

RAZDVAJANJE PIGMENATA HLOROPLASTA METODOM HROMATOGRAFIJE NA HARTIJI

Fotosintetički pigmenti su u kompleksu sa proteinima ugrađeni u tilakoidne membrane hloroplasta. Kod većine viših biljaka fotosintetički pigmenti se mogu podeliti na dve grupe, to su hlorofili i karotenoidi. Molekuli hlorofila imaju porfirinski prsten (ciklični tetrapirrol sa Mg jonom) za koji je estarski vezan dug ugljovodični lanac alkohola fitola, dok su molekuli karotenoida sačinjeni od takođe brojnih konjugovanih dvostrukih veza između C-atoma u lancu (izoprenoidi). Karotenoidi se dele na dve podgrupe: karotene i ksantofile. Karoteni su čisti ugljovodonici, od kojih je najrasprostranjeniji β -karoten, a zatim α -karoten, i narandžaste su boje. Ksantofili su oksidovani oblici karotena, a najrasprostranjeniji su lutein, fukoksantin, violaksantin, zeaksantin, i žute su boje. Nezasićene veze između C-atoma u molekulima hlorofila i karotenoida (C-C=C-C=C) daju ovim pigmentima optička svojstva. To su molekuli određene boje zavisno od toga koje talasne dužine iz vidljivog spektra apsorbuju, odnosno reflektuju. Osim toga, ovakva konfiguracija molekula ima za posledicu da oko molekula kruže brojni elektroni koji nisu čvrsto vezani za jezgra atoma i lako se prenose na akceptore nakon apsorpcije energije. Molekul hlorofila a jedini može svoje elektrone nakon ekscitacije predati nekom akceptoru koji nije fotosintetički pigment i zbog toga ima ulogu reakcionog centra u fotosistemima I i II. Ostali pigmenti (uključujući i hlorofil a) mogu prenositi ekscitirane elektrone (energiju ekscitacije) samo na druge molekule pigmenata i zbog toga imaju važnu funkciju "antena" sistema, odnosno dobavljača energije za ekscitaciju reakcionog centra. "Antena" sistem pigmenata obezbeđuje potpunije korišćenje svetlosne energije od strane fotosintetičkih organizama.

Zbog primarnog značaja u procesu fotosinteze, kvalitativna i kvantitativna analiza pigmenata se često radi u fiziološkim istraživanjima. Produkcija O_2 , asimilacija CO_2 , aktivnost pojedinih enzima i brojni drugi parametri, veoma često se izražavaju na količinu pojedinačnih ili ukupnih pigmenata.

Pre određivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava pigmenata potrebno je uraditi njihovu ekstrakciju. Fotosintetički pigmenti viših biljaka vrlo efikasno se mogu ekstrahovati u nepolarnim rastvaračima kao što su aceton, metanol, etanol i dr. Ovi rastvarači ne pokazuju selektivnu rastvorljivost pa ekstrakt predstavlja smesu svih pigmenata hloroplasta.

Hromatografija je analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje i izdvajanje pojedinačnih komponenti iz njihove smese. Hromatografsko izdvajanje pojedinačnih pigmenata iz njihove smese (ekstrakta) može se postići primenom papirne hromatografije. Ova tehnika omogućuje da se vizuelno detektuju pojedinačni pigmenti pošto se izdvajaju u prečišćenju formi u obliku različito obojenih zona na hartiji (hromatogram).

Hromatografija na hartiji spada u tip podeone hromatografije pošto se razdvajanje komponenta iz smese obavlja na osnovu njihove raspodele između dve faze koje se ne mešaju (polarna i nepolarna). Čvrsti nosač je u ovom slučaju hromatografska hartija koja je načinjena od celuloze, ima vrlo homogenu strukturu i može da sadrži i do 20% vode vezane vodoničnim vezama za celulozu. Dakle, pri hromatografskom razdvajanju pigmenata, tečna stacionarna faza je polarni rastvarač – voda u porama celuloznih vlakana hromatografske hartije, a tečna mobilna faza je nepolarni rastvarač (razvijač) i koji se ascendentno (uzlazno), zahvaljujući kapilarnim silama, kreće preko hromatografske hartije.

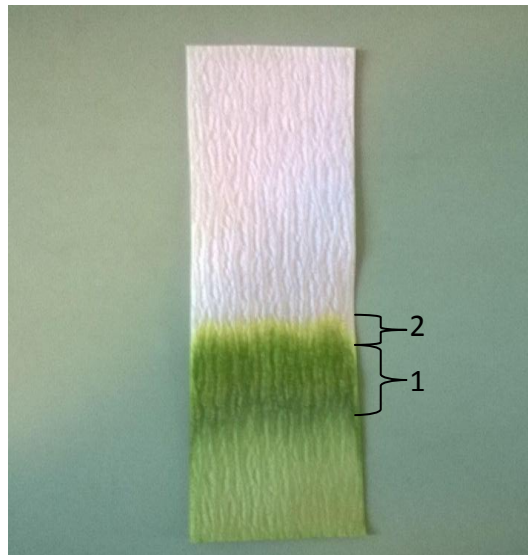
Materijal i pribor

- listovi biljaka
- avan sa tučkom
- makaze
- hromatografska hartija isečena u trake dimenzija 5x20 cm

- nepolarni rastvarač (aceton ili etanol)

Postupak

Uzorke listova iseckati sitno (izbegavajući glavni nerv), staviti u avan i macerirati tučkom. Maceriranje se vrši uz dodatak male količine rastvarača (do 10 ml). U macerat uroniti jedan kraj hromatografske hartije, postaviti je u vertikalni položaj, i sačekati 25 minuta da se razvije hromatogram. Rastvarač se kapilarnim silama kreće uz hromatografski papir (ascendentno), i nosi sa sobom rastvorene pigmente. Različite komponente iz smese koje je rastvarač poneo različito se rastvaraju u njemu i adsorbuju se na hromatografskom papiru u različitom stepenu: molekuli koji su više polarni po svojoj strukturi, slabije se rastvaraju u organskom rastvaraču i jače se adsorbuju, tako da u većoj meri zaostaju u obliku homogene zone. Osim polarnosti i molekulska masa značajno utiče na rastvorljivost molekula i njihovu adsorpciju: najteži molekuli iz smese obično najpre zaostaju i adsorbuju se pri dnu hromatografskog papira. Rezultat hromatografisanja je hromatogram: hromatografska hartija na kojoj se jasno uočavaju izdvojena polja pojedinačnih komponenti iz smese.



Izgled hromatograma: 1 – hlorofili (zelena traka); 2 – karotenoidi (žuta traka)