

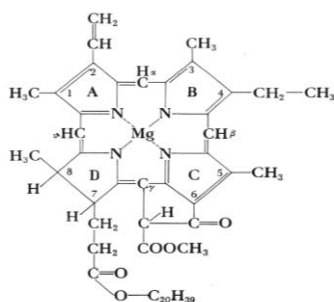


Ekstrakcyjno – spektrofotometryczna metoda oznaczania chlorofilu w roślinach

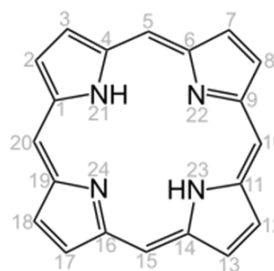
Wstęp

Chlorofile występują w chloroplastach roślin pełniąc (wraz z karotenami) rolę syntezatorów wytwarzających materię organiczną na drodze fotosyntezy. Chlorofil jest **zielonym barwnikiem** występującym w organizmach zdolnych do przeprowadzenia procesu fotosyntezy, m.in. w roślinach wyższych, glonach, cyjanobakteriach. Znaczna zawartość chlorofilu w organizmach fotosyntezujących jest odpowiedzialna za ich zieloną barwę.

Cząsteczka chlorofilu zbudowana jest z pochodnej porfiryny – *feoporphiryny* (pięciopierścieniowej porfiryny z różnymi podstawnikami). Zawiera on cztery połączone ze sobą pierścienie pirolowe, które łączy centralnie ułożony atom Mg (Rys. 1). W układzie porfiryńowym (Rys. 2) występują naprzemienne wiązania pojedyncze i podwójne, które tworzą układ rezonansowy.



Rys. 1. Wzór strukturalny chlorofilu a



Rys. 2. Układ porfiryńowy

Dzięki zdolności feoporphiryny do łączenia się poprzez wiązanie estrowe z alkoholem o 20 atomach węgla – fitolem ($C_{20}H_{39}OH$), chlorofile dobrze rozpuszczają się w lipidach, rozpuszczalnikach lipidowych, acetonie, alkoholach i są prawie nierozpuszczalne w wodzie.

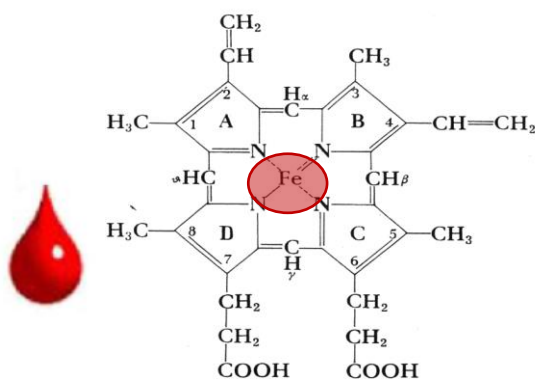
Istnieje kilka rodzajów chlorofilu, przy czym najbardziej rozpowszechnione w przyrodzie to chlorofil a i chlorofil b, występujące u wszystkich organizmów fotosyntezujących. Inne, jak chlorofile c i d występują jedynie u części glonów. Czym więcej chlorofilu w roślinie, tym wydajniejszy jest proces fotosyntezy i lepsza jest jakość rośliny.

Charakterystyka chlorofilu a i b:

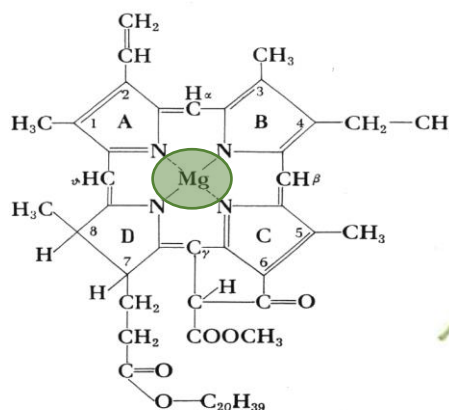
Chlorofil a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) – **ciemnoniebieska** substancja krystaliczna, topi się w $150-153\text{ }^{\circ}C$, nie rozpuszcza się w wodzie, rozpuszcza się w alkoholu, roztwór ma barwę niebieskozieloną;

Chlorofil b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) – jest **ciemnozielony**, topi się w temperaturze $183\text{ }^{\circ}C$, nie rozpuszcza się w wodzie, rozpuszcza się w alkoholu, roztwór ma barwę żółtozieloną.

Podobną strukturę chemiczną i istotną rolę dla organizmów żywych ma dobrze rozpuszczalny w wodzie *hem*, tj. niebiałkowa grupa barwnika krwi hemoglobiny i mioglobiny, będąca pochodną pirolu (porfiryny), zbudowanego z czterech pierścieni pirolowych połączonych z atomem Fe. Na rysunku 3 przedstawiono struktury chemiczne hemu oraz chlorofilu a:



Hem (żelazoprotoporfiryna)



Chlorofil a

Rys. 3. Struktury chemiczne hemu i chlorofilu a

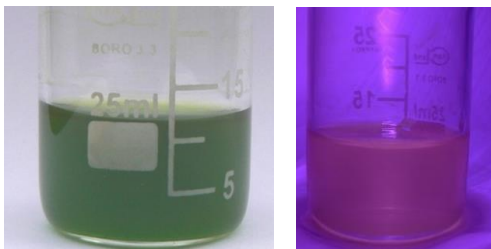
Chlorofil a dominuje w roślinie i jest zawsze w pewnym stosunku do chlorofilu b. Wiedza o wzajemnej relacji pomiędzy chlorofilem a i b (stosunek chl(a)/chl(b)) jest cenna, gdyż informuje o zachowaniu rośliny wobec światła:

5 : 1 - silne nasłonecznienie
3½ : 1 - dobre
2½ : 1 - umiarkowane
2 : 1 (i mniej) - słabe

rośliny światłolubne: stosunek korzystniejszy dla chlorofilu a

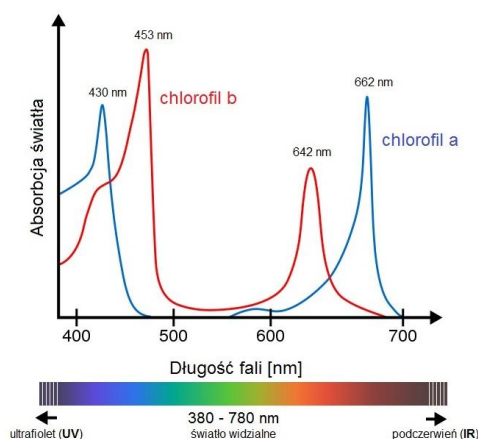
rośliny ceniolubne: więcej jest chlorofilu b, ale dalej chlorofil a jest w przewadze

Z uwagi na obecność podwójnych wiązań sprzężonych chlorofile są efektywnymi **fotoreceptorami**. Charakterystyczną cechą takich związków jest bardzo silna absorpcja w zakresie światła widzialnego (Vis) wyrażona poprzez wysokie molowe współczynniki absorpcji (ϵ), jedne z najwyższych, jakie znane są dla związków organicznych. Obecność Mg w strukturze wpływa na zdolność agregacji cząsteczek chlorofilu, co ułatwia przekazywanie energii wzbudzenia pomiędzy cząsteczkami. Ma to funkcję w organizmach fotosyntezujących, związaną z wychwytywaniem kwantów światła i przekazywaniem energii wzbudzenia do centrum reakcji fotoukładu, skąd wybijane są elektrony, spożytkowane następnie w dalszych etapach fotosyntezy. Chlorofile w roztworach wykazują silną **fluorescencję** (Rys. 4), tj. emitowanie światła przez substancję wzbudzoną przez pochłonięcie światła lub innego promieniowania elektromagnetycznego, wykorzystywaną do pomiarów parametrów wydajności fotosyntezy.



Rys. 4. Od lewej: chlorofil w świetle Vis i w świetle UV

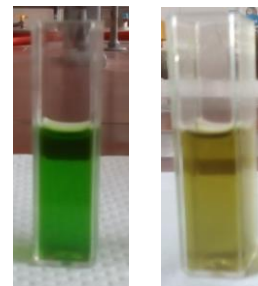
Zielony kolor chlorofilu spowodowany jest wysoką absorpcją w czerwonej i niebieskiej części spektrum światła, a niską absorpcją w zielonej części spektrum, przy długości fali 500-600 nm (Rys. 5).



Rys. 5. Widmo absorpcyjne chlorofilu

Chlorofile są dosyć **nietrwałe**. W żywych tkankach występują w formie związanej np. z białkami, fosfolipidami, co powoduje stabilność zielonej barwy. Z kolei zniszczenie żywej tkanki roślinnej oraz struktury chlorofilu poprzez np. ogrzewanie, odwadnianie, kontakt z rozpuszczalnikami, enzymami, prowadzi do przemian chlorofilu i zmiany barwy. Rozpad chlorofilu przyspiesza również działanie światła i tlenu.

W środowisku kwaśnym następuje przemiana chlorofilu, związana z zastąpieniem jonu magnezu przez dwa jony wodoru i powstanie oliwkowozielonej **feofityny** (Rys. 6) lub przy niższym pH, również odszczepienie fitolu i powstanie feoforbidy (brunatna barwa). Środowisko zasadowe prowadzi do hydrolizy wiązań estrowych, z zachowaniem jonu magnezu w strukturze chlorofilu, a produktami reakcji są chlorofiliny (zielona barwa), które pod wpływem enzymu chlorofilazy tracą fitol i przekształcają się w chlorofilidy. Chlorofile z łatwością ulegają też reakcji wymiany jonów magnezu na jony metali dwuwartościowych, takich jak żelazo (barwa szarobrunatna), miedź, cynk (zielona barwa).



Rys. 6. Od lewej: chlorofil i feofityna

Barwniki chlorofilowe, jak również ich pochodne, znajdują **zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym** (Rys. 7) (chlorofil służy do barwienia past do zębów, płynów do ust, niektórych mydeł i kremów; ma właściwości dezynfekcyjne oraz przyspiesza regenerację naskórka i gojenie drobnych podrażnień skóry, stąd

wykorzystywany jest w kosmetykach do pielęgnacji cery przetruszczonej się, szarej i zmęczonej; poprawia ukrwienie skóry, wpływając na lepsze jej dotlenienie i odżywienie).



przemysł spożywczy
E130 (barwnik spożywczy)



przemysł kosmetyczny



przemysł farmaceutyczny

Rys. 7. Praktyczne zastosowanie chlorofilu

Z uwagi na wysokie molowe współczynniki absorpcji zawartość chlorofilu oznacza się **metodą spektrofotometryczną**, związaną z pomiarem absorbancji (A) roztworu próbki przy określonej długości fali. Znając wartość ϵ można wyliczyć stężenie analitu (C) bezpośrednio ze wzoru:

$$A = \epsilon \times l \times C \quad (l - \text{długość drogi optycznej / grubość kuwety, standardowo 1 cm/})$$

W przypadku spektrofotometrycznego oznaczenia chlorofilu wykorzystuje się głównie zależności opracowane przez MacKinney'a, umożliwiające oznaczenie całkowitej zawartości chlorofilu, jak i osobno stężenie chlorofilu a i b, mierząc absorbancje roztworu próbki przy określonych długościach fali (663 i 645 nm):

Całkowita zawartości chlorofilu (a+b):

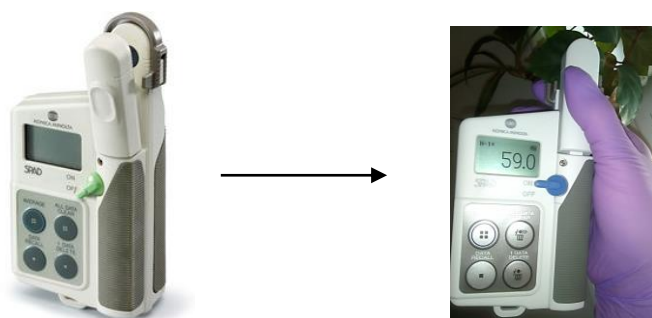
$$C_{\text{chl(a)+chl(b)}} = 8,02 \times A_{(663)} + 20,2 \times A_{(645)}$$

Chlorofil a i b:

$$C_{\text{chl(a)}} = 12,7 \times A_{(663)} - 2,69 \times A_{(645)}$$

$$C_{\text{chl(b)}} = 22,9 \times A_{(645)} - 4,68 \times A_{(663)}$$

Pomiar zawartości chlorofilu lub „zieloności” roślin można też wykonać za pomocą **miernika chlorofilu** (Rys. 8). Miernik umożliwia natychmiastowe badanie stanu zdrowia roślin w miejscu uprawy, nie wymaga pobierania próbek oraz ich niszczenia (metoda niedestrukcyjna (!)).



Wartości SPAD są wartościami zdefiniowanymi przez firmę MINOLTA, wskazują one względną ilość chlorofilu znajdującego się w liściach roślin

Rys. 8. Miernik chlorofilu SPAD-502Plus (Konica Minolta)

Celem ćwiczenia jest spektrofotometryczne oznaczenie całkowitej zawartości chlorofilu (a+b), chlorofilu a i b oraz produktu degradacji chlorofilu (feofityny) w roślinie zielonej.

Wykonanie oznaczenia

1. Ekstrakcja chlorofilu

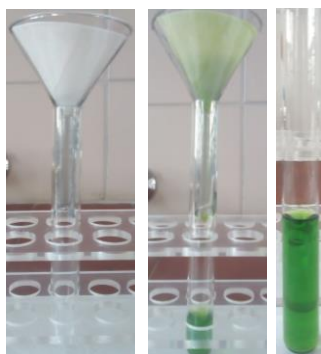
Próbkę (np. liście) pociąć nożyczkami na małe kawałeczki. Odważyć 0,3-0,4 g, przenieść do suchego moździerza porcelanowego i dodać ok. 2 cm³ metanolu. Rozcierać ostrożnie tłuczkiem aż do uzyskania zielonej pasty. Dodać kolejne ok. 2 cm³ alkoholu i ponownie rozcierać do uzyskania zawiesiny.



Przenieść ilościowo zawiesinę (poprzez lejek) do cylindra miarowego (z korkiem). Kolejnymi porcjami metanolu myć moździerz i tłuczek, przenosząc popłuczyny do cylindra. Dodać do cylindra tyle metanolu by suma roztworu w nim zawarta wynosiła 15,0-20,0 cm³. Zamknąć cylinder korkiem i dokładnie wymieszać.



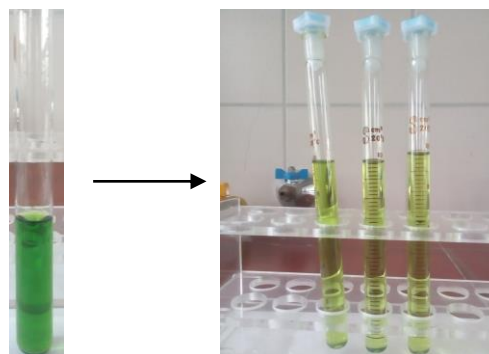
Następnie przesączyć ekstrakt przez miękki sączonek do czystej i suchej probówki.



2. Spektrofotometryczne oznaczenie chlorofilu

- oznaczenie chlorofilu a

Zawartość probówki z ekstraktem przelać do kuwety i zmierzyć wartość absorbancji (A) przy długości fali $\lambda=665$ nm stosując jako odnośnik (ślepa próba) roztwór czystego metanolu. Uwaga: Wykonując odpowiednie rozcieńczenie ekstraktu metanolem, należy dobrać tak stężenie roztworu, by mierzona absorbancja mieściła się w zakresie $A=0,30-0,80$. Rozcieńczenie wykonać w trzech ($n=3$) powtórzeniach.



- oznaczenie produktu degradacji chlorofilu a

Dodać do kuwety kroplę stężonego kwasu azotowego, wymieszać i ponownie zmierzyć wartość absorbancji przy długości fali $\lambda=665$ nm. Zanotować barwy roztworów przed dodatkiem oraz po dodatku HNO₃.

- oznaczenie chlorofilu a i chlorofilu b

Dla rozcieńczonych próbek z ekstraktem zmierzyć wartości absorbancji przy trzech różnych długościach fali: $\lambda=665$ nm, $\lambda=663$ nm i 645 nm.

3. Obliczenie zawartości chlorofilu

- Zawartość chlorofilu a obliczyć korzystając z poniższej zależności:

$$C_{chl(a)} = 10,81 \times A_{(665)} \quad (1)$$

- Całkowitą zawartość chlorofilu obliczyć korzystając z poniższej zależności:

$$C = 8,02 \times A_{(663)} + 20,2 \times A_{(645)} \quad (2)$$

- Zawartość chlorofilu a i chlorofilu b obliczyć korzystając z poniższej zależności:

$$C_{chl(a)} = 12,7 \times A_{(663)} - 2,69 \times A_{(645)} \quad (3)$$

$$C_{chl(b)} = 22,9 \times A_{(645)} - 4,68 \times A_{(663)} \quad (4)$$

gdzie stężenie C chlorofilu wyrażone jest w **mg/dm³**

Następnie obliczyć zawartość chlorofilu (w **mg/kg**) w badanej próbce (z uwzględnieniem rozcieńczenia, pełnej objętości, V (cm³) ekstraktu alkoholowego i masy odważki).

4. Sprawozdanie

Sprawozdanie powinno zawierać bardzo krótki opis stosowanej metody oznaczenia, rodzaj analizowanej próbki, dokładny opis przygotowania próbki do pomiaru oraz wyniki obliczeń *całkowitej zawartości chlorofilu* oraz *chlorofilu a i b*. Wyniki podać jako średnie arytmetyczne ($\bar{X}$) wraz z wartościami odchyłeń standardowych (SD). Obliczyć precyzję oznaczeń (w postaci %RSD). Porównać wyniki zawartości *chlorofilu a* otrzymane z dwóch różnych oznaczeń. Porównać wyniki oznaczenia całkowitej zawartości *chlorofilu a* i *chlorofilu b* (z zsumowanej zawartości chl(a) i chl(b) wyliczonej z dwóch niezależnych oznaczeń z całkowitą zawartością wyliczoną bezpośrednio). Określić stosunek zawartości chlorofilu a do chlorofilu b (wnioski). Określić wpływ dodatku stężonego kwasu na zawartość chlorofilu (wnioski).

ZESTAWIENIE WYNIKÓW (propozycja):

Tabela 1

Roślina zielona (rodzaj, nazwa)	Masa próbki, g

Tabela 2

Barwnik	Stężony ekstrakt		Rozcieńczony ekstrakt		Stężenie chlorofilu, mg/dm ³ (zależność)	Zawartość chlorofilu, mg/kg		
	λ ₁ , nm	A ₀	krotność rozcieńczenia	A ₁				
Oznaczenie wg równania 1	665				C _{chl(a)} =10,81×A ₍₆₆₅₎			
chlorofil a								
Produkt degradacji chlorofilu a	λ ₁ , nm	A ₀ '	Barwa ekstraktu					
	665		Bez dodatku 65% HNO ₃	Z dodatkiem 65% HNO ₃				
					C _{chl(a)} = 10,81×A ₍₆₆₅₎			
Oznaczenie wg równań 2-4			λ ₂ , nm	A ₂	λ ₃ , nm	A ₃		
Chlorofil a			663		645			
Chlorofil b							C _{chl(b)} =22,9×A ₍₆₄₅₎ – 4,68×A ₍₆₆₃₎	
Σ(chl(a),chl(b))								C=8,02×A ₍₆₆₃₎ + 20,2×A ₍₆₄₅₎

Tabela 3

Barwnik	Zawartość (X ± SD), mg/kg	RSD, %	Chl(a)/Chl(b)
Chl(a) (oznaczenie wg równania 1)			
Chl(a) (oznaczenie wg równania 2)			
Chl(b) (oznaczenie wg równania 3)			
$\Sigma(chl(a), chl(b))$ (oznaczenie wg równania 4)			
Produkt degradacji chlorofilu a (oznaczenie wg równania 1)			

Zagadnienia do kartkówki:

- właściwości chlorofilu, rodzaje, budowa i reakcje
- sposoby ekstrakcji chlorofilu z roślin za pomocą różnych mieszanin ekstrakcyjnych
- zasada oznaczeń spektrofotometrycznych
- prawa absorpcji i przyczyny odchyłeń od tych praw
- przygotowanie próbek roślinnych do oznaczeń spektrofotometrycznych
- metoda spektrofotometryczna oznaczania zawartości chlorofilu

Literatura:

- Leo M.L. Nollet, Handbook of Food Analysis, Second Edition, Volume 1: Physical Characterization and Nutrient Analysis, Marcel Dekker, Inc., USA 2004.
- P. Kafarski, P. Wieczorek, skrypt: „Ćwiczenia laboratoryjne z chemii bioorganicznej” 1997.
- A. Cygański, Metody spektroskopowe w chemii analitycznej, WNT, Warszawa 1997.
- Z. Marczenko, M. Balcerzak, Spektrofotometryczne metody w analizie nieorganicznej, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
- Z.S. Szmaj, T. Lipec, Chemia analityczna z elementami analiz instrumentalnej, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1996.