

RAZDVAJANJE PIGMENATA HLOROPLASTA METODOM HROMATOGRAFIJE NA HARTIJI

Kod većine viših biljaka fotosintetički pigmenti se mogu podeliti na dve grupe, to su **hlorofili i karotenoidi**. Zbog primarnog značaja u procesu fotosinteze, kvalitativna i kvantitativna analiza pigmenata se često vrši u fiziološkim istraživanjima. 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 smešu svih pigmenata hloroplasta.

Hromatografija je analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje i izdvajanje pojedinačnih komponenti iz njihove smeše. Postoje različiti tipovi hromatografije zavisno od fizičko-hemijskog procesa na kome se bazira razdvajanje (adsorpcija, izmenjivanje jona, raspodela između različitih faza i dr.), kao i različite tehnike (kolonska, tankoslojna).

Hromatografsko izdvajanje pojedinačnih pigmenata iz njihove smeše (ekstrakta) može se postići primenom **papirne hromatografije**. Ova tehnika omogućuje da se vizuelno detektuju pojedinačni pigmenti pošto se izdvajaju u prečišćenoj formi u obliku različito obojenih zona na hartiji (hromatogram).

Hromatografija na hartiji spada u tip podeone hromatografije pošto se razdvajanje komponenta iz smeše vrši 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 smeša nepolarnih rastvarača koja se nalazi u hromatografskoj koloni (razvijač) i koja se ascendentno (uzlazno), zahvaljujući kapilarnim silama, kreće preko hartije na koju je nanet uzorak.

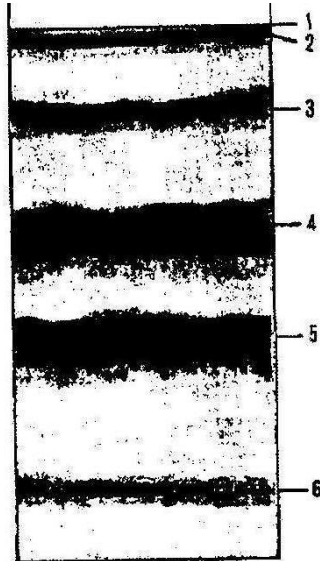
Materijal i pribor

- listovi različitih biljaka
- avan sa tučkom
- filter papir isečen u trake dimenzija 5x20 cm
- 100 % aceton

Postupak

Uzorke listova različitih biljnih vrsta iseckati sitno (izbegavajući glavni nerv), staviti u avan i macerirati tučkom. Maceriranje se vrši uz dodatak male količine apsolutnog acetona (do 10 ml). U avan uroniti kraj filter papira i sačekati nekoliko minuta. Nakon 10 minuta dolazi do hromatografisanja (razvijanja hromatograma) rastvarač se kapilarnim silama kreće uz hromatografski papir, dolazi do smeše pigmenata, rastvara ih i nosi sa sobom ascendentno. Različite komponente iz smeše koje je rastvarač poneo različito se rastvaraju u njemu i adsorbuju se na filter papiru u različitom stepenu: molekuli koji su više polarni po svojoj strukturi, slabije se rastvaraju u organskom rastvaraču i jače se adsorbuju na papiru, tako da brže zaostaju adsorbovani na papiru u obliku homogene zone. Rezultat hromatografisanja je **hromatogram**: filter papir na kome se jasno uočavaju izdvojena polja pojedinačnih komponenti iz smeše.

Na startnom mestu ostaju hlorofilidi (produkti razgradnje hlorofila), ispred njih, prema vrhu hromatografskog papira nalazi se zona žuto-zelene boje koja predstavlja hlorofil **b**, zatim sledi hlorofil **a** -plavo-zelene boje pa zona ksantofila - žute boje i na kraju, uz sam front rastvarača - zona karotena narandžaste boje.



Izgled hromatograma: 1- front rastvarača; 2- karoteni; 3- ksantofili;
4- hlorofil **a**; 5- hlorofil **b**; 6- startno mesto