

Osnovna šola Frana Roša

Barvila v jesenskem in zimskem listju



Avtorici:

Maja Cilenšek, 9.b

Eva Polutnik, 9.b

Mentorica:

Lotty Cojhter,

profesorica biologije in kemije

Mestna občina Celje,

Mladi za Celje 2014

KAZALO

POVZETEK.....	5
1 UVOD	6
1.1 Raziskovalni problem	6
1.2 Hipoteze	6
1.3 Metode dela	6
2 TEORETIČNE OSNOVE	7
2.1 Barva in barvilo	7
2.2.1 Vidna svetloba in elektromagnetni spekter	7
2.2.2 Zaznavanje barve	8
2.2.3 Fizikalne barve	9
2.2.4 Kemijske barve.....	9
2.3 Naravna barvila	9
2.3.1 Naravna barvila	9
2.3.2 Naloge naravnih barvil	9
2.3.3 Klorofili.....	10
2.3.4 Karotenoidi.....	11
2.3.5 Antocianidini	13
2.3.6 Barvne spremembe jesenskega listja.....	13
2.3.7 Zeleni listi zimzelenih rastlin pozimi	13
3 POTEK RAZISKOVALNEGA DELA	14
3.2 Izbor in priprava rastlinskega materiala	14
3.3 Priprava eksperimentalnega lista	14
3.4 Potek eksperimentalnega dela	17
3.4.1 Določitev ekstrakcijskega topila.....	17
3.4.2 Metoda ekstrakcije.....	19
3.4.3 Metoda kromatografije	19
3.4.4 Določanje položaja lis in izračun retenzijskega faktorja	21
3.4.5 Določanje širine lis za posamezna ločena barvila	22
4 REZULTATI IN UGOTOVITVE	22
4.1 Ugotovitve za jesensko in zimsko listje ameriške borovnice	24
4.2 Ugotovitve za jesensko in zimsko listje robide	26
4.3 Ugotovitve za jesensko in zimsko listje peterolistno viniko	27

4.4	Ugotovitve za jesensko in zimsko listje bršljana	28
4.5	Ugotovitve za jesensko in zimsko listje smreke	29
4.6	Ugotovitve za jesensko in zimsko listje kleka.....	30
5	ANALIZA REZULTATOV IN UGOTOVITEV	31
6	ZAKLJUČEK.....	34
7	VIRI	36

KAZALO SLIK

Slika 1:	Spekter elektromagnetnega valovanja.....	8
Slika 2:	Shema kloroplasta	10
Slika 3:	Skeletni formuli klorofila a in klorofila b	11
Slika 4:	Skeletna formula β -karotena.....	12
Slika 5:	Skeletna formula luteina	12
Slika 6:	Priprava rastlinskega materiala za ekstrakcijo	17
Slika 7:	Priprava ekstrakta v terilnici	18
Slika 8:	Aparatura za filtracijo ekstrakta.....	18
Slika 9:	Ekstrakte smo shranile v temne steklenice	19
Slika 10:	Nanašanje ekstrakta na trak filtrirnega papirja	20
Slika 11:	Kromatografska aparatura	21
Slika 12:	Shema izračuna retenzijskega faktorja	22
Slika 13:	Zimsko listje ameriške borovnice	26
Slika 14:	Zimsko listje robide	27

KAZALO TABEL

Tabela 1:	Prikaz poti topila, poti barvila in barve lise za posamezne rastline v jesenskem obdobju (druga polovica novembra).	23
Tabela 2:	Prikaz poti topila, poti barvila in barve lise za posamezne rastline v zimskem obdobju (sredina januarja).	24
Tabela 3:	Širina lis za posamezna barvila (povprečne vrednosti) v listih ameriške borovnice	24
Tabela 4:	Širina lis za posamezna barvila (povprečne vrednosti) v listih robide	26

Tabela 5: Širina lis za posamezna barvila (povprečne vrednosti) v listih peterolistne vinike	27
Tabela 6: Širina lis za posamezna barvila (povprečne vrednosti) v listih bršljana	28
Tabela 7: Širina lis za posamezna barvila (povprečne vrednosti) v listih smreke	29
Tabela 8: Širina lis za posamezna barvila (povprečne vrednosti) v listih kleka.....	30

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Prikaz širine lis posameznih barvil za ameriško borovnico v jesenskem in zimskem obdobju.....	25
Graf 2: Prikaz lis posameznih barvil za robido v jesenskem in zimskem obdobju. ...	26
Graf 3: Prikaz širine lis posameznih barvil za peterolistno viniko v jesenskem in zimskem obdobju.....	28
Graf 4: Prikaz širine lis posameznih barvil za bršljan v jesenskem in zimskem obdobju.....	29
Graf 5: Prikaz širine lis posameznih barvil za smreko v jesenskem in zimskem obdobju.....	30
Graf 6: Prikaz širine lis za posamezna barvila za krek v jesenskem in zimskem obdobju.....	31
Graf 7: Količina klorofila a v jesenskem in zimskem listju za posamezne rastline	32
Graf 8: Količina ksantofilov v jesenskem in zimskem listju za posamezne rastline...	32
Graf 9: Prikaz povprečnih dnevni temperatur za večletno obdobje (1991 - 2014) za Celje (http://ciklon.si/stran/?p=21251 , 10. 2. 2014).....	33

POVZETEK

V raziskovalni nalogi smo želele poiskati odgovore na vprašanja, kaj se dogaja v listih rastlin v jeseni, ko se barve listov spremenijo. Prav tako nas je zanimalo, kako je z zimzelenimi listi v jeseni in pozimi.

Raziskale smo klorofil in še druga (predvsem karotenoide) barvila, ki se pojavljajo v jesenskem in zimskem listju. Ugotavljale smo pojavnost in spreminjanje klorofila a, klorofila b, ksantofilov ter karotenov.

Spoznale smo metodo ekstrakcije barvil ter metodo papirne kromatografije za ločevanje naravnih barvil. Čeprav gre na prvi pogled za preproste metode, pa smo spoznale da zahtevajo veliko mero natančnosti ter časa in da je treba za čim boljše rezultate analizo večkrat ponoviti. Urile smo se v laboratorijskem delu ter ponovile in poglobile zanje o topnosti in polarnosti spojin.

1 UVOD

1.1 Raziskovalni problem

Ob opazovanju zanimivega naravnega pojava, obarvanja listja v jesenskem času, se nam je porodila zamisel o raziskovalni nalogi na temo barvil v listju. Zanimalo nas je, kaj se dogaja v listju jeseni, kakšna barvila se pojavljajo v listih pri listopadnem drevju ter kako je z barvili v listju zimzelenih rastlin. Letos smo imeli do konca januarja milo zimo. Zato nas je zanimalo, ali je prišlo do sprememb barvil v listju pri listopadnih rastlinah in zimzelenih rastlinah. Vemo, da se v zelenih listih nahaja barvilo klorofil, raziskali pa smo še druga barvila, ki se pojavljajo v jesenskem in zimskem listju. Uporabile smo metodo ekstrakcije naravnih barvil ter metodo kromatografije za ločevanje naravnih barvil. Iz polarnosti smo sklepale na topnost posameznih skupin barvil v določenih topilih. V nalogi smo se urile tudi v uporabi različnih virov podatkov.

1.2 Hipoteze

Postavile smo si naslednje hipoteze:

- Barvila v listju so zmesi.
- Barvila v jesenskem listju imajo poleg klorofila tudi druga barvila.
- Zimsko listje listopadnih rastlin ne vsebuje klorofila.
- Barvila v jesenskih listih listopadnih rastlin vsebujejo drugačna barvila kot jesenskih listi zimzelenih rastlin.
- Barvila v zimzelenih listih jeseni in pozimi se ne spremenijo.

1.3 Metode dela

Z ustreznimi topili smo ekstrahirale barvila iz listov. Za ločevanje naravnih barvil smo uporabile metodo papirne kromatografije. Izračunale smo retenzijske faktorje ter izmerile širino pasov posameznih barvil v jesenske in zimskem listju za izbrane rastlinske predstavnike.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Barva in barvilo

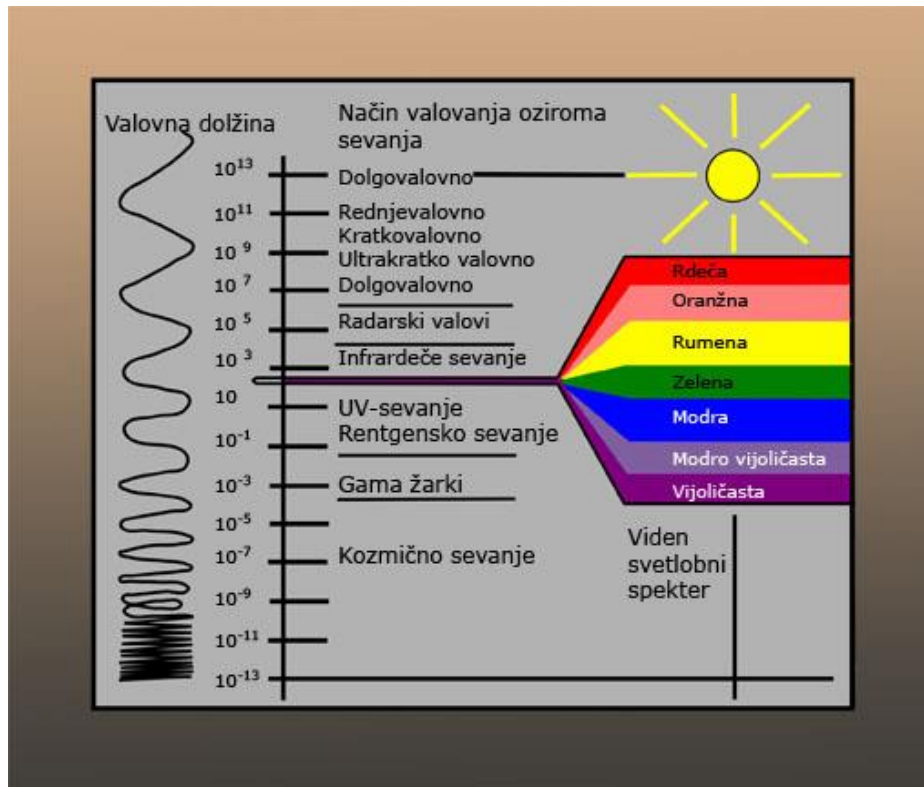
Barva je lastnost opazovanih predmetov. V slovenskem jeziku pa z istim izrazom označujemo tudi zmes za premazovanje in barvanje (npr. vodene barve, zidne barve).

Barvilo je topna snov, ki obarva druge materiale (npr. tkanine, papir) s kemijsko reakcijo, adsorpcijo ali difuzijo. Na podlago se trdno veže in se ne izpira (Boh, 2000, str. 11).

2.2.1 Vidna svetloba in elektromagnetni spekter

Vidni spekter (ali optični spekter) je del elektromagnetnega spektra, ki ga vidi človeško oko. Elektromagnetno sevanje v tem razponu valovnih dolžin se imenuje vidna svetloba ali pa preprosto svetloba. V zraku se človeško oko odziva na valovne dolžine približno 380 do 750 nm (http://sl.wikipedia.org/wiki/Vidni_spekter, 2. 2. 2014).

Svetloba se obnaša kot valovanje in kot delci, ki nosijo energijo. Energija svetlobe je obratno sorazmerna z valovno dolžino, kar pomeni, da imata vijolična in modra svetloba vidnega spektra najvišjo energijo, rdeča pa najnižjo (Boh, 2000, str. 6).



Slika 1: Spekter elektromagnetnega valovanja

(<http://www.erevija.com/potovanje/1526/Svetlobno-tehni%C3%A8ni-pojmi>, 2. 2. 2014)

2.2.2 Zaznavanje barve

Čutilo, s katerim sprejemamo svetlobne žarke, je oko. V notranjosti zrkla, ki je glavni del očesa, se nahaja mrežnica ali retina. V njej so celice, občutljive na svetlobo. Glede na obliko in njihovo delovanje jih razdelimo v čepke in paličice. Pri ljudeh barvno gledanje omogočajo trije tipi čepkov. Ti za delovanje potrebujejo močnejšo osvetlitev kot paličice, ki so odgovorne za črno-belo gledanje in jim zadošča zelo malo svetlobe. Čepki in paličice so povezani z živčnimi celicami. Na zadnji strani očesa živčna vlakna izstopajo iz zrkla in sestavljajo vidni živec. Dražljaji iz čutnih celic v očesu potujejo do možganov. Končno sliko predmeta zazna in prepozna naša zavest (Boh, 2000, str. 8).

2.2.3 Fizikalne barve

Nastanejo zaradi fizikalnih pojavov ko so disperzija, interferenca in uklon svetlobe. V naravi so redke. Opazimo jih pri pavovem perju, na notranji strani nekaterih školjk, kot modrino neba in rdeči sončni zahod (Boh, 2000, str. 10).

2.2.4 Kemijske barve

Kemijske barve so posledica prisotnosti barvnih kemijskih spojin in so odvisne od njihove zgradbe. Velja preprosto pravilo, da je ne snov obarvana, če imajo njene molekule več dvojnih ali trojnih vezi, ki ležijo skupaj (Boh, 2000, str. 10).

2.3 Naravna barvila

2.3.1 Naravna barvila

Naravna barvila so barvila, ki nastajajo v celicah živega organizma. Glede na kemijsko zgradbo so izredno raznolika.

2.3.2 Naloge naravnih barvil

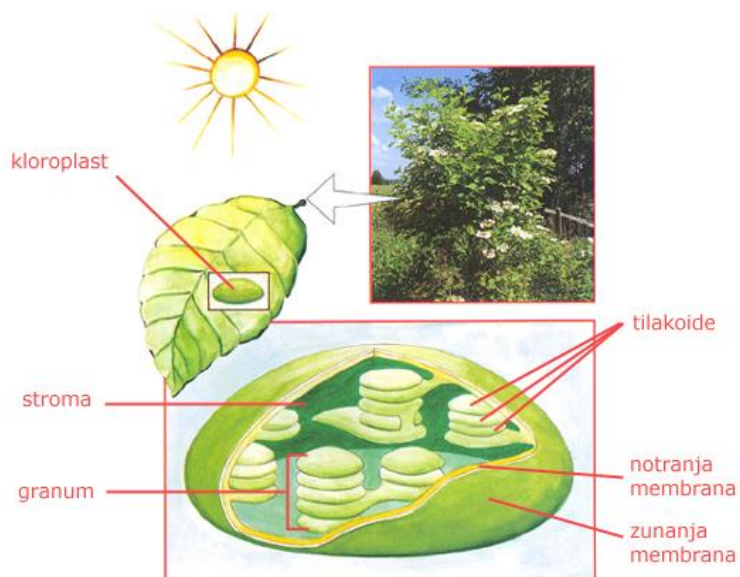
Naravna barvila so pomembna v fizioloških procesih, kot so fotosinteza, proces gledanja in prenos kislin v krvi. Pomembna so tudi pri parjenju in obrambi živali. Ponovno se vračajo v prehranske in farmacevtske izdelke, kozmetiko in umetniško barvanje tkanin.

Pojav barvil in barvnih vzorcev ima v naravi svoj evlucijski pomen. Nekatere živali se z barvami zavarujejo pred plenilci. Z varovalnimi barvami in s posnemanjem oblike rastlinskih delov se zlijejo z okoljem in tako postanejo neopazne. Mnoge izrazito pisano obarvane živali, zlasti samci, izkoriščajo učinek barv v obredih parjenja in za obrambo svojega življenjskega prostora pred drugimi samci. Močni kontrastni vzorci strupenih organizmov lahko služijo tudi kot svarilne barve.

2.3.3 Klorofili

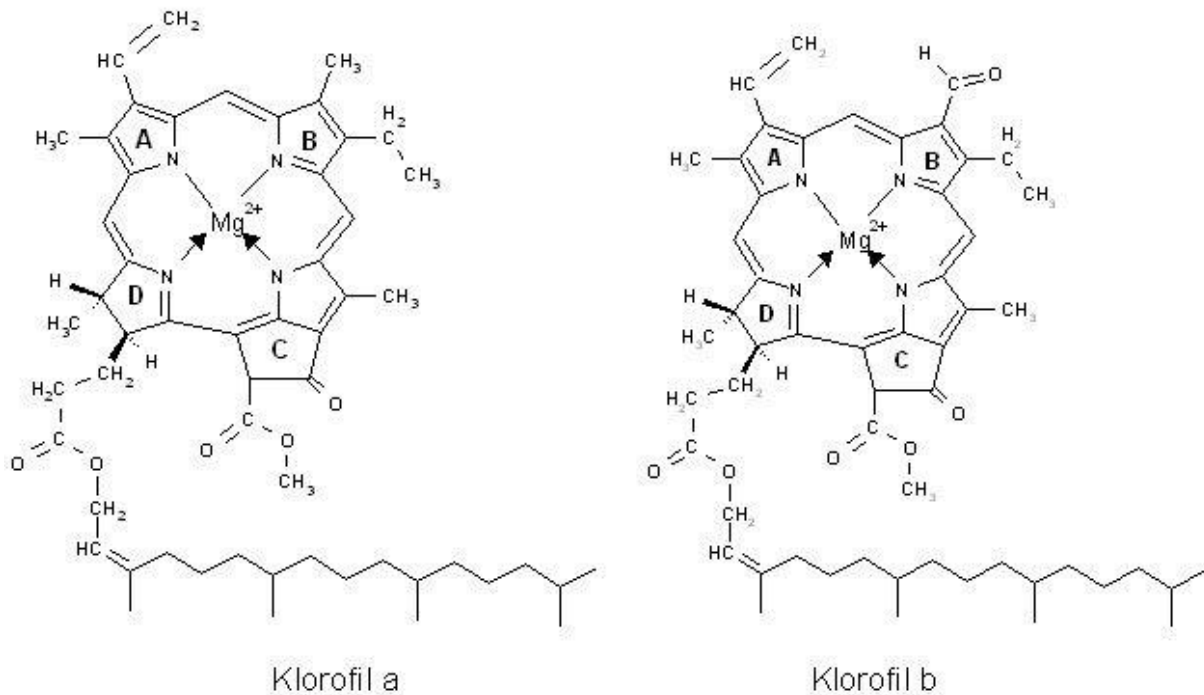
Vzrok za zeleno obarvanje rastlin so klorofili. Ti iz spektra bele svetlobe absorbirajo rdeče, modre in vijolične komponente. Preostanek svetlobnega spektra, ki se odbije, naše oko zaznava kot zeleno barvo.

Klorofil je fotosintezno barvilo, ki se nahaja v kloroplastih. Središče fotosintetskih reakcij so kloroplasti. Kloroplast navzven omejujeta dve membrani, v notranjosti pa so sploščene membranske vrečke, imenovane tilakoide. Ležijo v brezbarvni stromi ali matriksu. V tilakoidnih membranah so molekule asimilacijskih barvil razporejene v posebnih skupkih, ki jih imenujemo fotosintetske enote. Fotosintetska enota vsebuje molekule klorofila a in klorofila b. Najpogostejše razmerje med klorofilom a in klorofilom b je 3 : 1. Poleg klorofila pa so v fotosintetski enoti še druga barvila, kot so oranžni karoteni in rumeni ksantofili. Vsaka fotosintetska enota vsebuje dva fotosistema, ki ju imenujemo fotosistem 1 in fotosistem 2. Ločimo ju po glavnem barvilu: v fotosistemu 1 je klorofil a z absorpcijskim vrhom pri 700 nm, v fotosistemu 2 pa je klorofil b z absorpcijskim vrhom pri 680 nm. (<http://vedez.dzs.si/dokumenti/dokument.asp?id=949>, 31. 1. 2014)



Slika 2: Shema kloroplasta (<http://vedez.dzs.si/dokumenti/dokument.asp?id=949>, 31. 1. 2014)

Molekuli klorofila a in b se razlikujeta po skupinah na obroču. Molekula klorofila a ima pripeto metilno (-CH₃) skupino, molekula b pa aldehydno (-CHO) skupino. Metilna skupina je manj polarna od aldehydne, zato je klorofil a bolj topen v nepolarnih topilih kot klorofil b. Na osnovi različne polarnosti, ju lahko ločimo z metodo kromatografije (Boh, 2000, str.19).

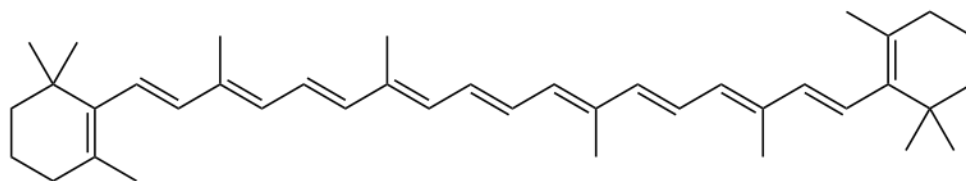


Slika 3: Skeletni formuli klorofila a in klorofila b

(Boh, 2000, str.18).

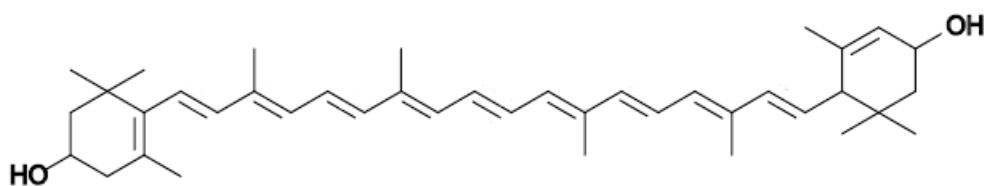
2.3.4 Karotenoidi

Karotenoidi so derivati izoprena. Imajo dolge molekule z velikim številom dvojnih vezi, ki si izmenično sledijo. Najpogosteje vsebujejo 40 ogljikovih atomov. Karotenoide delimo na karotene in ksantofile. Molekule karotenov so sestavljene iz atomov ogljika in vodika. Veriga teh spojin so lahko odprte (likopen, ki je v paradižniku) ali pa sklenjene v šestčlene obroče (β -karoten pri korenčku). Molekule ksantofilov vsebujejo tudi atome kisika, pogosto v obliki skupine -OH na obroču (lutein).



Slika 4: Skeletna formula β -karotena

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-Carotene>, 10. 2. 2014)



Slika 5: Skeletna formula luteina

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Lutein>, 10. 2. 2014)

Karotenoidi so dobro topni v maščobah (lipidih), zato jim drugače rečemo tudi »lipokromi«. Topni so tudi v nepolarnih topilih. Zaradi dolgih nepolarnih molekul niso topni v vodi. Prisotnost kisikovih atomov daje ksantofilom nekoliko bolj polarni značaj od karotenov, kar omogoča kromatografsko ločitev obeh skupin barvil.

Zeleni listi vsebujejo β -karoten (25-30%), lutein (45%) in ostale krotenoide.

Poznamo čez 600 različnih karotenoidov. Vsebujejo jih vse zelene rastline kot pomožna fotosintezna barvila, vendar jih prekrivajo klorofili s svojo močno zeleno barvo. Najpogosteje so rumeni ali oranžni, izjemoma pa tudi rdeči. Značilni so za korenje, paradižnik, redečo papriko, lupine pomaranč itn., zasledimo jih pa tudi pri živalih, kot so pikapolonice, morske zvezde, korale, zlate ribice in raki.

Pri fotosintezi karotenoidi absorbirajo svetlobo v modrozelenem delu in tako razširijo uporabni del svetlobnega spektra. Pretvorijo jo v energijo in jo prenesejo na klorofil. Zaradi tega delujejo kot pomožna fotosintezna barvila, ki tudi ščitijo klorofile pred poškodbami s premočno svetlobo (Boh, 2000, str. 25 - 27).

2.3.5 Antocianidini

Antocianidini so najboljše skupina flavonoidov. So barvila mnogih plodov, cvetov in rdečega jesenskega listja. So znani indikatorji, ki spremenijo barvo v odvisnosti z pH. Antocianidini se v rastlini glikozilirajo v antocianine. To jim omogoči boljšo stabilnost in topnost. Močno tudi absorbirajo svetlobo v vidnih delih spektra. Različne barve antocianidinih barvil so posledica zamenjave dvojnih vezi in skupin-OH. Zaradi veliko možnih kombinacij poznamo v naravi okoli 300 antocianinov. Izolirani so najbolj stabilni v kislem, na nizki temperaturi in čim manjši osvetljenosti. Na stabilnost vplivajo pH, prisotnost kisika, temperatura, encimi ter kovinski ioni (Boh, 2000, str. 38).

2.3.6 Barvne spremembe jesenskega listja

Jeseni so dnevi krajši in intenzivnost svetlobe se zmanjšuje. Ker je biosinteza klorofilov odvisna predvsem od svetlobe s krajšimi valovnimi dolžinami, se nastajanje klorofilov zmanjša in končno ustavi. Ko se razgradijo klorofili, pridejo v ospredje druga barvila, ki so sicer prisotna ves čas. To so predvsem karotenoidi. Oranžni odtenki so karoteni in rumeni ksantofili. Tudi dotok vode in hranil se zmanjšuje. Celice med listnim pecljem in vejo začnejo oplutenevati in prekinejo izmenjavo snovi. Iz glukoze v listih se tvorijo antocianidini. Zaradi tega se listje obarva rdeče. Intenzivnost obarvanja je odvisna od zaloge glukoze v listih in temperaturnih razlik med dnevom in nočjo. V suhih in jasnih jesenih je listje bolj intenzivno rdeče obarvano. Rjavo obarvanost listja pa prispevajo tanini, zelo stabilni odpadni produkti (Boh, 2000, str. 42).

2.3.7 Zeleni listi zimzelenih rastlin pozimi

Fotosinteza pri zimzelenih rastlinah se pozimi nadaljuje, le da je ta, zaradi nizke temperature in manjšega sončnega sevanja, upočasnjena. Listi zimzelenih rastlin so odporni na nizke temperature in sušo. Navadno so listi zimzelenih rastlin bolj trdni, usnjati in nekateri so prevlečeni z voskom, da ne bi izgubili preveč vode. V zimskem času je, zaradi nizkih temperatur, črpanje vode v rastlini oteženo ali se ustavi

(<https://www.princeton.edu/~achaney/tmve/wiki100k/docs/Evergreen.html>, 14.1. 2014).

3 POTEK RAZISKOVALNEGA DELA

Delo smo si zastavile tako, da smo najprej preučile barvila, ki se nahajajo v rastlinah. Torej smo se najprej lotile teoretičnega dela. Potem smo preučile metode dela za ločevanje rastlinskih barvil in se lotile eksperimentalnega dela, na katerem temelji naša raziskovalna naloga. Našemu eksperimentalnemu delu smo posvetile kar nekaj časa, saj mora biti delo natančno opravljeno. Ob eksperimentiranju smo pridobile podatke, ki smo jih uredile v tabelo, in izračunale retenzijske faktorje. Na koncu smo pridobljene podatke uredile, naredile analizo in oblikovale zaključek.

3.2 Izbor in priprava rastlinskega materiala


Na temo rastlinskih barvil je bilo izdelanih že veliko raziskovalnih nalog. Nismo zasledile nič o barvilih v zimskem listju, zato smo se odločile, da bomo to raziskale. Ker je bila letos januarja zelo mila zima in so bili listi listopadnih dreves in grmovnic v zelo dobrem stanju, smo imele možnost raziskati, kaj se z barvili dogaja v tem letnem času. Izbrale smo si liste plezalke peterolistne vinike, ki se jeseni zelo lepo rdeče obarva in krasi našo šolo, pa tudi liste dveh grmovnic - ameriške borovnice in robide. Odločile smo se še za zimzelene rastline, in sicer bršljan, smreko in klek. Vse našete rastline smo nabrale v okolici naše šole. Rastlinski material, torej liste, smo utrgale z iste rastline v jesenskem času (druga polovica novembra) in zimskem času (januarja).

3.3 Priprava eksperimentalnega lista

Za lažje sledenje poteku eksperimentalnega dela smo si pripravile eksperimentalni list, ki nam je služil beleženje podatkov. Zabeležile smo barvo lise, ki jo je naredilo posamezno barvilo, pot barvila v centimetrih in izračunale retenzijske faktorje. Pripravile smo dva lista, enega za jesensko obdobje in drugega za zimsko obdobje.

	Jesensko listje	Pot topila (cm)	Pot barvila (cm)	Rf	Barva lise
LISTOPADNE RASLINE	Borovnica				
ZIMZELENE RASTLINE	Bršljan				

Eksperimentalni list za jesensko listje

	Zimsko listje	Pot topila (cm)	Pot barvila (cm)	Rf	Barva lise
LISTOPADNE RASLINE	Borovnica				
	Robida				
	Vinika				
ZIMZELENE RASTLINE	Bršljan				
	Smreka				
	Klek				

Eksperimentalni list za zimsko listje

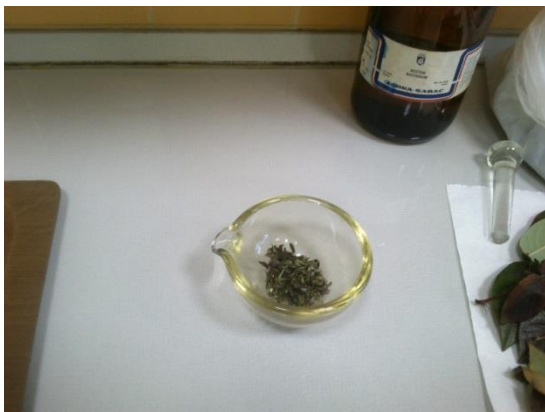
3.4 Potek eksperimentalnega dela

Vodilo za eksperimentalno delo sta bila delovni zvezek in učbenik Barvila in naravna barvila. V delovnem zvezku je delo zastavljeno tako, da je treba najprej ugotoviti, katero topilo je najustreznejše za ločevanje barvil. Preizkusiti je treba naslednja topila: vodo, aceton in heksan. Po poskusu in določitvi primernega ekstrakcijskega topila smo se lotile kromatografske metode. Delo smo opravile po navodilih kot so navedena v delovnem zvezku Barvila in naravna barvila (str. 7).

3.4.1 Določitev ekstrakcijskega topila

Trikrat smo odtehtale po 5 g jesenskih listov in jih narezale na majhne koščke. Nato smo za ekstrakcijo pripravile 3 različna topila: heksan, aceton in vodo, po 30 ml.

Za ekstrakcijo s heksanom, acetonom in vodo smo uporabile tri terilnice, na katere smo napisale ime topila. Narezanim listom (5 g) smo dodale kremenčev pesek in približno 15 mL heksana. Močno smo trle s pestilom, da se je raztopina obarvala. Nato smo ekstrakt previdno prelile v čisto čašo. Listnemu tkivu v terilnici smo dodale še preostanek heksana (15 ml) in postopek ponovile.



Slika 6: Priprava rastlinskega materiala za ekstrakcijo



Slika 7: Priprava ekstrakta v terilnici

Enak postopek smo ponovile še z acetonom in vodo.

Dobljene ekstrakte je bilo treba še prefiltrirati. Postavile smo si aparaturo za filtracijo: stojalo, obroč, lij, filtrirni papir in čašo. Vse tri ekstrakte smo prefiltrirale, vsak ekstrakt v svojo čašo.



Slika 8: Aparatura za filtracijo ekstrakta

Že iz barve ekstraktov se je videlo, da je najboljše topilo za izolacijo barvil iz listov aceton. To smo dokazali tudi s pomočjo papirne kromatografije. Aceton je ekstrahiral največ različnih skupin barvil. Heksan je ekstrahiral le rumena barvila, voda pa skoraj nič barvil.

Tako smo prišle do ugotovitve, da bomo za naše eksperimentalno delo uporabile zmes heksana in acetona, saj sta bili najbolj primerni topili za ekstrakcijo.

3.4.2 Metoda ekstrakcije

Metodo ekstrakcije smo uporabile za pridobivanje ekstraktov listov šestih različnih rastlin v jesenskem obdobju in listov šestih istih rastlin v zimskem obdobju. Metodo ekstrakcije smo naredile po enakem postopku, kot je opisan v točki 3.3.1, le da smo tokrat za ekstrakcijsko topilo uporabile zmes acetona in heksana. Dobljene ekstrakte smo shranile v temne steklenice, ki smo jih dobro zamašile in jih dale v hladilnik. To smo storile zato, ker kromatografije nismo uspele opraviti isti dan.



Slika 9: Ekstrakte smo shranile v temne steklenice

3.4.3 Metoda kromatografije

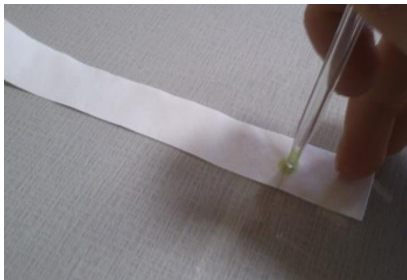
V literaturi, s katero smo si pomagale, je bila navedena tankoplastna kromatografija, pri kateri se uporablja kromatografska plošča s silikagelom. Ker nismo imele take plošče, smo se odločile za papirno kromatografijo.

Beseda kromatografija je izpeljana iz grških besed: *chromos* pomeni barva, *grafein* pa pisati. Prvi je to metodo leta 1903 uporabil ruski botanik M. Cvet za ločevanje zmesi barvil v zelenih rastlinah. Pri ločevanju s kromatografijo imamo dve fazi, stacionarno in mobilno. Mobilna faza je tekočina, ki potuje po stacionarni fazi.

(<http://www.kii3.ntf.uni-lj.si/e-kemija/file.php/1/output/kromatografija/>, 3. 2. 2014).

Pri papirni kromatografiji je filtrirni papir stacionarna faza, kromatografsko topilo pa mobilna faza. Topilo potuje po filtrirnem papirju zaradi kapilarnosti. To je delovanje površinske napetosti tekočin v ozkih cevkah. Filtrirni papir je zgrajen iz nešteto tankih cevk iz celuloze.

Aparaturo za papirno kromatografijo smo sestavile iz 200 mL merilnega valja, plutastega zamaška in filtrirnega papirja. V plutasti zamašek smo naredile zarezo in vanjo vstavile trak filtrirnega papirja ustrezne velikosti. Trakove filtrirnega papirja smo narezale na ustrezne velikosti, tako da so bili zadosti široki in dolgi. Na filtrirni papir smo s svinčnikom narahlo zarisale črto 2,5 cm od spodnjega roba, tj. štartna črta. Na sredino te črte smo natančno nanašale ekstrakt s tanjšo pipeto (1 mL), ki je bila alternativa za kapilaro. Za vsak ekstrakt smo naredile do 15 nanosov, po vsakem nanosu smo lise osušile, preden smo spet nanesele novega. Vsak posamezni trak filtrirnega papirja smo označile z ustrezno kratico, ki je označevala določen ekstrakt.



Slika 10: Nanašanje ekstrakta na trak filtrirnega papirja

V merilni valj smo nalile zmes kromatografskih topil. V literaturi smo našle podatek za kromatografsko zmes topil: 60mL petroletra, 20 ml acetona, 20 mL kloroforma. Kloroforma v šolskem laboratoriju nimamo, zato smo namesto te zmesi uporabile drugo zmes: 92% petroletra in 8% acetona. Navodilo za to zmes smo našle v Navodilih za laboratorijsko delo (str. 27). Odločile smo se, da bomo za razvoj kromatograma merile čas, in sicer 10 minut. Po tem času smo vzele trak papirja iz merilnega valja in označile mejo, do katere je pripotovalo topilo. Nato smo označile mejo, do katere je pripotovalo posamezno barvilo, in izračunale retenzijske faktorje. Za vsako rastlino smo trikrat ponovile postopek kromatografije. V nalogi smo predstavile le povprečne vrednosti dobljenih rezultatov.

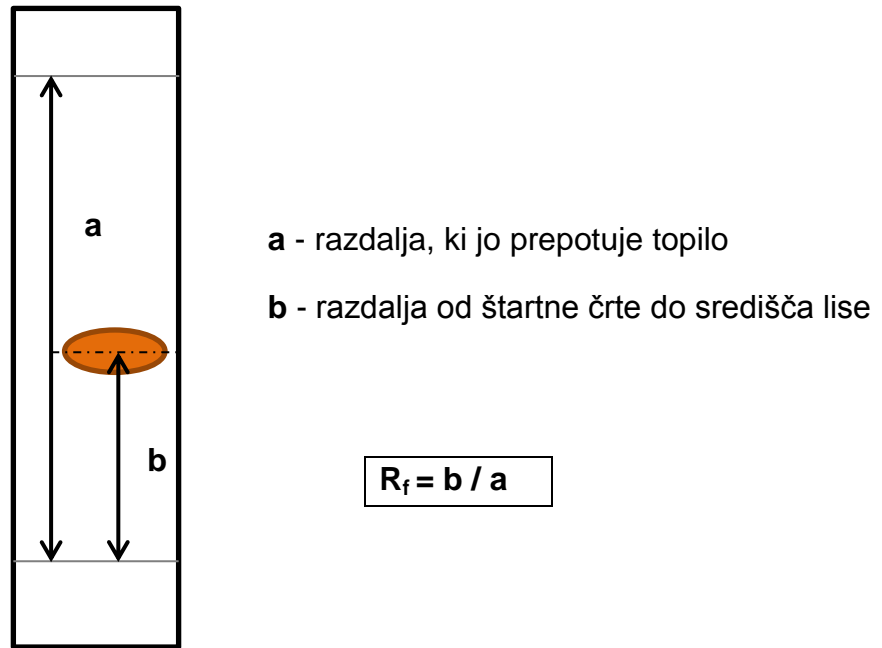


Slika 11: Kromatografska aparatura

3.4.4 Določanje položaja lis in izračun retenzijskega faktorja

Rezultat papirne kromatografije je kromatogram, na katerem se je vsaka od lis na štartni črti po potovanju mobilne faze razdelila v več lis – barvil. Lise so bile različno obarvane: svetlo zeleno, temno zeleno, rumeno, oranžno-rumeno in rdeče. Lise so bile jasno vidne, zato nismo potrebovali dodatnih reagentov.

Na razvitem kromatogramu smo posameznim lisam opredelile položaj z retenzijskim faktorjem (zadrževalni faktor) R_f . Določile smo ga tako, da smo razdaljo od štartne črte do središča lise – b, delile z razdaljo, ki jo prepotuje topilo (od štartne črte do končne črte - fronte) (Boh, 2000, str. 56).




Slika 12: Shema izračuna retenzijskega faktorja

3.4.5 Določanje širine lis za posamezna ločena barvila

Za vsako ločeno barvilo na kromatogramu smo izmerile širino lise in s tem sklepale na količino posameznih barvil v listu določene rastline. Meritve smo podale v milimetrih.


4 REZULTATI IN UGOTOVITVE

Rezultate smo zapisale v tabelo eksperimentalnega lista. Zapisale smo pot topila v centimetrih, pot barvila v centimetrih, izračunan retenzijski faktor in barvo lise za ekstrakt posamezne rastline.

	Jesensko listje	Pot topila (cm)	Pot barvila – povprečne vrednosti(cm)	R_f	Barva lise
LISTOPADNE RASLINE	Borovnica		6,1	0,98	Rumenkasto oranžna
			3,3	0,53	Rumena

		6,2	1,7	0,27	Temno zelena	
			1,3	0,20	svetlozelena	
	Robida	5,8	5,8	1	Rumenkasto oranžna	
			3,5	0,60	Rumena	
			1,5	0,25	Temno zelena	
			1,0	0,17	svetlozelena	
	Vinika	6,2	6,2	1	Rumenkasto oranžna	
			4	0,65	Rumena	
			/	/	Temno zelena	
			/	/	svetlozelena	
	ZIMZELENE RASTLINE	Bršljan	7,8	6,2	0,79	Rumenkasto oranžna
				3,9	0,50	Rumena
		2,3		0,29	Temno zelena	
		1,7		0,22	svetlozelena	
Smreka		7,7	7,7	1	Rumenkasto oranžna	
			5,7	0,74	Rumena	
			3,5	0,45	Temno zelena	
			2,5	0,32	svetlozelena	
Klek		6,7	6,7	1	rumenkasto oranžna	
			4,9	0,73	rumena	
			2,5	0,37	temno zelena	
			1,5	0,22	svetlozelena	

Tabela 1: Prikaz poti topila, poti barvila in barve lise za posamezne rastline v jesenskem obdobju (druga polovica novembra).

	Zimsko listje	Pot topila (cm)	Pot barvila – povprečne vrednosti (cm)	Rf	Barva lise
LISTOPADNE RASTLINE	Borovnica	7,2	7,2	1	rumenkasto oranžna
			5,5	0,76	rumena
			4,0	0,55	temno

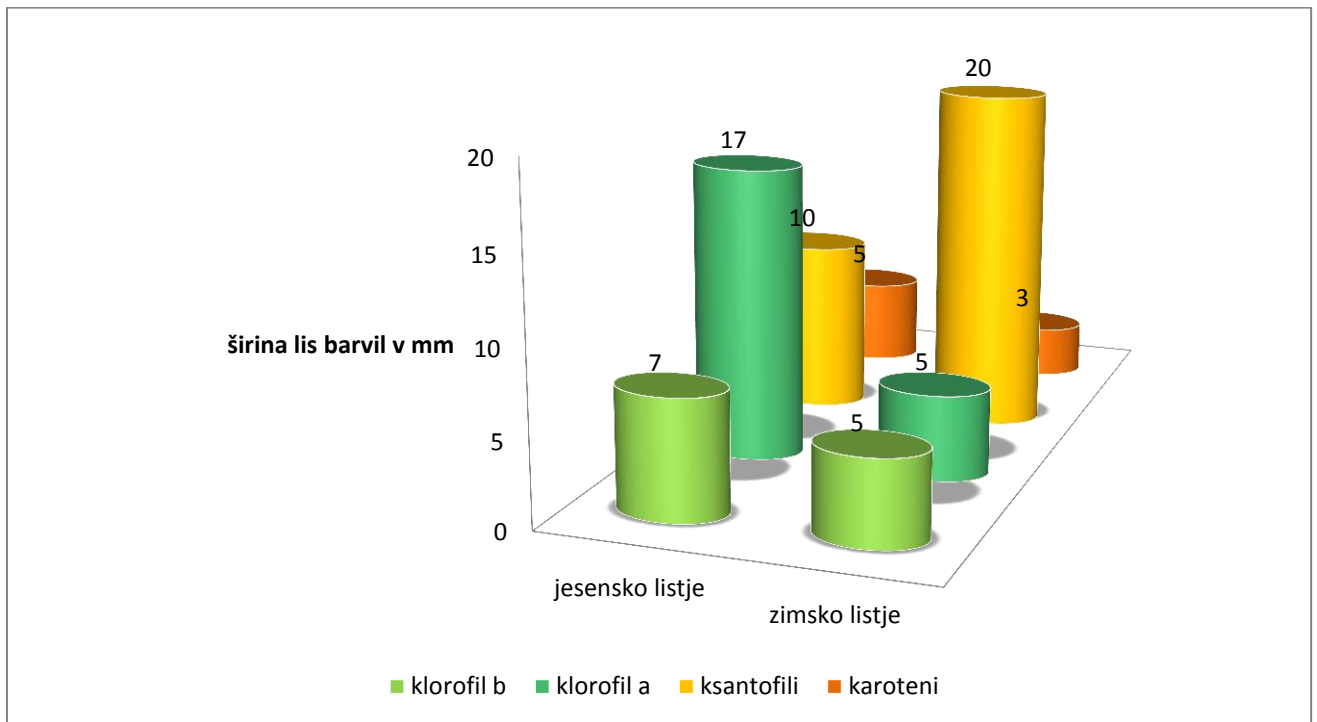
					zelena
			2,8	0,38	svetlozelena
	Robida	6,3	6,3	1	rumenkasto oranžna
			4,5	0,71	rumena
			1,8	0,28	temno zelena
			1,4	0,22	svetlozelena
	Vinika	/			rumenkasto oranžna
					rumena
					temno zelena
					svetlozelena
ZIMZELENE RASTLINE	Bršljan	7,5	7,3	0,97	rumenkasto oranžna
			3,5	0,47	rumena
			1,9	0,25	temno zelena
			1,1	0,15	svetlozelena
	Smreka				rumenkasto oranžna
					rumena
					temno zelena
					svetlozelena
	Klek	6,2	5,9	0,95	rumenkasto oranžna
			3,9	0,63	rumena
			2,3	0,37	temno zelena
			1,5	0,24	svetlozelena

Tabela 2: Prikaz poti topila, poti barvila in barve lise za posamezne rastline v zimskem obdobju (sredina januarja).

4.1 Ugotovitve za jesensko in zimsko listje ameriške borovnice

Barvila	Jesensko listje (mm)	Zimsko listje (mm)
Korofil b	7	5
Klorofil a	17	5
Ksantofili	10	20
Karoteni	5	3

Tabela 3: Širina lis za posamezna barvila (povprečne vrednosti) v listih ameriške borovnice



Graf 1: Prikaz širine lis posameznih barvil za ameriško borovnico v jesenskem in zimskem obdobju.

Kromatogram jesenskega listja borovnice v primerjavi z kromatogramom zimskega listja borovnice daje pričakovane rezultate, saj se v zimskem času količina klorofilov zmanjša, rumenih barvil pa poveča. Količina ksantofilov se je enkrat povečala, medtem ko so je količina karotenov skoraj za enkrat zmanjšala. Opazile smo tudi prisotnost rdečih barvil, ki pa se zaradi izbora mobilne faze niso ločila. Glede na obarvanost listov, ki je bila še rdečkasto-zelena (slika 13), smo sklepale, da bodo klorofili prisotni, kar smo tudi eksperimentalno dokazale. Razmeroma visoko količino klorofila v zimskih listih ameriške borovnice bi lahko povezali z ugodnimi vremenskimi razmerami.

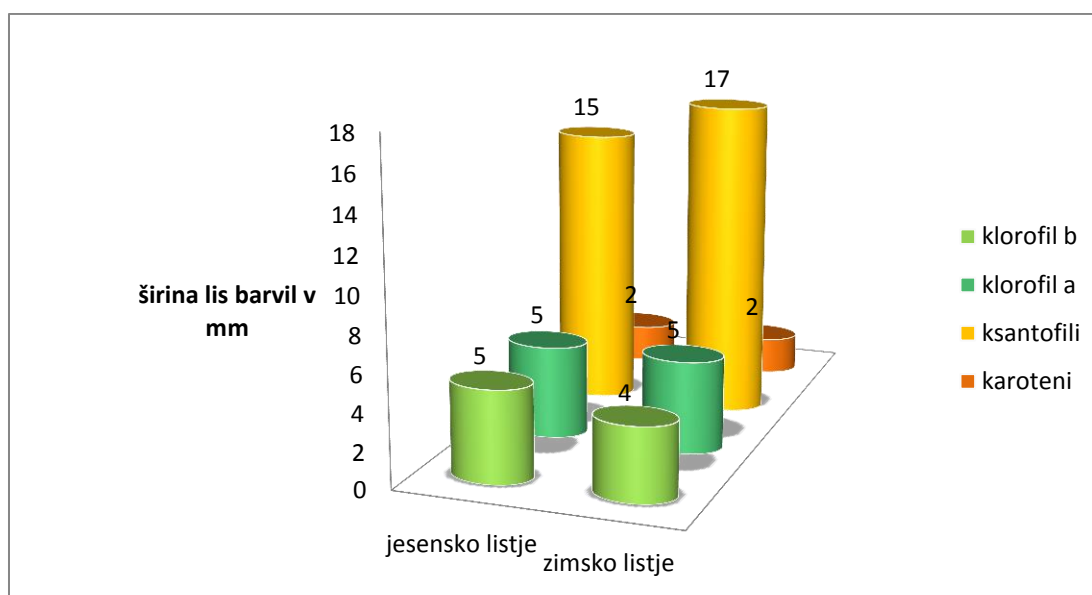


Slika 13: Zimsko listje ameriške borovnice

4.2 Ugotovitve za jesensko in zimsko listje robide

Barvila	Jesensko listje (mm)	Zimsko listje (mm)
Korofil b	5	4
Klorofil a	5	5
Ksantofili	15	17
Karoteni	2	2

Tabela 4: Širina lis za posamezna barvila (povprečne vrednosti) v listih robide



Graf 2: Prikaz lis posameznih barvil za robido v jesenskem in zimskem obdobju.

Pri robidi so, poleg pričakovanega naraščanja količine ksantofilov, karoteni zastopani v manjši količini. Iz kromatograma smo razbrale, da se količina karotenov v obdobju od jeseni do zime ni spremenila. Ugotavljamo pa tudi prisotnost klorofilov v približno enaki količini tako v jesenskem kot v zimskem listju. To pripisujemo ugodnim vremenskim razmeram v decembru in januarju. Na kromatogramu smo spet na štartni črti zasledile prisotnost rdečih barvil, ki pa se niso lepo ločile.

Obarvanost zimskih listov robide je bila rdeče-zelena, kar je nakazovalo na vsebnost klorofila (slika 14), čeprav je tu rdeča barva bolj zastopana kot pri listih ameriške borovnice.

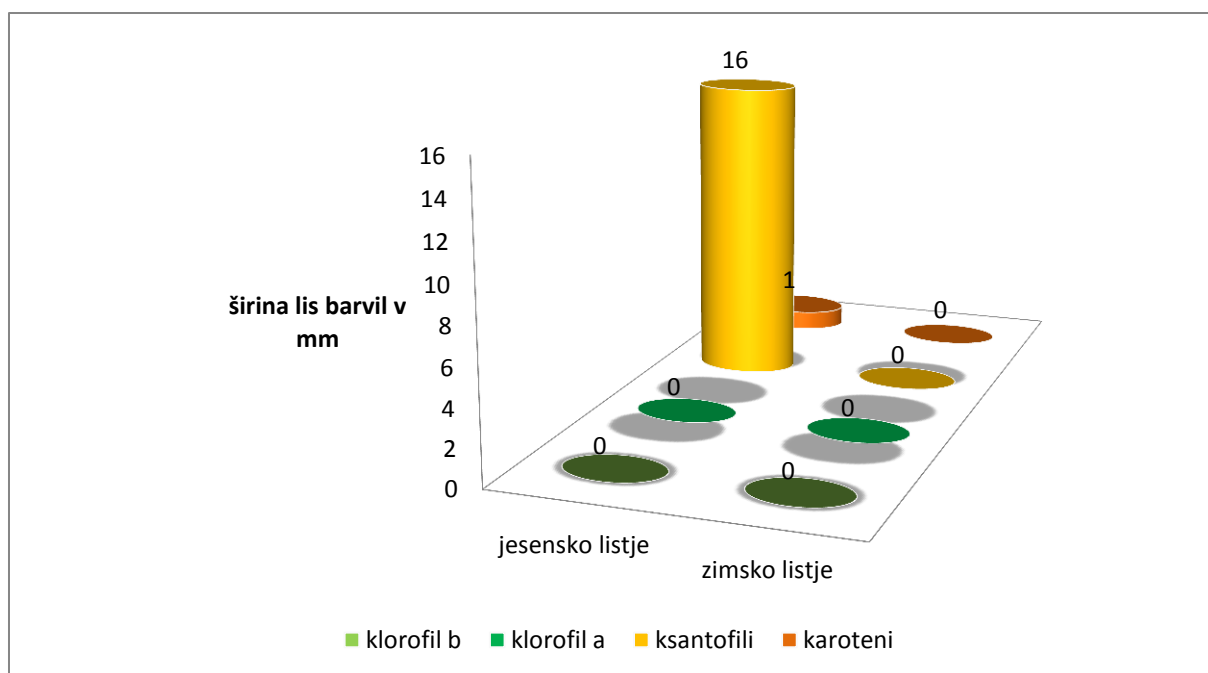


Slika 14: Zimsko listje robide

4.3 Ugotovitve za jesensko in zimsko listje peterolistno viniko

Barvila	Jesensko listje (mm)	Zimsko listje (mm)
Korofil b	0	0
Klorofil a	0	0
Ksantofili	16	0
Karoteni	3	0

Tabela 5: Širina lis za posamezna barvila (povprečne vrednosti) v listih peterolistne vinike



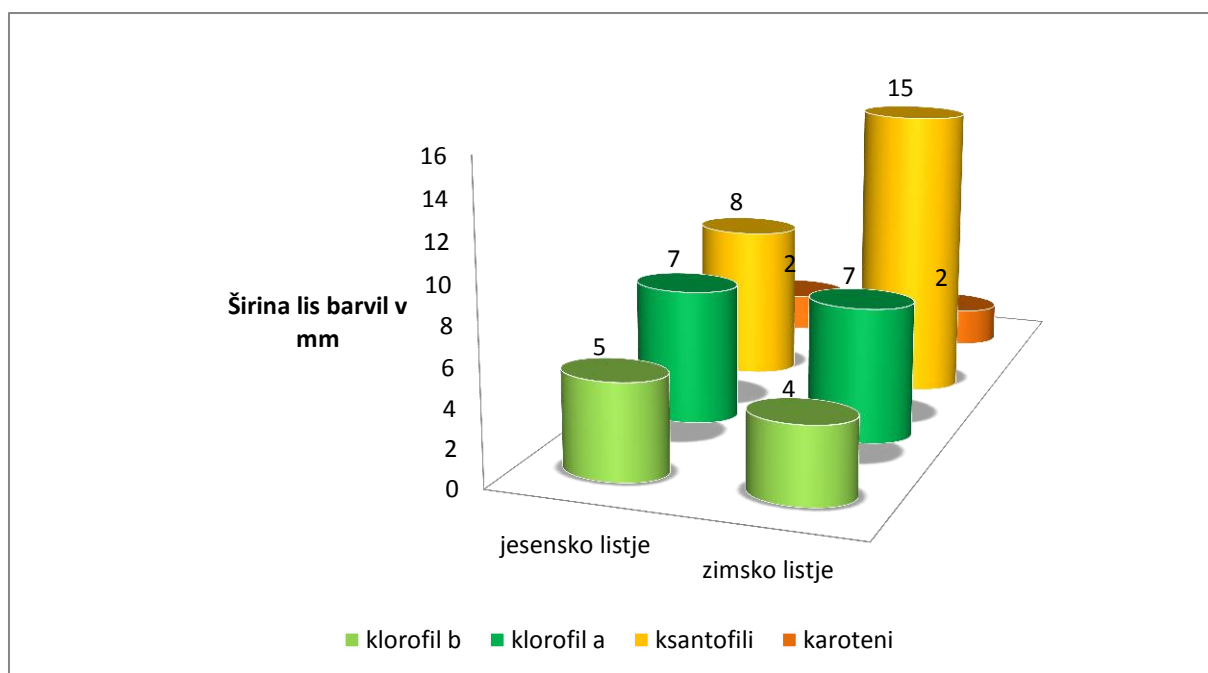
Graf 3: Prikaz širine lis posameznih barvil za peterlistno viniko v jesenskem in zimskem obdobju.

Kromatogram jesenskega listja nam prikazuje, da so v listih vinike prisotna rumena barvila. Tudi sledi rdečega barvila oziroma antocianidine smo opazile, vendar se zaradi izbora mobilne faze niso tako lepo ločila. Klorofilna barvila tukaj niso prisotna. Zimsko listje pri viniki se do februarja ni obdržalo na stebelu. Nekaj suhih, rjavo obarvanih listov smo našle na tleh. Kromatogram ni pokazal rezultatov. Taki listi vsebujejo tanine ali čreslovine, ki so zelo stabilni odpadni obarvani produkti. Ostala barvila niso več prisotna, saj so se razgradila.

4.4 Ugotovitve za jesensko in zimsko listje bršljana

Barvila	Jesensko listje (mm)	Zimsko listje (mm)
Korofil b	5	4
Klorofil a	7	7
Ksantofili	8	15
Karoteni	2	2

Tabela 6: Širina lis za posamezna barvila (povprečne vrednosti) v listih bršljana



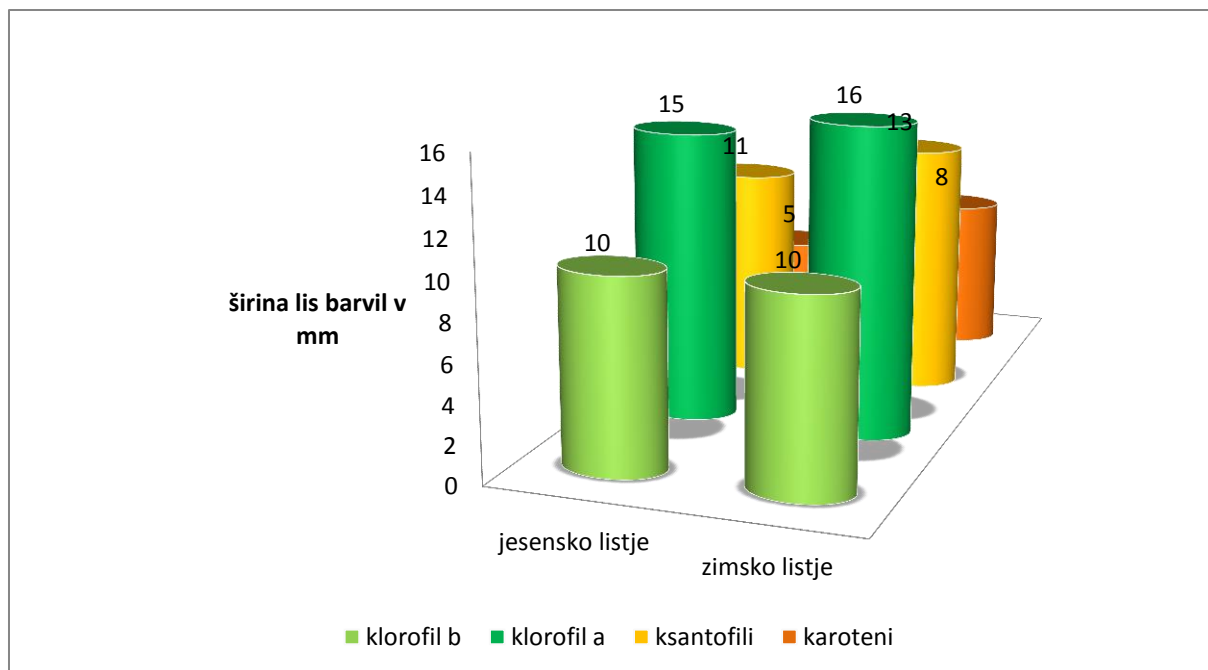
Graf 4: Prikaz širine lis posameznih barvil za bršljan v jesenskem in zimskem obdobju.

Kromatograma jesenskega in zimskega listja kažeta enako količino klorofilov, ki se torej v zimskem času ne spremeni. Spet pa opazamo povečanje ksantofilov v zimskem času. Količina karotenov se ne spreminja in je zastopana v manjši količini.

4.5 Ugotovitve za jesensko in zimsko listje smreke

Barvila	Jesensko listje (mm)	Zimsko listje (mm)
Korofil b	10	10
Klorofil a	15	16
Ksantofili	11	13
Karoteni	5	8

Tabela 7: Širina lis za posamezna barvila (povprečne vrednosti) v listih smreke



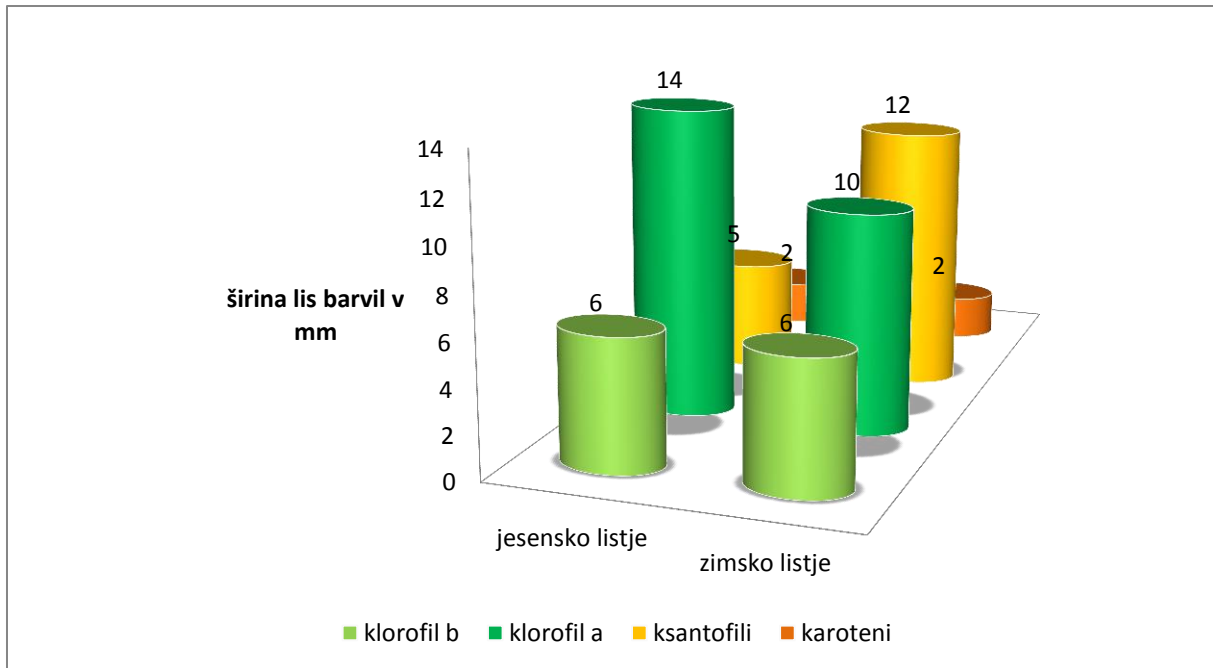
Graf 5: Prikaz širine lis posameznih barvil za smreko v jesenskem in zimskem obdobju.

Na splošno gledano so vsa barvila v obeh obdobjih dobro zastopana. Klorofila se pri smreki pojavljata v obeh obdobjih v približno nespremenjenih količinah. Sta dobro zastopana. Je pa zanimiv podatek, da karotenoidi v količini za klorofili ne zaostajajo. V zimskem listju je ksantofilov in karotenov nekoliko več kot v jesenskem listju.

4.6 Ugotovitve za jesensko in zimsko listje kleka

Barvila	Jesensko listje (mm)	Zimsko listje (mm)
Korofil b	6	6
Klorofil a	14	10
Ksantofili	5	12
Karoteni	2	2

Tabela 8: Širina lis za posamezna barvila (povprečne vrednosti) v listih kleka

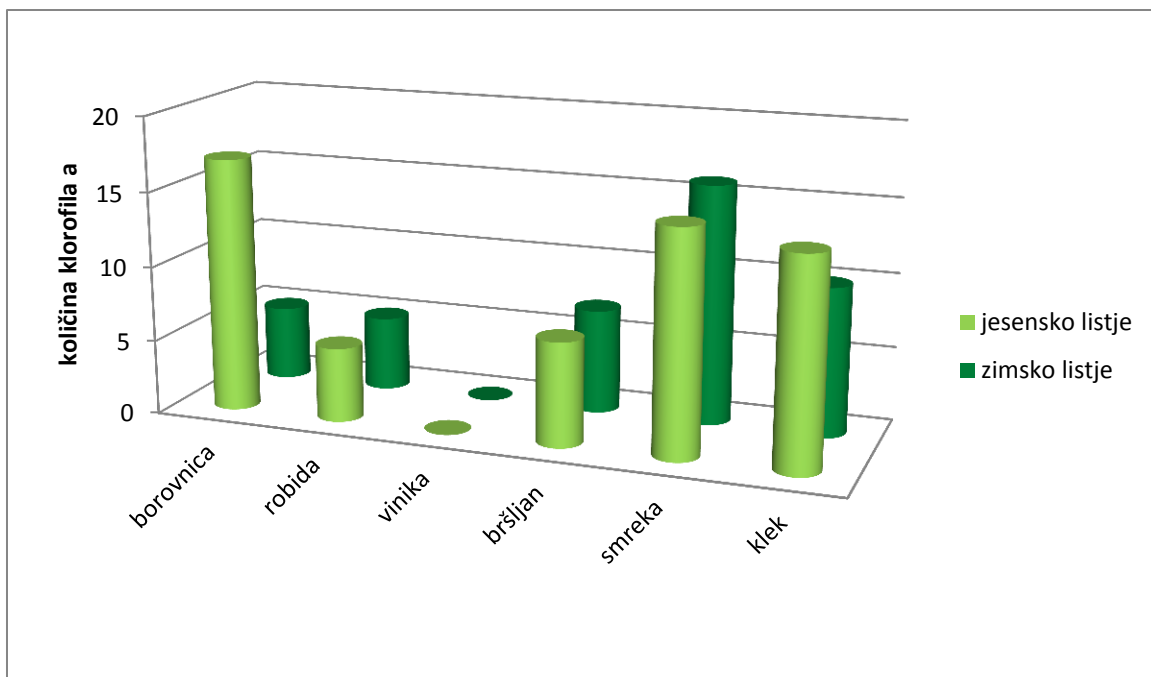


Graf 6: Prikaz širine lis za posamezna barvila za krek v jesenskem in zimskem obdobju.

Kromatogram barvil za liste krekla nam kaže, da se količina klorofila b ni spreminjala, nekoliko je znižana količina klorofila a. Ksantofili se povečajo skoraj za enkrat in karoteni ostajajo enaki.

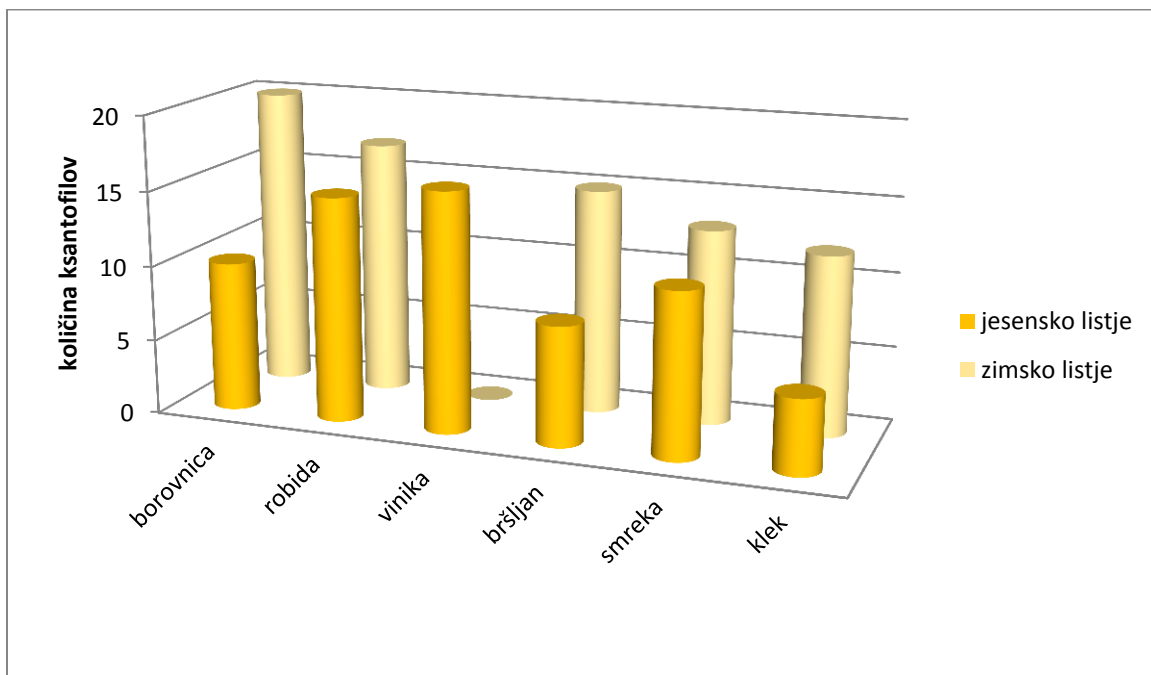
5 ANALIZA REZULTATOV IN UGOTOVITEV

Dobili smo zanimive podatke. Razen peterolistne vinike vsebujejo listi vseh rastlinskih predstavnikov, tako listopadnih kot zimzelenih, klorofila. Zaradi zelene obarvanosti listov smo lahko to tudi že sklepali. Vendar pa je prisotnost klorofila v takih količinah zanimiva. Po navadi se pri listopadnih rastlinah v pozni jeseni klorofil že precej razgradi. Pozimi pa naj bi bil že dokončno razgrajen. Iz grafa 7 je razvidno, da se klorofil a pojavlja pri vseh rastlinah (razen vinike), v pozni jeseni in pozimi.



Graf 7: Količina klorofila a v jesenskem in zimskem listju za posamezne rastline

Med karotenoidi je bil bolj zastopan ksantofil, barvilo, ki daje rumeno barvo. Ugotovili smo tudi, da je količina ksantofila v zimskem času narasla pri vseh rastlinskih vrstah, razen pri viniki.



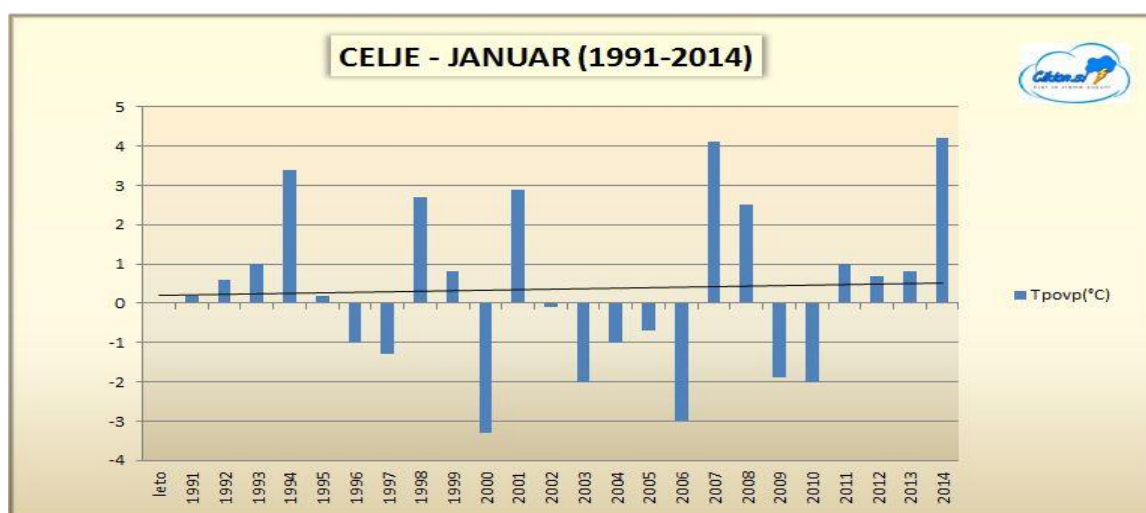
Graf 8: Količina ksantofilov v jesenskem in zimskem listju za posamezne rastline

Te ugotovitve, torej pojav klorofila pri vseh rastlinah, razen pri viniki, smo povezali z ugodnimi vremenskimi razmerami v jeseni, v novembru in decembru 2013 ter januarju 2014.

Jesen 2013 je bila izredno topla. Še zadnje dni oktobra so bile najvišje dnevne temperature zraka nad 20 °C, na skrajnem SV države se je ogrelo do skoraj 25 °C. November je bil v osrednji Sloveniji za 2 °C toplejši od dolgoletnega povprečja. Pogosto in obilno je deževalo, snega pa je bilo le za vzorec. Sonce je sijalo dalj časa kot v dolgoletnem povprečju, na večini ozemlja je bilo sončnega vremena do polovice več kot običajno, za več kot polovico pa so dolgoletno povprečje presegli v osrednji Sloveniji.

(<http://www.arso.gov.si/o%20agenciji/knji%C5%BEnica/mese%C4%8Dni%20bilten/NASE%20OKOLJE%20-%20December%202013.pdf>, 12. 2. 2014).

Čeprav je bilo sončnih dni v januarju 2014 malo, sta bila dejavnika, temperatura in količina padavin, nad dolgoletnim povprečjem. »V Celju je bila povprečna dnevna januarska temperatura +4,2 °C, kar je 3,8 °C nad dolgoletnim povprečjem 1991-2014. Povprečna najvišja dnevna temperatura je v Celju znašala +7,9 °C kar je 3,1 °C nad dolgoletnim povprečjem. Absolutna najvišja temperatura je bila +14,2 °C.« (<http://ciklon.si/stran/?p=21251>, 10. 2. 2014)



Graf 9: Prikaz povprečnih dnevni temperatur za večletno obdobje (1991 - 2014) za Celje (<http://ciklon.si/stran/?p=21251>, 10. 2. 2014)

6 ZAKLJUČEK

Po končanem delu smo lahko pregledale na začetku postavljene hipoteze in jih analizirale:

- Barvila v listju so zmesi. To smo potrdile z metodo kromatografije s katero smo ločile posamezna barvila.
- Barvila v jesenskem listju imajo poleg klorofila tudi druga barvila. Tudi to hipotezo smo potrdile, saj smo s kromatografijo odkrile prisotnost rumenih barvil – karotenoidov.
- Zimsko listje listopadnih rastlin ne vsebuje klorofila. Ta hipoteza delno drži, saj je to odvisno od rastlinske vrste. Peterolistna vinika je pozimi popolnoma odvrгла liste, ki so bili suhi. Kromatogram zimskih listov vinike ni dal rezultatov, tako da za viniko ta trditev drži. Za drugi dve rastlini, borovnico in robido, pa hipoteza ne drži, kajti kromatogram nam pokaže, da listi vsebujejo klorofil b in klorofil a celo v približno enaki količini kot v jesenskem listju. To smo pripisale ugodnim vremenskih razmeram v jeseni in pozimi.
- Barvila v jesenskih listih listopadnih rastlin vsebujejo drugačna barvila kot jesenskih listi zimzelenih rastlin. To drži spet le za viniko, katere listi niso vsebovali klorofilov, ampak le karotenoide. Listi ostalih dveh rastlin (borovnica in robida) vsebujeta ista barvila, kot zimzeleni rastlinski predstavniki.
- Barvila v zimzelenih listih jeseni in pozimi se ne spremenijo. Barvila ostajajo ista, le količina posameznih barvil se spreminja. Pri bršljanu in kleku je v zimskem listju narasla količina ksantofilov. V listju smreke se je pozimi nekoliko povečala količina karotenov.

Iz kromatograma smo lahko tudi odčitale, da je v tem topilu klorofil b najmanj topen, saj je prepotoval najkrajšo razdaljo. Karoten je najbolj topen, saj je prepotoval prepotoval najdaljšo razdaljo.

Načeloma smo bile z nalogo zadovoljne, saj smo spoznale veliko novega o biologiji zimzelenih in listopadnih listov.

Slabost naše raziskovalne naloge je ta, da nismo imele na razpolago kemikalij, da bi preizkusile še drugo kromatografsko topilo, ki bi bolje ločilo rdeča barvila. Zato se rdeča barvila na kromatogramu ne pojavljajo.

Zanimivo bi bilo narediti kromatograme za eno rastlinsko vrsto za vsak mesec vegetacijskega obdobja in tako spremljati spreminjanje listnih barvil za celotno vegetacijsko obdobje.

7 VIRI

- Barvila in naravna barvila: delovni zvezek. 2000. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije.
- Barvila in naravna barvila: učbenik. 2000. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije.
- Zupančič Brouwer, N., Vrtačnik, M. Eksperimentalna organska kemija. 1995Ljubljana: M&N.
- Navodila za laboratorijsko delo. 1997. Ljubljana: DZS.
- <http://www.kii3.ntf.uni-lj.si/e-kemija/file.php/1/output/kromatografija/>
- <http://sl.wikipedia.org/wiki/Barva>
- http://sl.wikipedia.org/wiki/Vidni_spekter
- <http://www.erevija.com/potovanje/1526/Svetlobno-tehni%C3%A8ni-pojmi>
- <http://vedez.dzs.si/dokumenti/dokument.asp?id=949>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Lutein>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Lutein>
- <http://www.arso.gov.si/o%20agenciji/knji%C5%BEnica/mese%C4%8Dni%20biten/NASE%20OKOLJE%20-%20December%202013.pdf>
- <http://ciklon.si/stran/?p=21251>
- http://www.gimvic.org/projekti/timko/2003/2c/naravn_abarvila/index.htm
- <https://www.princeton.edu/~achaney/tmve/wiki100k/docs/Evergreen.html>

IZJAVA*

Mentor (-ica) LOTTY COHNER, v skladu z 2. in 17. členom Pravilnika raziskovalne dejavnosti »Mladi za Celje« Mestne občine Celje, zagotavljam, da je v raziskovalni nalogi naslovom

Barvila v jesenskem in zimskem listju,
katere avtorji (-ice) so MAJA OLJENSEK, EVA POLJUTNIK,

- besedilo v tiskani in elektronski obliki istovetno,
- pri raziskovanju uporabljeno gradivo navedeno v seznamu uporabljene literature, da je za objavo fotografij v nalogi pridobljeno avtorjevo (-ičino) dovoljenje in je hranjeno v šolskem arhivu,
- da sme Osrednja knjižnica Celje objaviti raziskovalno nalogo v polnem besedilu na knjižničnih portalih z navedbo, da je raziskovalna naloga nastala v okviru projekta Mladi za Celje,
- da je raziskovalno nalogo dovoljeno uporabiti za izobraževalne in raziskovalne namene s povzemanjem misli, idej, konceptov oziroma besedil iz naloge ob upoštevanju avtorstva in korektnem citiranju,
- da smo seznanjeni z razpisni pogoji projekta Mladi za Celje

Celje, 7.3.2014



žig šole

Podpis mentorja(-ice)

Podpis odgovorne osebe

Bojca Kolin

*
POJASNILO

V skladu z 2. in 17. členom Pravilnika raziskovalne dejavnosti »Mladi za Celje« Mestne občine Celje je potrebno podpisano izjavo mentorja(-ice) in odgovorne osebe šole vključiti v izvod za knjižnico, dovoljenje za objavo avtorja(-ice) fotografskega gradiva, katerega ni avtor(-ica) raziskovalne naloge, pa hrani šola v svojem arhivu.

DOVOLJENJE ZA OBJAVO
AVTORSKE FOTOGRAFIJE V RAZISKOVALNI NALOGI

Podpisani, EVA POLJUTNIK, izjavljam, da sem avtor(-ica) fotografskega gradiva navedenega v priloženem seznamu in dovoljujem v skladu z 2. členom Pravilnika raziskovalne dejavnosti »Mladi za Celje« Mestne občine Celje, da se lahko uporabi pri pripravi raziskovalne naloge pod mentorstvom LOTTY COJHTER z naslovom Barvila v jesenskem in zimskem listju, katere avtorji (-ice) so HAJA EILENSEK, EVA POLJUTNIK:

Dovoljujem tudi, da sme Osrednja knjižnica Celje vključeno fotografsko gradivo v raziskovalno nalogo objaviti na knjižničnih portalih z navedbo avtorstva v skladu s standardi bibliografske obdelave.

Celje, 7.3.2014

Podpis avtorja:
Polutnik Eva

Priloga:
- seznam fotografskega gradiva