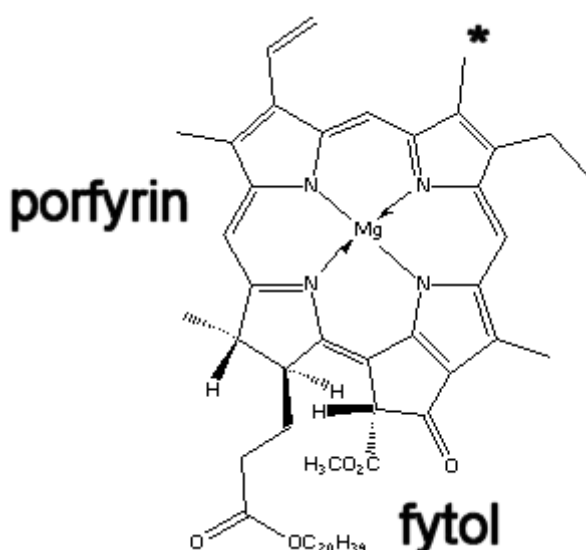


# Extrakce a spektrofotometrické stanovení chlorofylů *a* + *b*

## Trocha teorie:

Téměř všechny živé organismy na Zemi (výjimku tvoří např. chemolithotrofní bakterie) využívají ve svých metabolických procesech chemickou energii, která byla původně přeměněna z energie světelného záření zelenými rostlinami v procesu fotosyntézy. Z hlediska života na Zemi jsou tedy chlorofyly jednou z klíčových molekul.

Chlorofyly se vyskytují v rostlinách v chloroplastech ve formě chlorofyl-proteinových komplexů. Chlorofyl sám je složen ze dvou komponent: substituovaným porfyrinovým kruhem s centrálně navázaným kationtem  $Mg^{2+}$  a dlouhým uhlovodíkovým řetězcem - [fytolem](#). Chlorofyl *b* se od chlorofylu *a* liší pouze substitucí metylové skupiny za skupinu aldehydovou na 3. atomu uhlíku. Tyto dvě formy chlorofylů se v přírodě vyskytují v poměru 3:1 (chl *a*:chl *b*). Ačkoli porfyrin má hydrofilní charakter, nepolární charakter fytolu je pro molekuly chlorofylů významnější a ty jsou proto dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (ethanol, aceton, benzen...).



### Chlorofyl *a*

\* CH<sub>3</sub>

C<sub>55</sub>H<sub>72</sub>MgN<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, relativní molekulová hmotnost 893,49

maximální absorpce:  $\lambda=430$  nm a  $\lambda=662$  nm

### Chlorofyl *b*

\* CHO

C<sub>55</sub>H<sub>70</sub>MgN<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, relativní molekulová hmotnost 906,51

maximální absorpce:  $\lambda=453$  nm a  $\lambda=642$  nm

## Pomůcky a potřeby:

Čerstvé listy kukuřice (*Zea mays*), třenka, pipety 2, 5 a 10 ml, odměrné baňky 50 ml, skleněná tyčinka, filtrační papír, filtrační nálevky, stojan s filtračními kruhy, laboratorní váhy, spektrofotometr, mořský písek, 100% aceton, MgCO<sub>3</sub>.

## Postup:

1. Odvážíme 0,25 g čerstvých listů, rozstříháme je do třenky na menší kousky a přidáme malé množství mořského písku a uhličitanu hořečnatého.
2. Obsah třenky důkladně rozetřeme a poté promyjeme 5 ml acetonu. Necháme chvíli ustát a poté extrakt přes skleněnou tyčinku filtrujeme přes filtrační papír předem zvlhčený acetonem do 25ml odměrné baňky.
3. Bod č. 2 opakujeme několikrát za sebou, až do úplného odbarvení obsahu třenky.
4. Acetonem promyjeme rovněž filtrační papír - kvantitativně přeneseme do roztoku veškerý chlorofyl.
5. Acetonový extrakt chlorofylu v odměrné baňce doplníme po značku.
6. Oproti blanku (aceton) změříme absorbanci při  $\lambda=470\text{nm}$ ,  $\lambda=646\text{ nm}$  a  $\lambda=663\text{ nm}$ .
7. Koncentraci chlorofylů a karotenoidů v extraktu vypočteme dle následujících rovnic [Wellburn A.R., *J. Plant Physiol.* **144**: 307-313 (1994)]:

$$\text{Chl } a = 12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646} \quad [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$$

$$\text{Chl } b = 20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663} \quad [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$$

$$C_{x+c} = (1000 \times A_{470} - 3,27 \times \text{Chl } a - 104 \times \text{Chl } b) / 198 \quad [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$$

kde A jsou absorbance při příslušné vlnové délce a šířce kyvety 1 cm.

8. Výsledky přepočteme na množství chlorofylů na jednotku hmotnosti (1 g) čerstvých listů.

## Prezentace a diskuze získaných dat

1. Jak se liší obsah chlorofylů a karotenoidů u vámi testovaných rostlin kukuřice?
2. Jaký je poměr chlorofylu *a*: chlorofylu *b* a odpovídá tento poměr teoreticky udávaným hodnotám?