**Extrakce a spektrofotometrické stanovení fotosyntetických pigmentů**

**Pomůcky a potřeby:**

Čerstvé listy rostliny, třenka, pipety 2, 5 a 10 ml, odměrné baňky (25 nebo 50 ml), skleněná tyčinka, filtrační papír, filtrační nálevky, stojan s filtračními kruhy, laboratorní váhy, spektrofotometr, mořský písek, 100% aceton, MgCO3.

**Postup:**

1. Odvážíme přibližně 0,25 nebo 0,5 g čerstvých listů, zapíšeme si přesnou hmotnost
2. Listy rozstříháme do třenky na menší kousky a přidáme malé množství mořského písku a uhličitanu hořečnatého.
3. 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 odměrné baňky (25 nebo 50ml).
4. Bod č. 2 opakujeme několikrát za sebou, až do úplného odbarvení obsahu třenky.
5. Acetonem promyjeme rovněž filtrační papír - kvantitativně přeneseme do roztoku veškerý chlorofyl.
6. Acetonový extrakt chlorofylu v odměrné baňce doplníme po značku.
7. Oproti blanku (aceton) změříme pomocí spektrofotometru absorbanci vzorku při λ=663 nm, λ=646 nm a λ=470 nm.
8. Koncentraci fotosyntetických pigmentů v extraktu vypočteme dle následujících rovnic (Wellburn A.R. (1994)  *J. Plant Physiol.* 144: 307-313):  
      
   C(chl *a*) =   12,21×A663 - 2,81×A646[mg.l-1]  
   C(chl *b*) = 20,13×A646 - 5,03×A663[mg.l-1]  
   C(c+x) = (1000×A470 - 3,27×C(chl *a*) - 104×C(chl *b*))/198     [mg.l-1]  
      
   kde A jsou absorbance při příslušné vlnové délce a šířce kyvety 1 cm.
9. Výsledky přepočteme na množství pigmentů na jednotku hmotnosti (1 g)