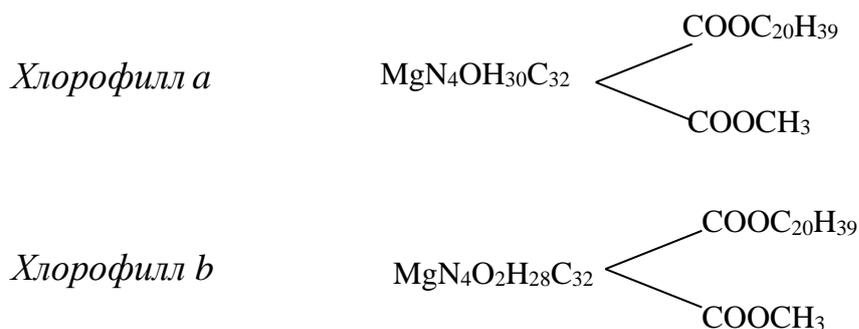


Работа 13

Химические свойства пигментов листа

Вводные пояснения. Пластиды высших растений содержат пигменты двух классов - хлорофиллы и каротиноиды. Зеленые хлорофиллы представлены хлорофиллами *a*, *b*, *c* и *d*. Каротиноиды включают три группы соединений – оранжевые или красные каротины, желтые ксантофиллы и каротиноидные кислоты. Основным функциональным пигментом является хлорофилл *a*, который обнаружен у всех фотосинтезирующих организмов (кроме бактерий). Он служит непосредственным донором энергии для фотосинтетических реакций, остальные пигменты лишь передают поглощенную энергию хлорофиллу *a*.

По химической природе хлорофиллы *a* и *b* — сложные эфиры дикарбоновой кислоты хлорофиллина и двух спиртов — метилового и одноатомного непредельного спирта фитола. Хлорофилл *b* отличается от хлорофилла *a* лишь тем, что у третьего углеродного атома во втором пиррольном кольце его молекулы метильная группа заменена на альдегидную.



Каротины — непредельные углеводороды с эмпирической формулой $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$. По своей химической структуре они являются ациклическими, моноциклическими и бициклическими соединениями. При этом в циклических каротинах шестичленные кольца представлены двумя типами: β -иононовыми и α -иононовыми. В фотосинтезирующих организмах эта группа желтых пигментов

представлена ликопином, α -каротином, β -каротином и γ -каротином. У высших растений основным каротином является β -каротин.

Ксантофиллы — кислородсодержащие производные каротинов, включающие в себя лютеин ($C_{40}H_{56}O_2$), зеаксантин ($C_{40}H_{56}O_2$), виолаксантин ($C_{40}H_{56}O_4$), неоксантин ($C_{40}H_{56}O_4$). Среди названных ксантофиллов преобладает лютеин, который по химической структуре очень близок к α -каротину, но в отличие от него является двухатомным спиртом, т. е. в каждом иононовом кольце один атом водорода замещен на гидроксильную группу.

Материалы и оборудование. Листья растений, этиловый спирт, бензин, 20%-ный раствор NaOH, 10%-ная соляная кислота в капельнице, уксуснокислый цинк, $CaCO_3$, кварцевый песок. Водяные бани, штативы с пробирками, насос Камовского, ступки с пестиками, пипетки на 1 мл, конические колбочки, цветные карандаши.

Ход работы. *Получение спиртового раствора пигментов.* Обычно пигменты из растительной ткани извлекают полярными растворителями (этиловый спирт, ацетон), которые разрушают связь хлорофиллов и ксантофиллов с липопротеинами пластид и тем самым обеспечивают их полное экстрагирование. Неполярные растворители (петролейный эфир, гексан, бензин и др.) не нарушают связи этих пигментов с белками и потому не могут их извлечь из свежих листьев. Для получения вытяжки пигментов используют как сырой, так и сухой материал.

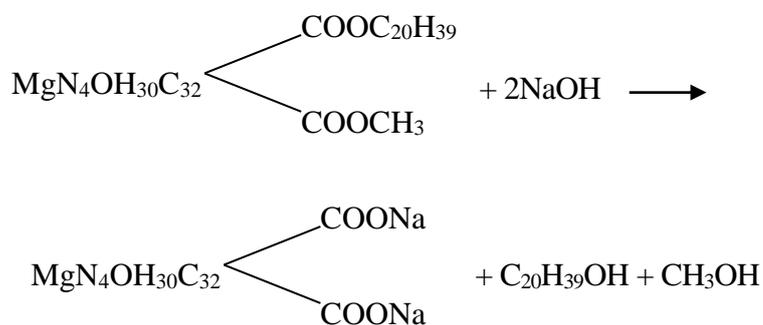
Навеску сырых листьев (200—300 мг) измельчают, растирают в ступке с добавлением небольшого количества кварцевого песка и $CaCO_3$ для нейтрализации кислот клеточного сока, затем экстрагируют этиловым спиртом. Экстракт фильтруют центрифугированием (8000 оборотов/мин, 5 минут) или при помощи насоса Камовского. Экстракт используют в последующих опытах.

Разделение пигментов по Краусу. Метод основан на различной растворимости пигментов в спирте и бензине. Эти растворители при сливании не смешиваются и образуют две фазы — верхнюю бензиновую и нижнюю спиртовую, благодаря чему и разделяются компоненты смеси.

В пробирку наливают 2—3 мл спиртового экстракта пигментов и добавляют 3—4 мл бензина. Содержимое пробирки сильно встряхивают, предварительно закрыв, и оставляют отстояться. По мере расслоения эмульсии бензиновый слой будет окрашиваться в зеленый цвет из-за лучшей растворимости в нем хлорофиллов. Кроме того, в бензин переходит каротин, но его окраска маскируется хлорофиллом. Ксантофилл остается в спиртовом слое, придавая ему золотисто-желтую окраску.

Если пигменты разделяются недостаточно четко, добавляют три-четыре капли воды и снова встряхивают. При избытке воды возможно помутнение нижнего слоя. В этом случае следует прилить немного этилового спирта и взболтать содержимое пробирки. В конце работы зарисовывают картину распределения отдельных пигментов, а в выводах объясняют их различную растворимость в спирте и бензине.

Омыление хлорофилла щелочью. Обработывая хлорофилл щелочью, можно вызвать омыление эфирных групп, т.е. отщепление остатков метилового спирта и фитола.



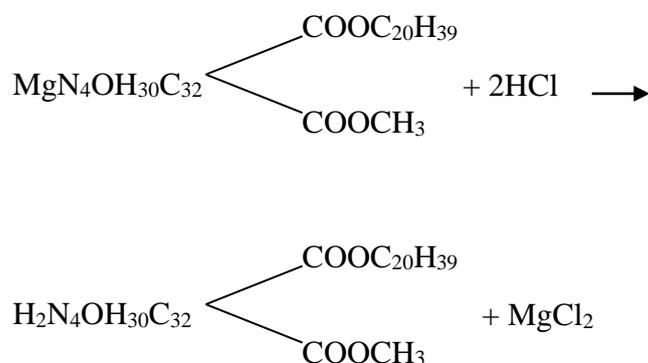
Образующаяся при этом соль хлорофиллиновой кислоты сохраняет зеленую окраску и оптические свойства хлорофилла, но отличается большей гидрофильностью по сравнению с неизменным пигментом.

В пробирку с 2—3 мл спиртового раствора пигментов приливают 1 мл 20%-ного NaOH и взбалтывают. К раствору добавляют равный объем бензина и несколько капель воды для лучшего разделения смеси. Затем содержимое про-

бирки резко встряхивают и дают ему отстояться. В бензиновый слой перейдут каротин и ксантофилл, а в спиртовой - натриевая соль хлорофиллиновой кислоты.

По окончании опыта зарисовывают окраску слоев, указав распределение пигментов.

Получение феофитина и обратное замещение водорода атомом металла. Атом магния сравнительно слабо удерживается в порфириновом ядре хлорофилла и при осторожном воздействии сильных кислот легко замещается двумя протонами, что приводит к образованию феофитина бурого цвета.



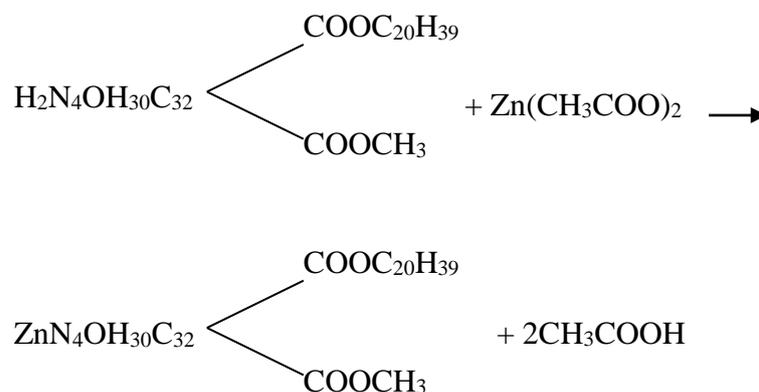
Если на феофитин подействовать солями меди, цинка или ртути, то вместо двух протонов в ядро входит соответствующий металл и вновь восстанавливается зеленая окраска. Однако она несколько отличается от окраски хлорофилла.

Следовательно, цвет хлорофиллов зависит от металлоорганической связи в их молекуле. Обратное введение магния в феофитин происходит с большим трудом.

В две пробирки берут по 2—3 мл спиртовой вытяжки пигментов и прибавляют по одной - две капли 10%-ной соляной кислоты. При взбалтывании зеленая окраска хлорофилла переходит в бурую, характерную для феофитина. Одну пробирку с феофитином оставляют для контроля, а во вторую вносят несколько кристаллов уксуснокислого цинка и нагревают раствор на водяной бане до кипения.

ния. После нагревания бурый цвет раствора меняется на зеленый в результате образования хлорофиллоподобного производного цинка.

Отмечают окраску феофитина и цинк-производного хлорофилла.



Работа 14

Оптические свойства пигментов

Вводные пояснения. В процессе фотосинтеза световая энергия перед преобразованием в химическую должна быть поглощена пигментами. Пластидные пигменты поглощают свет в пределах видимой части спектра (380—720 нм), благодаря чему эта область излучения называется фотосинтетически активной радиацией или ФАР. Пигменты поглощают видимый свет не полностью, а избирательно, т. е. каждый пигмент имеет свой характерный спектр поглощения. В частности, важнейшая особенность спектра поглощения хлорофиллов *a* и *b* — наличие у них двух ярко выраженных максимумов: в красной области — соответственно 660 и 640 нм и в сине-фиолетовой — 430 и 450 нм. Минимум по-

Через 7—10 дней таким же образом вновь отбирают растения и определяют массу сухих растений и площадь листового аппарата. Чистую продуктивность фотосинтеза рассчитывают по формуле 1.

Если такие наблюдения провести в течение вегетации растений, можно получить ценные данные о продуктивности работы листьев в отдельные периоды жизни исследуемой культуры или в зависимости от условий ее произрастания. Результаты наблюдений записывают в таблице 11.

Таблица 11 - Определение чистой продуктивности фотосинтеза

Объект	Число растений в пробе	Сырая масса растений, г			Сухая масса растений, г			Общая S листьев, см ²	ЧПФ, г/м ² сутки
		Листья	Стебли	Σ	Листья	Стебли	Σ		

Работа 16

Количественное определение пигментов в листьях растений

Вводные пояснения. Хлорофиллы и каротиноиды являются важнейшими компонентами фотосинтетического аппарата листьев. Их содержание зависит от жизнедеятельности организма и его генетической природы. Поэтому оно может быть использовано как физиологический показатель, характеризующий возрастные и генетические особенности растений. Количество пигментов очень чутко отражает и реакцию растительного организма на условия произрастания. Поэтому при физиологических исследованиях часто возникает необходимость проследить за динамикой хлорофилла и каротиноидов в отдельных органах растения.

Количественный анализ пигментов включает экстракцию их из растительных тканей растворителями, разделение смеси на отдельные компоненты (если этого требуют задачи эксперимента) и фотометрирование.

Для извлечения пигментов из листьев применяют полярные растворители (этиловый спирт, ацетон) или смесь полярных и неполярных (петролейный эфир, гексан, бензин, бензол) растворителей. Выбор растворителя зависит от условий опыта и объекта исследования. Наиболее часто используют этиловый спирт и ацетон. Пигменты лучше всего экстрагировать из свежего растительного материала. Полученный экстракт используют для количественного анализа пигментов с помощью спектрофотометра.

Спектрофотометрический анализ является наиболее точным количественным методом определения пигментов листа. Концентрация пигментов определяется на спектрофотометре по оптической плотности. Данный метод позволяет проводить анализ смеси веществ с близкими максимумами поглощения, что достигается за счет использования монохроматора, вследствие чего удается установить содержание хлорофиллов и каротиноидов в вытяжке без предварительного их разделения. Для этого измеряют оптическую плотность экстракта на спектрофотометре при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофилла *a* и *b* в красной области спектра и при длине волны абсорбционного максимума каротиноидов. Надо помнить при этом, что положение максимума поглощения несколько меняется в зависимости от используемого растворителя.

Концентрацию пигментов рассчитывают по следующим уравнениям:

1. Для 100%-ного ацетона (по Хольму - Веттштейну)

$$C_{\text{хл.а}} = 9,784 \cdot D_{662} - 0,990 \cdot D_{644}$$

$$C_{\text{хл.б}} = 21,426 \cdot D_{644} - 4,650 \cdot D_{662}$$

$$C_{\text{хл.а} + \text{хл.б}} = 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644}$$

$$C_{\text{кар.}} = 4,695 \cdot D_{440,5} - 0,268 \cdot C_{\text{хл.а} + \text{хл.б}}$$

2. Для 85%-ного ацетона (по Реббелену)

$$C_{\text{хл.а}} = 10,3 \cdot D_{663} - 0,918 \cdot D_{644}$$

$$C_{\text{хл.б}} = 19,7 \cdot D_{644} - 3,87 \cdot D_{663}$$

$$C_{\text{хл.а+хл.б}} = 6,4 \cdot D_{663} + 18,8 \cdot D_{644}$$

$$C_{\text{кар.}} = 4,75 \cdot D_{452,5} - 0,226 \cdot C_{\text{хл.а} + \text{хл.б}}$$

3. Для 80%-ного ацетона (по Вернону)

$$C_{\text{хл.а}} = 11,63 \cdot D_{665} - 2,39 \cdot D_{649}$$

$$C_{\text{хл.б}} = 20,11 \cdot D_{649} - 5,18 \cdot D_{665}$$

$$C_{\text{хл.а} + \text{хл.б}} = 6,45 \cdot D_{665} + 17,72 \cdot D_{649}$$

4. Для 96%-ного этанола

$$C_{\text{хл.а}} = 13,70 \cdot D_{665} - 5,76 \cdot D_{649},$$

$$C_{\text{хл.б}} = 25,80 \cdot D_{649} - 7,60 \cdot D_{665},$$

$$C_{\text{хл.а} + \text{хл.б}} = 6,10 \cdot D_{665} + 20,04 \cdot D_{649}.$$

В приведенных уравнениях $C_{\text{хл.а}}$, $C_{\text{хл.б}}$, $C_{\text{хл.а} + \text{хл.б}}$ и $C_{\text{кар.}}$ — концентрации хлорофилла a , b , их суммы и каротиноидов в миллиграммах на 1 л; D — экспериментально полученные величины оптической плотности при соответствующих длинах волн.

Содержание пигментов выражают в миллиграммах на грамм сырой (сухой) массы, в процентах сырой (сухой) массы и на единицу площади листьев (дм^2).

Материалы и оборудование. Листья растений, 85%-ный ацетон, кварцевый песок, CaCO_3 , вазелин. Весы, ножницы, ступки с пестиками, мерные колбочки или мерные пробирки на 25 мл, воронки со стеклянным фильтром № 2, воронки, стеклянные палочки, спектрофотометр СФ-26, насос Камовского.

Ход работы Навеску листьев определенного яруса (0,1—0,2 г) известной площади (высечки из листьев делают с помощью сверла) помещают в фарфоро-

вую ступку, добавляют немного CaCO_3 , промытого кварцевого песка и растирают с 2—3 мл 85%-го ацетона. К растертой массе добавляют 4—5 мл ацетона и снова растирают в течение нескольких минут. После отстаивания раствора нижнюю сторону носика ступки слегка смазывают вазелином, экстракт осторожно сливают по стеклянной палочке в воронку со стеклянным фильтром № 2 и отсасывают насосом. Перед перенесением вытяжки воронку вставляют с помощью каучуковой пробки в колбу Бунзена, которую соединяют с насосом. Экстракцию небольшими порциями чистого растворителя повторяют до тех пор, пока пигменты не будут полностью извлечены. По-другому отфильтровать раствор можно с помощью центрифугирования (8000 оборотов/мин, 5 минут). Затем фильтрат переносят с помощью сухой стеклянной воронки в мерную колбочку или мерную пробирку на 25 мл. Колбу Бунзена дважды ополаскивают небольшой порцией ацетона, сливая каждый раз жидкость в мерную колбочку. Далее содержимое колбочки доводят растворителем до метки, закрывают пробкой, тщательно взбалтывают и используют для определения концентрации пигментов. Анализ пигментов проводят при комнатной температуре, на рассеянном свете, так как при сильном освещении может произойти фотоокисление хлорофилла. Хранят вытяжку в темном и холодном месте.

Оптическую плотность (экстинкцию) полученной вытяжки измеряют на спектрофотометре. Результаты записывают в таблицу 12.

Таблица 12 - **Результаты спектрофотометрического определения**

Варианты опыта	Навеска листьев, мг	Объем вытяжки, мл	Величины оптической плотности		
			D ₆₆₃	D ₆₄₄	D _{452,5}

Концентрацию пигментов рассчитывают по уравнению Реббелена, указанного в водных пояснениях. Затем вычисляют содержание пигментов (А, мг/г сырой массы) в опытном материале, по формуле:

$$A=V \cdot C / 1000 \cdot P$$

где С - концентрация пигментов, мг/л;

V – объем вытяжки, мл (25 мл);

P – навеска растительного материала, г (0,1-0,2 г).

Результаты записывают в таблицу 13.

Таблица 13 - **Содержание фотосинтетических пигментов в листьях** *название объекта*

Пигменты	Содержание пигментов		
	мг / г сырой массы	% к сырой массе	мг / дм ²
Хлорофилл а			
Хлорофилл b			
Каротиноиды			
Хлорофилл a+b			
Хлорофилл а / b			