



Figur 1 *Stromanthe sanguinea* Karmintopp eller tricolor

Miljövänlig kolonn för separation av bladfärdämnen

Med en enkel och miljövänlig kolonn kan man separera gula, gröna och röda bladpigment från extrakt från röda och gröna blad. Den stationära fasen är gjord av potatisstärkelse (potatismjöl). Som elueringsmedel används petroleumeter (p.eter), aceton och ev. vatten.

Med denna kolonn kan man separera β -karoten, xantofyller, klorofyller a och b samt flavonoider såsom de färgade antocyaniner. Separationen sker efter ämnenas olika fysikaliska och kemiska egenskaper. Föreningarnas lipofila och hydrofila egenskaper fås genom de icke-polära kolvätegrupper (-CH₂-) eller de polära kväve- och syregrupper (-OH, -CHO, =O). Föreningarna förekommer i bladens kloroplaster och spelar viktiga funktioner i fotosyntesen. Vissa blad har också betydande flavonoider innehåll. Till denna grupp hör antocyaniner som är effektiva antioxidanter i vackra röda/lila färger.

Material: Karmintopp eller annan växt med både rött och grönt inslag, petroleumeter (p.eter 40-60°C), aceton eller etanol. 10 cm³ spruta, glasull, provrör, pipetter. För extrauppgift till TLC kärl och elueringsfas av p.eter:aceton (90:10)

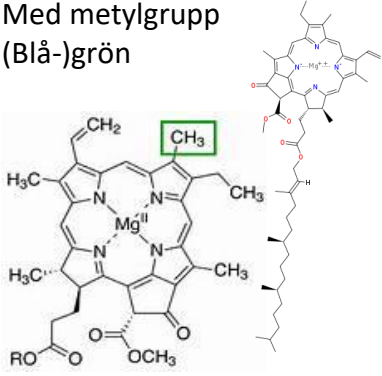
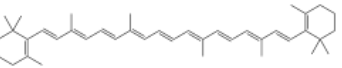
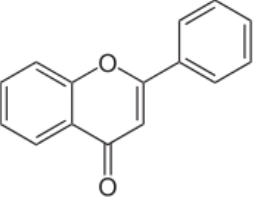
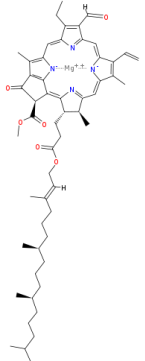
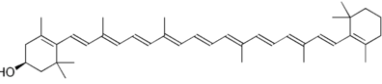
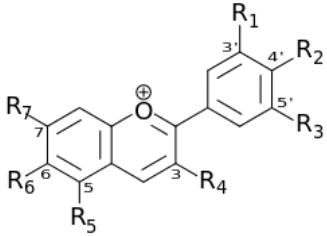
Utförande:

1. **Växtextrakt:** Ca 2 g röd och grönfärgade blad klipps med sax och krossas med ca 5 g sand i en mortel med pistong.
2. Bladpigmenten extraherades med ca 5 cm³ aceton. Dekantera över vätskan till en e-kolv/bägare. Det gör inget om lite materiel kommer över, ty allt ska filtreras senare.
3. Tillsätt ca 5 cm³ p.eter och mortla igen. Pressa ut all vätska och hålls ihop p.eter med acetonextraktet.
4. Behandlades sedan extraktet med ett torkmedel (kökssalt eller vattenfritt natriumsulfat). Låt stå ca 3–5 min. Saltet tas bort genom filtrering. Indunsta försiktigt extraktet till nästan torrhet över varmvatten eller på svag värmeplatta.
5. Tillsätt ca 0,5 tsk potatisstärkelse som adsorptionsmedel till det indunstade extraktet. Detta leder till ett (nästan) fast extrakt som kan appliceras direkt på kolonnen.
6. **Tillverkning av en kolonn** . Sätt lite glasull i botten på en engångsspruta på 10 cm³. Packa sedan sprutan med potatismjöl till 5–7 cm³ på sprutan.(Ju mer potatismjöl desto bättre separation men tar längre tid!)
7. Sätt sprutan i ett stativ eller häng den i ett passande provrör. Fukta igenom kolonnen och tvätta rent genom att låta några cm³ p.eter rinna igenom. Kontrollera samtidigt att kolonnen är tät och inte läcker potatismjöl.
8. Det fasta torkade extraktet applicerades jämt på toppen av kolonnen. Jämna ut ytan.

9. Tillsätt liten mängd p.eter och låt det gå ner i kolonnen så att extraktet sjunker ner i potatisstärkelsen. Tillsätt mera p.eter och börja eluera ut kolonnen. Samla upp små fraktionerna i provrör. Byt provrör ofta och efter färg. Dropphastigheten regleras med höjden på elueringsmedlet.
10. När den gula färgen har eluerats ur kolonnen, ökas andelen polärt elueringsmedel genom att tillsätta lite aceton i elueringsmedel till förhållande p.eter:aceton (ca 25:75).
11. När sedan de mindre polära pigment (gröna färgerna) har eluerats ut, tillsätt då endast aceton. Observera om något rött band kommer ut med aceton.
12. För att till slut eluera ut alla antocyaniner används vatten eller etanol som elueringsmedel. Färgen på antocyaninerna kan då ändras till färglös, blå eller grön. Antocyaninerna identifieras sedan genom att ta ut ett delprov och tillsätta några droppar stark HCl (2–5 M). Antocyaninerna bildar röda färger i sur miljö. Testa även att tillsätta en stark bas. Antocyanider ändrar färg till grön eller blå.
13. Identifiera de gul-orangea karotenoider, de gröna klorofyllerna med hjälp av färg och när de kommer ur kolonnen. Antocyaniner identifieras genom färgförändringen vid tillsats av en droppe 5 M HCl.

Extra uppgift: De uppsamlade fraktionernas renhet kan kontrolleras med tunnskittskromatografi TLC, med mobil fas p.eter:aceton (90:10)

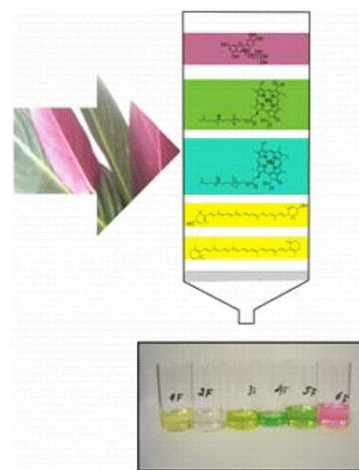
Pigmenten identifierades genom deras karakteristiska färger och polaritet

<i>Porfyrin</i>	<i>Karoteniod</i>	<i>Flavonoid</i>
<p>Klorofyll A Med metylgrupp (Blå-)grön</p> 	<p>Betakaroten förstadium till vit A Gula</p> 	<p>Grundskelett till flavonoid ingår i vit B₂ riboflavin</p> 
<p>Klorofyll b med aldehydgrupp (Gul-)grön</p> <p>-CHO</p> 	<p>Xantofyll innehåller syre Gula</p> 	<p>Grundskelett till antocyaniner</p> 
	<p>Kan även vara orangea och röda</p>	<p>Kan vara röda, blå lila och magenta. Ändrar färg i sur och basisk miljö</p>

Till läraren: laborationen ger ett utmärkt tillfälle att presentera grunderna för kromatografi, mobil och rörlig fas samt eluering. Diskutera begrepp såsom struktur, lipofil och hydrofil, polaritet, intermolekylära krafter och koppla detta till löslighet. Vikten av en gradvis ökning av polariteten hos elueringsmedlen som förs in, liksom begreppet adsorption.

Resultat: Gula och gröna band separerades på kolonnen med petroleumeter. Antocyaniner, de vattenlösliga pigmenten, adsorberas starkt på den neutrala stärkelsen och kan lätt identifieras genom sin rosafärgning. Vid tillsats av syra ändras antocyanider till blå eller gröna i bas. Starka vätebindningar bildas mellan stärkelsen och de hydroxyl-rika antocyaniner. Karotenoider och klorofyller, de lipofila pigment förflyttades i olika takt med petroleumeter. Gröna klorofyller rör sig långsammare än de mindre polära gula karotenoider. Fytylkedja av kolväte i klorofyllerna är löslig i p.eterfasen. Polära kväven och syren i de funktionella grupperna har en betydande adsorption i kolumnen. De gula karotenoider flyttas alltså snabbare än klorofyller. Den högre lösligheten av karotenoider i petroleumeter beror på dominansen av kolvätekedjor i deras strukturer. I potatisstärkelse kolumnen eluerades den opolära β -karoten ut först, medan xantofyller hålls kvar längre i stärkelse på grund av närvaron av syre som polär grupp.

Ren p.eter separerade ut tre väldefinierade band ut av gul (xantofyller), blå-grön (klorofyll a), och gul-grön (klorofyll b). Klorofyll b flyttade sig långsammare än klorofyll a på grund av närvaron av den mer polära aldehydgruppen och behövde ökad polaritet genom aceton för att snabbare komma ut. Genom att ytterligare öka polariteten med aceton kunde ev. någon mer opolär förening i gruppen antocyaniner elueras. Prova gärna även med ren etanol. Snabbast eluerades alla antocyaniner med vatten. Dropphastigheten sjönk dock något med vatten.



Figur 2 Schematisk separation av bladfärgämnen

Växtextraktet kan förvaras vid 8° C och skyddas från fukt och ljus, men separationskolonnen session bör utföras inom de närmaste 2–4 dygn.

Vi på KRC provade på blodbok, berberisblad med rött inslag och alunrot. Blodboken innehöll väldigt lite klorofyll men mycket av minst två vackert röda antocyaniner med olika separationsegenskaper. Alunroten innehåll mer balanserat mängd med olika pigment. Med berberisbladen extraherades antocyaninerna ut med etanol. V måste erkänna att vi fick inte riktigt denna fina separation som bilden visade. Låt eleverna ta olika blad och se skillnaderna.

Vi har provat på att använda en 5 cm³ spruta och det fungerar och går naturligtvis fortare. Dock krävs en bra labteknik varför vi rekommenderar 10 cm³ för skolbruk. Låt det bli en öppen laboration där eleverna får prova sig fram.

TLC separerar bra för klorofyll, xantofyll och karoten men antocyaniner vandrar inte alls i p.eter:aceton systemet. Dessa identifieras med färgändring i syra.

Riskbedömningsunderlag:

Petroleumeter kp 80–100: Brandfarligt, Hälsoskadligt, Utropstecken, Miljöfarligt
H225, H304, H336, H411, får hudsprickor vid kontakt och P280, P210, P301+P310, P331,
P304+P340, P312

Aceton: Brännbart, Utropstecken, Fara, H225, H319, H336, EUH066 och P 210, P240, P261,
P280, P305+P351+P338

Etanol: Brännbart, Fara, H225 och P233, P240, P241, P242, P243, P280

Saltsyra: Frätande, Fara, H314, H335 och P260, P261, P264, P271, P301+P330+P331(ej
kräkning), P405

Övrigt: Omarbetat från :J. Chem. Educ., **2015**, 92 (1), pp 189–192