

BIOLOGIA KOMÓRKI

LABORATORIUM NR 5

**ROZDZIAŁ BARWNIKÓW Z LIŚCI SZPINAKU I PIETRUSZKI
ZA POMOCĄ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ****CHLOROPLASTY**

Typowa komórka roślinna zawiera od 50 do 200 chloroplastów o owalnym kształcie i średnicy 5-10 μm . Chloroplasty występują przede wszystkim w miększu asymilacyjnym liści oraz w łodydze. Chloroplast zawiera trzy odrębne błony: błonę zewnętrzną, błonę wewnętrzną (zawierającą białka transportujące) oraz błonę tylakoidu. Tylakoidy są to struktury membranowe, zawierające barwniki fotosyntetyczne (chlorofil *a* i *b*) oraz barwniki pomocnicze (karoten i ksantofil). Pojedyncze tylakoidy są ze sobą połączone i wykazują tendencje do zespalania się, a tym samym do tworzenia gran. Przestrzeń w chloroplastie wypełnia stroma, która zawiera enzymy biorące udział w fotosyntezie (fazie ciemnej), cząsteczki kolistego DNA (zawiera kompletny genom chloroplastu) oraz rybosomy.

BARWNIKI FOTOSYNTETYCZNE

Najbardziej rozpowszechnionymi barwnikami roślinnymi są chlorofile. Występują one w liściach i zielonych częściach roślin. Cząsteczka chlorofilu zbudowana jest z 4-pierścieniowej pochodnej porfiryny, zwanej feoporfiryną, oraz reszty 20-węglowego alkoholu, dołączonej wiązaniem estrowym do reszty kwasu propionowego, która jest jednym z podstawników IV pierścienia pirolowego feoporfiryny. Fragmenty czterech połączonych pierścieni pirolowych tworzą układ naprzemiennie ułożonych wiązań pojedynczych i podwójnych. Układ taki nosi nazwę układu wiązań sprzężonych. Magnez jest połączony koordynacyjnie z atomami azotu pierścieni pirolowych. Hydrofobowy łańcuch fitolu nie uczestniczy w absorpcji światła, a jego funkcja polega na zakotwiczeniu i zapewnieniu odpowiedniej orientacji cząsteczki chlorofilu w błonie tylakoidów.

Wszystkie fotosyntetyzujące organizmy posiadają chlorofil *a*, który absorbuje światło czerwone o długości fali 680 nm i światło fioletowe o długości fali 440 nm. Chlorofil *b* najintensywniej absorbuje światło pomarańczowoczerwone i światło niebieskie.

Barwa chlorofilu *a* jest szaroniebieskawa, a chlorofilu *b* – niebieskozielona (natomiast chloroformowy oliwkowozielony ekstrakt liści, w świetle UV fluoryzuje wiśniowo!). Zielony kolor liści powstaje z nałożenia pozostałych barwników: karotenoidów (na chromatogramie są to plamy o największej wartości R_f) i ksantofilu, a czasem dodatkowo antocyjanów. Malownicze zmiany barwy liści jesienią powodowane są przez stopniowy zanik poszczególnych barwników (pierwszy zanika chlorofil). Różowa fluorescencja chlorofilu daje się obserwować dopiero po ekstrakcji lub innym uszkodzeniu komórek. Wykorzystywane jest to do lokalizacji obszarów Ziemi, na których szata roślinna jest uszkodzona mechanicznie lub biologicznie. Na zdjęciach satelitarnych takich miejsc wyraźnie widoczna jest fluorescencja chlorofilu.

W chloroplastach, obok chlorofilów występują również karotenoidy. Karotenoidy są pochodnymi izoprenu i dzielą się na:

- pomarańczowo-czerwone karoteny, zbudowane wyłącznie z węgla i wodoru,
- żółte i żółto-pomarańczowe ksantofile, zawierające także tlen (najczęściej są to grupy wodorotlenowe).

W większości karotenoidów występują dwa pierścienie połączone długim łańcuchem węglowodorowym, w którym na przemian występują wiązania pojedyncze i podwójne, tworzące układ wiązań sprzężonych. Podobnie jak w cząsteczce chlorofilu, układ ten umożliwia absorpcję światła. Dzięki innej budowie chemicznej karotenoidy absorbują światło w nieco odmiennym zakresie niż chlorofil. Ta właściwość karotenoidów ma istotne znaczenie dla ich funkcji. Mogą one absorbować światło w zakresie długości fali nie absorbowanym przez chlorofil i następnie przekazywać energię stanu wzbudzonego na cząsteczkę chlorofilu. Drugą istotną funkcją jest ich rola ochronna przed procesami fotooksydacji, na które narażone są głównie nienasycone kwasy tłuszczowe lipidów chloroplastowych.

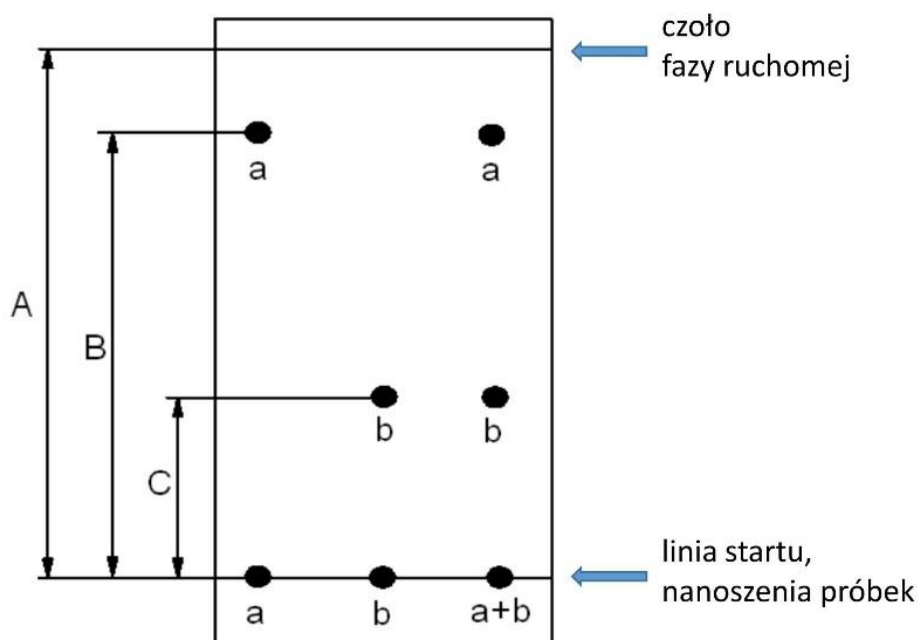
CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA

Fizykochemiczna metoda rozdzielania, w której rozdzielane składniki mieszaniny ulegają podziałowi ilościowemu pomiędzy dwie fazy (ruchomą i nieruchomą). Cząsteczki migrują w odpowiednio dobranym układzie chromatograficznym, który składa się z trzech elementów:

1. fazy ruchomej (eluent),
2. fazy stacjonarnej (adsorbent),
3. chromatografowana substancja (analit) zawierająca jedną lub wiele związków chemicznych.

Proces chromatografii to rozdział poprzez zetknięcie dwóch faz będących we względnym ruchu, przy maksymalnie rozwiniętej powierzchni kontaktu. Efekt zróżnicowania czasu migracji składnika mieszaniny w chromatografii związany jest z różnicą powinowactwa fizykochemicznego substancji do fazy nieruchomej i ruchomej. Jeżeli substancja wykazuje duży stopień powinowactwa do rozpuszczalnika – porusza się szybko, jeżeli zaś do fazy stacjonarnej – wolno. Substancja spędza bowiem więcej czasu w tej fazie, z którą pozostaje w większym kontakcie. Stężenie substancji w danej fazie zależy od tego powinowactwa.

Stosując polarne adsorbenty (np. żel krzemionkowy), jako fazy ruchome wykorzystuje się rozpuszczalniki niepolarne lub słabo polarne takie jak np. heksan, heptan, izooktan, chloroform. Poniżej przedstawiony jest schematyczny chromatogram TLC.



Podstawową wielkością, jaką wyznacza się z chromatografu TLC jest współczynnik retencji (opóźnienia, zatrzymania,) R_f (ang. *retardation factor*), definiowany jest jako stosunek drogi migracji substancji chromatografowanej od linii startu do środka plamki (B, C), do drogi przebytej przez czoło fazy ruchomej (A):

$$R_f = \frac{B(C)}{A}$$

Wartość współczynnika opóźnienia, R_f , charakteryzuje zachowanie się substancji chromatografowanej w danym układzie chromatograficznym i zależy od molekularnej struktury substancji chromatografowanej. W zależności od układu chromatograficznego wartość R_f substancji może przyjmować wartość z przedziału $0 \leq R_f \leq 1$:

- substancja bardzo silnie adsorbująca się w danym układzie, zostając na linii startu, osiąga wartość $R_f = 0$,
- substancja bardzo słabo absorbująca się w danym układzie (minimalna adsorpcja), wędrując z czołem fazy ruchomej, osiąga wartość $R_f = 1$.

ROZDZIAŁ BARWNIKÓW LIŚCI SZPINAKU I PIETRUSZKI ZA POMOCĄ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

WYKONANIE:

1. Pobrać niewielką ilość mrożonych liści szpinaku i pietruszki.
2. Umieścić je w moździerzu i dodać niewielką ilość chloroformu.
3. Próbkę ucierać w moździerzu do uzyskania chloroformowego ekstraktu liści.
4. Na płytce chromatograficznej zaznaczyć ołówkiem linię startu w odległości 2 cm od brzegu. Na niej w równych odstępach nanieść po 20 μ l ekstraktu z liści szpinaku i pietruszki (punkty startowe powinny znajdować się w odległości, co najmniej 1 cm od siebie).
5. Płytke chromatograficzną z naniesionymi próbkami umieścić w komorze chromatograficznej. Dochodzi do kontaktu rozpuszczalnika z brzegiem warstwy adsorbentu.
6. Komorę przykryć płytką, która zapobiega parowaniu rozpuszczalnika na zewnątrz. Rozwijanie chromatogramu zakończyć, gdy front rozpuszczalnika dochodzi do przeciwległego brzegu płytki. Barwniki od linii startu będą ułożone w następujący sposób: ksantofile, chlorofil b, chlorofil a, β -karoten.
7. Przeanalizować otrzymany chromatogram.

SPRAWOZDANIE

W sprawozdaniu powinny znaleźć się:

1. Strona tytułowa - tytuł ćwiczenia, data, nr grupy, osoby wykonujące ćwiczenie;
2. Wstęp teoretyczny (maksymalnie 1 strona);
3. Wykonanie ćwiczenia;
4. Wyniki – zdjęcie płytki, obliczenie współczynnika retencji;
5. Wnioski – omówić uzyskane wyniki.

Sprawozdanie należy przysłać w formacie ***pdf**. Temat maila oraz nazwa pliku powinny brzmieć: **L1 zespół 2 sprawozdanie Biologia komórki (TLC)** (wpisać odpowiednie numery grup).

ODCZYNNIKI

- mrożone liście szpinaku, świeże liście pietruszki
- układ rozwijający: cykloheksan + aceton (w stosunku 4 : 1,5)
- chloroform (ekstrahent)
- płytka chromatograficzna (Silica Gel 60 firmy Merck)
- tlenek glinu

APARATURA I SPRZĘT

- moździerz
- komora chromatograficzna
- probówki typu Eppendorf
- pipety automatyczne
- pipety pasterowskie

LITERATURA

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2005) Podstawy biologii komórki 1. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2, 2016.

Kilarski W. Strukturalne podstawy biologii komórki. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1, 2018.