



Pracownia studencka
Katedry Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 3

SEPARACJA BARWNIKÓW ROŚLINNYCH METODAMI CHROMATOGRAFICZNYMI

Metody separacyjne

Gdańsk, 2021

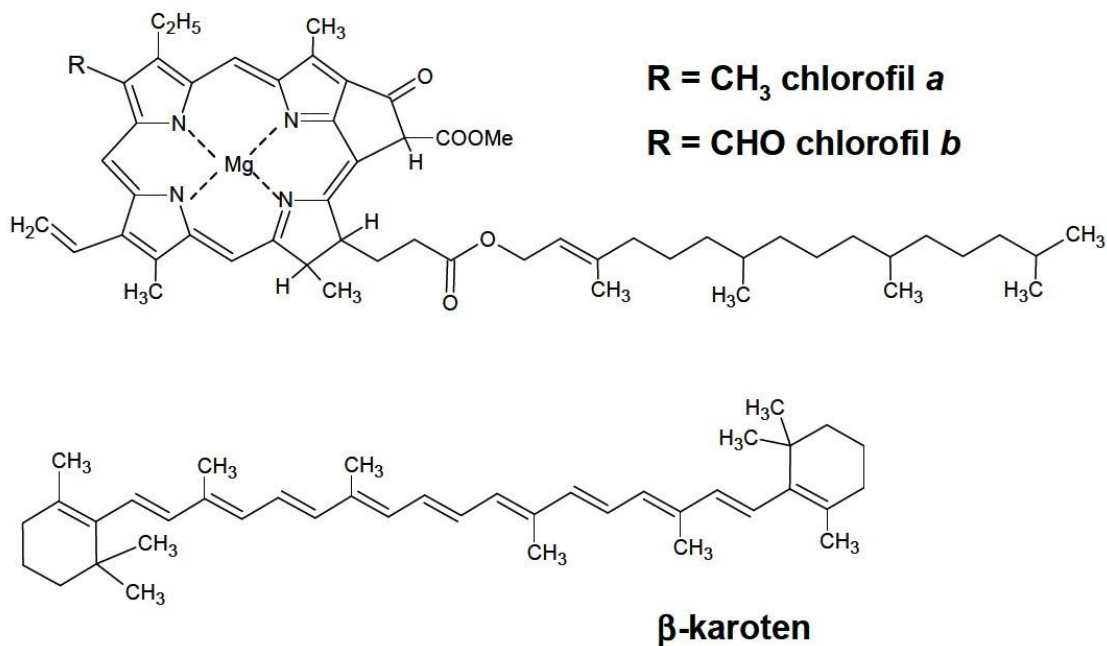
I. Wprowadzenie

1. Barwniki roślinne

Barwniki występujące w liściach szpinaku: chlorofile *a* i *b*, feofityny *a* i *b*, β -karoten oraz ksantofile zostaną wyekstrahowane za pomocą acetonu, a następnie rozdzielone na żelu krzemionkowym. Analiza zostanie wykonana z zastosowaniem adsorpcyjnej chromatografii kolumnowej (LC). W trakcie ćwiczenia zostanie także wykonana analiza techniką chromatografii cienkowsarstwowej (TLC) ekstraktu oraz wydzielonych związków. Izolowane i analizowane związki są substancjami barwnymi, dzięki czemu można łatwo monitorować zarówno rozdział LC, jak i TLC. Pomysł eksperymentu został zaadaptowany z Pavia D.L. et al., *Introduction to Organic Laboratory Techniques: A Microscale Approach*, 2005.

Chlorofile są barwnikami niezbędnymi w procesie fotosyntezy. W chloroplastach roślinnych występują przeważnie w dwóch formach: jako niebieskozielony chlorofil *a* oraz żółtozielony chlorofil *b* (struktury na **Rysunku 1**). Chlorofile zawierają rdzeń porfirykowy, w którym znajduje się atom magnezu łączący się z atomami azotu każdego z pierścieni rdzenia porfirykowego. Chlorofil *b* różni się od chlorofilu *a* obecnością grupy aldehydowej w bocznym pierścieniu pirolowym zamiast grupy metylowej. Budowa strukturalna feofityny *a* i *b* jest podobna do budowy chlorofilu *a* i *b*, z tym, że w miejscu jednego atomu magnezu w cząsteczce feofityny występują dwa atomy wodoru. Feofitynę można uzyskać poprzez działanie kwasem na chlorofil. Oprócz chlorofili, w chloroplastach występują także karoteny, m.in. żółty β -karoten, czyli prowitamina A, oraz ksantofile. Zielony kolor chlorofili wynika z faktu, że związki te silnie absorbują światło w czerwonej i niebieskiej części widma promieniowania widzialnego, natomiast słabo w części zielonej. Jesienią zabarwienie liści zmienia się na żółtawe ze względu na rozkład chlorofilu, dzięki czemu ujawnia się barwa obecnych w liściach żółtych barwników.

W zależności od stanu próbki szpinaku oraz warunków eksperymentu mogą wystąpić pewne różnice w składzie i ilości poszczególnych barwników. Rozpad i przekształcenia chemiczne chlorofilu oraz innych barwników roślinnych zachodzą na drodze utleniania, hydrolizy lub innych reakcji zachodzących pod wpływem światła, tlenu i innych czynników. Próbkę szpinaku i wyizolowane barwniki należy zatem w miarę możliwości przechowywać w ciemności, co zminimalizuje ryzyko wystąpienia niepożądanych zmian strukturalnych.



Rysunek 1. Wzory strukturalne chlorofilu a, chlorofilu b oraz β -karotenu

2. Chromatografia adsorpcyjna

Zarówno cieczowa chromatografia kolumnowa (LC), jak i chromatografia cienkowarstwowa (TLC) należą do technik określanych wspólnym mianem "chromatografia adsorpcyjna". Rozdzielenie substancji następuje w wyniku wielokrotnych, selektywnych procesów adsorpcji zachodzących na aktywnych powierzchniach sorbentów. Szczególnie cenne usługi oddaje kolumnowa chromatografia adsorpcyjna w przypadku złożonych mieszanin stosunkowo niewielkich ilości substancji, których rozdzielanie za pomocą krystalizacji czy destylacji jest praktycznie nieosiągalne, zwłaszcza gdy chodzi o związki wysokowrzące i wrażliwe na działanie temperatury. Z tych samych powodów, metodę kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej stosuje się do rozdzielania szczególnie złożonych mieszanin związków pochodzących ze źródeł naturalnych.

W chromatografii cieczowej występują konkurencyjne oddziaływania między składnikami próbki (substancje analizowane oraz składniki matrycy) a fazą stacjonarną (adsorbent), między składnikami próbki a fazą ruchomą (rozpuszczalnik wymywający próbkę z adsorbentu) oraz pomiędzy fazą ruchomą i stacjonarną. Mechanizm adsorpcyjny polega na zatrzymywaniu cząsteczek substancji na powierzchni adsorbentu (zwykle porowatego). W procesie tym biorą udział następujące oddziaływania międzycząsteczkowe:

- siły wynikające z oddziaływań między cząsteczkami mającymi trwałe moment dipolowy (oddziaływania dipol-dipol),

Separacja barwników roślinnych metodami chromatograficznymi

- siły wynikające z oddziaływań między cząsteczkami mającymi trwały moment dipolowy oraz cząsteczkami, w których dipol jest indukowany przez sąsiadujące cząsteczki (oddziaływanie dipol-dipol indukowany),
- oddziaływania związane z tworzeniem wiązań wodorowych, specjalny rodzaj oddziaływania dipol-dipol między atomem wodoru a atomem pierwiastka elektroujemnego, np. O, N, F.

Oddziaływania międzycząsteczkowe powodują, że rozdzielane substancje w niejednakowym stopniu zatrzymują się na adsorbencie. Im większe powinowactwo związku chemicznego do fazy stacjonarnej, tym jest on silniej przez nią zatrzymywany. Związek jest wymywany z powierzchni adsorbentu za pomocą fazy ruchomej. Im silniej jest zatrzymywany, tym później opuszcza kolumnę (większa retencja, czyli opóźnienie w stosunku do przepływu fazy ruchomej). Objętość fazy ruchomej potrzebna do jego wymycia nazywa się objętością retencji. Zdolność fazy ruchomej do wymywania konkretnej substancji chemicznej zależy od tego, jak silnie konkuruje z nią o centra aktywne na powierzchni sorbentu (patrz następne podrozdziały).

2.1. Fazy stacjonarne w chromatografii adsorpcyjnej

W chromatografii cieczowej używa się adsorbentów porowatych o powierzchniach od setek do tysiąca m²/g. Adsorbenty dzieli się na polarne i niepolarne. Do niepolarnych należą węgiel aktywny, węglowodory nasycone, niektóre sorbenty polimerowe; do polarnych – żel krzemionkowy, krzemian magnezu, tlenek glinu. Żel krzemionkowy o ogólnym wzorze SiO₂·nH₂O jest najczęściej stosowanym adsorbentem w adsorpcyjnej chromatografii cieczowej. O jego szerokim zastosowaniu decyduje łatwość otrzymywania i niska cena, jak również możliwość łatwej modyfikacji jego właściwości powierzchniowych, takich jak struktura geometryczna porów czy modyfikacja chemiczna. Na powierzchni żelu krzemionkowego występują grupy -OH (silanolowe), których modyfikacja chemiczna prowadzi zwykle do otrzymania sorbentu o znacząco innych właściwościach. Aktywność żelu krzemionkowego jest większa, gdy usunie się z jego powierzchni zaadsorbowane cząsteczki wody. Usuwanie wody przez ogrzewanie w temperaturze 120-150°C nazywa się aktywacją adsorbentu. Wyższa temperatura, w przypadku żelu krzemionkowego, może powodować usuwanie grup wodorotlenowych z jego powierzchni. Siła adsorpcji związków organicznych na żelu krzemionkowym jest tym większa, im większa jest ich polarność, i rośnie w szeregu: węglowodory < halogenki alkilowe, aryłowe < etery (ROR) < aldehydy (RCHO) < ketony (R₂CO) < estry (RCOOR) < alkohole (ROH) < fenole (ArOH) < kwasy karboksylowe (RCOOH).

2.2. Fazy ruchome w chromatografii adsorpcyjnej

Zdolność rozpuszczalnika do wymywania substancji w chromatografii adsorpcyjnej zależy od jego siły oddziaływania z powierzchnią adsorbentu i zwana jest **mocą elucyjną** rozpuszczalnika (eluentu). Mechanizm tego oddziaływania jest taki sam, jak przedstawiony wyżej dla pary substancja – adsorbent. Silniejsza adsorpcja rozpuszczalnika na fazie stacjonarnej zmniejsza adsorpcję zatrzymanej substancji, przyspieszając jej elucję. Rozpuszczalniki klasyfikuje się zgodnie ze wzrastającą zdolnością wymywania zaadsorbowanych substancji z powierzchni adsorbentu (czyli zgodnie ze wzrastającą mocą elucyjną), zestawiając je w tzw. **szereg eluotropowy**. W chromatografii z fazą stacjonarną polarną, np. z żelem krzemionkowym, o sile elucji decyduje polarność eluentu, więc szereg eluotropowy rozpuszczalników porządkuje rozpuszczalniki według ich wzrastającej polarności. Wybór odpowiedniego rozpuszczalnika do rozdzielania wybranej mieszaniny związków nie jest łatwy. Zwykle stosuje się zestaw kilku rozpuszczalników, rozpoczynając od tego o najniższej mocy elucyjnej (polarności) i stopniowo tę moc zwiększając. Można mieszać dwa lub więcej rozpuszczalników dla uzyskania odpowiedniej siły elucji i selektywności rozdzielania. Szereg eluotropowy rozpuszczalników wg. ich wzrastającej mocy elucyjnej dla adsorbentów polarnych przedstawiono w **Tabeli 1**.

Tabela 1. Rozpuszczalniki uszeregowane zgodnie ze wzrastającą mocą elucyjną w chromatografii adsorpcyjnej na żelu krzemionkowym.

L.p.	Rozpuszczalnik	L.p.	Rozpuszczalnik	L.p.	Rozpuszczalnik
1.	n-Pentan	7.	Eter dietylowy	13.	Acetonitryl
2.	Eter naftowy	8.	Chloroform	14.	Pirydyna
3.	n-Heksan	9.	Dichlorometan	15.	Etanol
4.	Cykloheksan	10.	Tetrahydrofuran	16.	Metanol
5.	Tetrachlorek węgla	11.	Aceton	17.	Woda (b. duża siła elucji)
6.	Toluen	12.	Octan etylu	18.	Kwas octowy (b. duża siła elucji)

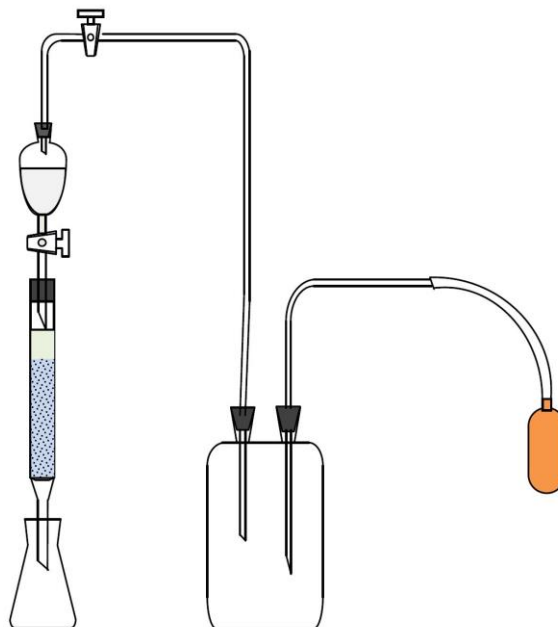
2.3. Kolumnowa chromatografia adsorpcyjna (LC)

W adsorpcyjnej chromatografii kolumnowej analizowane substancje są w postaci roztworu nanoszone na złożę adsorbentu wypełniające szklaną kolumnę. Wybór rozpuszczalnika zależy przede wszystkim od rozpuszczalności substancji rozdzielanych. Związek organiczny jest zawsze silniej adsorbowany przez złożę z rozpuszczalnika niepolarnego niż polarnego – natomiast już zaadsorbowany będzie tym silniej ze złoża wypierany, im bardziej polarny jest dany rozpuszczalnik. Następnie, przemywając złożę (adsorbent w kolumnie) fazą ruchomą, dzielimy mieszaninę na grupy związków lub poszczególne związki chemiczne i wymywamy je (eluujemy) z kolumny, zbierając

Separacja barwników roślinnych metodami chromatograficznymi

kolejne frakcje eluatu (rozpuszczalnika z wymywanymi związkami). Wymywanie można prowadzić: (a) jednym rozpuszczalnikiem lub mieszaniną o stałym składzie (elucja izokratyczna); lub (b) kilkoma rozpuszczalnikami kolejno według ich rosnącej polarności, albo mieszaniną rozpuszczalników o wzrastającej polarności (elucja gradientowa). Spływające z kolumny frakcje zbiera się oddzielnie. W ten sposób uzyskuje się rozdzielenie badanej mieszaniny na składniki nieadsorbowane i adsorbowane coraz silniej przez zastosowany adsorbent. Poszczególne frakcje zateża się i bada innymi metodami.

Zasadniczą częścią każdego zestawu do chromatografii kolumnowej (**Rysunek 2**) jest kolumna ze szkła obojętnego, której wymiary są dostosowane do skali przeprowadzanego procesu. W zależności od tej skali, stosuje się od 1 do 100 g adsorbentu, co wystarcza do adsorpcji od ułamka grama do kilku gramów substancji rozdzielanych. Dla przyspieszenia elucji stosuje się słabe ssanie (pompka wodna) lub tłoczenie. Napełnianie kolumny adsorbentem zwykle przeprowadza się metodą *na mokro*, polegającą na wprowadzaniu do kolumny zawiesiny adsorbentu w rozpuszczalniku użytym do rozpuszczania substancji. Napełnianie należy wykonać tak, by złożo adsorbentu było jednorodne, pozbawione pęcherzyków powietrza i nie zmieniało objętości w czasie rozdziału. Powierzchnia adsorbentu powinna być stale pokryta płynem od chwili wprowadzenia pierwszych porcji rozpuszczalnika do zakończenia procesu. W przeciwnym razie złożo na kolumnie może łatwo wyschnąć, co silnie zakłóca proces rozdzielania substancji.

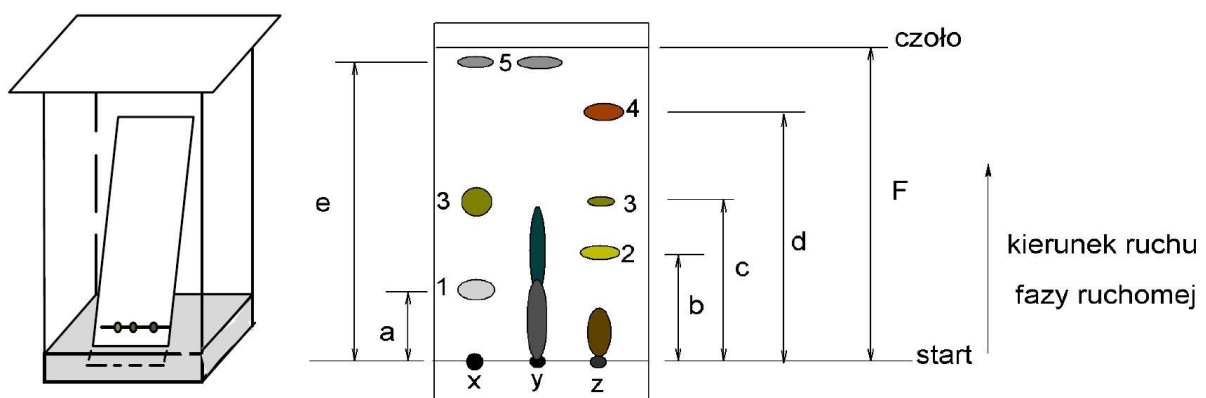


Rysunek 2. Zestaw do chromatografii kolumnowej z zastosowaniem tłoczenia

2.4. Cienkowarstwowa chromatografia adsorpcyjna (TLC)

Chromatografia cieczowa, polegająca na rozdzieleniu mieszaniny substancji na fazie stacjonarnej w postaci płaszczyzny, nazywa się chromatografią planarną. Fazą stacjonarną może być bibuła (chromatografia bibułowa) lub cienka, równomierna warstwa adsorbentu umieszczona na podłożu szklanym, metalowym lub z tworzywa sztucznego, zwana płytką chromatograficzną (chromatografia cienkowarstwowa). Po zanurzeniu brzegu płytki chromatograficznej w fazie ruchomej, następuje przepływ fazy ruchomej w górę płytki, wymuszony przez siły kapilarne. Substancje naniesione na płytkę będą przesuwały się wraz z fazą ruchomą (rozwijanie chromatogramu) lub pozostaną na miejscu naniesienia, jeśli moc elucyjna zastosowanej fazy ruchomej będzie niewystarczająca. Prędkość, z jaką substancje będą przesuwały się z fazą ruchomą, zależy od ich wzajemnego oddziaływania z fazą stacjonarną i fazą ruchomą oraz oddziaływania fazy ruchomej z fazą stacjonarną. Jeśli różnice w prędkości poruszania się poszczególnych substancji będą wystarczające, po pewnym czasie każda z substancji znajdzie się w innym miejscu płytki chromatograficznej – nastąpi rozdzielenie składników próbki.

Miejsce położenia substancji na płytce chromatograficznej po zakończeniu analizy określa **współczynnik opóźnienia** oznaczany symbolem R_f , a wyrażający stosunek drogi przebytej przez substancję do drogi przebytej przez fazę ruchomą. Współczynnik R_f jest wielkością charakterystyczną dla danej substancji i układu chromatograficznego: fazy stacjonarnej i fazy ruchomej. Na **Rysunku 3** przedstawiono komorę chromatograficzną z fazą ruchomą oraz prawidłowy sposób zanurzania w niej płytki z naniesionymi próbkami. Obok przedstawiono rozwinięty i wywołany chromatogram próbek x, y i z.



Rysunek 3. Komora chromatograficzna z zanurzoną płytką i chromatogram TLC uzyskany dla próbek x, y i z (interpretacja poniżej)

Separacja barwników roślinnych metodami chromatograficznymi

Współczynniki R_f dla poszczególnych substancji wynoszą:

- dla substancji 1: $R_f = a/F$,
- dla substancji 2: $R_f = b/F$,
- dla substancji 3: $R_f = c/F$,
- dla substancji 4: $R_f = d/F$,
- dla substancji 5: $R_f = e/F$.

Dla substancji bezbarwnych istnieje szereg metod wizualizacji ich miejsca położenia na płytce chromatograficznej (wywoływanie chromatogramu). Metody te zależą od właściwości chemicznych i fizycznych badanych substancji. Bardzo często wywoływanie chromatogramu polega na przeprowadzeniu reakcji barwnych. Inną metodą jest zwęglanie substancji, absorpcja par jodu czy wizualizacja pod lampą UV. Substancje barwne nie wymagają wywoływania. Na chromatogramie TLC próbek x, y i z (**Rysunek 3**) można zauważyć, że:

- plamy od 1 do 5 odpowiadają prawdopodobnie pojedynczym substancjom 1-5,
- substancja 1 znajduje się w próbce x,
- substancja 2 i 4 znajduje się w próbce z,
- substancja 3 znajduje się w próbce x i z (ta sama wartość R_f),
- substancja 5 znajduje się w próbce x i y (ta sama wartość R_f),
- pozostałe plamy odpowiadają nierozdzielonym substancjom, identyfikacja nie jest możliwa,
- plamy na starcie pochodzą od substancji bardzo silnie adsorbowanych przez fazę stacjonarną,
- pojedyncza plama nie musi odpowiadać jednej substancji, dopiero gdy plama jest pojedyncza na chromatogramach TLC uzyskanych w różnych układach chromatograficznych, możemy założyć, że odpowiada jednej substancji.

2.5. Chromatografia adsorpcyjna barwników roślinnych

Jak już wspomniano, w kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej kolejność elucji związków chemicznych z kolumny zależy od ich polarności. Związki o niskiej polarności są wymywane jako pierwsze, następnie eluują związki o większej polarności. Barwniki, izolowane z liści szpinaku, różnią się polarnością, co powoduje, że będą eluowały w następującym porządku zgodnym z ich wzrastającą polarnością (w nawiasach podane są kolory związków):

1. Karoteny (intensywnie żółty kolor)
2. Feofityna a (intensywnie szary)
3. Feofityna b (szary, może być niewidoczny)
4. Chlorofil a (niebieskozielony, bardziej intensywny niż chlorofil b)

Separacja barwników roślinnych metodami chromatograficznymi

5. Chlorofil b (zielony)

6. Ksantofile (żółty).

II. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z metodami rozdzielania barwnych związków obecnych w tkankach roślinnych. Jako materiał do badań posłużą mrożone liście szpinaku. Użyta zostanie ekstrakcja rozpuszczalnikowa barwników, które będą następnie rozdzielane przy zastosowaniu technik chromatografii adsorpcyjnej: chromatografii kolumnowej (LC) i cienkowsarstwowej (TLC).

III. Wykonanie ćwiczenia

Ekstrakcja barwników

Odważyć około 1,0-1,5 g mrożonego szpinaku za pomocą wagi technicznej w zlewce o objętości 100 ml. Począć, aż szpinak się rozmrozi, dodać 1,0-1,5 g bezwodnego siarczanu magnezu w celu zatrzymania części wody obecnej w próbce. Całość wymieszać i delikatnie rozetrzeć. Ekstrahować barwniki acetonem (20 ml) w łaźni ultradźwiękowej bez ogrzewania w czasie 10-15 minut. Dodać do próbki 8 g bezwodnego siarczanu sodu, wymieszać i pozostawić na 5-10 min. Następnie, zdekantować i przesączyć ekstrakt do kolby sercowej przez sącdek zawierający ok. 3-4 g bezwodnego siarczanu sodu. Pozostały osad przemyć acetonem (10 ml), zdekantować i przesączyć przez ten sam sącdek. Odparować aceton na odparowywaczu obrotowym w temperaturze 30°C. Jeżeli w kolbie pozostała woda, rozpuścić ekstrakt w około 5 ml heksanu, pobrać tylko warstwę organiczną i ponownie wysuszyć ją bezwodnym siarczanem sodu. Ekstrakt zatężyć do objętości ok. 1 ml.

Dobór faz ruchomych – chromatografia cienkowsarstwowa (TLC)

Analiza TLC ekstraktu ze szpinaku pozwala dobrać warunki rozdzielania na kolumnie z żelem krzemionkowym. Należy wykonać analizy TLC ekstraktu ze szpinaku przy użyciu **dwóch wybranych rozpuszczalników** spośród następujących: aceton, eter naftowy, chlorek metylenu, chloroform. Proszę skonsultować wybór z prowadzącym! Należy zidentyfikować badane związki na podstawie ich barw i kolejności elucji. Policzyc wartości współczynników opóźnienia (R_F) dla rozdzielanych związków oraz ich różnice (ΔR_F). Wybrać optymalną fazę ruchomą do rozdzielania LC lub zaproponować ich mieszaninę. Różnica współczynników rozdzielania dla związków powinna być jak największa; zadowalające efekty uzyskuje się, gdy $\Delta R_F \geq 0,15$. Wybrana faza ruchoma

Separacja barwników roślinnych metodami chromatograficznymi

powinna dawać zatem wartości R_F około 0,15 - 0,40. Jeżeli jest to konieczne, rozważyć zastosowanie elucji gradientowej w LC.

Po wykonaniu rozdzielania ekstraktu ze szpinaku za pomocą chromatografii kolumnowej należy wykonać analizę TLC uzyskanych frakcji, a następnie ocenić jakość rozdzielania LC – patrz dalsza część instrukcji.

Procedura analizy TLC. Napełnić komorę chromatograficzną wybraną fazą ruchomą (3 ml), przykryć wieczkiem i pozostawić na około 5-10 min. W tym czasie wyciąć płytki TLC, które zmieszczą się w stosowanych komorach tak, by ich brzegi nie dotykały ścian komory. Następnie przygotować płytki TLC, czyli narysować delikatnie miękkim ołówkiem:

- linię startową - około 0,8-1 cm od dolnego brzegu płytki i zaznaczyć na niej punkty nanoszenia próbek,
- linię końcową - około 1 cm od górnego brzegu płytki.

Nanieść na płytkę niewielką objętość roztworów badanych próbek za pomocą kapilary, uważając, aby plamka nie miała średnicy większej niż 5 mm; im mniejsza średnica, tym mniejsze rozmycie plamki w czasie rozwijania chromatogramu. Powtórzyć nanoszenie roztworu jeszcze dwa razy, każdorazowo czekając na odparowanie rozpuszczalnika z plamki. Badane związki są barwnikami, co powoduje, że łatwo można kontrolować ilość nanoszonego roztworu. Należy nanieść taką ilość roztworu, aby uzyskać intensywne żółte, zielone lub szare zabarwienie plamki.

Delikatnie, przy pomocy pęsety, wstawić płytkę TLC z naniesionymi substancjami do komory chromatograficznej. Zamknąć komorę i rozwijać chromatogram, do momentu, gdy czoło rozpuszczalnika będzie w odległości 1 cm od górnego brzegu płytki, następnie wyjąć i wysuszyć płytkę. Natychmiast zrobić zdjęcie lub skan płytki TLC i dołączyć do sprawozdania. Wyznaczyć współczynniki opóźnienia R_F i zanotować zabarwienie dla wszystkich związków. Przedyskutować zasadność wyboru użytych faz ruchomych.

Chromatografia kolumnowa (LC)

W kolbie stożkowej (100 ml) odważyć 4 g żelu krzemionkowego, a następnie dodać 30 ml mieszaniny eter naftowy-aceton (9:1 v/v). Wymieszać i pozostawić na 5-10 min. Zamocować kolumnę w statywie i zamknąć odpływ z kolumny. Umieścić na dnie kolumny małą ilość zwiniętej waty szklanej. Wprowadzić 2 ml mieszaniny eter naftowy-aceton (9:1 v/v). Usunąć powietrze z waty szklanej naciskając bagietką. Uważnie wprowadzić zawiesinę żelu krzemionkowego do kolumny, za pomocą pipety z szerokim otworem wyjściowym lub poprzez lejek, otwierając jednocześnie odpływ

Separacja barwników roślinnych metodami chromatograficznymi

z kolumny. Zrobić to w taki sposób, aby uzyskać w miarę płaskie dno oraz płaski wierzch fazy stacjonarnej. Górną powierzchnię złoża można zasypać cienką warstwą piasku. Od momentu wprowadzenia do kolumny żelu krzemionkowego, jego powierzchnia musi być stale przykryta cieczą – nie wolno doprowadzić do przesuszenia kolumny. Roztwór eter naftowy-aceton wypływający z kolumny zachować do zakończenia eksperymentu – posłuży do umycia kolumny oraz pipety i kolby zabrudzonej ekstraktem ze szpinaku. Za pomocą pompki ręcznej przepuścić przez złożo ok. 20-30 ml mieszaniny eter naftowy-aceton (9:1 v/v). Gdy wysokość złoża w kolumnie będzie stała, należy ją zmierzyć i zanotować. Pozostawić około 3 cm słupa cieczy nad złożem.

Należy wcześniej przygotować wszystkie roztwory potrzebne do elucji barwników:

- roztwór A: eter naftowy-aceton (9:1 v/v), V = 20 ml,
- roztwór B: eter naftowy-aceton (7:3 v/v), V = 20 ml,
- roztwór C: aceton, V = 20 ml.

Wyrównać poziom fazy ruchomej w kolumnie do poziomu ok. 0,5 cm nad powierzchnią złoża fazy stacjonarnej i zamknąć odpływ z kolumny. Ostrożnie wprowadzić do kolumny około ½ części ekstraktu ze szpinaku za pomocą pipety Pasteura i otworzyć odpływ z kolumny. Wprowadzić próbkę do fazy stacjonarnej, przemywając 2-4 razy po 1 ml roztworu A aż do momentu, gdy cała próbka znajdzie się w fazie stacjonarnej (zaniknie zielone zabarwienie roztworu nad powierzchnią fazy stacjonarnej). W tym momencie zbieramy już frakcje! Ostrożnie wprowadzić do kolumny pozostała część roztworu A. Gdy poziom rozpuszczalnika osiągnie wartość ok. 1 ml nad powierzchnią złoża, wprowadzić ostrożnie roztwór B, następnie analogicznie roztwór C. Zbierać kolejne frakcje fazy ruchomej zawierające wydzielone barwniki roślinne do kolejnych 6 cylindrów miarowych. Należy zanotować objętości uzyskanych frakcji.

Frakcje (objętości orientacyjne, proszę śledzić barwę złoża):

- 1 – bezbarwna, V = około 5 ml,
- 2 – żółta, V = około 5 ml,
- 3 – bezbarwna, V = około 14 ml,
- 4 – szara, V = około 5 ml,
- 5 – niebiesko-zielona, V = około 10 ml,
- 6 – żółtozielona, V = około 10 ml.

Zebrane frakcje zatężyć do około 0,5 ml i pozostawić do analizy TLC. **Wykonać analizę TLC** (zgodnie z wcześniejszym opisem) uzyskanych frakcji i ekstraktu stosując jako fazę ruchomą mieszaninę eter naftowy-aceton (7:3 v/v). Zidentyfikować barwniki. Ocenić jakość rozdzielności LC (czystość poszczególnych frakcji).

Literatura

1. Pałczyński A., Podbielkowski Z., Polakowski B., *Botanika*. PWN, Warszawa, 1995.
2. Still W.C., Kahn M., Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.*, 1978, 43 (14), 2923–2925.
3. Stryer L. *Biochemia*. PWN, Warszawa, 2000.
4. Pavia D.L., Lampman G.M., Kriz G.S., Engel R.G. *Introduction to organic laboratory techniques: a small scale approach*. Thomson Brooks/Cole, 2005.

Szkło i odczynniki

Odczynniki:

- bezwodny siarczan magnezu
- bezwodny siarczan sodu
- aceton (250 ml)
- eter naftowy (250 ml)
- chlorek metylenu (100 ml)
- chloroform (100 ml)
- żel krzemionkowy LC60A 60-200 MICRON firmy DAVISIL
- płytki do TLC *silica gel 60* firmy Merck

Szkło:

- zlewka V = 100 ml
- zlewka V = 50 ml
- zlewka V = 25 ml
- kolba stożkowa V = 50 ml + pasujący korek szklany (3 szt.)
- kolba stożkowa V = 100 ml + pasujący korek szklany (1 szt.)
- cylinder miarowy V = 25 ml (4 szt.)
- cylinder miarowy V = 10 ml (3 szt.)
- kolba sercowa V = 100 ml (2 szt.)
- kolba sercowa V = 50 ml (6 szt.)
- reduktor do odparowywacza
- kolumna szklana o wymiarach 1 × 15 cm + przedłużka + pompka
- lejek pasujący do kolumny
- pipety Pasteura + smoczki

Separacja barwników roślinnych metodami chromatograficznymi

- pipeta z dużym otworem wyjściowym do zawiesiny żelu krzemionkowego
- bagietka szklana
- lejek średni + pasujące sączi
- pipeta V = 5 ml (2 szt.)
- 2 komory chromatograficzne do TLC
- kapilary

Pozostałe:

- płytka + nóż do krojenia
- łyżka metalowa
- tłuczek porcelanowy
- ołówek
- pisak do szkła
- metalowa pęseta
- wata szklana
- piasek

Uwaga: Proszę nie myć komór chromatograficznych ani kolumny do LC wodą, a stosować jedynie rozpuszczalniki organiczne.