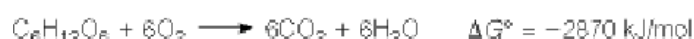


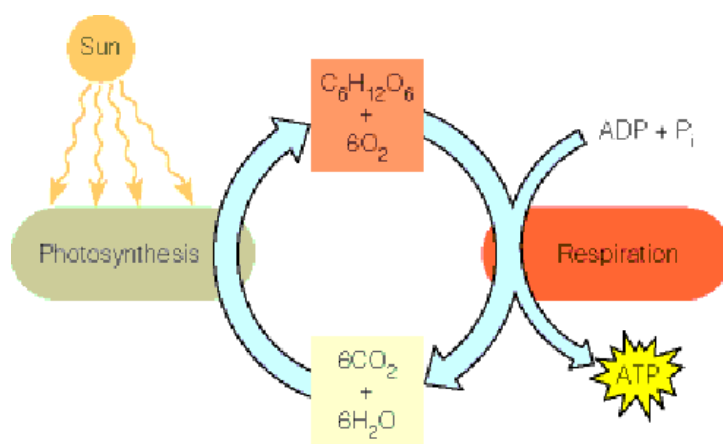
Πείραμα 5^ο : Απομόνωση και χαρακτηρισμός φυτικών χρωστικών (χλωροφύλλες, καροτενοειδή και ανθοκυανίνες) - Στοιχεία θεωρίας

I. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ - ΓΕΝΙΚΑ

Οι τρόποι με τους οποίους οι οργανισμοί απορροφούν και αποθηκεύουν με τη μορφή του ATP, ένα σημαντικό μέρος της ενέργειας που απελευθερώνεται από την οξείδωση των υδατανθράκων έχουν ήδη παρουσιαστεί λεπτομερώς. Χρησιμοποιώντας τη γλυκόζη ως παράδειγμα έχουμε:

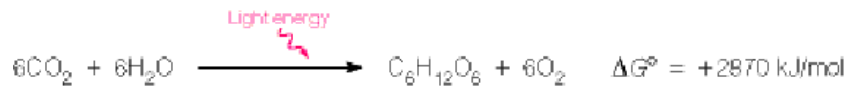


Όμως είναι προφανές ότι η ζωή δεν μπορεί να στηρίζεται στον οξειδωτικό μεταβολισμό για την εξασφάλιση της ενέργειας που είναι απαραίτητη για τη διατήρησή της και κυρίως δεν μπορεί να διοχετεύει συνεχώς οργανικό άνθρακα στην ατμόσφαιρα με τη μορφή CO_2 . Η παραπάνω αντίδραση είναι μόνο το ένα μέρος του μεγάλου κύκλου ενέργειας - άνθρακα στη φύση (Εικόνα 1):



ΕΙΚΟΝΑ 1: Ο κύκλος του άνθρακα στη φύση

Μια διαδικασία «αντίστροφη» της οξείδωσης των υδατανθράκων πραγματοποιείται από φυτά, φύκη και ορισμένους μικροοργανισμούς, χρησιμοποιώντας ενέργεια από το ηλιακό φως για να εξασφαλίσουν τα τεράστια ποσά ενέργειας που απαιτούνται για την πραγματοποίησή της:



Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **φωτοσύνθεση** και ο ρόλος που διαδραματίζει όσον αφορά τη διατήρηση της ζωής είναι προφανής:

- Παρέχει υδατάνθρακες για την παραγωγή ενέργειας σε φυτά και ζώα.
- Είναι το κύριο μονοπάτι μέσω του οποίου ο άνθρακας επιστρέφει στη βιόσφαιρα.
- Είναι η κύρια πηγή οξυγόνου και εμπλουτισμού της γήινης ατμόσφαιρας στο στοιχείο αυτό.

Σήμερα γνωρίζουμε πλέον ότι η φωτοσύνθεση αποτελεί την πρωταρχική πηγή ενέργειας σχεδόν για όλες τις μορφές ζωής και πραγματοποιείται σε φυτά, φύκη και πολλούς προκαρυωτικούς οργανισμούς – τα παραπάνω αποτελούν πηγή τροφής για όλους τους υπόλοιπους οργανισμούς.

II. ΟΙ ΒΑΣΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΗΣ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗΣ

Η γενική αντίδραση της φωτοσύνθεσης όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως είναι φυσικά υπεραπλουστευμένη αφού είναι φυσικό η διεργασία αυτή να περιλαμβάνει και άλλα ενδιάμεσα στάδια. Επιπλέον, η εξόξυ δεν είναι ο μοναδικός υδατάνθρακας που παράγεται. Συνεπώς, μια πιο γενική μορφή της φωτοσυνθετικής αντίδρασης είναι η εξής:



όπου $[\text{CH}_2\text{O}]$ είναι ένας οποιοσδήποτε υδατάνθρακας.

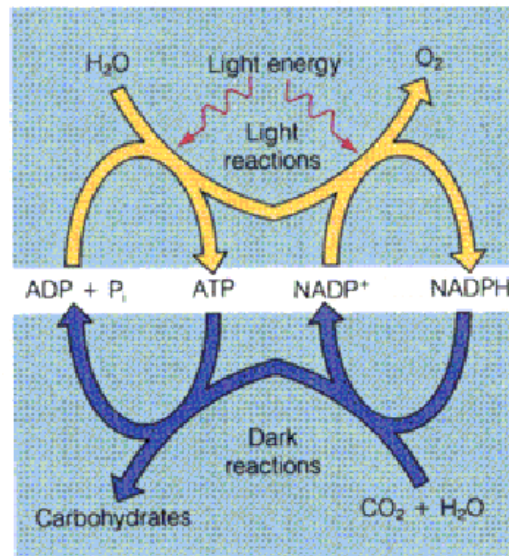
Επειδή η καύση των υδατανθράκων και ο σχηματισμός CO_2 , είναι μια οξειδωτική διαδικασία, η μετατροπή του CO_2 σε υδατάνθρακες περιλαμβάνει την αναγωγή του άνθρακα. Στην παραπάνω αντίδραση, το H_2O είναι ο αναγωγικός παράγοντας, πράγμα που ισχύει για τα φυτά, τα περισσότερα φύκη και τα κυανοβακτήρια. Όμως ένας σημαντικός αριθμός βακτηριδίων χρησιμοποιεί διαφορετικά αναγωγικά κατά τη φωτοσυνθετική διαδικασία. Επομένως μια γενικότερη (και σωστότερη) διατύπωση της παραπάνω εξίσωσης είναι η εξής:



όπου H_2A είναι ένα γενικό αναγωγικό και A είναι το οξειδωμένο προϊόν.

Πειράματα τα οποία ξεκίνησαν από το 1930 (C.B. van Neil) οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το οξυγόνο που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης προέρχεται από το H_2O και όχι από το CO_2 .

Σε καμία περίπτωση όμως δεν πρέπει να θεωρήσουμε ότι το ηλιακό φως αυτόματα οδηγεί στην αναγωγή του CO_2 από το H_2O . Η διαδικασία που παρουσιάζεται συνοπτικά στην παραπάνω αντίδραση χωρίζεται σε δυο επιμέρους διαδικασίες σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς (Εικόνα 2):



ΕΙΚΟΝΑ 2: Οι δυο επιμέρους διαδικασίες της φωτοσύνθεσης

Κατά τη διάρκεια της πρώτης υποδιαδικασίας, σε μια σειρά βημάτων που ονομάζονται **φωτεινές αντιδράσεις**, ενέργεια από το ηλιακό φως χρησιμοποιείται για τη φωτοχημική οξείδωση του νερού. Η διαδικασία αυτή εξυπηρετεί δυο σκοπούς:

Ο οξειδωτικός παράγοντας $NADP^+$ ανάγεται σε $NADPH$ παράγοντας αναγωγικά ισοδύναμα και το νερό οξειδώνεται σε O_2 .

Ένα μέρος της ηλιακής ενέργειας <<δεσμεύεται>> μέσω της φωσφορυλίωσης του ADP και της μετατροπή του σε ATP - μια διαδικασία γνωστή ως φωτοφωσφορυλίωση.

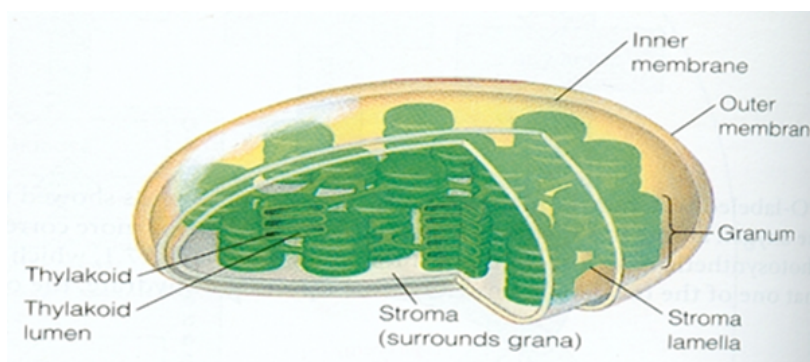
Κατά τη διάρκεια της δεύτερης υποδιαδικασίας, σε μια σειρά βημάτων που ονομάζονται **σκοτεινές αντιδράσεις**, το $NADPH$ και το ATP που έχουν παραχθεί κατά τη διάρκεια των φωτεινών αντιδράσεων χρησιμοποιούνται στην αναγωγική σύνθεση των υδατανθράκων από CO_2 και H_2O . Οι αντιδράσεις αυτές ονομάστηκαν σκοτεινές απλά για να δοθεί έμφαση στο γεγονός ότι δε χρειάζονται την άμεση συμμετοχή της

ηλιακής ενέργειας και δε σημαίνει σε καμία περίπτωση ότι πραγματοποιούνται μόνο στο σκοτάδι.

III. ΟΙ ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΕΣ

Η φωτοσυνθετική διαδικασία στα ανώτερα φυτά και φύκη πραγματοποιείται σε συγκεκριμένα οργανίδια του κυττάρου που ονομάζονται χλωροπλάστες (Εικόνα 3). Στα φυτά, οι περισσότεροι από τους χλωροπλάστες απαντώνται στα κύτταρα που βρίσκονται ακριβώς κάτω από την επιφάνεια του φύλλου (κύτταρα του μεσόφυλλου). Κάθε κύτταρο περιέχει περίπου 20 με 30 χλωροπλάστες. Η φυσιολογία των οργανιδίων αυτών μοιάζει μ' εκείνη των μιτοχονδρίων. Η εσωτερική μεμβράνη περικλείει μια «διπλωμένη» εσωτερική μεμβράνη, τα **θυλακοειδή** (Εικόνα 3). Η σύνθεση των μεμβρανών αυτών είναι μάλλον ασυνήθιστη. Περιέχουν μονάχα ένα μικρό ποσοστό φωσφολιπιδίων αλλά είναι πλούσιες σε γλυκολιπίδια. Περιέχουν επίσης πολλές πρωτεΐνες και κάποιες από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι συνδεδεμένες με ορισμένες από αυτές. Άλλες φωτοσυνθετικές χρωστικές, όπως οι χλωροφύλλες a και b δεν είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες αλλά αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες.

Ο διαχωρισμός των αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης μέσα στο χλωροπλάστη είναι απλός. Η απορρόφηση του φωτός και όλες οι φωτεινές αντιδράσεις πραγματοποιούνται μέσα ή πάνω στις θυλακοειδείς μεμβράνες. Το ATP και το NADPH που παράγονται από τις αντιδράσεις αυτές απελευθερώνονται στο stroma όπου και πραγματοποιούνται όλες οι συνθετικές σκοτεινές αντιδράσεις.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Σχηματικό διάγραμμα χλωροπλάστη

IV. Η ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ

Για να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός δέσμευσης και χρήσης της ηλιακής ενέργειας, θα αναφέρουμε περιληπτικά λίγα λόγια για τη φύση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Το φως (και όλες οι άλλες μορφές ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας) έχει δυο μορφές: κυματική και σωματιδιακή. Μπορούμε να χαρακτηρίσουμε ένα συγκεκριμένο είδος ακτινοβολίας αναφέροντας το μήκος κύματος (λ) ή τη συχνότητά της (ν). Οι παράμετροι αυτές χαρακτηρίζουν την κυματική φύση του φωτός. Εάν κύματα με μήκος λ περνάνε από το σημείο παρατήρησης με ταχύτητα c , τότε ο αριθμός των κυμάτων που περνούν από το συγκεκριμένο σημείο ανά δευτερόλεπτο είναι η συχνότητα, ν . Επομένως

$$\nu = c/\lambda$$

όπου c είναι η ταχύτητα του φωτός, 2.99×10^8 m/s.

Όμως για να μπορέσουμε να καταλάβουμε πως είναι δυνατό να αποκομίσουμε ενέργεια από το φως, είναι απαραίτητο να λάβουμε υπόψη μας τη σωματιδιακή φύση του. Πρέπει να φανταστούμε τη δέσμη φωτός σαν μια ροή φωτεινών σωματιδίων ή **φωτονίων**. Κάθε φωτόνιο συνδέεται με μια μονάδα ενέργειας που ονομάζεται **quantum**. Η ενεργειακή αξία ενός quantum- με άλλα λόγια η ενέργεια ανά φωτόνιο- συνδέεται με τη συχνότητα του φωτός με μια από τις βασικότερες σχέσεις της φυσικής, το νόμο του Planck:

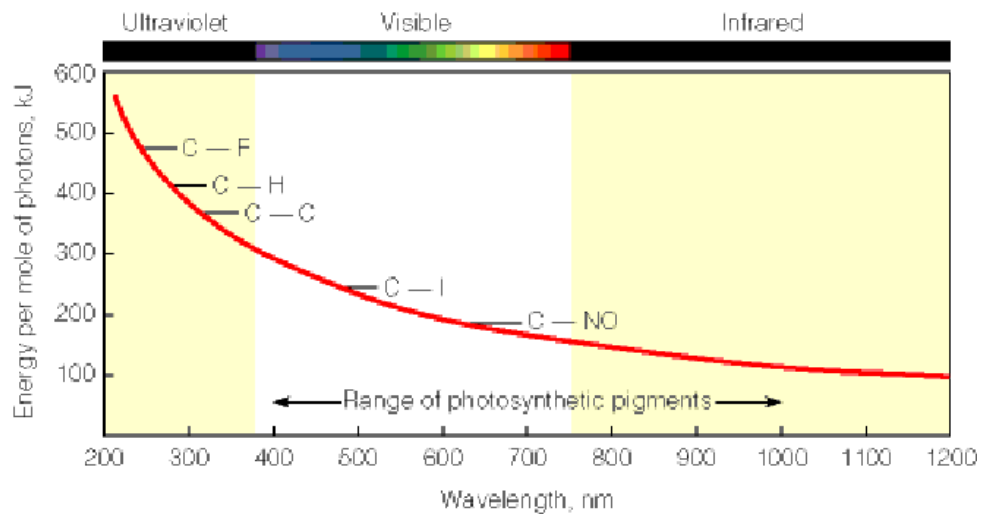
$$E = h\nu$$

όπου h είναι η σταθερά του Planck, 6.6×10^{-34} J s.

Οι βιοχημικοί σπάνια κάνουν χρήση του όρου <<φωτόνια>>. Ενδιαφέρονται κυρίως για το πώς η ακτινοβολία προάγει χημικές ή βιοχημικές διαδικασίες, οι οποίες συνήθως εκφράζονται σε μοριακή βάση, οπότε η πιο κατάλληλη μονάδα για το σκοπό αυτό είναι η **ενέργεια ενός μορίου** (6.023×10^{23}) **φωτονίων**. Ένα mole φωτονίων ονομάζεται **einstein**.

Η διαδικασία της φωτοσύνθεσης εξαρτάται κυρίως από την ακτινοβολία που αντιστοιχεί στην περιοχή του ορατού και του εγγύς υπέρυθρου (Εικόνα 4). Αν σκεφτούμε με βάση την ενέργεια των φωτονίων, τότε μιλάμε για την περιοχή ανάμεσα στο σπάσιμο των ομοιοπολικών δεσμών και της ενεργοποίησης των μοριακών δονήσεων. Τα φωτόνια στο ορατό και το κοντινό υπέρυθρο δεν προκαλούν ιδιαίτερες καταστροφές στους μοριακούς δεσμούς, αλλά μπορούν να προκαλέσουν μεταπτώσεις

στις ηλεκτρονικές καταστάσεις των οργανικών μορίων. Με άλλα λόγια μπορούν να κατευθύνουν αντιδράσεις ώστε να δεσμεύσουν ενέργεια σε χημική μορφή.



ΕΙΚΟΝΑ 4: Η ενέργεια ανά mole φωτονίων σε συνάρτηση με το μήκος κύματος

V. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Χλωροφύλλες και καροτενοειδή

Πολλά από τα χρώματα των ανώτερων φυτών (το πράσινο των φύλλων την άνοιξη και το καλοκαίρι, το κίτρινο ή το κόκκινο των φύλλων το φθινόπωρο, το πορτοκαλί χρώμα στα καρότα, διάφορα χρώματα στα πέταλα των λουλουδιών) οφείλονται στην παρουσία συγκεκριμένων μορίων που ονομάζονται *χρωστικές*. Ο όρος χρωστική αναφέρεται σε κάθε ουσία που απορροφά ορατό φως. Οι κυριότερες φωτοσυνθετικές χρωστικές των ανώτερων φυτών μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες, τις *χλωροφύλλες* και τα *καροτενοειδή*. Οι χρωστικές αυτές βρίσκονται στους χλωροπλάστες των φυτικών κυττάρων και συγκεκριμένα συνδέονται με πρωτεΐνες των θυλακοειδών (φωτοχημικά ενεργές φωτοσυνθετικές μεμβράνες). Τα μόρια των χρωστικών αλληλεπιδρούν με αυτά των πρωτεϊνών με ασθενείς, μη ομοιοπολικούς δεσμούς σχηματίζοντας σύμπλοκα τα οποία μπορούν να απομονωθούν από τους χλωροπλάστες σε λειτουργική μορφή και να χαρακτηριστούν με SDS-PAGE και ισοηλεκτρική εστίαση. Επιπλέον, οι χρωστικές μπορούν να απομακρυνθούν από τις πρωτεΐνες με διαλυτοποίηση (άλεση) του φυτικού ιστού σε ακετόνη ή μεθανόλη. Εφόσον οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή διαλυτοποιούνται εύκολα σε οργανικούς διαλύτες, από χημικής πλευράς, κατατάσσονται στα λιπίδια.

Οι χρωστικές που βρίσκονται στα φυτά σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι οι χλωροφύλλες **a** και **b** οι οποίες είναι σε αναλογία (**a:b**) περίπου **3:1**. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, οι χλωροφύλλες (πράσινες χρωστικές) αποτελούνται από τέσσερις πυρρολικούς δακτύλιους, που ενώνονται με ένα άτομο Mg στο κέντρο και μια μακριά λιπιδική «ουρά», τη φυτόλη. Αυτή η υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα υδρογονανθράκων ευθύνεται για τη διαλυτότητα των χλωροφυλλών σε μη πολικούς διαλύτες. Η μόνη διαφορά μεταξύ χλωροφύλλης a και b εντοπίζεται στη θέση 3 του δακτυλίου 3^ο η χλωροφύλλη a έχει μια μεθυλομάδα ενώ, η χλωροφύλλη b έχει μια αλδεϋδομάδα.

Οι χλωροφύλλες απορροφούν φως στο κυανό (450nm) και στο ερυθρό (650-700nm) τμήμα του ορατού (Εικόνα 6). Η απορρόφηση του φωτός έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση ενός ηλεκτρονίου στο μόριο της χλωροφύλλης παρέχοντας έτσι την ενέργεια για την έναρξη της φωτοσυνθετικής διαδικασίας που παράγει NADH και ATP. Η ενέργεια που αποθηκεύεται στα μόρια αυτά χρησιμοποιείται τελικά για τη βιοσύνθεση των υδατανθράκων από το φυτό.

Η δεύτερη ομάδα των φυτικών χρωστικών, τα καροτενοειδή, χωρίζεται σε δύο υποομάδες: (1) τα **καροτένια**, που περιλαμβάνουν μόνο άνθρακα και υδρογόνο και (2)

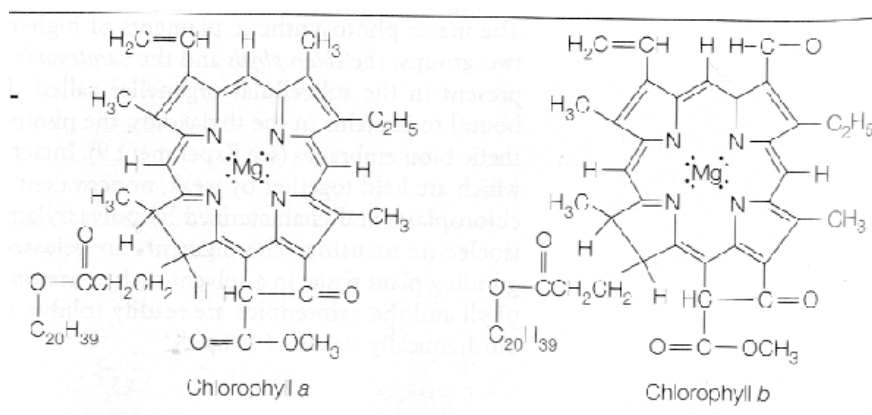
τις **ξανθοφύλλες**, που αποτελούνται από άτομα άνθρακα, υδρογόνου και οξυγόνου σε μορφή υδροξυλικών ή εποξικών ομάδων. Οι δομές των κυριότερων καροτενοειδών φαίνονται στην Εικόνα 7.

Η % κ.β. σύσταση των καροτενοειδών στα φυτά εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης του φυτού. Σε γενικές γραμμές τα ποσοστά έχουν ως εξής: β-καροτένιο 25-40%, λουτεΐνη 40-60%, βιολοξανθίνη 10-20%, και νεοξανθίνη 5-13%. Τα καροτενοειδή απορροφούν κυρίως τις ακτινοβολίες που ανήκουν στο κυανό και μεταξύ κυανού και πράσινου τμήματος του φάσματος (Εικόνα 8).

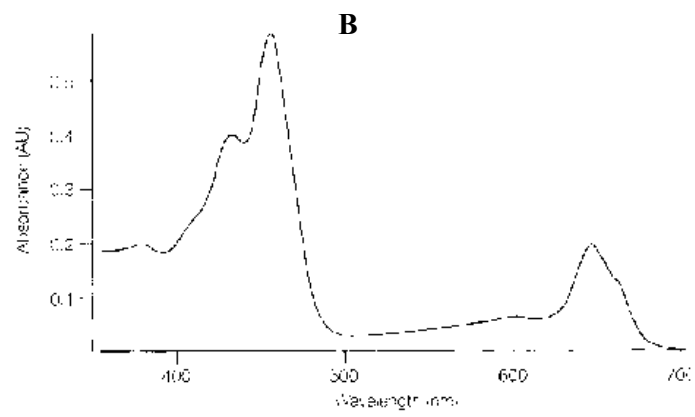
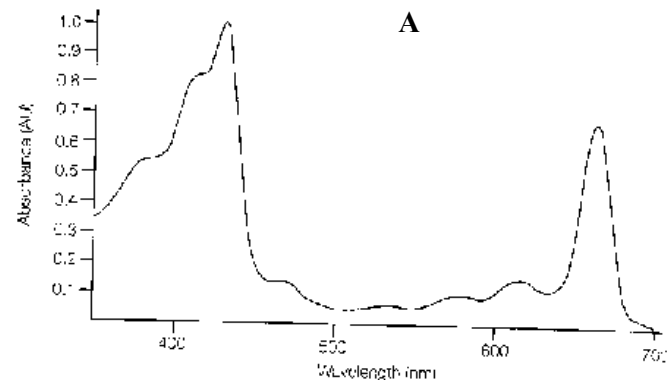
Ο ρόλος των καροτενοειδών δεν έχει ξεκαθαριστεί ακόμα όμως έχουν προταθεί δύο πιθανές λειτουργίες:

- i) Τα καροτενοειδή, και ιδιαίτερα οι ξανθοφύλλες, πιθανώς να παίρνουν μέρος στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Έχει αποδειχτεί ότι έπειτα από έκθεση σε φως, οι χρωστικές αυτές μπορούν να μεταφέρουν άμεσα την ενέργεια ενεργοποίησης σε μόρια χλωροφύλλης a.
- ii) Τα καροτένια πιθανόν να εμποδίζουν την φωτοοξειδωτική καταστροφή της χλωροφύλλης, μια διαδικασία που καταναλώνει οξυγόνο.

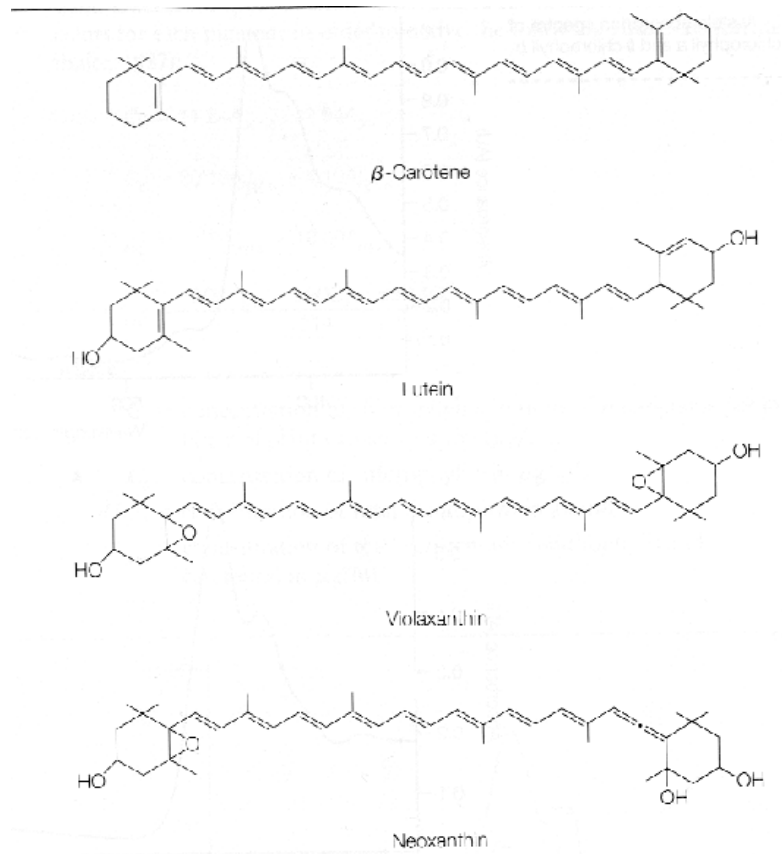
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι φωτοσυνθετικές χρωστικές παρουσιάζουν αυξημένη απορρόφηση σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (ή περιοχές) του ορατού. Εκτός από τη χρήση τους στην ταυτοποίηση των χρωστικών, τα φασματοσκοπικά αυτά δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των χρωστικών σε ένα φυτικό εκχύλισμα.



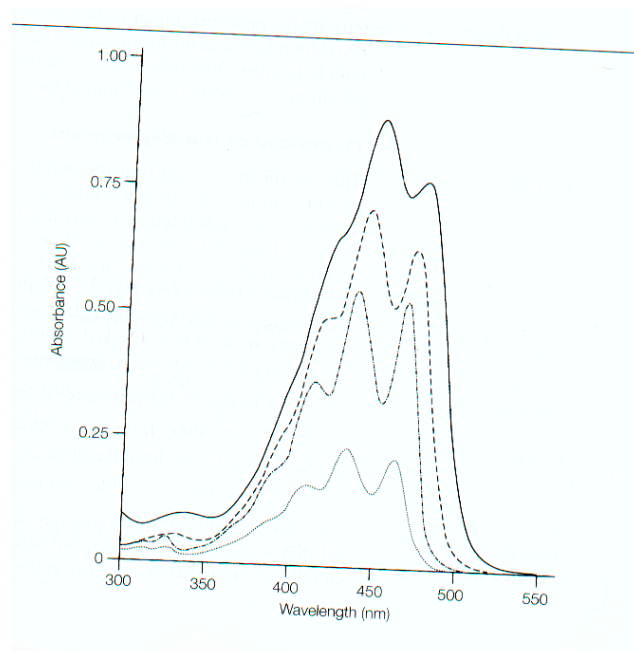
ΕΙΚΟΝΑ 5. Δομές των μορίων των χλωροφυλλών a και b.



ΕΙΚΟΝΑ 6. Φάσματα απορρόφησης ορατού της **(A)** χλωροφύλλης a και **(B)** Χλωροφύλλης b.



ΕΙΚΟΝΑ 7. Δομές των κυριότερων καροτενοειδών: β-καροτένιο, λουτεΐνη, βιολαξανθίνη, και νεοξανθίνη.



ΕΙΚΟΝΑ 8. Φάσματα απορρόφησης ορατού των τεσσάρων κυριότερων καροτενοειδών: β-καροτένιο (-), λουτεΐνη (--), βιολαξανθίνη (.-.), και νεοξανθίνη (...).

ΧΙ. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ

Γενικά

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το πώς τα μόρια της διαλυμένης ουσίας αλληλεπιδρούν με τη στατική (μη κινητή) φάση.

Στη **χρωματογραφία προσρόφησης** χρησιμοποιείται μια στατική φάση (π.χ. μια ρητίνη ιονανταλλαγής), η οποία διαθέτει στην επιφάνειά της ένα συγκεκριμένο αριθμό ειδικών θέσεων δέσμευσης για τα μόρια της διαλυμένης ουσίας. Η δέσμευση των μορίων οφείλεται σε διάφορους τύπους ελκτικών δυνάμεων όπως υδρόφοβες ή ιονικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου κ.τ.λ. Η ακινητοποίηση των μορίων που μας ενδιαφέρουν πάνω στη στατική φάση πρέπει φυσικά να είναι αντιστρεπτή.

Η **χρωματογραφία κατανομής** σχετίζεται με τη διαφορική κίνηση διαλυμένων ουσιών ως αποτέλεσμα της κατανομής τους σε δυο διαφορετικούς διαλύτες. Ένας διαλύτης, η στατική φάση, πλένεται διαδοχικά με μια κινητή φάση με τέτοιο τρόπο ώστε οι διαλυμένες ουσίες να κατανέμονται ή να χωρίζονται σε διαφορετικές περιοχές με τη διαδοχή των διαλυτών.

Στην πραγματικότητα δεν υπάρχουν σαφή όρια μεταξύ των δύο παραπάνω μεθόδων. Όλοι οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί βασίζονται κατά κάποιο τρόπο, σε διαδικασίες προσρόφησης. Όμως, σε ορισμένα είδη χρωματογραφίας (χάρτου, λεπτής στοιβάδας, αέρια) οι συγκεκριμένες προσροφητικές διαδικασίες περιορίζονται στο ελάχιστο και ο διαχωρισμός βασίζεται κυρίως σε μη ειδικούς παράγοντες διαλυτότητας. Εξαιτίας των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων που επικρατούν στις παραπάνω κατηγορίες χρωματογραφίας, επιλέγεται η πιο κατάλληλη ανάλογα με τη φύση του διαχωρισμού που έχουμε. Η χρωματογραφία κατανομής είναι περισσότερο αποτελεσματική για τον διαχωρισμό μικρών μορίων όπως αμινοξέα, υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα. Οι τεχνικές προσρόφησης (όπως η χρωματογραφία ιονανταλλαγής) εφαρμόζονται κυρίως στον διαχωρισμό μακρομορίων όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα.

Χρωματογραφία χάρτου

Οι χρωματογραφίες χάρτου και λεπτής στοιβάδας λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο. Αυτά τα συστήματα συνήθως χρησιμοποιούν ένα κορεσμένο διάλυμα ενός μη πολικού διαλύτη (π.χ. βουτανόλη) σε ένα πιο πολικό διαλύτη (π.χ. νερό). Καθώς το μίγμα αυτό προχωρά επάνω στο χαρτί ή στη λεπτή στοιβάδα, το πολικό συστατικό του μίγματος (νερό στο παράδειγμά μας) απορροφάται στο υλικό (κυτταρίνη στο παράδειγμα του

χαρτιού) ώστε να γίνει χιλιάδες μικρές σταγόνες στατικής φάσης. Αυτά τα προσκολλημένα σταγονίδια, πλένονται διαδοχικά από τον μη πολικό διαλύτη (κινητή φάση, βουτανόλη) ώστε να γίνεται μια κατανομή αντίθετου ρεύματος σε μικροκλίμακα ή χρωματογραφία κατανομής.

Στις χρωματογραφίες χάρτου και λεπτής στιβάδας (TLC) η ουσία ή το μίγμα των ουσιών τοποθετείται σε διάλυμα, κατά μήκος μιας γραμμής βάσης πάνω σε ένα φύλλο χαρτιού (χρωματογραφία χάρτου) ή σε μια λεπτή στιβάδα κοκκοποιημένου ξηρού υλικού επάνω σε μια γυάλινη πλάκα ή πλαστικό φιλμ (χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, TLC). Το χαρτί ή η πλάκα στεγνώνει στον αέρα και ένα κατάλληλο μίγμα διαλυτών αφήνεται να προχωρήσει και να περάσει από την κηλίδα ή γραμμή των εναποτιθέμενων ουσιών. Αυτό γίνεται, είτε καθοδικά για ένα φύλλο χαρτιού, λόγω τριχοειδών φαινομένων και βαρύτητας (χρωματογραφία χάρτου) είτε ανοδικά, λόγω τριχοειδών φαινομένων (χρωματογραφία χάρτου και λεπτής στιβάδας).

Η ανάπτυξη των παραπάνω χρωματογραφημάτων διαρκεί 1-24 ώρες εξαρτώμενη από μεταβλητές όπως το πάχος της στατικής φάσης, την επιλογή των διαλυτών, τη θερμοκρασία κ.τ.λ. Η απόσταση που διατρέχει κάθε ουσία από την αρχή ή γραμμή βάσης, ως προς το μέτωπο του διαλύτη ορίζεται ως R_f :

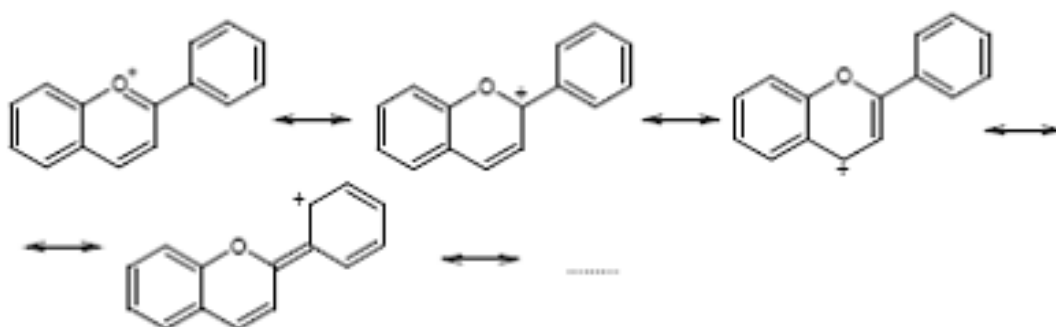
$$R_f = \frac{\text{απόσταση της ουσίας από τη γραμμή βάσης (τοποθέτησης)}}{\text{απόσταση του διαλύτη από τη γραμμή βάσης}}$$

Κάθε ουσία έχει μια τιμή R_f που μετρείται κάτω από ορισμένες συνθήκες (διαλύτες, θερμοκρασία, τύπος ανάπτυξης-ανερχόμενη ή κατερχόμενη, χρωματογραφικό υλικό - TLC ή χαρτί). Επειδή παρεμβαίνουν τόσες μεταβλητές η τιμή R_f μιας ουσίας είναι μόνο μία κατά προσέγγιση ένδειξη της ταυτότητάς της. Γι' αυτό, κοινή πρακτική για να χρωματογραφήσουμε ένα μίγμα στο οποίο περιέχεται μια γνωστή ουσία είναι να χρωματογραφήσουμε μαζί και ένα δείγμα καθαρής ουσίας για αναφορά.

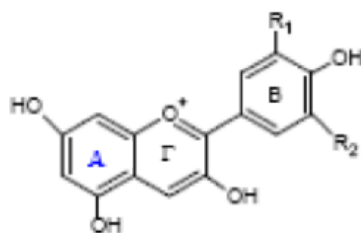
XII. ANΘOKYANINES

Οι ανθοκυανίνες είναι η μεγαλύτερη ομάδα υδατοδιαλυτών χρωστικών που υπάρχει στο φυτικό βασίλειο. Συγκαταλέγεται ανάμεσα στις τρεις μεγαλύτερες κατηγορίες φυσικών χρωστικών που υπάρχουν στη φύση και βρίσκεται στην τρίτη θέση μετά τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Ως φυσικά προϊόντα, οι ανθοκυανίνες συγκαταλέγονται στην οικογένεια των φλαβονοειδών, αλλά παρόλα αυτά εμφανίζουν αρκετές δομικές διαφορές από τα άλλα μέλη της οικογένειας αυτής, δηλαδή τα παράγωγα της φλαβόνης. Είναι υπεύθυνες για τα χρώματα που εμφανίζονται σε πολλά λουλούδια και φρούτα και είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με το κόκκινο χρώμα, παρόλο που εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία χρωμάτων. Έχει βρεθεί επίσης ότι υπάρχουν σε λαχανικά, ρίζες, όσπρια αλλά και δημητριακά. Πέραν αυτών, αποτελούν τις κύριες χρωστικές των ερυθρών οίνων σε συνδυασμό με τις τανίνες.

Η παρουσία τους στα φυτά είναι υπό τη μορφή γλυκοζιτών των αλάτων του φλαβυλίου ή αλλιώς του 2- φαίνυλο-βενζοπυριλίου το οποίο σταθεροποιείται με δομές συντονισμού (Εικόνα 9), κυρίως στη θέση C₃ (μέτα- θέση ως προς το οξυγόνο του ετεροκυκλικού δακτυλίου), και τα άγλυκά τους τμήματα καλούνται ανθοκυανιδίνες (δηλαδή ανθοκυανιδίνη + σάκχαρο = ανθοκυανίνη). Στη φύση υπάρχουν έξι ανθοκυανιδίνες οι οποίες ονομάζονται: πελαργονιδίνη, κυανιδίνη, πεονιδίνη, δελφινιδίνη, πετουνιδίνη και μαλβιδίνη. Όλες έχουν τον ίδιο σκελετό (Εικόνα 10) αλλά διαφέρουν ως προς τους υποκαταστάτες του δακτυλίου Β όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 11 και στον Πίνακα 1.



ΕΙΚΟΝΑ 9: Σταθεροποίηση του κατιόντος φλαβυλίου μέσω δομών συντονισμού. Η δομή που συμμετέχει περισσότερο είναι η πρώτη που έχει το σύστημα του ναφθαλινίου.

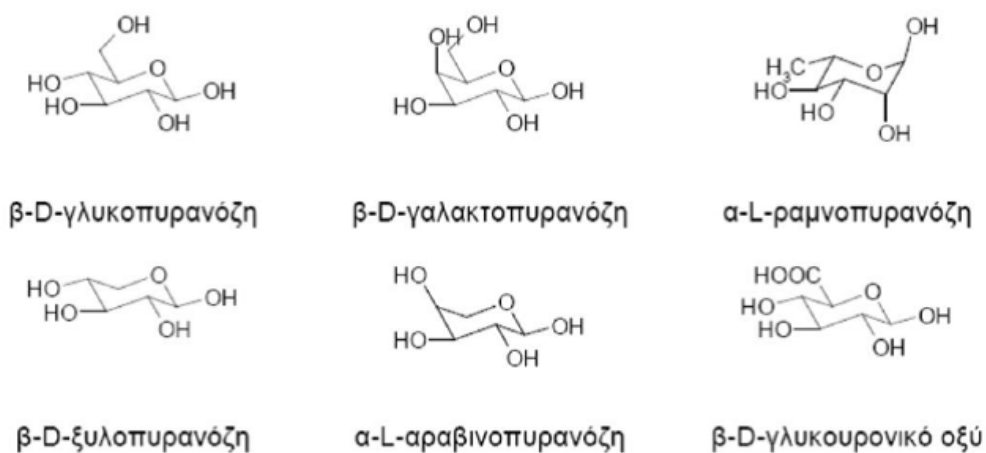


ΕΙΚΟΝΑ 10: Σκελετός των ανθοκυανιδινών

Πίνακας 1: Δομές των ανθοκυανιδινών

Ανθοκυανιδίνες	R ₁	R ₂
Δελφινιδίνη	OH	OH
Πετουνιδίνη	OH	OCH ₃
Μαλβιδίνη	OCH ₃	OCH ₃
Κυανιδίνη	OH	H
Πεονιδίνη	OCH ₃	H
Πελαργονιδίνη	H	H

Τα σάκχαρα τα οποία υπάρχουν ποικίλουν αλλά κυρίως είναι γλυκόζη, γαλακτόζη και αραβινόζη. Η μονάδα σακχάρου μπορεί να είναι ένας μονοσακχαρίτης ή δισακχαρίτης και μπορεί να είναι ακυλιωμένο με ένα φαινολικό ή αλειφατικό οξύ.



ΕΙΚΟΝΑ 11. Σάκχαρα που έχουν βρεθεί ως υποκαταστάτες στις ανθοκυανίνες

Παρόλο λοιπόν που υπάρχουν έξι κοινές ανθοκυανιδίνες, έχουν απομονωθεί ως αυτή τη στιγμή 539 ανθοκυανίνες από φυτά, 277 εκ των οποίων έχουν εντοπιστεί μετά

το 1992. Οι πιο διαδεδομένες ανθοκυανίνες στα φρούτα είναι γλυκοζυλιωμένες στην C₃ θέση (3-O-μονογλυκοζίτες). Στα φρούτα και τα λαχανικά η συνολική κατανομή ανθοκυανινών είναι: κυανιδίνη 50%, δελφινιδίνη 12%, πελαργονιδίνη 12%, πεονιδίνη 12%, πετουνιδίνη 7% και μαλβιδίνη 7%.

Τα χρωματικά χαρακτηριστικά τους επηρεάζονται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τον τρόπο υποκατάστασης του δακτυλίου B. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση της παρουσίας υδροξυλίων, οδηγεί σε βαθυχρωμική μετατόπιση από κόκκινο σε ιώδες χρώμα (πελαργονιδίνη, κυανιδίνη, δελφινιδίνη). Επιπλέον η φύση του σακχάρου αλλά και η θέση του στο σκελετό, είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την υφή του χρώματος αυτών των ενώσεων.

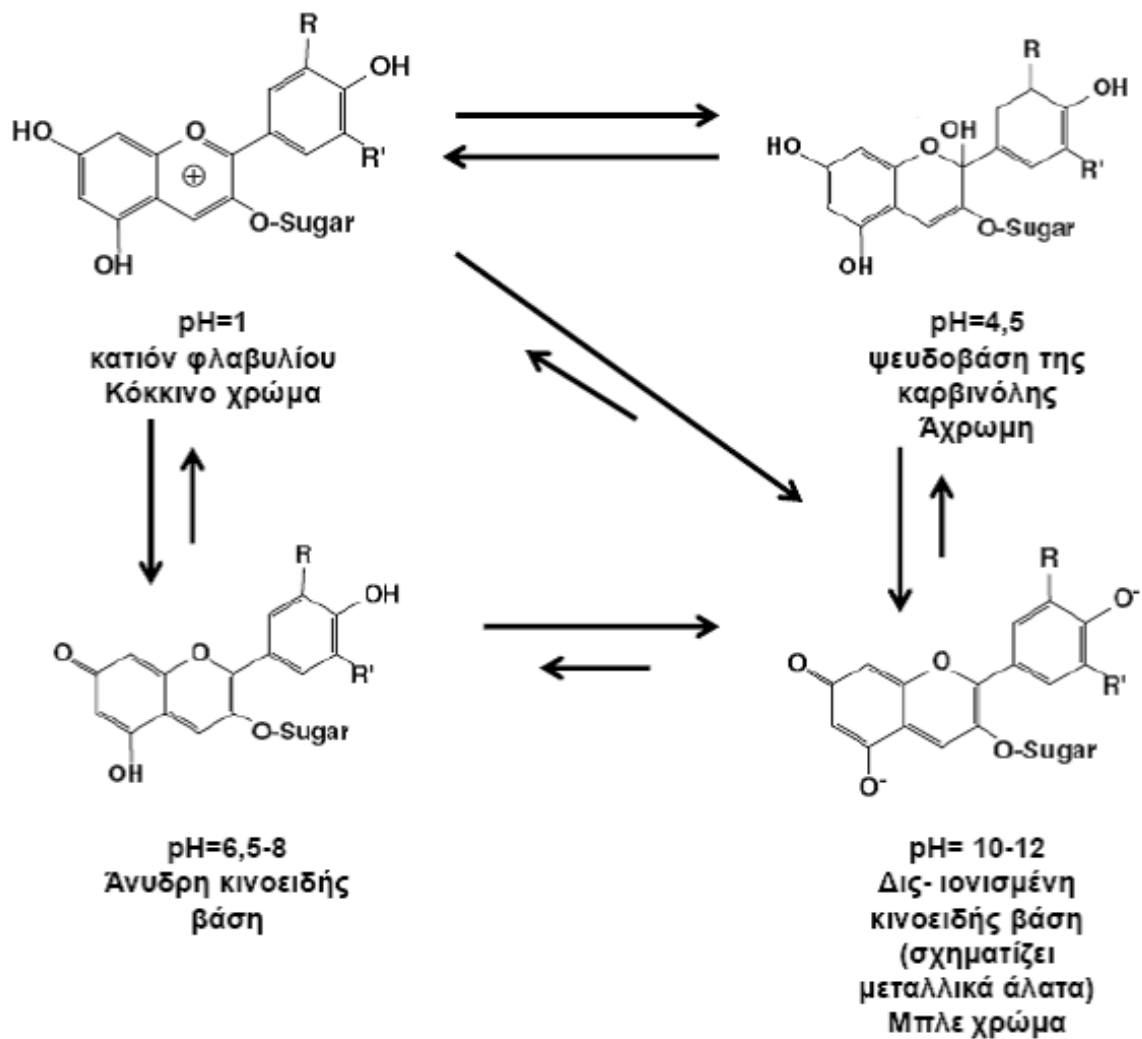
Αναλογιζόμενοι τη φυσική προέλευση αυτών των χρωστικών, θα δούμε ότι τα κόκκινα σταφύλια είναι από τις καλύτερες πηγές σε μία μακρά λίστα που περιλαμβάνει το κόκκινο λάχανο, το σαγκουίνι, και πολλούς καρπούς φρούτων (καρπούς κουφοξυλιάς, βατόμουρα, μούρα κ.α.). Τα δεδομένα που έχουμε από την κατανάλωση στις Η.Π.Α. είναι ότι καθημερινά η μέση πρόσληψη ανθοκυανινών στον άνθρωπο ανέρχεται στα 215mg το καλοκαίρι και στα 180mg το χειμώνα. Οι τιμές αυτές γίνονται υψηλότερες για τους καταναλωτές κόκκινου κρασιού, το οποίο έχει σχετικά υψηλά ποσοστά ανθοκυανινών, παρόλο που οι ανθοκυανίνες στο κρασί συμπλέκονται με άλλα συστατικά του.

Η χημεία και η σταθερότητα των ανθοκυανινών σε ένα διάλυμα εμφανίζει πολύ ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά. Στους φυτικούς οργανισμούς, οι ανθοκυανίνες βρίσκονται στον κενό χώρο ανάμεσα στα κύτταρα. Εκεί συνυπάρχουν με άλλες ενώσεις όπως φαινόλες, πολυφαινόλες, πρωτεΐνες, πεπτίδια, σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα και μεταλλικά ιόντα (π.χ. ασβέστιο, κάλιο, μαγνήσιο). Η συνύπαρξή τους με αυτές τις ενώσεις είναι που τις κάνει σταθερές και ικανές να διατηρούν το χρώμα τους, διότι σε πειράματα μοντέλων ομοίων συνθηκών με τη φύση (ελαφρώς όξινες συνθήκες και θερμοκρασία δωματίου) έχει βρεθεί ότι οι ανθοκυανίνες είναι σταθερές σε άχρωμη μορφή.

Επίδραση του pH στη χημεία των ανθοκυανινών

Οι ανθοκυανίνες εμφανίζουν επαμφοτερίζοντα υδατοδιαλυτό χαρακτήρα. Τα όξινα άλατά τους είναι συνήθως κόκκινα, τα μεταλλικά τους άλατα είναι συνήθως μπλε ενώ τα ουδέτερα διαλύματά τους είναι συνήθως ιώδη.

Σε $\text{pH}=1,0$, το κυρίαρχο είδος είναι το κατιόν φλαβυλίου το οποίο συνεισφέρει σε ιώδες και κόκκινο χρώμα. Το κατιόν φλαβυλίου μπορεί να αποπρωτονιωθεί πάρα πολύ εύκολα διότι το μόριο είναι επιρρεπές σε πυρηνόφιλες προσβολές από το νερό και σε τιμές pH από 4,0 έως 6,0 το μόριο υπάρχει υπό τη μορφή της ψευδοβάσης της καρβινόλης η οποία είναι μία άχρωμη χημική μορφή. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 12, κατά την προσβολή από το νερό (υπό μορφή $-\text{OH}$) αλλάζει η έκταση της συζυγίας του μορίου και κατά συνέπεια αλλάζει και το χρώμα. Περαιτέρω αύξηση του pH αλλάζει ακόμα παραπάνω το μόριο. Επίσης όταν το pH ξεπεράσει το 6,5 τότε η αντίστροφη αντίδραση της χημικής ισορροπίας είναι πιο δύσκολο να λάβει χώρα. Η αντίδραση αποπρωτονίωσης των υδοξυλομάδων έχει τιμές $\text{pK}_a \approx 4,85$. Σε pH από 6 έως 8 έχουμε περαιτέρω αποπρωτονίωση αν υπάρχουν διαθέσιμα υδροξύλια. Σε τιμές pH από 6,5-8,0 το μόριο υπάρχει υπό τη μορφή της άνυδρης κινουειδούς βάσης και το χρώμα εξαρτάται κάθε φορά από τους υποκαταστάτες αλλά και το σάκχαρο. Το πιο σύνηθες χρώμα έχει διακύμανση ανάμεσα σε γκριζο και ιώδες. Όταν το pH γίνει αλκαλικό οι ανθοκυανίνες φορτίζονται αρνητικά και είναι σε θέση να σχηματίσουν μεταλλικά άλατα. Το σύνηθες χρώμα των μεταλλικών αλάτων των ανθοκυανινών είναι μπλε και είναι υπό τη μορφή της δις-ιονισμένης κινουειδούς βάσης. Βεβαίως είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη και το είδος των υποκαταστατών αλλά και του σακχάρου. Κατά γενικό κανόνα όλες οι ανθοκυανίνες παρουσιάζουν τις μεταβολές που μόλις αναφέρθηκαν αλλά μερικές δεν είναι τόσο επιρρεπείς. Η παρουσία ύδροξυ-ή μέθοξυ- ομάδων στον Β δακτύλιο, ελαττώνει τη σταθερότητα της άγλυκης ένωσης και οι μεταβολές είναι πιο έντονες. Άρα κατά γενικό κανόνα η πελαργονιδίνη είναι η πιο σταθερή ανθοκυανίνη. Όλες οι μεταβολές των ανθοκυανινών συναρτήσεως του pH φαίνονται στην εικόνα 12.



ΕΙΚΟΝΑ 12: Δομή ανθοκυανινών σε διάφορες τιμές pH.

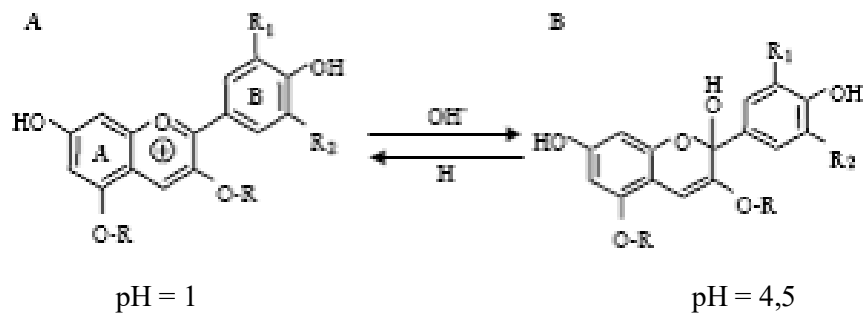
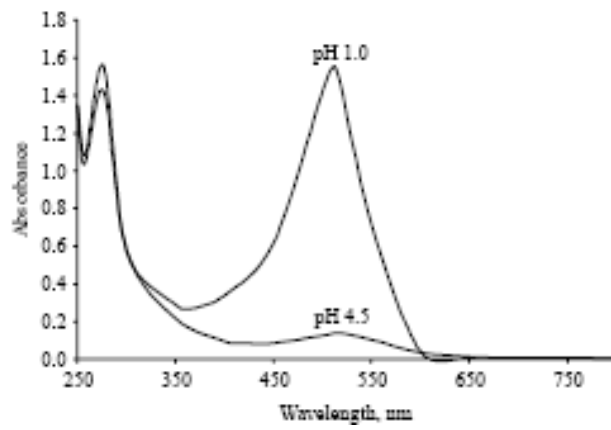
Ποσοτικός προσδιορισμός των ανθοκυανινών με τη μέθοδο Wrolstad-Durst-Lee.

Γενικά, η ποσοτικοποίηση των ανθοκυανινών σε ένα δείγμα που προέρχεται από φυσική πηγή είναι δύσκολη διότι συνήθως περιέχονται και άλλα φυσικά προϊόντα ή πολλών ειδών ανθοκυανίνες μέσα στο δείγμα. Επιπλέον έλλειψη πρότυπων διαλυμάτων δεν επιτρέπει τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό των δειγμάτων. Έτσι για τον ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιείται η μέθοδος που περιγράφεται από την εργασία των Ronald E. Wrolstad et al. (Ronald E. Wrolstad, Robert W. Durst and Jungmin Lee, Tracking color and pigment changes in anthocyanin products, Trends in Food Science & Technology 16, 2005, 423–428). Αυτό που κάνουμε είναι να εκμεταλλευτούμε τη συμπεριφορά των ανθοκυανινών σε τιμές pH 1,0 και 4,5. Η αλλαγή στη χημική δομή του μορίου έχει επίδραση και στο χρώμα του (όπως είδαμε

παραπάνω). Σε $\text{pH}=1$ είναι κυρίαρχο το κατιόν φλαβυλίου που έχει κόκκινο χρώμα, ενώ σε $\text{pH}=4,5$ κυρίαρχη είναι η άχρωμη ψευδοβάση της καρβινόλης η οποία είναι άχρωμη. Αυτό θα έχει επίδραση στην απορρόφηση του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, εξαφάνιση του χρώματος σημαίνει ότι η απορρόφηση στο μήκος κύματος με τη μέγιστη απορρόφηση (λ_{max}) θα μειωθεί σημαντικά ή ίσως μηδενιστεί! Άρα είμαστε σε θέση να χρησιμοποιήσουμε τις ανθοκυανίνες με αυτό τον τρόπο για να τις ποσοτικοποιήσουμε!

Η μέθοδος Wroldstad-Durst-Lee είναι πολύ απλή και η άλλη της ονομασία είναι τροποποιημένη μέθοδος υπολογισμού της συγκέντρωσης μέσω των διαφορετικών pH (differential pH method). Τα δείγματα διαλύονται σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα τιμών $\text{pH}=1,0$ και $\text{pH}=4,5$. Σύμφωνα με τη δημοσίευση λαμβάνονται τα φάσματα στην περιοχή του ορατού (400-700nm) και στις δύο τιμές pH και υπολογίζεται η διαφορά στις τιμές απορρόφησης ανάμεσα στα διαλύματα διαφορετικού pH , στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης για το διάλυμα με $\text{pH}=1$. Ο παράγων αραιώσης DF (dilution factor) πρέπει να είναι τέτοιος ώστε οι τιμές απορρόφησης να κυμαίνονται 0,4-0,6. Για τον υπολογισμό γίνεται χρήση του μοριακού βάρους και του συντελεστή μοριακής απόσβεσης της κύριας ανθοκυανίνης στο διάλυμα και ο υπολογισμός γίνεται από τον τύπο που παρουσιάζεται παρακάτω. Επιπλέον οι ανθοκυανίνες εμφανίζουν μηδενική απορρόφηση στα 700nm όταν βρίσκονται σε καθαρή μορφή. Επειδή όμως οι ανθοκυανίνες που θα χρησιμοποιηθούν στο πείραμα έχουν απομονωθεί από φυσική πηγή, θα πρέπει να καταγράφεται και η τιμή της απορρόφησης στα 700nm για να αφαιρεθεί ως διόρθωση από τη μέγιστη απορρόφηση που θα καταγραφεί.

Στο συγκεκριμένο πείραμα θα γίνει η παραδοχή ότι η μέγιστη απορρόφηση για το διάλυμα με $\text{pH}=1$ εμφανίζεται στα 520nm και δε θα ληφθούν φάσματα αλλά απορροφήσεις στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.



ΕΙΚΟΝΑ 13: Μορφή φάσματος υπεριώδους - ορατού στις δύο διαφορετικές τιμές pH και μορφή των ανθοκυανινών στις αντίστοιχες τιμές. (Ronald E. Wrolstad et al., *Trends in Food Science & Technology* 16, 2005, 423–428)

Πείραμα 5^ο : Απομόνωση και χαρακτηρισμός φυτικών χρωστικών (χλωροφύλλες, καροτενοειδή και ανθοκυανίνες)

Μέρος α: απομόνωση χλωροφυλλών και καροτενοειδών

Το πείραμα αυτό σας δίνει τη δυνατότητα να απομονώσετε μια ομάδα βιομορίων απευθείας από τη φυσική πηγή τους και στη συνέχεια να τα διαχωρίσετε και να τα ταυτοποιήσετε. Για να το πετύχετε αυτό θα ακολουθήσετε την τυπική διαδικασία απομόνωσης και χαρακτηρισμού των λιπιδίων. Όμως, σε αντίθεση με τα περισσότερα λιπίδια, οι χρωστικές των φυτών έχουν έντονο χρώμα και είναι δυνατός ο ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός τους με φασματοσκοπία ορατού. Στο πείραμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεγάλη ποικιλία φυτικών ιστών όπως φρέσκα φύλλα από δέντρα, φυτά, γρασίδι, σπανάκι κ.τ.λ.

Ο απαιτούμενος χρόνος για την εκτέλεση του πειράματος είναι σε γενικές γραμμές, ο εξής:

A. Εκχύλιση των χρωστικών-30 λεπτά

B. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση χρωστικών (φασματοσκοπία ορατού-ολικό φάσμα εκχύλισματος, χρωματογραφία χάρτου, εκχύλιση χρωστικών, φασματοσκοπία ορατού χρωστικών) - 2 έως 3 ώρες.

Πρέπει να έχετε υπόψη σας ότι το εκχύλισμα των χρωστικών είναι πολύ ευαίσθητο και καταστρέφεται λόγω φωτοοξειδωσης. Είναι απαραίτητο να δουλεύετε σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού, με ταχύτητα και αποτελεσματικότητα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Φύλλα από διάφορα φυτικά είδη (γρασίδι, σπανάκι, πράσινα φύλλα δέντρων κ.τ.λ)
- Ακετόνη, 100%
- Πορσελάνινο γουδί και γουδοχέρι
- Χωνί από διηθητικό χαρτί προσαρμοσμένο σε γυάλινο χωνί
- Σύριγγα 25ml
- Φίλτρο σύριγγας 0,8μm (ή μικρότερων πόρων)
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες, 100x12mm
- Γυάλινο σιφώνιο μέτρησης 2 ή 5 mL
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis
- Γυάλινες κυψελίδες 3ml
- Υλικά για χρωματογραφία χάρτου:

Χαρτί Whatman 3MM

Σύριγγα μικρολίτρων ή τριχοειδής σωλήνας
Σύστημα διαλυτών, πετρελαϊκός αιθέρας-ακετόνη (9:1 v/v)
Θάλαμος χρωματογραφίας, ποτήρι ζέσεως 600ml
Ψαλίδι

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Εκχύλιση των χρωστικών

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Η ακετόνη είναι ένας εξαιρετικά πτητικός και εύφλεκτος διαλύτης. Η παρατεταμένη εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα θέτουν σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία του χρήστη. Η επαφή του διαλύτη με τα μάτια προκαλεί σοβαρότατο ερεθισμό.

Σε καμία περίπτωση δεν θα πρέπει να υπάρχει στον ίδιο χώρο, γυμνή φλόγα και ακετόνη.

Μετά το τέλος του πειράματος, όλα τα διαλύματα και εκχυλίσματα που περιέχουν ακετόνη τοποθετούνται στο δοχείο με την ένδειξη «ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ».

Ζυγίστε περίπου 3gr από τον φυτικό ιστό της επιλογής σας, τεμαχίστε τον σε μικρά κομμάτια και τοποθετήστε τον στο γουδί. Προσθέστε σταδιακά μέχρι 25ml ακετόνης και αλέστε το μίγμα μέχρι να ολοκληρωθεί η εκχύλιση των χρωστικών (ο φυτικός ιστός να αποχρωματιστεί). Στη συνέχεια, φτιάξτε ένα απλό φίλτρο με χαρτί διήθησης, τοποθετήστε το στο γυάλινο χωνί και φιλτράρετε το εκχύλισμα. Μόλις ολοκληρωθεί το στάδιο αυτό κάνετε ένα επιπλέον φιλτράρισμα χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά, ένα φίλτρο σύριγγας 0,8μm. Τοποθετήστε το φιλτραρισμένο εκχύλισμα σε ένα ογκομετρικό κύλινδρο και καλύψτε το με αλουμινόχαρτο. Προχωρήστε όσο πιο γρήγορα μπορείτε στο στάδιο B.

B. Ολικό φάσμα απορρόφησης του εκχυλίσματος

Στο στάδιο αυτό θα πάρετε το ολικό φάσμα του εκχυλίσματος στην περιοχή 400-700nm. Εάν δεν υπάρχει δυνατότητα εκτύπωσης, προσπαθήστε να σχεδιάσετε όσο καλύτερα μπορείτε το φάσμα και σημειώστε οπωσδήποτε τα μήκη κύματος και τις απορροφήσεις που αντιστοιχούν στις κορυφές του. Θα συγκρίνετε το φάσμα αυτό με τα φάσματα που θα πάρετε για καθεμία χρωστική ξεχωριστά, στο μέρος Δ.

Στις παραπάνω μετρήσεις (καθώς και σε όσες ακολουθήσουν) πώς θα μηδενίσετε το φασματοφωτόμετρό σας; Με άλλα λόγια ποια ουσία θα είναι το τυφλό σας δείγμα;

Εάν το εκχύλισμά σας είναι πολύ πυκνό αραιώστε το με ακετόνη μέχρι να έχετε τιμές απορρόφησης μικρότερες του 1.000.

ΚΡΑΤΗΣΤΕ περίπου 1ml από το πυκνό εκχύλισμα για το στάδιο Γ.

Γ. Διαχωρισμός και έκλυση των χρωστικών με χρωματογραφία χάρτου

Η χρωματογραφία χάρτου έχει πολλά κοινά στοιχεία με τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας όσο αφορά τον τρόπο εφαρμογής:

- Κόψτε ένα κομμάτι από το χαρτί χρωματογραφίας (Whatman 3MM) σε διαστάσεις που να εφαρμόζουν στο ποτήρι που θα χρησιμοποιήσετε ως θάλαμο χρωματογραφίας.
- Με χρήση τριχοειδούς σωλήνα ή σύριγγας μικρολίτρων, τοποθετήστε ομοιόμορφα το πυκνό εκχύλισμα της ακετόνης κατά μήκος μιας νοητής γραμμής 1cm από το άκρο του χαρτιού. Αρχίστε να εφαρμόζετε το δείγμα σε απόσταση 1cm από το άκρο του χαρτιού και σταματήστε περίπου 1cm από το απέναντι άκρο. Όσο πιο στενή είναι η γραμμή εφαρμογής του δείγματος τόσο καλύτερο διαχωρισμό θα έχετε. Έπειτα από κάθε εφαρμογή, αφήστε λίγο χρόνο στο δείγμα ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης πριν περάσετε στην επόμενη εφαρμογή. Επαναλάβετε τη διαδικασία αυτή μέχρι και 10 φορές ή μέχρι η γραμμή εφαρμογής να έχει σκούρο πράσινο χρώμα.
- Όταν το χαρτί στεγνώσει εντελώς, τοποθετήστε το μέσα στο δοχείο χρωματογραφίας (η γραμμή του δείγματος προς τα κάτω), το οποίο περιέχει τον κατάλληλο διαλύτη (πετραλαϊκός αιθέρας:ακετόνη 9:1) η στάθμη του οποίου δεν πρέπει να ξεπερνά το 1cm. Σκεπάστε το ποτήρι με αλουμινόχαρτο ή ύαλο ωρολογίου.
- Όταν ο διαλύτης έχει φτάσει περίπου 1cm από την κορυφή του χαρτιού, βγάλτε το από το θάλαμο χρωματογραφίας και σημειώστε με ένα μολύβι το μέτωπο του διαλύτη.
- Παρατηρήστε τη θέση των χρωστικών και μεταφέρετε την εικόνα του χρωματογράμματος στο σημειωματάριό σας με όλες τις λεπτομέρειες.
- Κάθε χρωστική εκλύεται από το χαρτί με χρήση ακετόνης. Μετρήστε πόσες χρωστικές έχουν εμφανιστεί στο χρωματογράμα σας και βάλτε από 2ml ακετόνης στους ανάλογους δοκιμαστικούς σωλήνες.
- Με το ψαλίδι, κόψτε κάθε χρωματιστή λωρίδα από το χρωματογράμμα και στη συνέχεια κάθε λωρίδα σε μικρότερα κομμάτια. Βάλτε τα κομμάτια κάθε χρωστικής (λωρίδας) σε ξεχωριστό δοκιμαστικό σωλήνα (σημειώστε τους σωλήνες ώστε να ξέρετε σε ποια θέση του χρωματογράμματος αντιστοιχεί κάθε χρωστική που εκχυλίζετε).
- Σκεπάστε τους σωλήνες με parafilm και περιμένετε 5-10 min μέχρι να ολοκληρωθεί η εκχύλιση, ανακατεύοντας ήπια μερικές φορές.

Δ. Φάσμα απορρόφησης ορατού κάθε χρωστικής ξεχωριστά

Χρησιμοποιώντας γυάλινες κυψελίδες, καταγράψτε την απορρόφηση κάθε εκχυλίσματος από 400 έως 700nm. Μεταφέρετε προσεκτικά κάθε δείγμα στην κυψελίδα ώστε τα κομματάκια χαρτιού να παραμείνουν στο σωλήνα. Μόλις ολοκληρωθούν οι μετρήσεις, μεταφέρετε όλα τα διαλύματα ακετόνης στο δοχείο με την ένδειξη «ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ».

Μέρος β: Φασματοσκοπική μελέτη της χημικής συμπεριφοράς των ανθοκυανινών υπό την επίδραση διαφορετικών τιμών pH. Ποσοτικός προσδιορισμός ανθοκυανινών

ΥΛΙΚΑ

- Δείγμα ανθοκυανινών
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Γυάλινα σιφώνιο μέτρησης 10 mL
- Πιπέτες ακριβείας 10 ή 20 μL
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis
- Κυψελίδες 3ml
- Διαλύματα
 1. Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl (F.W.= 157,60 gr/mol) pH=1,0
 2. Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM NaH₂PO₄ (F.W.= 137,99 gr/mol) pH=4,5
 3. Ρυθμιστικό διάλυμα 0,2M NaH₂PO₄ (F.W.= 137,99 gr/mol) pH=7,0
 4. Ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Na₂CO₃ (F.W.= 105,99 gr/mol) pH=10,0

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Συμπεριφορά των ανθοκυανινών σε διαφορετικές τιμές pH

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιούνται καρποί από το φυτό *Myrtus Communis*, όπου η κύρια ανθοκυανίνη είναι ο 3-O-γλυκοζίτης της μαλβιδίνης με $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$ (σε υδατικό διάλυμα).

Παρασκευάζονται τέσσερα διαλύματα σε δοκιμαστικούς σωλήνες, ένα για κάθε τιμή pH. Εισάγονται 10 μl δείγματος ανθοκυανινών σε 7ml ρυθμιστικού. Οι σωλήνες αφήνονται για επώαση (αναδεύοντας περιοδικά) για 5-10 λεπτά. Παρατηρούνται οι σωλήνες και καταγράφονται τα χρώματα.

B. Ποσοτικός προσδιορισμός των ανθοκυανινών με τη μέθοδο Wrolstad-Durst-Lee.

Για τα διαλύματα που παρασκευάσατε στο A σε pH=1 και pH=4,5 λαμβάνονται οι απορροφήσεις στα 520 nm. ΜΗΝ ΞΕΧΑΣΕΤΕ ΝΑ ΚΑΤΑΓΡΑΨΕΤΕ ΤΗΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΣΤΑ 700nm. Σας δίδεται ότι:

$$\text{Συνολικές Ανθοκυανίνες (mg / l)} = \frac{A \cdot MB \cdot DF \cdot 10^3}{\epsilon \cdot l}$$

$$\blacksquare A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}=1,0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}=4,5}$$

- MB: μοριακό βάρος του 3-O-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης ($493,437 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- DF: παράγων αραίωσης (δηλαδή αν διαλύσω 10μl ουσίας σε 990μl διαλύτη, δηλαδή τελικός όγκος 1000μl, έχω DF= 100)
- ε: συντελεστής μοριακής απόσβεσης του 3-O-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης ($28000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
- l: μήκος οπτικής διαδρομής (1cm)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

R. F. Boyer, **Modern Experimental Biochemistry**, Addison-Wesley, 1993.

M. Campbell, **Biochemistry**, Saunders college Publishing, 1998.

R. L. Dwyer and G. F. Lata, **Experimental biochemistry**, Oxford University Press, 1989.

R. Boyer, **Concepts in Biochemistry** (1999), Brooks/Cole (Pacific Grove, CA), pp.142-173. An introduction to enzyme and kinetics.

L. Stryer, **Biochemistry**, 4th ed. (1995), W. H. Freeman (New York), pp. 181-204. Introduction to enzymes and kinetics

C. Matthews, K. van Holde, and K. Ahern, **Biochemistry**, 3rd ed. (2000), Benjamin/Cummings (San Francisco), pp. 360-413. Introduction to enzyme kinetics.

D. Voet, J. Voet, **Biochemistry**, 2nd ed. (1995), John Wiley & Sons (New York), pp.332-410. An Introduction to enzymes.

Ronald E. Wrolstad et al., Tracking colour and pigment changes in anthocyanin products, *Trends in Food Science & Technology* 16, 2005, 423–428