EXTRAKCE, CHROMATOGRAFICKÉ DĚLENÍ (C18, TLC) A STANOVENÍ LISTOVÝCH BARVIV

LISTOVÁ BARVIVA A JEJICH FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM

Listová barviva jsou fotosynteticky aktivní pigmenty nacházející se v plastidech (chloro- a chromoplastech). Rozlišují se na **chlorofyly**, **karotenoidy** resp. fykobiliny. Jejich zásadní fyziologický význam spočívá v konverzi světelného záření ne energii chemických vazeb, neboť jenom listová barviva mají možnost absorbce elektromagnetického záření viditelné části spektra za současného spuštění kaskády biofyzikálních a biochemických dějů v tzv. fotosystémech.

Fotosystémy se nacházejí v thylakoidech a jsou to supramolekulární pigmento-proteinové komplexy složené z jádra a světlosběrného systému. Jejich organizace je vícestupňová a funkčně uzpůsobená složitosti fotochemických dějů vlastní fotosyntézy. Zajišťují účinný přenos absorbovaných kvant do reakčních center v nichž dochází k oxidačně redukčním reakcím. Rozlišujeme fotosystém I (PSI), který redukuje $NADP^+$ a fotosystém II (PSII), který se podílí na fotolýze vody.

Význam karotenoidů spočívá v ochraně fotosyntetického aparátu před irreverzibilní fotooxidací, zvláště při nadměrné ozářenosti. Barviva ze skupiny xantofylů vyvolávají tzv. **fotoinhibici** fotosyntézy prostřednictvím konverze světelné energie na tepelnou a jejím výdejem do prostředí.

BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI LISTOVÝCH BARVIV

Listová barviva jsou barviva **lipochromní**ho typu, tj. jsou rozpustná v tucích, neboť jsou vázána svým výskytem na membránové struktury lipoidního charakteru. Chlorofyly a fykobiliny vytvářejí velké molekuly obsahující dusík, karotenoidy neobsahují dusík, rozlišujeme je na karoteny (uhlovodíky) a xantofyly (kyslíkaté deriváty karotenů).

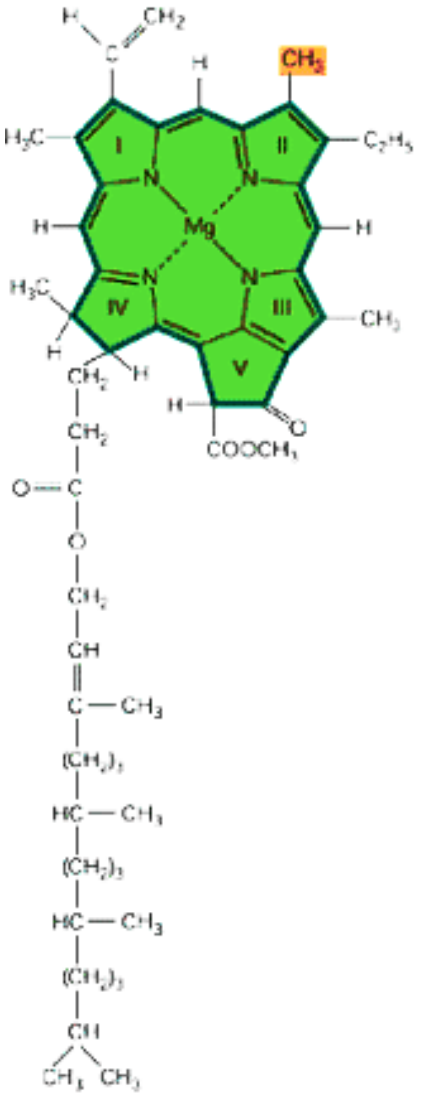
Chlorofyly jsou tvořeny porfyrinem (tetrapyrolové jádro) s komplexně vázaným kationtem hořčíku Mg^{II+}. IV pyrolový kruh nese nasycený alifatický alkohol fytol, který je vlastním nositelem lipofilních vlastností molekuly chlorofylu. Chlorofyly jsou zelená barviva. Snadno podléhají kyselé hydrolýze (degradace na feofytin), izolované jsou fotolabilní. Rozlišujeme jich několik typů, přičemž nejvíce jsou zastoupeny chlorofyl "*a*" a chlorofyl "*b*". U heliofytů převládá množství chlorofylu *a* nad chlorofylem *b*, zatímco sciofilní rostliny mají tento poměr obrácený. (Pro zajímavost sumární vzorec

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

chlorofylu *a* $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ byl určen Willstätterem, který za tento objev dostal roku 1915 Nobelovu cenu).

Karotenoidy jsou izoprenoidní sloučeniny s cca 40 atomy uhlíku. Z karotenů se nejčastěji vyskytuje *b*-karoten ($C_{40}H_{56}$)a lykopen, z xantofylů violaxantin, xantoxin a zeaxantin a lutein. Jsou to barviva žlutá, oranžová až červenohnědá. Převládají nad chlorofyly v četných květech a plodech. *b*-karoten se vyskytuje v kořeni mrkve. Snadno podléhají oxidaci. Produkty oxidace karotenoidů jsou bezbarvé látky.

Strukturní vzorce chlorofylu „a“ a b-karotenu



porfyrinový kruh chlorofylu

fytol



β-karoten

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

ANALYTICKÉ STANOVENÍ LISTOVÝCH BARVIV

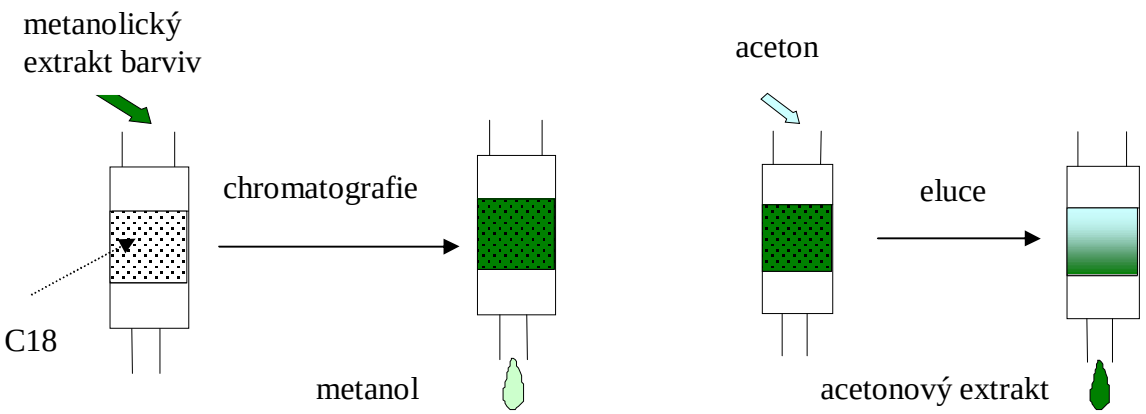
Lipofilní vlastnosti listových barviv umožňují jejich vlastní extrakci z rostlinného materiálu pomocí organických rozpouštědel. Nejčastěji se používá aceton. Účinnost extrakce zvyšuje dokonalá homogenizace (v tekutém dusíku nebo použití jemnozrnného křemenného písku) za současné neutalizace extraktu hořečnatými či vápenatými ionty. V kyselém prostředí (tedy bez neutralizace) dochází k odštěpení kationtu hořčíku z molekuly chlorofylu a k malé sterické změně porfyrinového kruhu a současně s tím ke změně zabarvení dohněda. Z chlorofylu pak vzniká feofytin. Karotenoidy a xanthofyly jsou stabilnější, bvysytují se však v rostlinných pletivech v menších koncentracích. Homogenát je možno filtrovat či centrifugovat pro oddělení vysokomolekulárních látek. Po tomto kroku musí být předčištěný extrakt pro další práci (TLC, C18-separace a spektrofotometrie) čirý. Následujícím krokem je chromatografické rozdělení jednotlivých barviv a stanovení jejich obsahu spektrofotometricky.

Vhodnou preparační chromatografickou metodou je TLC – chromatografie na tenké vrstvě. Existují soustavy TLC využívající různé mobilní směsi z organických rozpouštědel (benzen, benzín, toluen, chloroform, alkoholy, petroleter aj.). Tento typ chromatografie je snadný, rychlý a finančně nenáročný. Finančně náročná je HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie), která je však velmi přesná včetně možnosti finální kvantifikace. Nejčastěji se však používá pro stanovení xanthofylů.

PRINCIP C-18 SEPARACE A TLC CHROMATOGRAFIE

C-18 separace je efektivní chromatografická rozdělovací metoda (adsorbční chromatografie). Pomocí chromatografických patronek Separon (C18 sep-pak), které obsahují silikagel s nasycenými C18 uhlovodíky je možno z metanolického extraktu zachytit listová barviva a ty pak následně eluovat nepolárním rozpouštědlem (např. acetonem). Uplatňuje se zde interakce polárního extrakčního činidla s hydrofobními barvivy s velkými molekulami, které jsou zachyceny na hydrofobní stacionární C18 fázi. Při následné eluci jsou barviva i vhodně zakoncentrována.

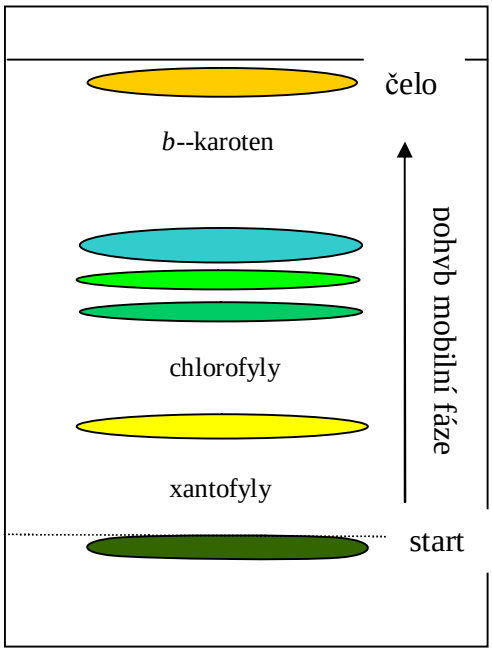
Schéma použití C18 Sep-pak kolonek k extrakci listových barviv



PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Tenkovrstevná chromatografie (TLC) je rozdělovací adsorpční metoda. Používá se k rozdělení směsi listových barviv z extraktu, neboť směs fotosyntetických pigmentů je pro svou složitost nevhodná pro přímou spektrofotometrii. Pro TLC listových barviv lze použít tenkou vrstvu *Silufol* (komerčně dodávaná hliníková deska se silikagelem, různé rozměry) a vyvíjecí směs (mobilní fáze) benzin : izopropanol : H_2O = 100 : 10 : 0,25. Extrakt se směsí barviv se nanese skleněnou kapilárou na pomyslný start na chromatografické desce (cca 1 ml extraktu). Po zaschnutí startu se deska vloží v kolmé poloze do chromatografické komory s mobilní fází.

Na základě fyzikálně-chemických interakcí jednotlivých barviv s mobilní a stacionární fází dochází k jejich unášení vzhůru po desce. Finální poloha barviv odpovídá hodnotě R_f, což je poměr vzdálenosti středu chromatografické skvrny od startu ke vzdálenosti čela mobilní fáze od startu.



$$R_f = \frac{\text{vzdálenost START – ROZDĚLENÁ LÁTKA}}{\text{vzdálenost START - ČELO}}$$

SPEKTROFOTOMETRIE LISTOVÝCH BARVIV

Spektrofotometrie jednotlivých listových barviv je vhodná kvantitativní metoda absorpční analýzy fotosyntetických pigmentů. Principem metody je měření tzv. absorbance (A), která vyjadřuje absorpci monochromatického záření při jeho průchodu absorpční vrstvou (tj. skleněnou kyvetou s extraktem či eluovaným barvivem). Absorpce se zvyšuje se zvyšujícím se obsahem absorbujícího prostředí. Naměřené hodnoty absorbance se pak dosazují do vztahů pro výpočty koncentrací jednotlivých barviv.

monochromatická záření pro měření:	vhodné eluenty:
chlorofyl *a* …..…..663 nm	aceton
chlorofyl *b* ……645 nm	aceton
b-karoten ……..447 nm	aceton
karotenoidy ……...435, 441, 445 nm	etanol

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Koncentrace jednotlivých barviv se pak vypočítají (mg . l^{-1}):

$c_a=12,7.A_{663} - 2,69.A_{645}$	pro chlorofyl *a*
$c_b=22,9.A_{645} - 4,68.A_{663}$	pro chlorofyl *b*
$c_k= 4,968.A_{440} - 0,268. (c_a + c_b)$	pro karotenoidy

Praktické provedení úlohy

1. Cíl praktické úlohy

Cílem úlohy je pomocí C18 separace a TLC rozdělit směs listových barviv s eventuální následnou kvantifikací pomocí spektrofotometrie. Dalším cílem je provedení dvěma různými způsoby izolace směsi barviv a srovnání těchto způsobů po kvantifikaci jednotlivých barviv (chlorofyl „a“ i „b“, a β-karoten) v průběhu jednotlivých kroků stanovení.

2. Pracovní postup

1. budou provedeny 2 způsoby extrakce směsi barviv (postup A, postup B)
2. provedení TLC separace (složení mobilní fáze – viz výše v textu)
3. eluce jednotlivých barviv a spektrofotometrie

1. extrakce barviv – postup A

1. homogenizovat 0,25 g čerstvé hmotnosti listů – rozstříhané na nudličky (přidat na špičku nože $CaCO_3$ a mořský písek) na kašičku v acetonu (8 ml)
2. extrakt filtrovat přes sintr do skleněné zkumavky

– postup B

1. homogenizovat 0,25 g čerstvé hmotnosti listů (přidat na špičku nože $CaCO_3$) na prach pomocí tekutého dusíku (vychlazená třecí miska i palička), přidat 10 ml metanolu a rozetřít
2. extrakt slít do skleněné zkumavky, zkumavky vyvážit
3. centrifugovat 5 min
4. supernatant prokapat přes aktivovaný sep-pak (C18 kolona, viz schéma výše)
5. barviva zachycená na sep-paku eluovat 0,5 – 1 ml acetonu (zakoncentrování)

Vše je nutno provádět kvantitativně beze ztrát. Aktivace sep-paku se provádí předem prokapáním postupně 10 ml metanolu, pak 10 ml destilované vody a nakonec vysušením (protlačení vzduchu). S kolonkou se musí pracovat opatrně, vyvíjet jen nepatrný tlak (prokapávání vodou), aby se nerozpadla a nevysypal se sorbent. Na separaci barviv lze použít kolonku jen jednou (přesto se nevyhazují).

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

2. nanášení extraktů na TLC

Z důvodů kvantitativního hodnocení je potřeba si zaznamenat množství vynesené na TLC desku. Pro postup A se vynáší cca 1 ml acetonového extraktu, pro postup B celý eluát (či polovina). Extrakt se nanáší postupně s krátkými přestávkami pro odpaření rozpouštědla na pomyslný start tak, aby nedošlo k vyškrábnutí (porušení) silikagelu TLC desky. TLC deska se předem nijak nerýsuje, neoznačuje. Pomyslný start by měl být cca 2,5 cm od spodního okraje desky orientované tak, že se nanáší kolmo na směr linií na zadní (hladké) straně desky. Směs je možno vynášet tahem či jako kapičky buď plastovou špičkou na digitální pipety či skleněnou kapilárou jemné tloušťky. Maximální šířka startu pro směs cca 4 cm, nanášíme tak aby deska měla okraj cca 2 cm. Desky po nanesení necháme vyschnout a dáme do dělicí nádoby s mobilní fází (temná vyvíjecí kyveta) cca na 40 minut. Uzavřeme.

Po ukončení dělení necháme desky v digestoři cca 20 minut pro odvětrání mobilní fáze a dokonalé vysušení. Po té si zaznamenáme výsledky dělení pro výpočet R_f. Vrstvu silikagelu s barvivy seškrábneme, eluujeme do acetonu do mikrozkumavky. Centrifugujeme 5 minut pro měření supernatantu na spektrofotometru.

1. nanášet extrakt na TLC desku (špičkou či kapilárou)
2. „vyvíjet“ desku
3. vysušit desku, záznam hodnot pro R_f
4. odběr silikagelu s barvivy, rozpuštění v mikrozkumavce s acetonem 1 ml
5. centrifugace 5 minut

3. spektrofotometrie

! Zdroj záření spektrofotometru je nutno nejprve nahřát – cca 20 minut (tj. zapnout do sítě) a vzorky je v případě nutnosti potřeba ředit a přepočítávat na ředění. Pro měření v acetonu se používají výhradně skleněné kyvety. Oplach opět acetonem do odpadu, dosušení buničitou vatou. Uchopení kyvety za matnici, nerozbít !!!

1. nastavit příslušnou vlnovou délku
2. měření blanku – 1 ml acetonu
3. postupně proměřit všechny vzorky
4. výpočty dle vzorců uvedených výše

3. Hodnocení a výsledky

V protokolu budou zaznamenány hodnoty R_f pro jednotlivá barviva, měření absorbancí (včetně případných ředění), výpočty koncentrací barviv a přepočet obsahu barviva na 1 g čerstvé hmotnosti analyzovaného materiálu. Výpočty budou provedeny pro oba způsoby izolace směsi barviv. Mohou být přiloženy oskenované TLC desky. Protokol vypracuje každá dvojice studentů.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz