

## Ćwiczenie nr 2

### 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. W układzie porfiryńowym występują naprzemienne wiązania pojedyncze i podwójne, które tworzą układ rezonansowy. 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.

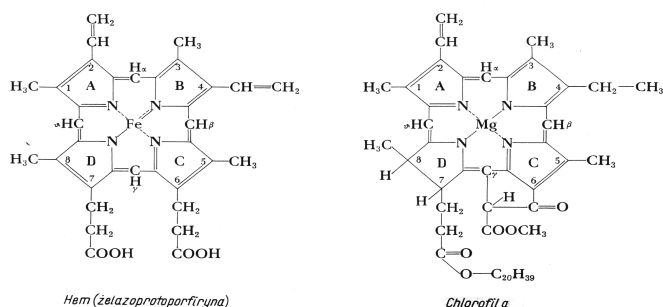
Istnieje kilka rodzajów chlorofilu, przy czym najbardziej rozpowszechnione w przyrodzie to *chlorofil a* i *chlorofil b*, występujące u wszystkich organizmów fotosyntezujących. Inne, jak chlorofile c i d występują jedynie u części glonów. Czym więcej chlorofilu w roślinie tym wydajniejszy jest proces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

Charakterystyka chlorofilu a i b:

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

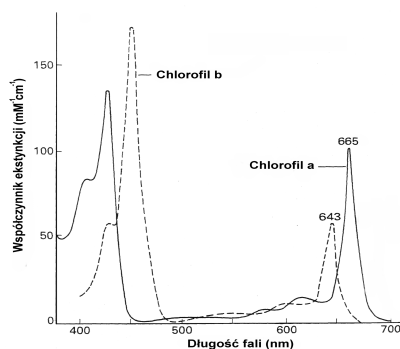
**chlorofil b** ( $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ ) – jest ciemnozielony, topi się w temperaturze  $183^{\circ}C$ , nie rozpuszcza się w wodzie, rozpuszcza się w alkoholu, roztwór ma barwę żółtozieloną.

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 1 przedstawiono struktury chemiczne hemu oraz chlorofilu a:



Rys. 1. Struktury chemiczne hemu i chlorofilu a

Z uwagi na obecność podwójnych wiązań sprzężonych chlorofile są efektywnymi fotoreceptorami. Charakterystyczną cechą takich związków jest bardzo silna absorpcja w zakresie światła widzialnego wyrażona poprzez wysokie molowe współczynniki absorpcji, jedne z najwyższych, jakie znane są dla związków organicznych. Z uwagi na wysokie molowe współczynniki absorpcji, zawartość chlorofilu oraz karotenu oznacza się metodą spektrofotometryczną. 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.2).



Rys.2. Widmo absorpcyjne chlorofilu a i b

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 poprzez dwa jony wodoru i powstanie feofityny (oliwkowozielona) lub przy niższym pH, również odszczepienie fitolu i powstanie feoforbidyny (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 chlorofilidy. Chlorofile z łatwością ulegają reakcji wymiany jonów magnezu na jony metali dwuwartościowych, takich jak żelazo (barwa szarobrunatna), miedź, cynk (zielona barwa).

Barwniki chlorofilowe, jak również ich pochodne, znajdują zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym (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 przetłuszczającej się, szarej i zmęczonej; poprawia ukrwienie skóry, wpływając na lepsze jej dotlenienie i odżywienie).

## Wykonanie oznaczenia

### 1. Ekstrakcja chlorofilu

Próbkę (liście, rośliny zielone) o wadze około 0,5 g pociąć nożyczkami na małe kawałeczki. Odważyć 0,2-0,3 g, przenieść do suchego moździerza porcelanowego i dodać ok. 2 cm<sup>3</sup> metanolu. Rozcierać ostrożnie tłuczkiem aż do uzyskania zielonej pasty. Dodać kolejne ok. 2 cm<sup>3</sup> alkoholu i ponownie rozcierać do uzyskania zawiesiny. Przełać zawiesinę (poprzez lejek) do 25 cm<sup>3</sup> cylindra miarowego (z korkiem). Kolejnymi porcjami metanolu (2x2 cm<sup>3</sup>) myć moździerz i tłuczek, przenosząc popłuczyny do cylindra. Dodać do cylindra tyle metanolu by suma roztworu w nim zawarta wynosiła 15 cm<sup>3</sup>. Zamknąć cylinder korkiem i dokładnie wymieszać. Następnie przesączyć ekstrakt przez (zwilżony kilkoma kroplami metanolu) miękki sącdek do probówki. Przechowywać probówkę w ciemnym miejscu.

### 2. Spektrofotometryczne oznaczenie chlorofilu

#### - oznaczenie chlorofilu a

Zawartość probówki z ekstraktem przełać 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  $\lambda=665$ . Zanotować barwy roztworów przed dodatkiem oraz pod dodatku HNO<sub>3</sub>.

#### - 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:

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

- Całkowitą zawartości chlorofilu obliczyć korzystając z poniższej zależności:

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

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

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

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

gdzie stężenie C chlorofilu wyrażone jest w  $mg/dm^3$

Następnie obliczyć zawartość chlorofilu (w  $mg/kg$ ) w badanej próbce (z uwzględnieniem rozcieńczenia, pełnej objętości, V (cm<sup>3</sup>) 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 *zawartości całkowitej chlorofilu* oraz *chlorofilu a i b*. Wyniki podać jako średnie arytmetyczne (X) wraz z wartościami odchyłek standardowych (SD). Określić precyzję oznaczeń (wyznaczyć wartości %RSD). Porównać wyniki zawartości *chlorofilu a*, otrzymanych z dwóch różnych oznaczeń. Porównać wyniki oznaczenia całkowitej zawartości *chlorofilu a* i *chlorofilu b* (z zsumowanej zawartości chl<sub>a</sub> i chl<sub>b</sub> 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.

## ZESTAWIENIE WYNIKÓW:

**Tabela 1**

Roślina zielona (rodzaj, nazwa)	Masa próbki, g

**Tabela 2**

Barwnik	Stężony ekstrakt		Rozcieńczony ekstrakt				Stężenie chlorofilu, mg/dm <sup>3</sup> (zależność)	Zawartość chlorofilu, mg/kg
	λ <sub>1</sub> , nm	A <sub>0</sub>	krotność rozcieńcz.		A <sub>1</sub>			
<u>Bezpośrednie oznaczenie</u>	665						C <sub>chl(a)</sub> =10,81xA <sub>(665)</sub>	
chlorofil a								
Produkt degradacji chlorofilu a	λ <sub>1</sub> , nm	A <sub>0</sub>	Barwa ekstraktu				C <sub>chl(a)</sub> = 10,81xA <sub>(665)</sub>	
	665		Bez dodatku 65% HNO <sub>3</sub>		Z dodatkiem 65% HNO <sub>3</sub>			
<u>Wspólne oznaczenie</u>			λ <sub>2</sub> , nm	A <sub>2</sub>	λ <sub>3</sub> , nm	A <sub>3</sub>	C <sub>chl(a)</sub> =12,7xA <sub>(663)</sub> -2,69xA <sub>(645)</sub> C <sub>chl(b)</sub> =22,9xA <sub>(645)</sub> -4,68xA <sub>(663)</sub> C=8,02xA <sub>(663)</sub> +20,2xA <sub>(645)</sub>	
Chlorofil a			663		645			
Chlorofil b								
Σchl <sub>a</sub> ,chl <sub>b</sub>								

**Tabela 3**

Barwnik	Zawartość średnia (X), mg/kg	SD	RSD, %	Chl <sub>a</sub> /Chl <sub>b</sub>
chl <sub>a</sub> (bezpośrednie oznaczenie)				
chl <sub>a</sub> (pośrednie oznaczenie)				
chl <sub>b</sub>				
Σ(chl <sub>a</sub> ,chl <sub>b</sub> )				
Produkt degradacji chlorofilu a				

### UWAGA:

Główny chlorofil w roślinie to chlorofil a i jest w pewnym stosunku do chlorofilu b. Gdy rośliny są światłolubne ten stosunek jest korzystniejszy dla chlorofilu a. Gdy są cieniophilne więcej jest chlorofilu b, jednak dalej chlorofil b jest w przewadze:

### **Stosunek chlorofilu a : chlorofilu b**

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

### **Zagadnienia do kartkówki:**

- własności chlorofilu, rodzaje, budowa i reakcje
- sposoby ekstrakcji chlorofilu z roślin za pomocą różnych mieszanin ekstrakcyjnych
- zasada oznaczeń spektrofotometrycznych
- prawa absorpcji i przyczyny odchyłań 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. Szał, T. Lipec, Chemia analityczna z elementami analiz instrumentalnej, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1996