



Isfahan University

Faculty of science

Biology department

Lab:

Principles of plant physiology



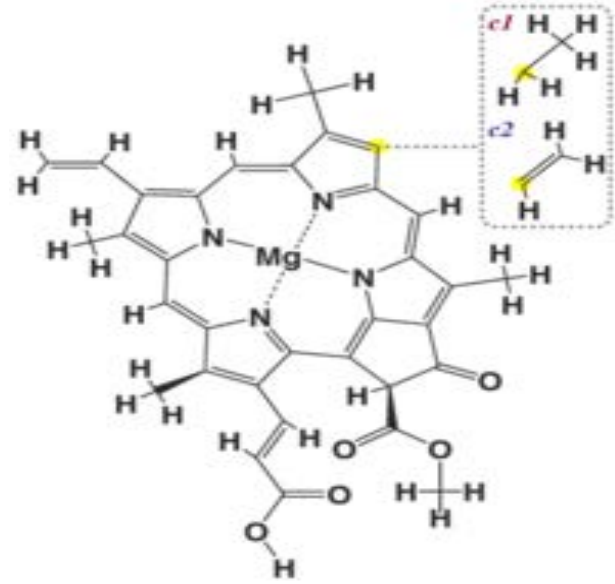
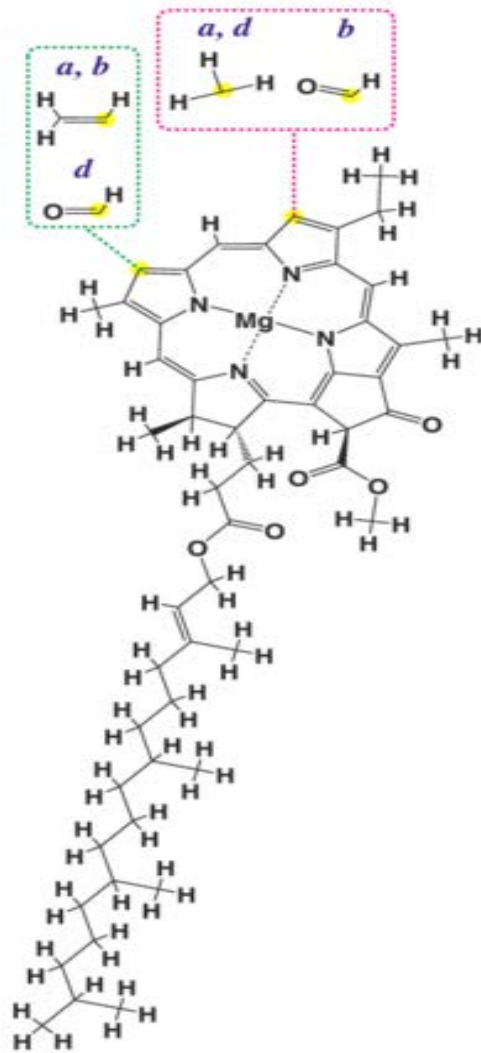
# جداسازی رنگدانه های فتوسنتزی از طریق کروماتوگرافی کاغذی

By:Farzaneh Zoei

- رنگیزه‌های فتوسنتزی به مولکول‌های اطلاق می‌شوند که توانایی جذب نور و تبدیل آن به انرژی شیمیایی را دارا باشند.
- چنین مولکول‌های را رنگیزه و یا رنگدانه می‌نامند.
- این نوع مولکول‌ها به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند:
- کلروفیل‌ها Chlorophyll
- کاروتنوئیدها Carotenoid
- فیکوبیلین‌ها Phycobilin

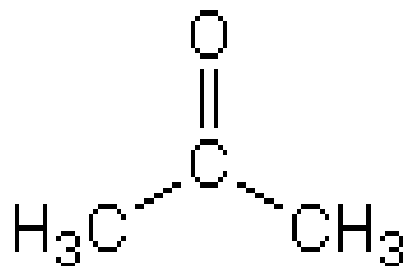
## کلروفیل‌ها:

- در حدود ۱۰ نوع کلروفیل تاکنون شناسایی شده است که مهمترین آنها کلروفیل a ، کلروفیل b ، کلروفیل c ، کلروفیل d و باکتريوکلروفیل می باشند.
- اسکلت مولکولی کلیه کلروفیل‌ها یکسان است و تفاوت‌ها فقط در برخی شاخه‌های جانبی دیده می‌شود.
- تمامی این مولکول‌ها از چهار حلقه پیرول و یک اتم منیزیم تشکیل شده‌اند که مجموعاً بخش پورفیرین نامیده می‌شود. این قسمت هیدروفیل یا به عبارتی آبدوست می باشد. بر روی یکی از این حلقه ها زنجیره ۲۰ کربنی قرار دارد که فیتول نام دارد و آبگریز می باشد. کلروفیل c فاقد این بخش است.
- مولکول کلروفیل به واسطه بزرگ بودن و جدا بودن دو بخش قطبی و غیرقطبی آن اصطلاحاً آمفی پاتیک نامیده می‌شود.

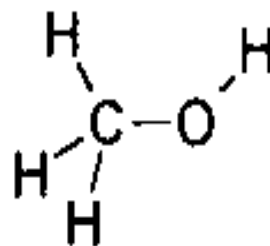


ساختار کلروفیل های a, b, c, d

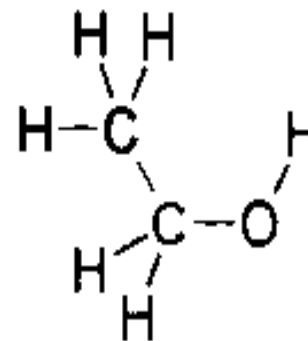
- این نوع مولکول‌ها در حلال غیرآلی مانند آب به راحتی حل نمی‌شوند و برای حل کردن آنها بایستی از حلال آلی استفاده نمود. حلال‌های مانند الکل، استون، تتراکلرور کربن، بنزن، اتر، اترنفت و بنزین مناسب هستند.



استون



متانول

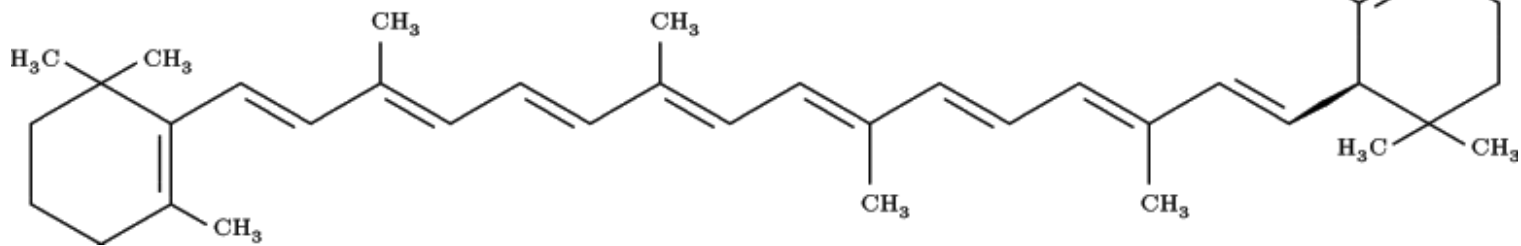


اتانول

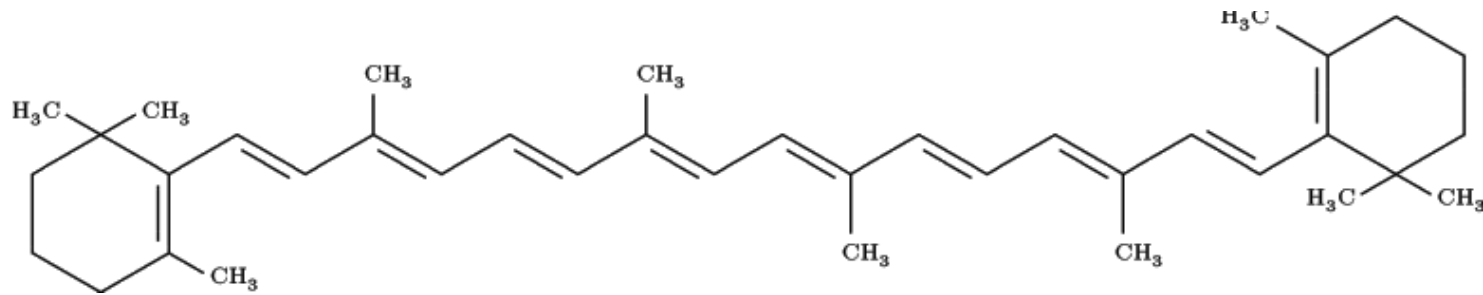


## کاروتنوئیدها:

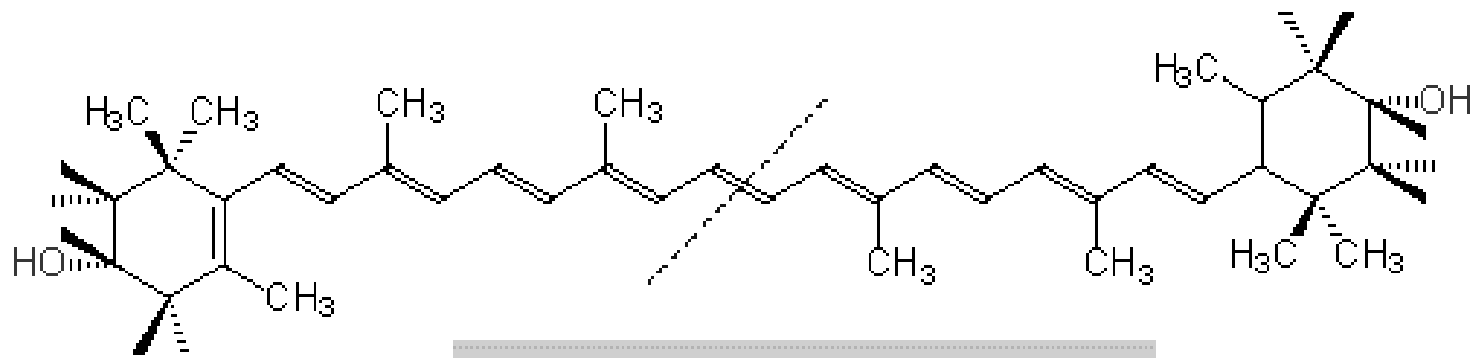
- کاروتنوئیدها مولکول‌های به رنگ‌های زرد، قرمز، قهوه‌ای، بنفش، نارنجی و ... می‌باشند و در دو گروه کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها طبقه‌بندی می‌گردند.
- کاروتن: مولکولی با فرمول شیمیایی  $C_{40}H_{56}$  است. مولکول آن خطی و نوعی ترپنوئید و در واقع لیپید می‌باشد. این مولکول غیر اشباع است و با توجه به محل قرار گرفتن پیوندهای دوگانه به انواع  $\alpha$  کاروتن،  $\beta$  کاروتن،  $\gamma$  کاروتن تقسیم می‌گردد.
- برای جدا کردن آن از بافت گیاهی بایستی از حلال آلی مانند اترنفت، الکل، استون استفاده نمود.
- گزانتوفیل: مولکولی با فرمول شیمیایی  $C_{40}H_xO_y$  است بنابراین نسبت به کاروتن اتم اکسیژن اضافه دارد. تعداد اکسیژن وارد شده در آن بستگی به پیوندهای دوگانه باز شده دارد. مولکول آن خطی و نوعی ترپنوئید و در واقع لیپید می‌باشد.
- برای جدا کردن آن از بافت گیاهی بایستی از حلال آلی مانند اترنفت، الکل، استون استفاده نمود. لیکوپین رنگیزه قرمز رنگ گوچه فرنگی از این گروه است.



$\alpha$  Carotene



$\beta$  Carotene



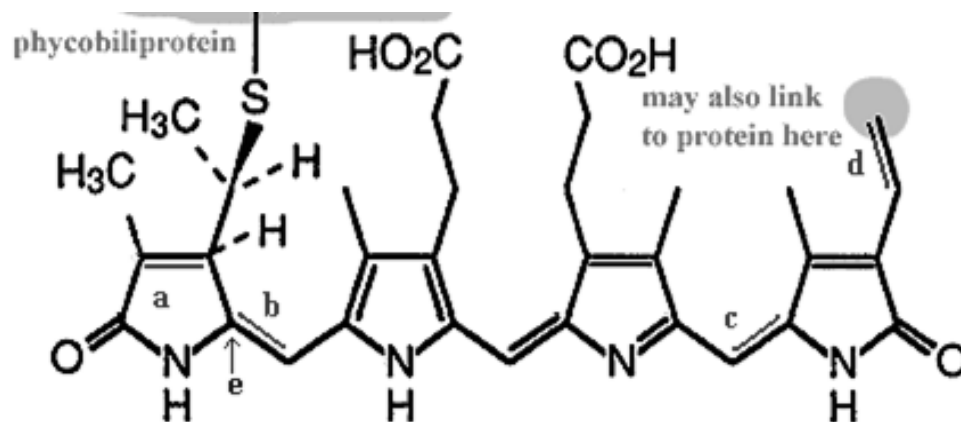
Lutein (Xanthophyll)



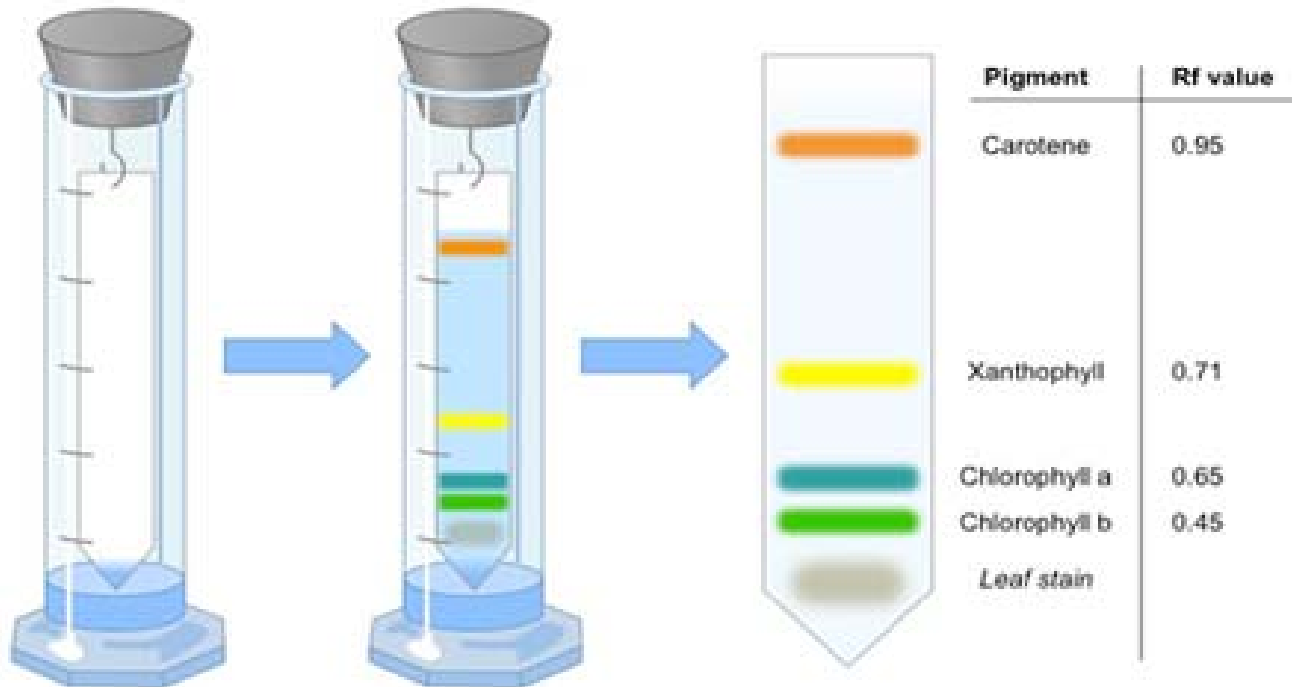


## فیکوبیلین:

- این رنگیزه یک نوع مولکول خطی متشکل از چهار حلقه پیرول پیوسته می‌باشد، که به بخش‌های پروتئینی غشاء تیلاکوئید اتصال دارد.
- در این گروه دو نوع رنگیزه اصلی شناسایی می‌شود: فیکوسیانین Phycocyanin (آبی)، فیکواریترین Phycoerythrin (قرمز)، فیکوسیانین در سیانوفیسه‌ها و فیکواریترین در جلبک‌های قرمز دیده می‌شوند.



- یکی از روش‌های جدا کردن رنگی‌های موجود در عصاره گیاه استفاده از تکنیک کروماتوگرافی کاغذی می‌باشد.
- در این روش کاغذ فاز ثابت و محلول داخل تانک کروماتوگرافی به عنوان فاز متحرک در نظر گرفته می‌شود.
- اجزاء موجود در عصاره در فاز متحرک حل شده و همراه حلال در طول کاغذ حرکت کرده و بر حسب وزن مولکولی و میزان حلالیت در حلال کروماتوگرافی در مناطقی از کاغذ برجایی می‌مانند.
- الگوی ترکیبات جدا شده روی کاغذ را کروماتوگرام گویند.
- در انتها می‌توان فاکتور ( $R_f$  (Rate of folwing) را برای هر یک از رنگی‌ها محاسبه نمود.
- $R_f$  در واقع نسبت بین فاصله‌ایی که رنگی‌ه طی کرده به فاصله‌ایی که حلال طی کرده است می‌باشد.



## مراحل آزمایش

- یک یا دو عدد پهنک برگ اسفناج را انتخاب کرده ، دمبرگ آنها را حذف نمایید.
- چنانچه برگ بالغ باشد و میزان رنگیزه بیشتری داشته باشد مناسبتر است.
- پهنکها قطعه قطعه شده و سپس در هاون چینی سائیده می شوند .
- پس از سائیده شدن پهنک برروی آن در حدود ۳ الی ۵ میلی لیتر استون ۸۰٪ اضافه کرده و سائیدن را ادامه دهید. در پایان بایستی محلول سبز رنگی درون هاون با حجمی در حدود ۵ میلی لیتر حاصل شود. این محلول بایستی برروی کاغذ کروماتوگرافی انتقال یابد.
- کاغذ کروماتوگرافی را به ابعاد ۲۰×۵ سانتی متر برش زده و سپس از لبه کاغذ ۲ سانتی متر رها کرده و با مداد خط مبدا را به صورت بسیار کم رنگ رسم کنید. این خط بایستی از پایین کاغذ ۲ سانتی متر و از کناره ها نیز ۵/۰ سانتی متر فاصله داشته باشد.
- به کمک لوله موئینه (لوله هماتوکریت) حجمی از عصاره را برداشته و برروی خط مبدا انتقال دهید.
- پس از خشک شدن آخرین عصاره منتقل شده کاغذ را به تانک کروماتوگرافی که درون آن محلول تتراکلرورکربن و سولفات سدیم ریخته شده انتقال دهید . پس از مشخص شدن طیف رنگیزه های مورد نظر برروی کاغذ، آن را از تانک خارج کرده و پس از خشک شدن کاغذ برای هریک از اجزاء تفکیک شده فاکتور  $R_f$  را محاسبه نمایید



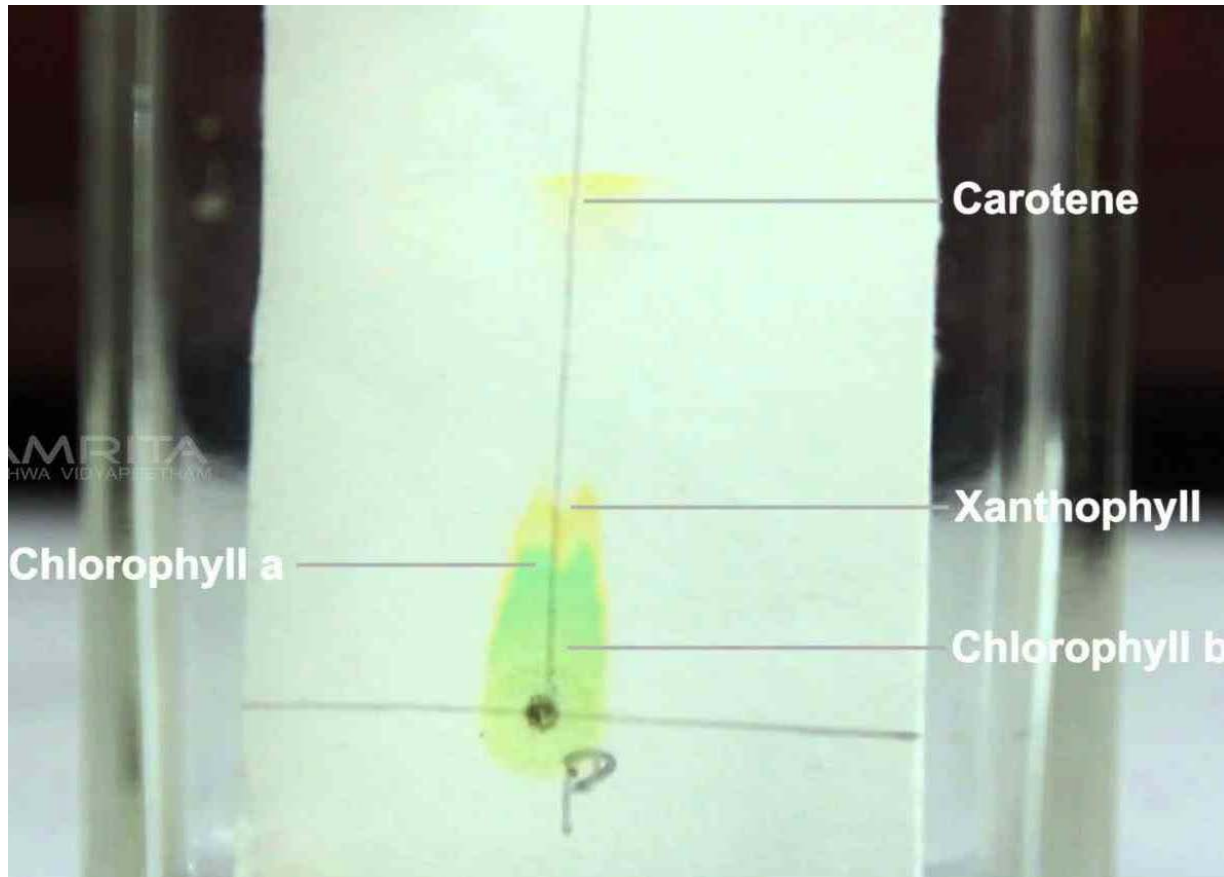
وسایل لازم جهت تهیه عصاره حاوی رنگدانه



ساییدن برگ در مجاورت حلال

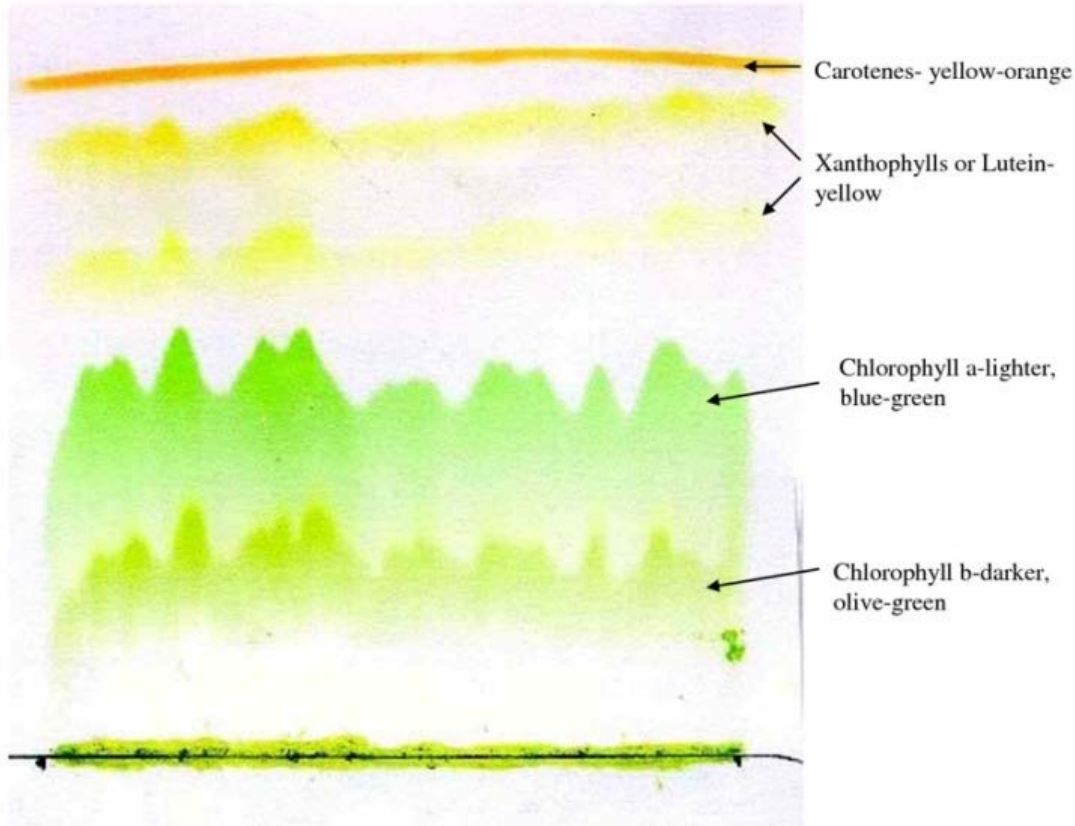


کروماتوگرام تهیه شده



نمونه گذاری به صورت نقطه ایی





تفکیک رنگدانه بر روی کروماتوگرام