

## OZNACZANIE ZAWARTOŚCI CHLOROFILU

Zielona barwa organizmów fotosyntetyzujących jest związana z obecnością cząsteczek chlorofilu w chloroplastach. Rośliny syntetyzują kilka rodzajów chlorofilu, przy czym do najbardziej rozpowszechnionych w przyrodzie zalicza się *chlorofil a* i *chlorofil b*. Chlorofile są barwnikami asymilacyjnymi o charakterze hydrofobowym. Związki te składają się z pochodnej porfiryryny (feoporfiryryny), której cztery pierścienie pirolowe połączone są z atomem Mg. W cząsteczce porfiryryny występują naprzemiennie wiązania pojedyncze i podwójne, które tworzą układ rezonansowy. Wiązania sprzężone powodują, że chlorofile są efektywnymi fotoreceptorami, których charakterystyczną cechą jest bardzo silna absorpcja w zakresie światła widzialnego wyrażona poprzez wysokie molowe współczynniki absorpcji. W związku z tym zawartość chlorofilu w tkankach roślinnych można oznaczać **metodą spektrofotometryczną**. Zielony kolor cząsteczek chlorofilu jest związany z wysoką zdolnością do pochłaniania czerwonej i niebieskiej części spektrum światła, a niską zielonej części spektrum światła.

**Charakter hydrofobowy** cząsteczek chlorofilu jest związany z obecnością fitolu ( $C_{20}H_{39}OH$ ), który łączy się estrowo z feoporfiryryną. Zatem chlorofile dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych takich jak aceton, alkohol czy benzen. Wysoka zawartość chlorofilu w roślinie warunkuje wydajniejszy proces fotosyntezy.

Cząsteczki chlorofilu są dosyć nietrwałe, a ich rozpad wynikający z ekstrakcji przyspiesza działanie światła i tlenu. Należy zatem pamiętać podczas ekstrakcji by minimalnie narażać badane próby na działanie światła. Ponadto czynnikiem wpływającym negatywnie na uzyskane wyniki pomiaru zawartości chlorofilu jest zmiana pH (zakwaszenie) ekstraktu, która może nastąpić w wyniku homogenizacji tkanki. W tym celu trzeba stosować związki neutralizujące działanie kwasów.

**Cel ćwiczenia:** celem ćwiczenia jest porównanie zawartości chlorofilu *a* i chlorofilu *b* w różnych tkankach roślinnych oraz porównanie stosunku chlorofilu *a* do chlorofilu *b* w badanych próbach.

**Potrzebny sprzęt:** moździerz, probówki wirnikowe, pipety laboratoryjne z wymiennymi końcówkami, wirówka, kuwety spektrofotometryczne, spektrofotometr.

**Potrzebne odczynniki:** 96 % alkohol etylowy, węglan wapnia ( $CaCO_3$ ).

**Materiał roślinny** (0,2 g): liście lub inne organy różnych gatunków roślin np. cienio- i światłolubnych lub zielonych i pstrolistnych.

**Wykonanie:**

Liście dokładnie rozetrzeć w moździerzu, do którego uprzednio wiano 3 ml alkoholu etylowego, dodano szczyptę piasku i szczyptę CaCO<sub>3</sub>. Roztwór przelać ilościowo do odpowiednio oznakowanych probówek wirnikowych. Moździerz, i tłuczek przepłukać kolejnymi 2 ml alkoholu i zlać do tych samych probówek wirnikowych. Do momentu wirowania probówki z roztworem alkoholowym chlorofilu powinny być zakorkowane i znajdować się w ciemnym miejscu. Próby wirować w temperaturze pokojowej 9 000 rpm 10 min. Po tym czasie nadsącz przenieść ilościowo do nowych, oznakowanych probówek wirnikowych. Do kuwet spektrofotometrycznych wlać 1,9 ml alkoholu etylowego i 0,5 ml badanej próby. Wymieszać i oznaczyć zawartość chlorofilu za pomocą spektrofotometru przy odpowiednich długościach fal: 645 nm, 649 nm, 654 nm i 665 nm. Aparat wyzerować przy konkretnej długości fali na 2 ml etanolu.

**Obliczenia:**

Obliczyć zawartość chlorofilu a i b korzystając ze wzorów:

$$\text{Chlorofil } a = [(13,7 \times A_{665} - 5,76 \times A_{649}) \times (V : (1000 \times W))] \times 4 \text{ [mg g}^{-1} \text{ świeżej masy]}$$

$$\text{Chlorofil } b = [(25,8 \times A_{645} - 7,6 \times A_{665}) \times (V : (1000 \times W))] \times 4 \text{ [mg g}^{-1} \text{ świeżej masy]}$$

$$\text{Chlorofil } (a + b) = [(25,1 \times A_{654}) \times (V : (1000 \times W))] \times 4 \text{ [mg g}^{-1} \text{ świeżej masy]}$$

gdzie:

A 645-665 - wartość absorbancji mierzonej przy długości fali 649 - 665 nm,

V – całkowita objętość ekstraktu (ml)

W – masa próbki (g).

Obliczyć stosunek chlorofili a/b:

Uzyskane wyniki zinterpretować.