Робота №13. **Пігменти листка, їх фізичні властивості.**

*Мета***:** Вивчити хімічну структуру пігментів зеленого листа, їх фізичні властивості.

Завдання:

1. оволодіти навичками виготовлення спиртової витяжки пігментів зеленого листка;
2. сформувати уявлення про спектри поглинання пігментів рослин;
3. проспостерігати явище флуоресценції хлорофілу.

Література: Векирчик К.Н. Физиология растений. Практикум. – К.: Высшая школа, 1984. – 240 с.: робота № 36, 37, 38, 42, 43, 44,

Фізіологія рослин. Практикум /за ред. проф. М.М. Мусієнка. – Київ: Вища школа, 1995. – 191 с. – робота №23, 24, 25, 26, 32.

*До заняття*: Скласти структурні формули піддослідних пігментів (завдання 1). Письмово дати визначення поняттям:

Хлорофіли – \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Каротини – \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Ксантофіли – \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Витяжка – \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Флуоресценція – \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Хроматографія – \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

*Завдання 1.* **Отримання витяжки рослинних пігментів**

*Пояснення*: Пігментна система хлоропластів складається з зелених (хлорофіли) та жовтих (каротини і ксантофіли) пігментів. За хімічною природою хлорофіли „а” і „в” – складні ефіри дикарбонової кислоти хлорофіліну і двох спиртів – метилового і фітолу

Для хімічних формул

Каротини являють собою ненасичені вуглеводні (С40 Н56), ксантофіли – це киснепохідні каротинів (С40Н56О2, С40 Н56О4 та ін.).

Для хімічних формул

*Об'єкт:* листки аспідістри високої (*Aspidistra elatior*), пеларгонії садової (*Pelargonium hortorum*), гібіскуса китайського (*Hibiscus rosa-sinensis*), сингоніума (*Syngonium*). або інших кімнатних рослин з темно-зеленими листками, коренеплід моркви посівної (*Daucus carota* subsp. *sativus*)

*Матеріали та обладнання:* фарфорові ступки з товкачиками, набір пробірок в штативі, скляні воронки, фільтрувальний папір (для фільтрації витяжки), ножиці, металеві терки, скляні лопаточки для роботи з сухими реагентами, скляні палички, етиловий спирт, бензин (хімічно чистий), сухий карбонат кальцію СаСО3.

**Хід роботи:**

2-3 листки кімнатних рослин розрізають ножицями на невеликі шматочки, кладуть у фарфорову ступку, додають трохи СаСО3 (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. Замальовують пробірки з витяжками.

|  |  |
| --- | --- |
| 1 | 2 |

**Рис. 17. Витяжки рослинних пігментів: 1 – спиртова витяжка пігментів листка \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_, 2 – бензинова витяжка пігментів коренеплоду моркви.**

Роблять висновок про те, які рідини дозволяють екстрагувати пігменти з органів рослин; за забарвленням розчинів – висновок про те, яку частину спектру наявні в них пігменти не поглинають, а відбивають.

|  |
| --- |
| Висновки: |
|  |
|  |
|  |
|  |

*Завдання 2.* **Дослідження оптичних властивостей пігментів**

*Пояснення*: До фізичних властивостей хлорофілу відноситься його здатність флуорисцирувати. При поглинанні хлорофілом кванту енергії світла один з π-електронів переходить на більш високий енергетичний рівень і молекула "збуджується". Але дуже швидко електрони повертаються у своє вихідне положення. Цей процес супроводжується вилученням світла більшої довжини хвилі, тобто флуорисцирується.

*Об'єкт:*Спиртовий витяг хлорофілу, розчин каротину та ксантофілу.

*Матеріали та обладнання:*спектроскопи, чорний папір, електрична лампа денного світла на 200 Вт.

**Хід роботи:**

Спиртовий розчин пігментів листа розглядають у прямих променях світла, витяжка буде зеленого кольору, тому що зелені промені не поглинаються. Якщо цей розчин роздивитися у відбитому світлі на темному фоні, він має темно-червоний колір. Розміщують пробірку зі спиртовим витягом пігментів листка на тлі чорного екрану (прямокутник матового чорного паперу) і підсвічують яскравою лампою денного світла або джерелом ультрафіолетового випромінювання. Відзначають забарвлення розчину в пробірці.

 Пігменти зеленого листка поглинають світло вибірково, тобто кожен пігмент має свій спектр поглинання. Так, максимум поглинання світла хлорофілом "а" і "в" лежать у червоній і синьо-фіолетовій зонах спектру. Каротини і ксантофіли поглинають світло тільки у зонах синьо-фіолетових кольорів.

Щоб розглянути спектри поглинання пігментів листа, у пробірку наливають 3-4 мл спиртового розчину, закріплюють її у лапці пробіркотримача, підсвічують лампою денного світла і дивляться у спектроскоп (рис. 18). На суцільній смузі спектру денного світла мають вирізнятися темні смуги, що відповідають спектру поглинання пігментів листка. Треба порівняти за допомогою спектроскопу спектри поглинання концентрованого і розведеного розчинів пігментів.

Аналогічно треба розглянути і бензиновий розчин жовтих пігментів.

Замалювати спектр сонячного проміння, спектр поглинання хлорофілів "а" і "в", каротину та ксантофілів. Замалювати явище флуоресценції.

|  |  |
| --- | --- |
| spectroscop_1 |  |
| **Рис. 18. Портативний спектроскоп та схема принципу дії.** | **Рис. 19. Спектр сонячного світла («веселка»)** |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |
| **Рис. 20. Спектр поглинання хлорофілів (витяг пігментів листка)** |  | **Рис. 21. Спектр поглинання каротиноїдів (бензиновий витяг пігментів коренеплоду моркви)** |  | **Рис. 22. Флуоресценція хлорофілу під дією ультрафіолету** |

У висновках пояснити, які фізичні властивості пігментів листка відображені у проведеному досліді.

|  |
| --- |
| Висновки: |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |

*Завдання 3.* **Розділення пігментів зеленого листка методом паперової хроматографії.**

*Пояснення*: Для роздільної хроматографії використовують спиртовий витяг пігментів зеленого листка. Для більш чистого результату в якості піддослідної слід брати кімнатні рослини, позбавлені ефірних залоз – аспідістру, гібіскус.

Принцип хроматографії, використаної в даному досліді, вперше був розроблений російським фізіологом М.О.Цвєтом. В основі цього метода лежить різний зв’язок молекул піддослідної речовини з адсорбентом. Розподіл пігментів на хроматографічному папері оснований на різній розчинності пігментів листа у розчині. Чим краще розчиняється пігмент, тим швидше він піднімається і тим вище буде знаходитися на папері. Внаслідок безперервного рух розчинника відбувається новий розподіл пігментів.

*Об'єкт:* листки аспідістри, китайського гібіскуса, сингоніума.

*Матеріали та обладнання:* фарфорові ступки з товкачиками, набір пробірок в штативі, скляні воронки, фільтрувальний папір (для фільтрації витяжки), ножиці, металеві терки, скляні лопаточки для роботи з сухими реагентами, скляні палички, етиловий спирт, бензин (хімічно чистий), сухий карбонат кальцію СаСО3;

Хроматографічний папір або високоякісний білий фільтрувальний папір, бензин, бензол, хімічні склянки, скло для закриття склянки, вазелін, скляний шпатель, пластилін, металеві канцелярські скріпки.

**Хід роботи:**

2-3 листки кімнатних рослин розрізають ножицями на невеликі шматочки, кладуть у фарфорову ступку, додають кілька міліграмів СаСО3 (для нейтралізації кислот клітинного соку), близько 0,5 мл етилового спирту і розтирають до отримання однорідної кашеподібної маси. Додають в ступку 10 мл етилового спирту, перемішують скляною паличкою протягом 2-3 хв і відфільтровують спиртову витяжку пігментів листа у чисту суху пробірку через сухий фільтрувальний папір. Пробірку перед початком досліду ретельно миють і висушують за допомогою пінцету і фільтрувального паперу.

Вирізають з хроматографічного або фільтрувального паперу прямокутник, трохи нижчий і вужчий за хімічну склянку, таким чином, розташовуючи лист таким чином, щоб волокна йшли впоперек (паралельно дну склянки). Вирізають з паперу смужки (див. рис. 20).

На звужену частину смужок наносять по 10 краплин спиртової витяжки пігментів листа. Кожну наступну краплину наносять мікропіпеткою після того, як попередня висохне. Підсушувати папір можна в потоці теплого повітря. У верхній частині підготованого паперу роблять невеликий отвір для кріплення в склянці.

**Наступний етап досліду проводиться студентами тільки у витяжній шафі!**

Готують портативну хроматографічну камеру. До скла, яким накривають склянку, в центрі за допомогою пластиліну кріплять зігнуту канцелярську скріпку таким чином, щоб до гачка можна було прикріпити фільтрувальний папір з нанесеними пігментами листа. В склянку наливають 30 мл бензолу і 10 мл бензину. Кріплять папір таким чином, щоб нижній край був занурений у суміш розчинників не більш ніж на 1 см, а рівень суміші був би нижчим за плями пігментів на 1 – 1,5 см. Змащують краї склянки, закривають її склом, обережно опускаючи хроматографічний папір у розподільчу суміш.

Час експозиції при даному способі розподільчої паперової хроматографії – 1 година. По закінченні папір виймають зі склянки, висушують під витяжною шафою і роздивляються. Відзначають наявність смуг пігментів, їх колір. Забарвлення пігментів наступне: жовто-зелене – хлорофіл «в», синьо-зелене – хлорофіл «а», оранжево-жовте – каротин, цитриново-жовте – ксантофіл. Враховуючи вищесказане, роблять висновок про ступінь розчинності в бензині різних пігментів, на основі розміру кольорових смуг – про вміст пігментів у витяжці.

Результати хроматографії замальовують, роблять підписи до зон конкретних пігментів.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |

**Рис. 20. Пігменти зеленого листка на хроматографічному папері.**

Описати у висновках, як по фракціях розподілились пігменти листка під час хроматографії. Пояснити результат з точки зору властивостей молекул окремих пігментів.

|  |
| --- |
| Висновки: |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |

**Контрольні питання:**

1. Поясніть суть та значення фотосинтезу.
2. Написати загальне рівняння фотосинтезу.
3. Розповісти про структурну будову молекул хлорофілу
4. Як можна виділити пігменти з зеленого листа?
5. Які пігменти містяться в спиртовій витяжці хлорофілу?
6. Як добути спектр поглинання хлорофілу? В яких частинах спектра лежить основний максимум поглинання хлорофілу та жовтих пігментів?
7. Що таке флуоресценція?
8. На чому ґрунтується роздільна хроматографія?
9. Які властивості пігментів листка дозволяють зробити їх витяжку?

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Дата захисту\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ | Оцінка \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ | Підпис викладача \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ |