

Štúdium absorpčných spektier rastlinných pigmentov

Teoretická časť

Najdôležitejším predpokladom pre správny priebeh životných funkcií organizmov je premena chemickej resp. slnečnej energie na energiu organizmu vlastnú. Väčšina rastlín a niektoré baktérie majú fotosyntetický systém, pomocou ktorého sú schopné prijímať a premieňať energiu zo slnečného žiarenia. Fotosyntetický systém musí zahŕňať molekuly schopné absorbovať svetelné kvantá, prenášať energiu na iné molekuly a vedieť sa navrátiť do základného stavu tak, aby molekuly boli znovu schopné absorpcie. Pri zelených rastlinách plní túto funkciu chlorofyl. Chlorofyl sa vyskytuje v piatich mierne odlišných formách. Jedna rastlina najčastejšie obsahuje niekoľko jeho foriem [1]. Farbivá absorbujúce viditeľné spektrum sú dôležité aj pre správnu funkcionalitu zraku živočíchov.

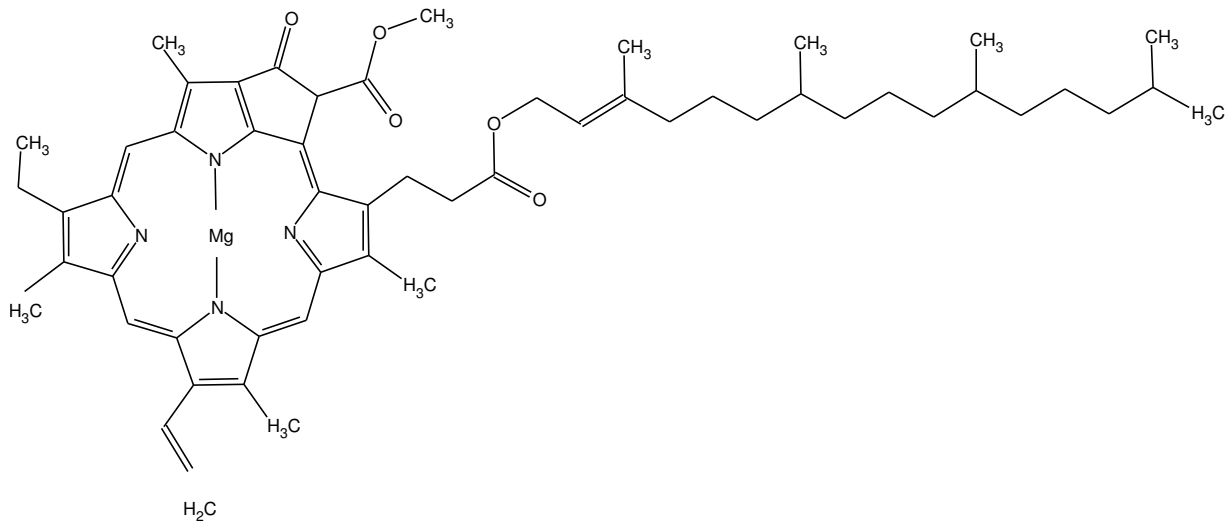
Rastlinné farbivá sú látky obsiahnuté v rastlinách, ktoré majú schopnosť absorbovať elektromagnetické spektrum z ultrafialovej a viditeľnej oblasti. Podľa typu rozpúšťadla delíme rastlinné farbivá na hydrochrómy a lipochrómy. Hydrochrómy sú pigmenty bunkovej šťavy a vyznačujú sa rozpustnosťou vo vode alebo v polárnych rozpúšťadlách. Lipochrómy sú pigmenty plastidov, preto sú rozpustné len v tukoch [2].

Hydrochrómy sú lokalizované vo vakuolách rastlinných buniek. Nachádzajú sa v plodoch, listoch a kvetoch. Jedná sa o chalkóny, flavóny, aeuróny a antokyány, ktoré spôsobujú ich červené, modré alebo fialové zafarbenie. Farbu určuje pH prostredia, v ktorom sa nachádzajú [2].

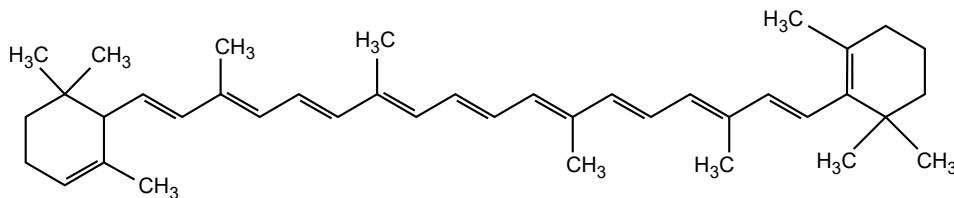
Do skupiny lipochrómov zaraďujeme chlorofyly, fykobyliny a karotenoidy. Chlorofyly sa nachádzajú v chloroplastoch rastlín a sú to horčíkové deriváty porfyrínu. Hrajú dôležitú úlohu vo fotosyntéze. Fykobyliny sa vyskytujú pri nižších vývojových štádiách rastlín napr. machy a lišajníky. Karotenoidy sú nenasýtené uhľovodíky, ktoré obsahujú chromoplasty. Do tejto skupiny patria karotény, pre ktoré je typická oranžová farba a xantofyly s typickou žltou farbou. Na obrázku obr. 7.1 sú chemické vzorce chlorofylu, karotenoidu a antokyanu [2].

Molekula chlorofylu (obr. 7.1) pozostáva zo 4 pyrolových jadier, umiestnených okolo centrálného atómu kovu horčíka. Takáto štruktúra má podobu molekuly hemoglobínu. Horčík môžeme z väzby uvoľniť opatrne hydrolýzou napríklad kyselinou oxálovou a vznikne feofytín. Štyri pyrolové jadrá majú konjugovaný π -elektrónový systém vďaka striedajúcim sa jednoduchým a dvojitým väzbám. Práve tento systém je možné vzbudiť pomerne nízkymi dávkami energie. Z tohto dôvodu má chlorofyl schopnosť absorbovať kvantá dlhovlnného žiarenia viditeľného svetla a na čas $t \sim 5 \cdot 10^{-4}$ s tieto kvantá akumulovať. Ak by nedošlo k zadržaniu energie, uvoľnila by sa vo forme žiarenia alebo tepla. V prípade fotosyntézy by to bolo nevýhodné, lebo nahromadená energia sa využíva ako hnacia sila chemických procesov syntézy (napr. syntéza ATP) [2].

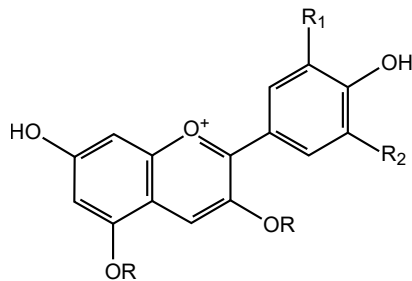
Karotenoidy (obr. 7.2) zohrávajú úlohu vo fotosyntéze ako zachytávače energie. Pomocou fotosystému II ju odovzdávajú chlorofylu, kde sa využije v primárnej fáze fotosyntézy.



Obr. 7.1: Chlorofyl [3].



Obr. 7.2: Karotenoid [4].

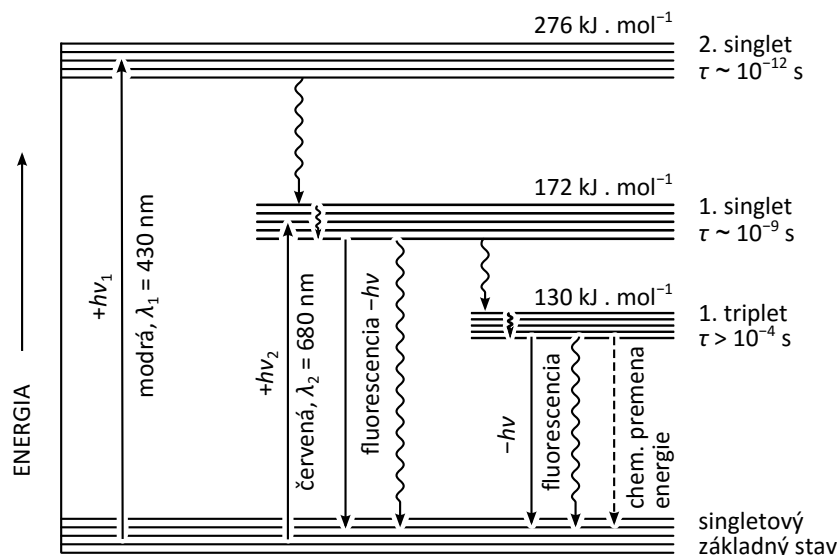


Obr. 7.3: Antokyán [5].

Karotenoidy okrem ochrany buniek pred nadmerným ožiarením zvyšujú aj spektrum vlnových dĺžok, pri ktorých je systém schopný fotosyntetizovať, majú fotosyntetickú funkciu [1].

Antokyán (obr. 7.3) je vo vode rozpustný pigment. Patrí k flavonoidom a vyskytuje sa vo forme glykozidov. Ich farba sa mení v závislosti od pH prostredia, v ktorom sa nachádzajú. Kyslé roztoky majú červenú farbu, v neutrálnom prostredí sú sfarbené na fialovo a v zásaditom prostredí sa vyfarbujú na modro. Tieto zlúčeniny sa môžu použiť na identifikáciu základných typov pH. Toto farbivo sa vyskytuje v listoch červenej kapusty a v plodoch čiernych ríbezlí [1].

Absorpciou svetelného žiarenia sa molekula dostáva do vzbuđeného stavu. Každému vzbuđenému stavu zodpovedá diskretná energetická hladina, pričom suma energetických hladín jednej molekuly tvorí tzv. energetickú štruktúru molekuly (obr. 7.4).



Obr. 7.4: Energetická pásová štruktúra molekuly chlorofylu a znázorňujúca energiu a priemernú dobu života najdôležitejších vzbuđených stavov (priame šípky reprezentujú žiarivé procesy, vlnovky nežiarivé procesy) [1].

V tejto štruktúre sa udáva energia každého vzbuđeného stavu a stredná doba jeho života. Informácie o vlnových dĺžkach kvanta absorbovaného daným typom molekúl možno získať štúdiom absorpčného spektra [2].

Vo všeobecnosti platí, že elektromagnetické vlnenie, ktoré prechádza určitým objektom sa zoslabuje absorpciou a rozptylom. Ak svetlo prechádza homogénnym prostredím, rozptyl je prakticky zanedbateľný a zoslabenie svetla je spôsobené iba absorpciou. Podľa Lambertovho-Beerovho zákona je pri homogénnom zložení média zoslabenie svetla dané hrúbkou prežiarenej vrstvy ℓ , koncentráciou absorbujúcich molekúl c a príslušnými konštantami úmernosti a_λ a b_λ pre tieto dva príspevky. Konštanty slúžia na charakterizáciu veľkosti svetelnej absorpcie pri určitej vlnovej dĺžke. Matematicky je možné vzťahy vyjadriť rovnicami:

$$-dI = I_0 a_\lambda d\ell \quad (7.1)$$

$$-dI = I_0 b_\lambda d\ell \quad (7.2)$$

kde I_0 je intenzita dopadajúceho monochromatického svetla, dI je zmena intenzity monochromatického svetla, ktoré prešlo cez homogénnu absorbujúcu vrstvu. Separáciou premenných a integráciou oboch diferenciálnych rovníc v hraniciach od 0 do ℓ pre hrúbku vrstvy a v hraniciach od 0 do c pre koncentráciu dostaneme:

$$\ln \frac{I_0}{I} = a_\lambda \ell, \quad \ln \frac{I_0}{I} = b_\lambda c \quad (7.3)$$

Zlúčením rovníc do jednej zavedením konštanty úmernosti ε je matematickým vyjadrením Lambert-Beerovho zákona.

$$I = I_0 e^{-\varepsilon c l} \quad (7.4)$$

Konštantu úmernosti ε , ktorá sa nazýva molárny extinkčný koeficient (molárna absorptivita, alebo extinkčný koeficient), je pre každý druh molekúl charakteristická a závisí od štruktúry molekuly, od fyzikálno-chemických podmienok okolia a od vlnovej dĺžky žiarenia.

Dekadický logaritmus pomeru intenzít sa označuje ako *absorbancia*:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T = \varepsilon c l \quad (7.5)$$

Lambertov-Beerov zákon platí iba pre monochromatické svetlo a veľmi zriedené roztoky, v ktorých nie sú absorbujúce molekuly ovplyvnené medzimolekulárnymi interakciami napr. tvorbou komplexov.

Pomer I/I_0 sa označuje tiež ako *priepustnosť*, *transparentnosť* alebo *transmitancia* T .

Experimentálna časť

Úlohy

1. Zaznamenajte absorpčné spektrá chlorofylu a karoténu.
2. Analýzou získaných absorpčných spektier určte koncentrácie extrahovaného farbiva z jednotlivých látok.

Prístroje a pomôcky

Transmisný spektrofotometer, mažiar, tĺčik, filtračný papier, nôž, kremenné kyvety na meranie transmsie v UV-VIS oblasti, pipety, špičky, kadičky.

Chemikálie

Mrkva, zelené listy rastlín, chloroform (acetón), etanol, destilovaná voda.

Opis zariadenia a metóda merania

Na meranie intenzity absorbovaného svetla v roztokoch sa používa spektrálny fotometer, ktorý pracuje vo viditeľnej oblasti. V spektrofotometri je žiarenie vhodného svetelného zdroja rozložené hranolom alebo difrakčnou mriežkou. Ďalej sa vedie cez skúmanú vzorku až do detektora žiarenia. Natočením hranola alebo mriežky sa dá nastaviť požadovaná vlnová dĺžka svetla. Na záznam žiarenia sa používa fotodetektor. Vychádzajúci fotoprúd je mierou výstupnej intenzity svetla.

Postup merania a vyhodnotenie

1. Materiál (mrkvu, listy) pripravíme a rozdrvíme v mažiari. Rozdrvené zmesi zalejeme roztokom chloroformu (acetónu) s objemom 10 ml.
2. Extrakt prefiltrujeme cez filtračný papier. V roztoku sa nachádzajú rôzne molekulárne formy chlorofylu.
3. Extrahované farbivo zriedime na minimálnu hodnotu tak, aby roztok bol slabo zafarbený.
4. V spektrofotometri najskôr zmeriame signál prechádzajúci kvetou, ktorá obsahuje čisté rozpúšťadlo. Odčítaním tohto spektra od hodnôt nameraných pre roztok farbiva získame absorpčné spektrum rozpusteného materiálu v roztoku. Získané výsledky zaznamenáme do grafu. Z hodnôt maxima absorpcie určíme koncentráciu farbív v roztokoch použitím Lambert-Beerovho zákona. Hodnoty absorpčných koeficientov pre dané molekuly pre jednotlivé vlnové dĺžky sa dajú nájsť v tabuľkách. Pre chlorofyl *a* je to okolo $\varepsilon_{ch} = 111\,700\text{ cm}^2/\text{mol}$ pre maximum absorpcie pri vlnovej dĺžke $\lambda = 430\text{ nm}$. Pre karotén je $\varepsilon_k = 139\,500\text{ cm}^2/\text{mol}$ pre maximum v okolí $\lambda = 450\text{ nm}$.

Literatúra

- [1] Cirák, J., Ottova, A Bioelektronika – Návody na cvičenia, Skriptá, 1984, SVŠT v Bratislave.
- [2] http://www.chtf.stuba.sk/kbcht/rozne/biol/BIOL_Cv3.pdf
- [3] <http://www.studiumbiochemie.cz/fotosynteza/3a.jpg>
- [4] http://www.sinicearasy.cz/files/alfa_karoten.gif
- [5] <http://kekule.science.upjs.sk/chemia/expert/demonstracne/chkazdzi/fyzchem/3/celky.htm>
- [6] http://old.lf3.cuni.cz/chemie/english/practical_trainings/task_B1.htm – upravené
- [7] <http://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/>