznačná, a to především v „zelené“ oblasti, kde najdeme nejenom feofytin, chlorofyl *a* a chlorofyl *b*, ale v závislosti na postupu i některé rozkladné produkty. V případě violaxantinu a neoxantinu je možné demonstrovat jejich odlišení na základě změny barvy po vystavení parám HCl. První jmenovaný zmodrá, druhý pak ze zelené – principem je reakce epoxidicky vázaného kyslíku (viz vzorec v pracovním listu).

Syntéza a závěr

Na závěr je vhodné žákům shrnout:

- Co je to extrakce a jak souvisí s rozpustností látek (polarita látek a polarita rozpouštědla).
- Princip tenkovrstevné rozdělovací chromatografie (TLC).
- Zjistili jsme, že zelené listy obsahují celou řadu různých barviv. Tato barviva jsou nejen zelená, ale také například žlutá a oranžová. Složením všech barev dohromady vzniká typická zelená barva listů břechťanu.
- *Jak souvisí barevnost látky s jejím absorpčním spektrem.*
- Na základě porovnání absorpčních spekter bylo možné identifikovat konkrétní barviva ve všech, nebo alespoň ve většině, získaných proužcích.

- 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.

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 odečtete 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.

Hodnocení práce žáků

- Nastudovali si žáci teorii předem?
- Sestavili a použili žáci dělicí a měřicí aparaturu správně?
- Postupovali žáci korektně podle pracovního návodu?
- Vypracovali žáci správně své pracovní listy?
- Získali žáci předpokládané výsledky?
- Interpretovali žáci výsledky správně?
- Shrnuli žáci nové poznatky v závěru?

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