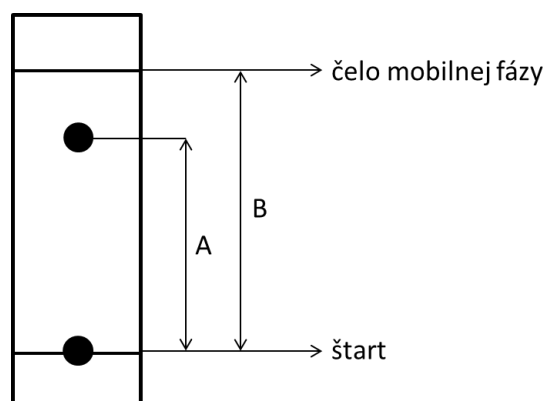


## Papierová chromatografia

### Teoretická časť

Listy rastlín obsahujú množstvo rozmanitých pigmentov. Delia sa na plastidové a vakuolové. Plastidové pigmenty sú chlorofyly a karotenoidy. Tieto pigmenty sú rozpustné v nepolárnych organických rozpúšťadlách, čo umožňuje ich pomerne jednoduchú extrakciu. Rastlinné pigmenty boli po prvý krát separované v roku 1903 ruským vedcom M. S. Cvetom, objaviteľom chromatografie. Princípom tejto metódy je adsorpcia a separácia zložiek zmesi medzi stacionárnou a mobilnou fázou. Zložky migrujú rôznou rýchlosťou na základe rozdielnej rozpustnosti v mobilnej fáze (rozpúšťadlo) a rozdielnej afinity k stacionárnej fáze, čo vedie k ich separácii.

V tomto laboratórnom cvičení použijeme na separáciu rastlinných pigmentov *papierovú chromatografiu*. Ako vyplýva z názvu, stacionárnou fázou je chromatografický papier (môže byť nahradený filtračným papierom). Mobilná fáza je rozpúšťadlo, poprípade zmes rozpúšťadiel, zvolená tak, aby sa dosiahla najúčinnejšia separácia. Táto fáza vplyvom kapilárnych síl postupne vzlína po papieri, na ktorom sú v jednej línii (tzv. štart) nanesené separovaná zmes a štandardy (t. j. zložky, ktoré v zmesi očakávame). Po určitom čase sa zmes rozdelí na zložky, ktoré sa nachádzajú v rôznej vzdialenosti od štartu (obr.1).



Obr. 5.1: Schematické znázornenie chromatogramu.

Jednotlivé zložky zmesi možno identifikovať na základe retardačného faktora  $R_f$ , ktorý je charakteristický pre každú separovanú zložku v závislosti od zvolenej mobilnej fázy. Definujeme ho ako pomer vzdialenosti  $A$  stredu škvŕny separovanej zložky od štartu k vzdialenosti  $B$  čela mobilnej fázy od štartu:

$$R_f = \frac{A}{B} \quad (5.1)$$

Môže nadobúdať hodnoty z intervalu  $\langle 0, 1 \rangle$ . Ak  $R_f = 0$ , zložka nemigruje a ostáva na štarte. Ak  $R_f = 1$ , tak zložka migruje s čelom mobilnej fázy.

Rozpúšťadlá používané v chromatografii zoraďujeme podľa rastúcej permitivity do *elutropického* radu: petroléter, izohexán, cyklohexán, tetrachlórmetán, benzén, chloroform, dietyléter, octan etylový, acetón, butanol, etanol, metanol, voda, kyselina octová, pyridín. Pri výbere činidla sa postupuje od stredu radu a postupne sa hľadá najvhodnejšie [1]. Ak sú separované zložky bezfarebné, chromatogram musíme najprv usušiť a potom nasprejovať príslušnou selektívne reagujúcou látkou, ktorá zložky zafarbí.

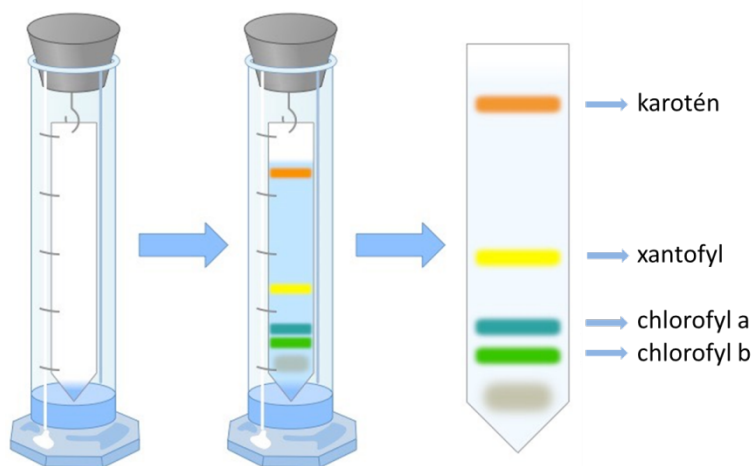
## Experimentálna časť

### Úloha

Separácia rastlinných pigmentov pomocou papierovej chromatografie.

### Opis zariadenia a metóda merania

Pri separácii rastlinných pigmentov metódou papierovej chromatografie sa využíva rozdielna pohyblivosť jednotlivých pigmentov (chlorofyl a, chlorofyl b, xantofyl, karotén). Malý objemu roztoku nanesieme na štartovaciu líniu chromatogramu, ktorý následne ponoríme do mobilnej fázy (správne zvolené rozpúšťadlo). Chromatogram necháme vyvíjať, až dovedy, kým čelo mobilnej fázy nedosiahne požadovanú vzdialenosť od štartu.



Obr. 5.2: Papierová chromatografia.

### Prístroje a pomôcky

Listy ľubovoľnej zelenej rastliny, porcelánová trecia miska, tĺčik, chromatografický/filtračný papier, nožnice, mikropipety, skúmavky, parafilm, kadičky.

## Chemikálie

Acetón, petroléter, benzín, benzén, etanol, destilovaná voda, chloroform

## Postup merania a vyhodnotenie

1. Extrakcia rastlinných pigmentov: listy nastrihajte do trecej misky, pridajte 2,5 ml acetónu a rozotrite. Po dôkladnej homogenizácii pridajte asi 7,5 ml acetónu. Zmes nechajte lúhovať 15 min. Homogenát následne prefiltrujte.
2. Chromatografický/filtračný papier nastrihajte. Rozmery prispôbte použitej skúmavke. Asi 1,5 cm od dolného okraja chromatografického/filtračného papiera ceruzkou naznačte štart.
3. Mikropipetou naneste na štartovaciu líniu vzorku rastlinného pigmentu v niekoľkých vrstvách (viac ako 6). Každú vrstvu nechajte zaschnúť a až potom nanášajte ďalšiu.
4. Do skúmaviek pripravte jednotlivé mobilné fázy s objemom cca 1 ml.
5. Ponorte chromatografické prúžky do skúmaviek s rozpúšťadlom, tak aby sa miesto so vzorkou neponorilo do mobilnej fázy. Skúmavku uzavrite, aby sa predišlo vyparovaniu rozpúšťadla.
6. Chromatografiu ukončíte, keď čelo rozpúšťadla dosiahne 2/3 papiera.
7. Ceruzkou zakreslite profil jednotlivých zložiek a čela mobilnej fázy. Odmerajte vzdialenosť stredu škvŕny separovanej zložky od štartu a vzdialenosť čela mobilnej fázy od štartu.
8. Vypočítajte hodnoty  $R_f$  a porovnajte jednotlivé výsledky s tabuľkovými hodnotami v závislosti od použitého rozpúšťadla. Identifikujte príslušné pigmenty.

## Literatúra

- [1] Šikurová, L., Špeciálne praktikum z biomedicínskej fyziky a biofyziky, FMFI UK, Bratislava 2008