

# 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, MgCO<sub>3</sub>.

## 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  $\lambda=663$  nm,  $\lambda=646$  nm a  $\lambda=470$  nm.
8. Koncentraci fotosyntetických pigmentů v extraktu vypočteme dle následujících rovnic (Wellburn A.R. (1994) *J. Plant Physiol.* 144: 307-313):

$$C(\text{chl } a) = 12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646} \quad [\text{mg.l}^{-1}]$$

$$C(\text{chl } b) = 20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663} \quad [\text{mg.l}^{-1}]$$

$$C(c+x) = (1000 \times A_{470} - 3,27 \times C(\text{chl } a) - 104 \times C(\text{chl } b)) / 198 \quad [\text{mg.l}^{-1}]$$

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

9. Výsledky přepočteme na množství pigmentů na jednotku hmotnosti (1 g)