

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Лабораторне заняття 3

Тема: Властивості хлорофілу

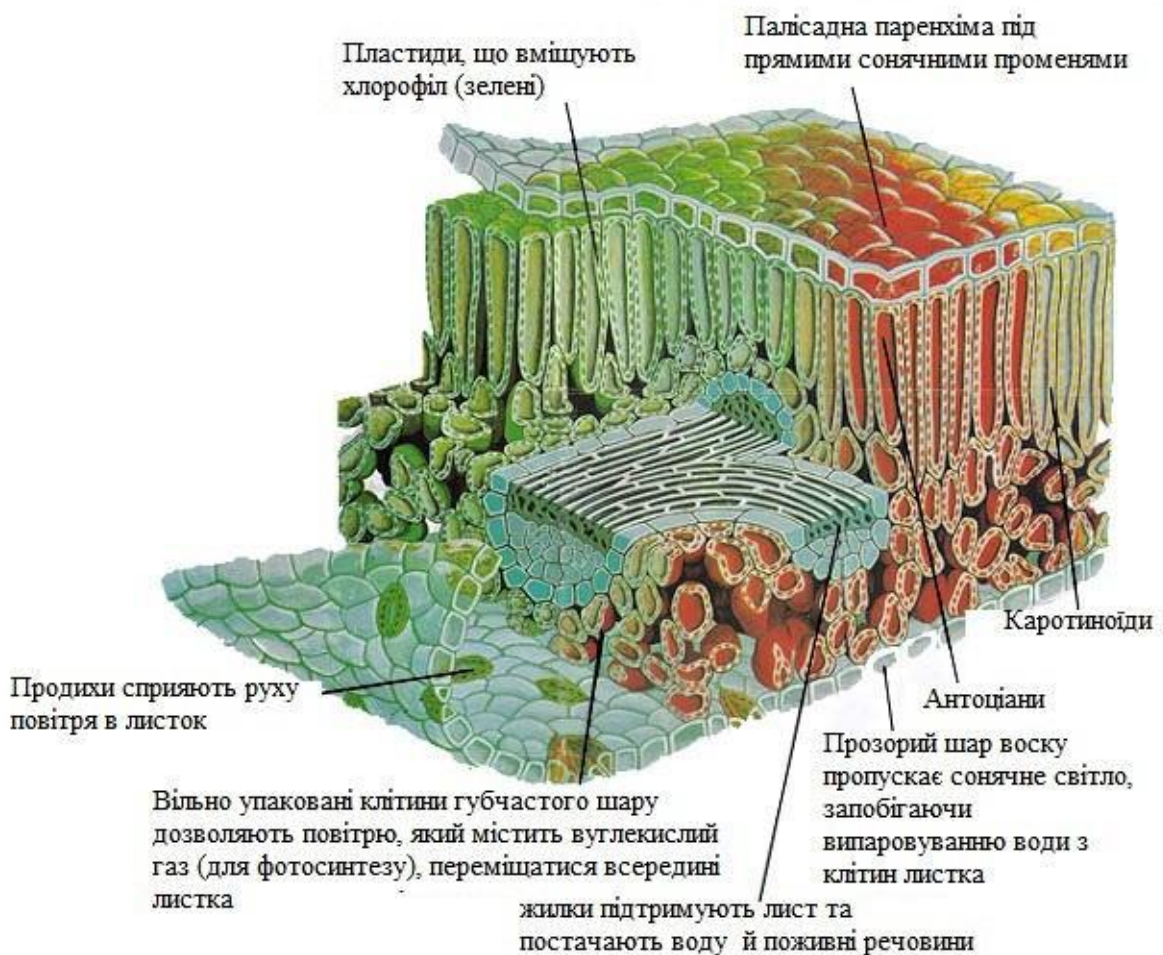
Мета: дослідити основні фізичні та хімічні властивості окремих фотосинтезуючих пігментів рослинної клітини, оволодіти основними засобами визначення якісного та кількісного складу пігментів.

Завдання для підготовки:

У лабораторному зошиті дати визначення наступних понять: *хлорофіли, каротини, ксантофіли, витяжка, флуоресценція, хроматографія, фітол, хлорофілінова кислота, омилення, феофітин.*



Хід роботи:



ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Завдання 1. Пігменти листа, їх фізичні властивості

Теоретична частина

Екстракція пігментів



Розділення пігментів



Спектр поглинання



Фотосенсибілізуюча дія



Усі пігменти рослин поділяють на чотири групи: хлорофіли, каротиноїди, фікобіліни і флавоноїдні пігменти, які функціонують у вигляді хромопротеїнів, тобто пігмент-білкових комплексів.

Основна роль у фотосинтезі належить хлорофілам. Група хлорофілів включає понад 10 пігментів, що відрізняються деякими структурними особливостями. Найпоширеніші чотири форми хлорофілів: a, b, c, d. Загальний вміст хлорофілу в рослинах

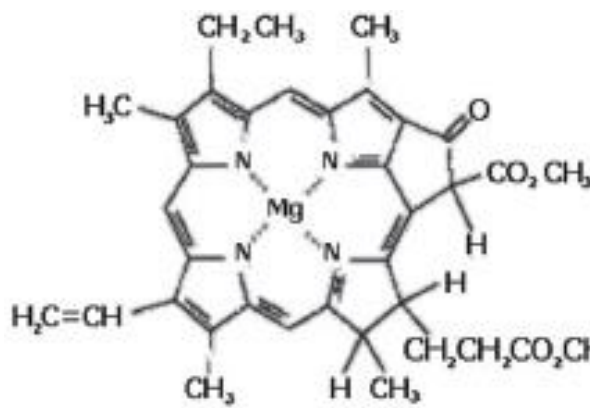
ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



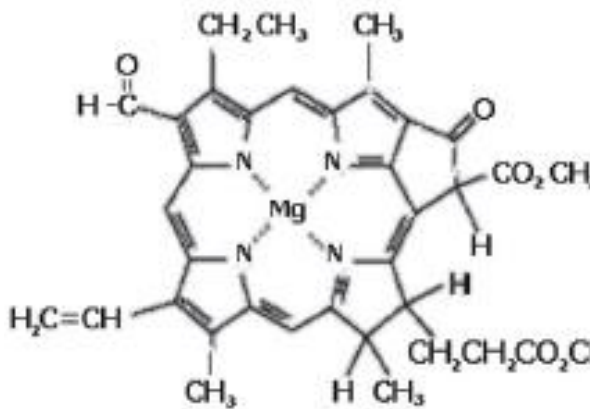
складає 0,6–1,2 % сухої речовини. Наявність атома Mg^{2+} у ядрі хлорофілу обумовлює зелений колір пігменту.

Рослини, вирощені в темряві (етіоляти), завжди блідо-жовті через відсутність хлорофілу. У проростків, що знаходяться в ґрунті і виносять листки на поверхню до світла, етіоляція – звичайне явище. На наступних фазах росту рослин етіоляція викликає морфологічні зміни в будові стебла листків і є однією з причин вилягання рослин у загущених посівах.

У твердому вигляді хлорофіл а є аморфною речовиною синьо-чорного кольору. Температура плавлення хлорофілу а – 117–120.С. Хлорофіли добре розчинні в етиловому ефірі, бензолі, хлороформі, ацетоні, етил. спирті; погано — в петролейному ефірі і нерозчинні у воді.



Хлорофіл а

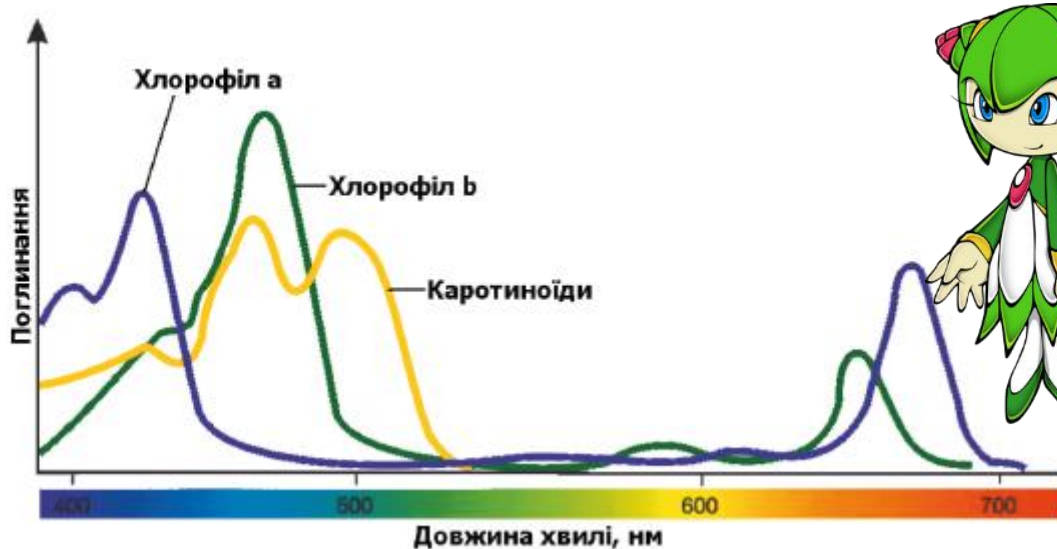


Хлорофіл б

Найважливіша властивість хлорофілу — його здатність поглинати світлову енергію в межах видимої частини спектру (380—720 нм). Поглинання світла хлорофілом є не суцільним, а вибіркоvim.

В цьому можна переконатися, пропускаючи біле світло через розчин хлорофілу, а потім розкладаючи його за допомогою призми. Окремі ділянки спектру виявляться поглиненими, а на їх місці будуть видні темні смуги. Отриманий спектр називається спектром поглинання.

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Зіставляючи спектри поглинання розчинів різної концентрації (або одного і того ж розчину, але при різній товщині шару), можна встановити ступінь поглинання окремого проміння: чим слабше поглинається дана ділянка спектру, тим більш концентрований потрібно узяти розчин, щоб добитися зникнення цієї ділянки в спектрі поглинання. Проміння, що сильно поглинається, можна визначити за смугами в спектрі поглинання дуже розбавленого розчину, тоді як проміння, що найменше поглинається, проходить навіть через досить концентрований розчин. Спектр поглинання каротиноїдів охоплює тільки короткохвильову область видимого спектру (до 540 нм).

Максимуми поглинання хлорофілів лежать у синій і червоній областях видимої частини спектру (що відповідає довжинам хвиль близько 450 і 650–700 нм). Каротиноїди і фікобіліни поглинають у межах 400–500 і 500–650 нм відповідно. Збуджені під впливом світла молекули хлорофілів після припинення його дії повертаються до початкового стану. Цей перехід супроводжується втратою енергії у вигляді випромінення світла – флуоресценції.

Флуоресценція є свіченням активності речовин при поглинанні ними світла. Флуоресценція хлорофілу, не будучи фотосинтетично утилізованою формою енергії, служить ознакою його фотохімічної активності.

В темряві молекула хлорофілу знаходиться в основному стані з найнижчим енергетичним рівнем валентних електронів. При поглинанні кванта світла один з π -електронів молекули хлорофілу переходить на більш високий енергетичний рівень, внаслідок

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



чого виникає електронно-збуджений стан молекули. При поверненні із збудженого стану в основний енергія електронів може витрачатися на: 1) фотохімічну роботу, 2) збудження сусідніх молекул хлорофілу, 3) втрату у вигляді тепла, 4) флуоресцентне випромінювання. Незалежно від довжини хвилі спектр флуоресценції хлорофілу *a* має максимум при 670 нм. Хлорофіл сильно флуоресцирує в розчинах і слабо — в листі, що пояснюється щільною упаковкою молекул в тілакоїдах і використанням поглиненої енергії у фотохімічних процесах.

Розчини хлорофілів у полярних розчинниках мають яскраву флуоресценцію (люмінесценцію) і здатні до фосфоресценції (в інфрачервоній частині спектра). Нативний хлорофіл флуоресцирує слабо.

Таким чином, молекула хлорофілу може бути не лише первинним акцептором електрона, але і його первинним донором. Виходячи з цього можна зробити висновок, що молекула хлорофілу завдяки структурним і фізико-хімічним особливостям здатна виконувати 3 важливі функції:

- 1) вибірково поглинати Е світла;
- 2) запасати її у вигляді Е електронного збудження;
- 3) фотохімічно перетворювати Е збудженого стану електронів у хімічну Е фотовідновлених і фотоокиснених станів.

Практична частина

1.1 Отримання витяжки пігментів

2-3 листки кімнатних рослин розрізають ножицями на невеликі шматочки, кладуть у фарфорову ступку, додають трохи CaCO_3 (для нейтралізації кислот клітинного соку), близько 0,5 мл етилового спирту і розтирають до отримання однорідної кашоподібної маси. Додають в ступку 5-10 мл етилового спирту, перемішують скляною паличкою і відфільтровують спиртову витяжку пігментів листа у чисту суху пробірку через сухий фільтрувальний папір.

Коренеплід моркви натирають на терці, вміщують шпателем в пробірку, заливають бензином, дають постояти не менше 10 хвилин (періодично вміст пробірки перемішують скляною паличкою). Після цього рідину зливають в іншу суху пробірку.

Розглядають отримані витяжки у проникаючому світлі, відзначаючи їх колір.

Замалюйте пробірки з витяжками.

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Витяжки пігментів

1.2 Спектри поглинання пігментів

Направити спектроскоп на джерело світла. Відрегулювати ширину щілини на кінці труби спектроскопа так, щоб спектр вийшов чітким і достатньо яскравим (при дуже широкій щілині спектр виходить розмитим, нечистим, при дуже вузькій щілині освітленість спектру недостатня).

Налити досліджуваний розчин в пробірку і закріпити її в лапці штатива перед щілиною спектроскопа. Вивчити спектри поглинання розчинів хлорофілу різної концентрації, розбавляючи витяжку із зеленого листа в співвідношеннях 1:1, 1:3, 1:5, 1:15 та 1:30. Для порівняння розглянути спектр бензинової витяжки з коренеплоду моркви, що містить каротин, і спиртовий розчин ксантофілу, отриманий при розділенні пігментів за Краусом. Отримані дані ввести в таблицю.

Таблиця

Розчин	Колір						
	ф	с	г	з	ж	п	ч
Хлорофілу:							
1:30							
1:15							
1:5							
1:3							
1:1							
1:0							
Каротину							
Ксантофілу							

Завдання: замалювати спектри за формою, наведеною в таблиці, причому ділянки, які поглинаються, закрасити чорним, а видимі ділянки — кольоровими олівцями. Зробити висновок щодо спектрів поглинання різних фотосинтетичних пігментів.

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



1.3 Флуоресценція хлорофілу

Витяжку пігментів в пробірці помістити на темному фоні у світлі настільної лампи або освітити пучком світла проекційного ліхтаря. Розглянути витяжку з тієї сторони, звідки падає світло (рис).

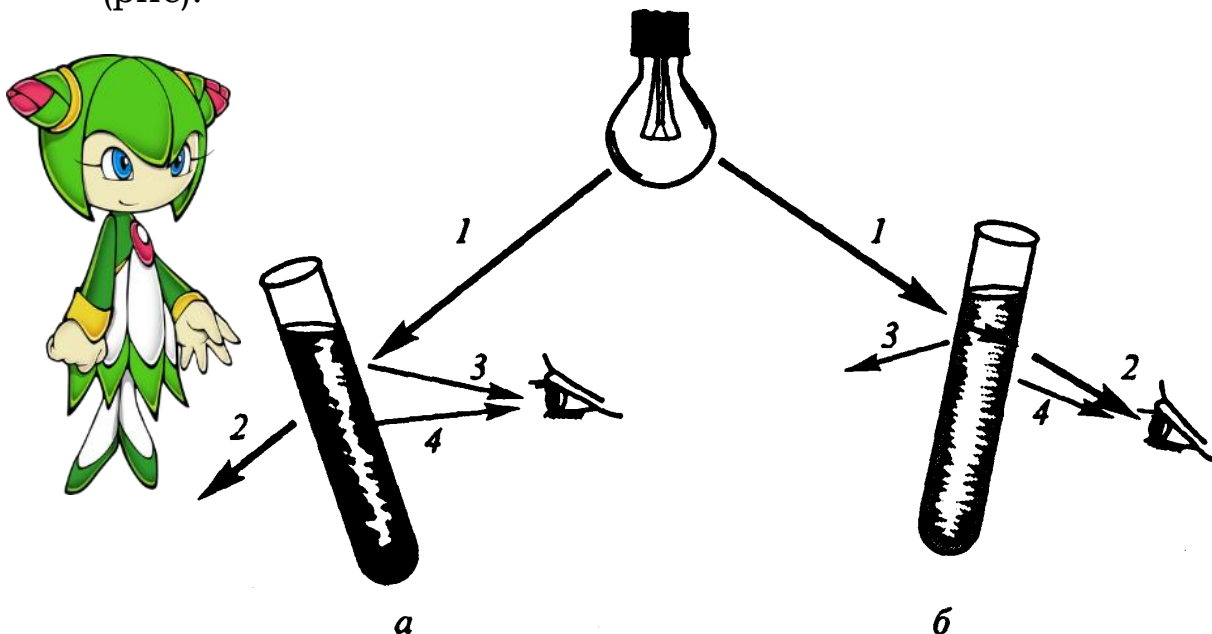


Рисунок. Спиртна витяжка хлорофілу у відбитому (а) і прямому промінні (б):

1 — світло лампи, що освітлює пробірку з розчином хлорофілу та збуджує його флуоресценцію;

2 — світло лампи, що проходить через пробірку з розчином хлорофілу;

3 — світло лампи, відбите від пробірки;

4 — флуоресценція хлорофілу.

Кольоровий малюнок досліду

Завдання: відзначити забарвлення розчину і зробити висновок про причину флуоресценції.



1.4 Розділення пігментів методом паперової хроматографії

Цей метод заснований на розділенні пігментів між волокнами целюлози хроматографічного паперу і рухомою фазою — розчинником. Коли розчин рухається по паперу під дією капілярних сил, то молекули пігментів розподіляються між двома фазами. Чим вище розчинність пігменту в рухомій фазі, тим далі він просувається по паперу разом з розчинником, і навпаки.

Відстань, пройдена нанесеним на папір пігментом у напрямі руху розчинника, характеризується величиною R_f , яка є відношенням відстані, пройдені розчиненим пігментом, до відстані, пройдені фронтом розчинника. В стандартних умовах ця величина для даного пігменту постійна і відповідає його коефіцієнту розподілу.

Хроматографування на папері проводять висхідним і низхідним способами. При висхідній хроматографії паперову смужку підвішують вертикально; її нижній кінець, на який нанесена суміш пігментів, занурюють в розчинник. При цьому місце нанесення суміші повинне знаходитися вище за рівень розчинника. Під час руху розчинника під дією капілярних сил вертикально вгору відбувається розділення розчинених речовин.

При низхідній хроматографії верхній кінець паперової смуги з сумішшю пігментів, нанесених недалеко від кромки паперу, закріплюють в судині і розміщують у верхній частині камери. Нижній кінець паперу спускають вниз, але так, щоб він не торкався налитого на дні камери розчинника. В результаті дії капілярних сил і сили тяжіння розчинник починає пересуватися вниз по паперовій смугі, внаслідок чого відбувається розділення суміші.

Смужку хроматографічного паперу шириною 1,5 см і довжиною, відповідною висоті судини, кладуть на чисту поверхню і олівцем на папері креслять горизонтальну лінію старту на відстані 1 см від краю.

З раніше приготовленої ацетонової витяжки беруть капіляром або інсуліновим шприцом невелику порцію екстракту і наносять її багато разів на стартову лінію хроматографічного паперу у вигляді плями діаметром не більше 1 см. Папір підсушують на повітрі і нанесення повторюють доти, доки пляма не стане інтенсивного зеленого кольору.

Висушивши смужку до повного зникнення запаху ацетону, помістити її у вертикальному положенні в циліндр, на дно якого налита суміш бензолу і бензину (3:1). Смужку потрібно підвісити на гачок так, щоб в розчинник був занурений тільки

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Разом з хлорофілами *a* і *b* в хлоропластах містяться каротиноїди — група жовтих пігментів, що є за хімічною природою тетратерпеноїдами (8 залишків ізопрену C_5H_8).

Каротини (в основному β -каротин) — ненасичені вуглеводні, що містять два симетрично розташованих іононових кільця, сполучених довгим вуглецевим ланцюгом. Серед ксантофілів, що є кисневмісними похідними каротину, переважає лютеїн, який має в кожному іононовому кільці спиртову групу.

Один з перших методів розділення пігментів був запропонований німецьким вченим Краусом в 1860 р. Він заснований на різній розчинності пігментів в спирті і бензині. Ці розчинники не змішуються при зливанні і утворюють два шари: верхній — бензиновий, де розчинені хлорофіли і каротин, і нижній — спиртовий, де розчинений ксантофіл.

Цей метод не дозволяє розділити хлорофіли *a* і *b*, проте його доцільно використовувати для отримання жовтих пігментів каротину і ксантофілу у великих кількостях.

Для розділення і отримання хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів застосовують і інший метод розділення пігментів, розроблений в 1906 р. російським вченим М. С. Цветом. Метод отримав назву адсорбційного. Саме він лежить в основі сучасних методів хроматографії.

Суть методу полягає в тому, що різні речовини мають неоднакову здатність адсорбуватися на твердому порошкоподібному адсорбенті. Якщо суміш пігментів листа, розчинену в якому-небудь органічному розчиннику, наприклад бензині, пропустити через сухий адсорбент (цукрова пудра, крохмаль, вуглекислий кальцій, окис цинку, фільтрувальний папір), то відбудеться розділення пігментів. Кожний пігмент має визначену, тільки йому властиву здатність адсорбуватися на даному адсорбенті. В результаті на адсорбційній колонці пігменти розділяться і розподіляться в певному порядку.

До різновиду адсорбційного методу відноситься і метод розділення пігментів за допомогою паперової хроматографії, розроблений в 1951 р. і до теперішнього часу широко застосовується при розділенні сумішей, різних сполук і їх ідентифікації.



Практична частина

2.1 Омилення хлорофілу лугом

При додаванні лугу до розчину хлорофілу відбувається реакція омилення: відщеплюються спирти — метанол і фітол, а двоосновна кислота хлорофілін утворює сіль.

Солі хлорофіліну мають зелене забарвлення, але відрізняються від хлорофілу нерозчинністю в бензині.

До 2 мл спиртової витяжки пігментів додати 4—5 крапель 20% розчину лугу і збовтати. Підлити в пробірку рівний об'єм бензину, сильно струсити і дати відстоятися.



Завдання: написати рівняння реакції, відзначити забарвлення нижнього спиртового і верхнього бензинового шарів (замалювати). Вказати, які речовини розчинені в спирті, і які в бензині, маючи на увазі, що жовті пігменти з лугом не реагують. Зробити висновок щодо різної розчинності пігментів.

2.2 Отримання феофітину і відновлення металоорганічного зв'язку

Якщо до розчину хлорофілу додати невелику кількість соляної кислоти, то можна одержати буро-оливковий феофітин — продукт заміщення магнію в молекулі хлорофілу двома атомами водню.

Металоорганічний зв'язок можна відновити шляхом нагрівання феофітину з оцтовою кислотою міддю: атом двовалентного металу витісняє водень з феофітину; оцтова кислота, що утворюється при цьому, служить каталізатором.

Налити в дві пробірки по 2 мл спиртової витяжки пігментів зеленого листа і додати в них по 2 краплі 10% соляної кислоти. Відзначити забарвлення отриманого продукту реакції.

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



В одну з пробірок з феофітином додати декілька кристалів оцтовокислої міді і довести розчин до кипіння (нагрівати слід обережно, не допускаючи викидання рідини з пробірки). Якщо забарвлення не зміниться, додати ще оцтовокислій міді і продовжувати нагрівання. Відзначити зміну забарвлення, викликану заміщенням двох атомів водню у феофітині атомом міді.



Завдання: замалювати пробірки і написати рівняння прямої і зворотної реакцій. На основі проведеного експерименту зробити висновок щодо вкладу магнію у оптичні властивості хлорофілу.

2.3 Розділення пігментів методом Крауса

В пробірку з 2 мл спиртового розчину пігментів додають таку ж кількість бензину і одну краплю води (для кращого відділення спирту від бензину). Пробірку добре збовтують і дають суміші пігментів відстоятися. Відбувається розшарування рідини: у верхній, бензиновий, шар, переходять обидва хлорофіли і каротин, в нижньому, спиртовому, шарі залишається жовтий пігмент — ксантофіл, оскільки він краще, ніж бензин, розчинний в спирті.

Для відділення каротину від хлорофілу верхній бензиновий шар піпеткою переносять в чисту пробірку. В цій зеленій витяжці каротин непомітний, оскільки його маскує хлорофіл, переважаючий кількісно. В пробірку додають 2 мл етилового спирту і 3 краплі води, вносять декілька кристалів луку і сильно струшують. При взаємодії луку з хлорофілом відбувається його омилення, утворюється лужна сіль хлорофіліну, яка легко переходить з бензину в спирт. В результаті в пробірці утворюються два шари: верхній, бензиновий, шар — жовтого кольору, що містить каротин і нижній, спиртовий, — зеленого кольору, що містить лужну сіль хлорофіліну.



Малюнок дослідю

Завдання: замалювати пробірки з розділеними пігментами; зробити висновки про розчинність пігментів в різних розчинниках і способах виділення окремих пігментів.

2.4 Розділення пігментів методом Цвета

Недоліком методу Крауса є те, що за допомогою нього складно провести кількісний аналіз пігментного складу рослини (не розділяються хлорофіли). Для розділення і отримання хлорофілів *a* і *b* і каротиноїдів застосовують інший метод розділення пігментів - адсорбційний.

Етап 1. Приготування витяжки пігментів з листя рослин.

Наважку свіжого листя (3 г) ретельно розтирають у фарфоровій ступці з невеликою кількістю розчинника, що складається з суміші 10 мл бензину і 10 мл ацетону. Продовжують розтирання до гомогенного стану з одночасною екстракцією пігментів невеликими порціями суміші.

Осад і надосадову рідину переносять на складчастий паперовий фільтр. Ступку змивають невеликою кількістю чистого ацетону і також зливають на паперовий фільтр.

Етап 2. Концентрування пігментів в бензині.

Відфільтровану витяжку переливають в пробірку на 50 мл і проводять відмивання ацетону для концентрації пігментів в бензиновій фракції. Обережно, додають 30 мл дистильованої води та декілька разів перевертають пробірку так, щоб не утворилася стійка емульсія. Після розділення рідини на дві фази: усі пігменти переходять у верхню – бензинову, а ацетон у нижню – водну. Обережно дозатором відбирають верхній бензиновий шар, що

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



містить пігменти. Очищену від домішок сконцентровану витяжку пігментів переливають в бюкс з притертою кришкою і висипають туди 3—5 г прожареного Na_2SO_4 , залишають на 15-20 хв для повного зневоднення екстракту. Це дуже важливо для подальшого розділення пігментів на адсорбційній колонці.

Етап 3. Приготування адсорбційної колонки.

Адсорбційна колонка є скляною трубкою діаметром 1-1,5 см і завдовжки 10-15 см, звужена на одному кінці. В звужений кінець трубки вкладають шматочок вати, щоб цукрова пудра не висипалася. Невеликими порціями вводять в колонку, добре висушену цукрову пудру або крохмаль на $2/3$ її висоти, злегка постукуючи об твердий предмет. Для успішного розділення пігментів треба мати абсолютно сухі колонки, цукрову пудру (крохмаль, крейду) і прожарений сірчаноокислий натрій і стежити за рівномірним наповненням цукрової пудри у всьому об'ємі трубки.

Етап 4. Розділення пігментів.

Бензинову витяжку (3 мл) обережно наливають по краю трубки у вільний простір колонки. Через декілька хвилин відбувається розділення і відокремлення пігментів. Зверху колонки залишається зелена зона, що складається з суміші пігментів, потім жовто-зелена зона хлорофілу *b*, потім синьо-зелена зона хлорофілу *a*, нижче розташовується зона темно-жовтого пігменту ксантофілу, а в самому низу колонки — яскраво-жовтий каротин, який першим змивається з колонки (рис. 3.3). Пігменти по черзі можна змити з колонки бензином і зібрати у випарювальні чашки або колби для подальшого дослідження.



- 1 — каротин;
- 2 — ксантофіл;
- 3 — хлорофіл *a*;
- 4 — хлорофіл *b*;
- 5 — скляна колонка з адсорбентом;
- 6 — бензиновий екстракт;
- 7 — шматочок вати;
- 8 — конічна колба



Рисунок Розділення пігментів на адсорбційній колонці (за М. С. Цветом).

Розділення пігментів зеленого листа можна проводити на шматку крейди у формі стовпчика, заздалегідь добре висушеного

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



в сушильній шафі. Одним кінцем крейду занурюють на 0,5-1,0 см в бензиновий екстракт пігментів (теж осушений Na_2SO_4). Чітке розділення пігментів відбувається на стовпчику крейди протягом 5-10 хв.

Малюнок досліду

Завдання: зробити малюнок почергового розділення пігментів на колонці та підписати зони з різними пігментами. Вказати переваги та недоліки цього методу.

Висновки до завдання 2:

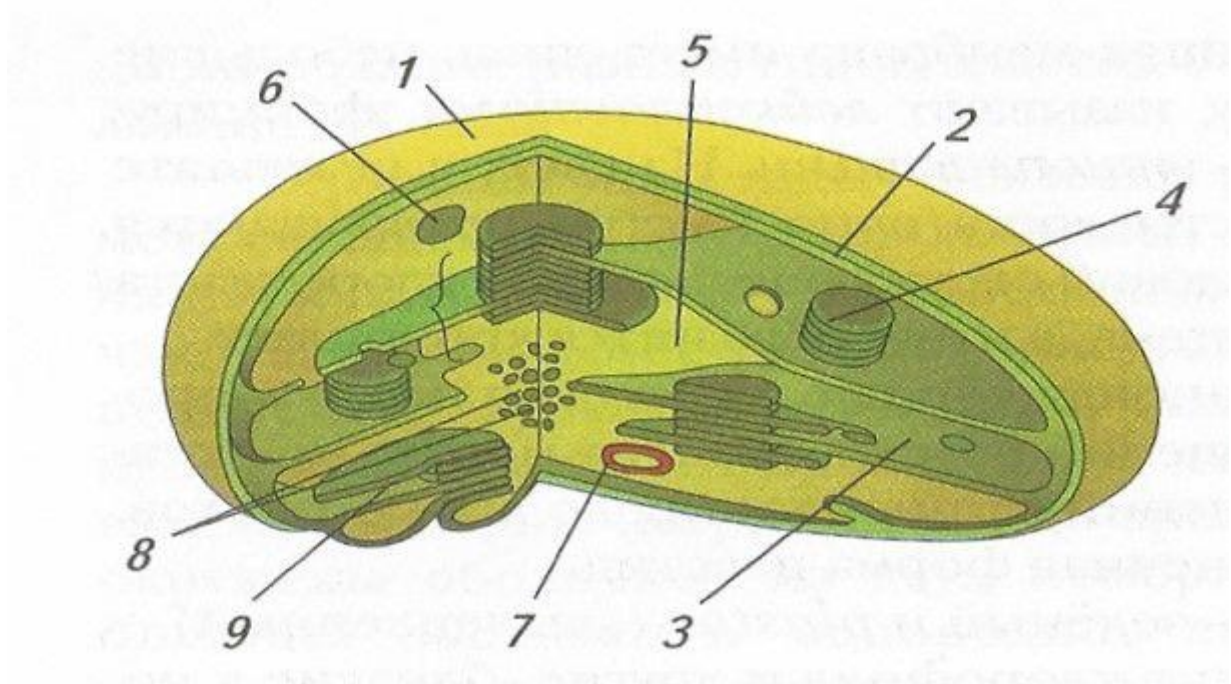


ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Завдання для виконання вдома:

Завдання 1. Зробити підписи до малюнка



1		6	
2		7	
3		8	
4		9	
5			

Завдання 2. Заповнити таблицю Властивості пігментів

№	Пігмент	Спектр поглинання	Основні властивості
1	Хлорофіл <i>a</i>		
2	Хлорофіл <i>b</i>		
3	Хлорофіл <i>c</i>		
4	Хлорофіл <i>d</i>		
5	Каротини		
6	Ксантофіли		
7	Фікобіліни		

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Завдання 3. Розв'язати задачі

Задача 1.

Чому екстрагування 80-90% водними розчинами спирту чи ацетону призводить до повного знебарвлення листків, а неполярні розчинники (бензин, наприклад) не можуть знебарвити листок?

Задача 2.

До спиртової витяжки пігментів додали вдвічі більший об'єм бензину та кілька крапель води, добре перемішали та дали відстоятися. Яким буде забарвлення спиртового та бензинового шарів? Відповідь поясніть.

Задача 3.

До спиртової витяжки із зеленого листа додали кілька крапель 20% розчину КОН, прилили бензин, ретельно перемішали дали відстоятися. Обґрунтуйте результати спостережень рівняннями відповідних реакцій.



Бажаю успіхів і до зустрічі наступного заняття!