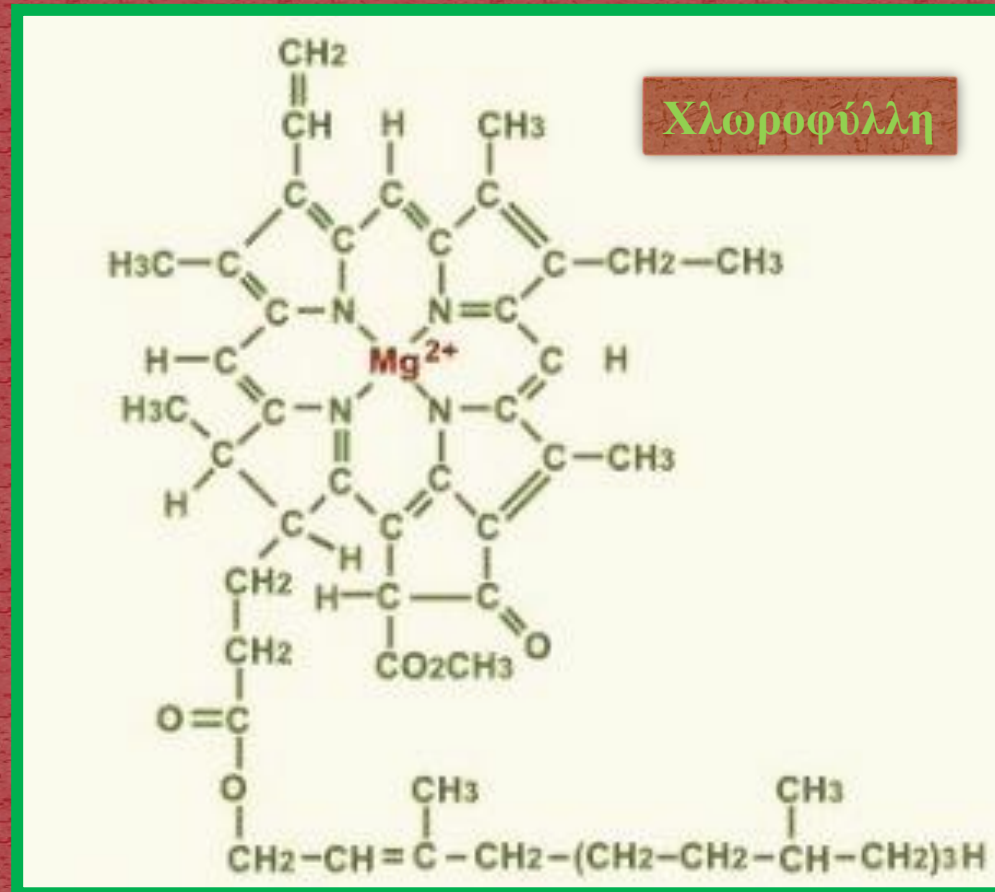


ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ



Κοτονιά Χρυσούλα

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη φωτοσύνθεση είναι η ύπαρξη των φωτοσυνθετικών χρωστικών που βρίσκονται στους χλωροπλάστες.

Στα ανώτερα φυτά, οι χρωστικές αυτές διακρίνονται σε δύο ομάδες:

α) τις χλωροφύλλες και β) τα καροτενοειδή.

Οι χρωστικές και των δύο ομάδων είναι διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες και αδιάλυτες στο νερό. Οι μέθοδοι εκχύλισης όσο και οι μέθοδοι διαχωρισμού των χρωστικών στηρίζονται στη διαφορετική διαλυτότητά τους σε διάφορους διαλύτες

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Η εκχύλιση των χρωστικών, από νωπό ιστό, απαιτεί τη χρησιμοποίηση διαλύτη ο οποίος μπορεί να αναμιχθεί με νερό. Η παρουσία μικρής ποσότητας νερού διευκολύνει την εκχύλιση. Έτσι, αν γίνει εκχύλιση ξηρού ιστού με οργανικό διαλύτη, η εκχύλιση είναι αργή. Η εκχύλιση διευκολύνεται με προσθήκη μικρής ποσότητας νερού. Γενικά, δεν υπάρχει μία μοναδική μέθοδος εκχύλισης που εφαρμόζεται με επιτυχία σε όλες τις περιπτώσεις. Σε κάθε περίπτωση πρέπει να γίνει επιλογή του κατάλληλου διαλύτη.

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Πειραματικό μέρος

Κατά την διάρκεια της άσκησης θα γίνουν οι παρακάτω εργασίες: • Εκχύλιση των χρωστικών από φύλλα σπανακιού.

Διαχωρισμός των χρωστικών

Φυτικό υλικό

Νωπά φύλλα σπανακιού.

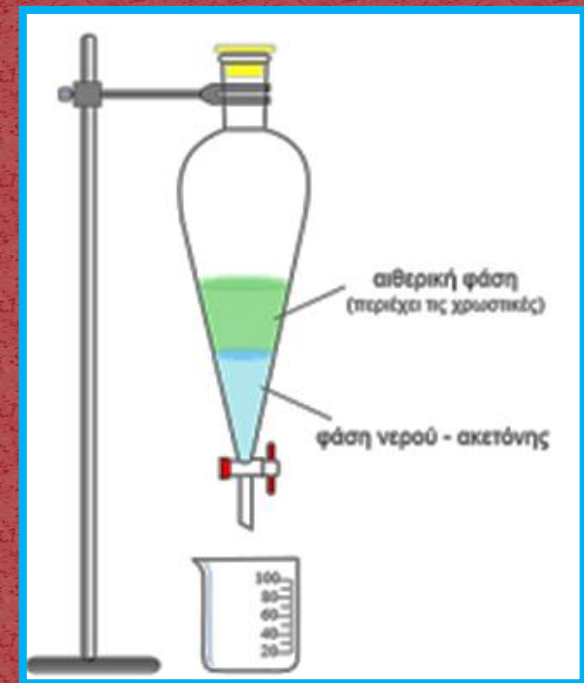
Όργανα και συσκευές

Ζυγός φαρμακευτικός, φασματοφωτόμετρο, γουδί πορσελάνης, 2 διαχωριστικές χοάνες των 300 ml, στηρίγματα, δακτύλιοι, διηθητικό χαρτί, γυάλινη ράβδος, υδροβολέας, ανοξείδωτο μαχαιράκι.

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Χημικά αντιδραστήρια

Ακετόνη, CaCO_3 , πετρελαϊκός
αιθέρας, αιθυλαιθέρας,
μεθυλική αλκοόλη



ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Εκχύλιση χρωστικών

Σε ογκομετρικό κύλινδρο των 50 ml ογκομετρούνται **40 ml** ακετόνης 100%. Παράλληλα ζυγίζονται **5 g** φύλλων σπανακιού αφού προηγουμένως έχουν αφαιρεθεί τα μεγάλα νεύρα. Στη συνέχεια τα φύλλα κόβονται με μαχαιράκι σε μικρά κομμάτια (διαστάσεων λίγων mm) και τοποθετούνται μέσα σε γουδί πορσελάνης. Προστίθεται μικρή ποσότητα CaCO_3 (περίπου ο όγκος μιας φακής), 1-2 ml ακετόνης (από τα 40 ml) και ακολουθεί λειοτρίβηση.

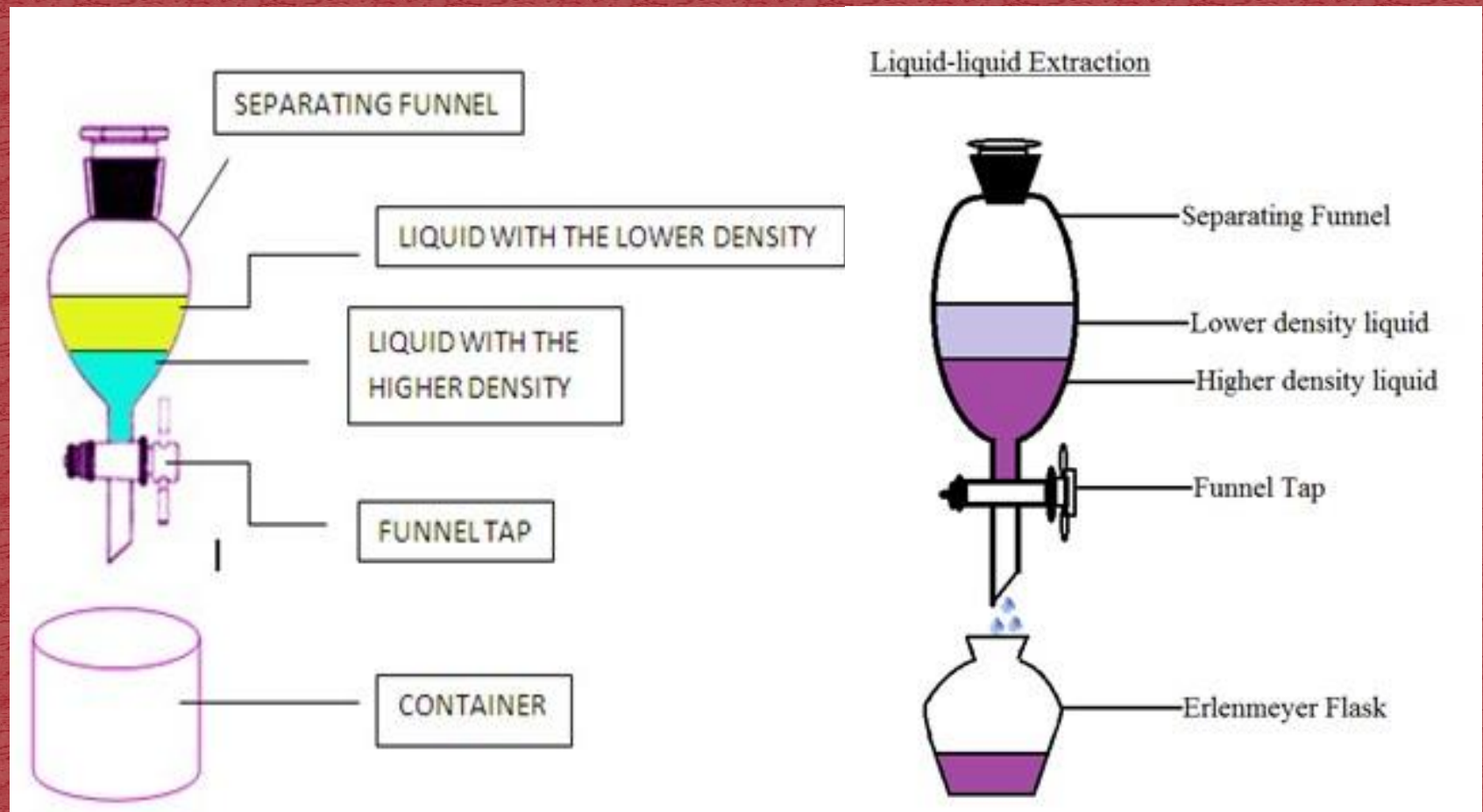


ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Όταν ο ιστός πολτοποιηθεί και ομογενοποιηθεί εντελώς, προστίθεται προσεκτικά και σταδιακά μέσα στο γουδί το υπόλοιπο των 40 ml ακετόνης. Με τον τρόπο αυτό (και ελαφρά ανάδευση) οι φωτοσυνθετικές χρωστικές εκχυλίζονται και το ακετονικό εκχύλισμα παίρνει ένα σκούρο πράσινο χρώμα. Τέλος, το εκχύλισμα διηθείται με κοινό διηθητικό χαρτί και το καθαρό εκχύλισμα των χρωστικών ογκομετρείται σε ογκομετρικό κύλινδρο.



ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ



ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Διαχωρισμός των χρωστικών με τη
χρησιμοποίηση διαλυτών.

Μέσα σε διαχωριστική χοάνη φέρονται 50 ml πετρελαϊκού αιθέρα και στη συνέχεια προστίθενται 15 ml από το αρχικό εκχύλισμα. Το σύνολο αναμιγνύεται με ελαφρές κυκλικές κινήσεις (κατά μικρά χρονικά διαστήματα, πρέπει να ανοίγεται η στρόφιγγα της χοάνης). Προστίθενται στη συνέχεια 70 ml αποσταγμένο νερό από τα τοιχώματα της χοάνης και ακολουθεί νέα προσεκτική ανάμιξη, μέχρι να χρωματιστεί η πάνω στιβάδα έντονα πράσινη.



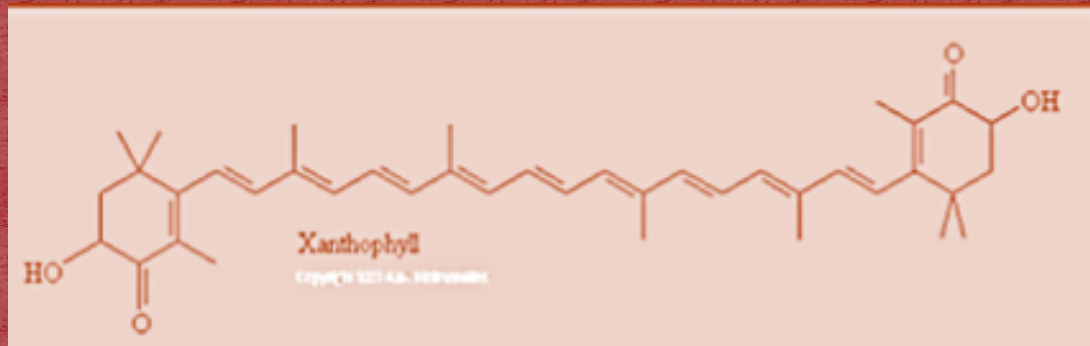
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Η ανάμιξη δεν πρέπει να γίνεται με δυνατή ανατάραξη γιατί υπάρχει κίνδυνος να σχηματιστεί γαλάκτωμα. Αφήνεται το σύστημα σε ηρεμία για να διαχωριστούν εντελώς οι φάσεις. Η πάνω φάση αποτελείται από πετρελαϊκό αιθέρα και περιέχει τις χρωστικές. Η κάτω φάση απορρίπτεται. Η φάση του πετρελαϊκού αιθέρα πλένεται τρεις φορές με 50 ml αποσταγμένο νερό κάθε φορά για να απομακρυνθούν και τα τελευταία ίχνη της ακετόνης.

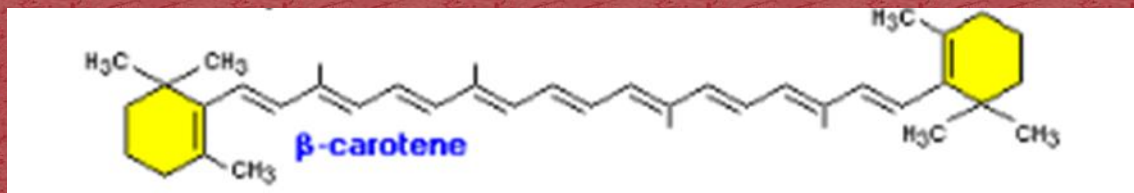


ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Στο διάλυμα του πετρελαϊκού αιθέρα προστίθενται 50 ml CH_3OH 92% (προσοχή στη συγκέντρωση 92%) και ακολουθεί ανάμιξη. Αφήνεται το σύστημα σε ηρεμία, για να διαχωριστούν οι φάσεις. Η κάτω φάση της μεθυλικής αλκοόλης περιέχει τη **χλωροφύλλη β** και τις **ξανθοφύλλες**, η πάνω φάση περιέχει τη **χλωροφύλλη α** και τα **καροτένια**.



ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ



ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

**Παραλαβή και διαχωρισμός χλωροφυλλών και ξανθοφυλλών
από φύλλα σπανακιού με τη χρήση άλλων διαλυτών**

Εισαγωγή

Δύο χρωστικές συνυπάρχουν στα πράσινα φύλλα των φυτών .

Οι πράσινες χλωροφύλλες και οι κίτρινες ξανθοφύλλες. Οι πρώτες κυριαρχούν χρωματικά δίνοντας το πράσινο χρώμα στα φύλλα ενώ οι δεύτερες αναδεικνύονται όταν το φύλλο πάψει να φωτοσυνθέτει (πχ το φθινόπωρο ή μετά την αποκοπή του από το φυτό).

Οι χλωροφύλλες είναι περισσότερο διαλυτές στην βενζίνη σε αντίθεση με τις ξανθοφύλλες οι οποίες είναι περισσότερο διαλυτές στο οινόπνευμα.

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

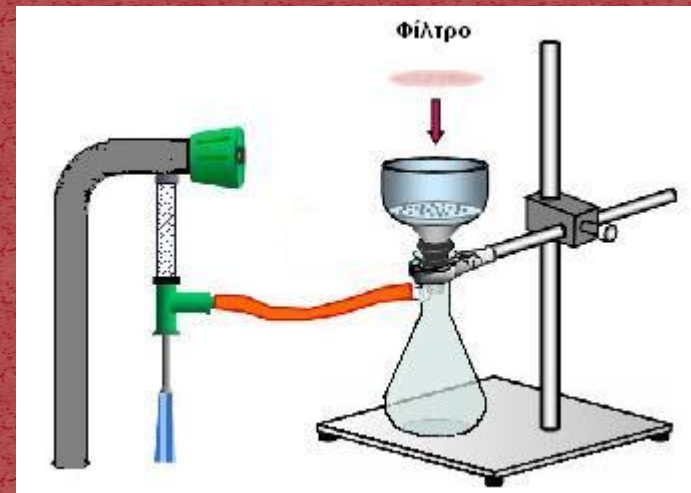
Απαιτούμενα όργανα και αντιδραστήρια

Γουδί με γουδοχέρι	Φύλλα σπανακιού
2 ποτήρια ζέσεως των 100ml	Οινόπνευμα 95%
Συσκευή Buchner ή χωνί με φίλτρο	Βενζίνη
Διαχωριστική χοάνη	
Χωνί	

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Διαδικασία

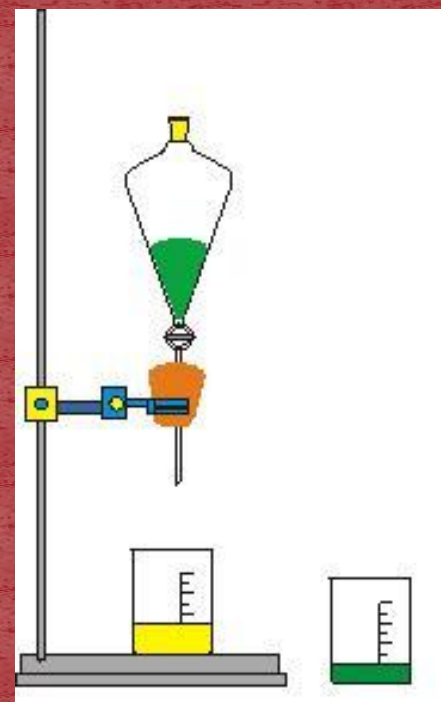
Κόβουμε τα φύλλα σε μικρά κομμάτια λειοτριβούμε μέσα στο γουδί προσθέτοντας λίγο -λίγο το οινόπνευμα (περίπου 50 ml). Μόλις τα φύλλα πολτοποιηθούν αδειάζουμε το πολτό στη συσκευή Buchner αφού έχουμε βάλει σε αυτή το κατάλληλο χαρτί διήθησης.



ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Ανοίγουμε την βρύση και παραλαμβάνουμε το απόσταγμα που περιέχει διαλυμένες στο οινόπνευμα τις χλωροφύλλες και ξανθοφύλλες.

Το διήθημα το μεταφέρουμε σε διαχωριστική χοάνη με βοήθεια χωνιού και ακολούθως προσθέτουμε 20 ml βενζίνης. Ανακινούμε ισχυρά την χοάνη και αφήνουμε να ηρεμήσει να διαχωριστούν οι δύο φάσεις.



ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Αδειάζουμε την κάτω φάση (του οиноπνεύματος) σε ένα ποτήρι (ποτήρι Α) και ακολούθως την πάνω φάση (της βενζίνης) σε άλλο ποτήρι (ποτήρι Β).

Το υγρό από το πρώτο ποτήρι το μεταφέρουμε πάλι στην διαχωριστική χοάνη και επαναλαμβάνουμε την διαδικασία προσθέτοντας άλλα 20 ml βενζίνης.

Διαχωρίζουμε εκ νέου τις φάσεις συλλέγοντας την φάση οиноπνεύματος στο κενό ποτήρι Α και την φάση της βενζίνης στο ποτήρι Β που ήδη περιέχει διάλυμα από τον πρώτο διαχωρισμό.



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η χρωματογραφία είναι μια ευρύτατα διαδεδομένη εργαστηριακή τεχνική διαχωρισμού ουσιών από ένα μίγμα τους. Το μίγμα των ουσιών τοποθετείται στη μία άκρη ενός υλικού προσρόφησης που ονομάζεται στατική φάση. Στη συνέχεια, το μίγμα εκλούεται (ξεπλένεται) από μία κινητή φάση (έναν διαλύτη ή ένα αέριο) η οποία κινείται προς την άλλη άκρη της στατικής φάσης. Όσες ουσίες κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση και είναι πιο διαλυτές στην κινητή φάση κινούνται ταχύτερα κατά τη ροή της κινητής φάσης, ενώ όσες κατακρατούνται ισχυρότερα «τρέχουν» πιο αργά. Το αποτέλεσμα είναι ο διαχωρισμός τους.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Χρωματογραφία χάρτου

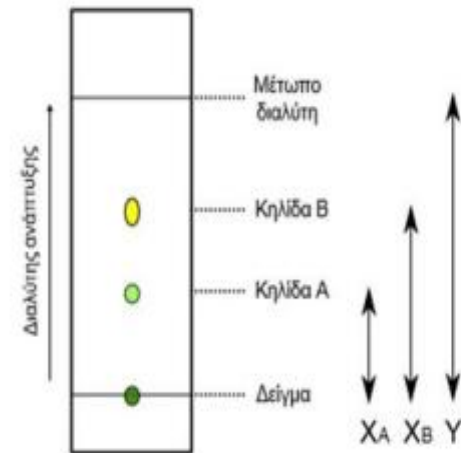
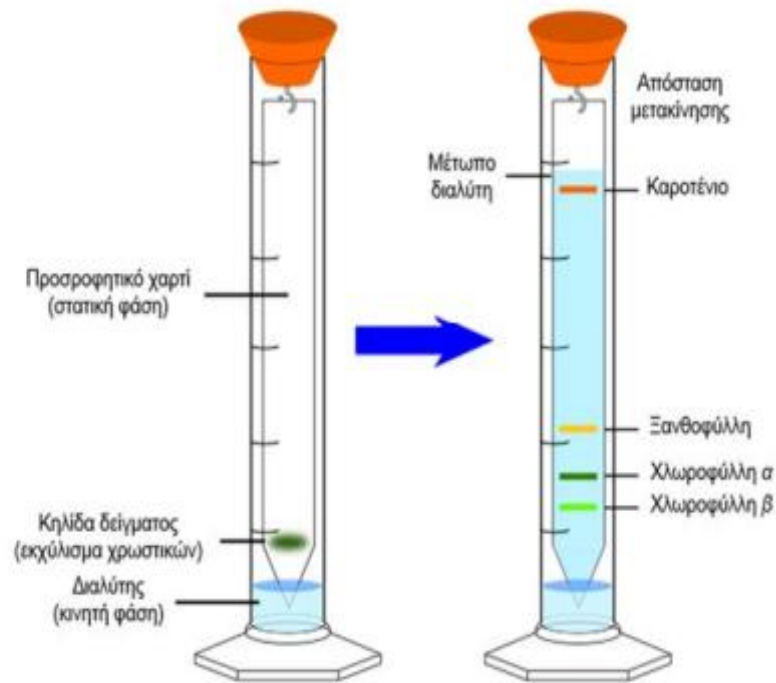
Είναι η πιο απλή μορφή χρωματογραφίας. Στην άκρη μιας λωρίδας προσροφητικού χαρτιού (στατική φάση) τοποθετείται μια κηλίδα δείγματος. Το χαρτί βυθίζεται στον κατάλληλο διαλύτη (κινητή φάση) από τη μεριά της κηλίδας και όπως διαποτίζεται σιγά-σιγά από τον διαλύτη εκκλούνται τα συστατικά του δείγματος και γίνεται διαχωρισμός. Πρόκειται για αναλυτική μέθοδο, κατάλληλη για τον διαχωρισμό χρωματιστών ενώσεων, όπως οι φωτοσυνθετικές χρωστικές.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Ως συντελεστής επιβράδυνσης (Retardation factor, R_f) μιας ουσίας ορίζεται ο λόγος της απόστασης που διανύθηκε από την ουσία προς την απόσταση που διήνυσε ο διαλύτης. Εάν η τιμή R_f μιας ουσίας είναι μηδέν, αυτό σημαίνει ότι η διαλυμένη ουσία παραμένει στη στατική φάση αμετακίνητη. Αν η τιμή $R_f=1$, τότε η διαλυμένη ουσία δεν έχει καμία συγγένεια για τη στατική φάση και «ταξιδεύει» με το μέτωπο του διαλύτη. Για τον υπολογισμό της τιμής R_f , μετράμε την απόσταση που διανύθηκε από την - 79 - ουσία και τη διαιρούμε μ' αυτή που διανύθηκε από τον διαλύτη. Για παράδειγμα, εάν μία χημική ένωση διήνυσε 2,4 εκατοστά και το μέτωπο του διαλύτη διήνυσε 3,2 εκατοστά, τότε η τιμή R_f της ουσίας αυτής ισούται με 0,75 ($2,4/3,2 = 0,75$). Η τιμή R_f εξαρτάται από τη θερμοκρασία και τον διαλύτη που χρησιμοποιείται κάθε φορά, επομένως διαφορετικοί διαλύτες δίνουν διαφορετικές τιμές R_f για το ίδιο μίγμα ουσιών.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ



$$R_f = \frac{\text{Απόσταση μετακίνησης του συστατικού}}{\text{Απόσταση μετακίνησης του διαλύτη}}$$

ΠΗΓΕΣ

<https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/5139/1/KEFALAIO%20%20copy.pdf>

<http://www.tay.teiwest.gr/ghotos/wp-content/uploads/sites/11/2020/02/PHOTOSYNTHETIC-PIGMENTS-HOTOS-1.pdf>

<https://slideplayer.gr/slide/2978718/>

<http://users.sch.gr/spangs/ergastiria/chlorofyll.html>