

Eesti koolinoorte 45. bioloogiaolümpiaad

Praktiline töö – taimefüsioloogia



Eesnimi:

Perekonnanimi:

Kool:

Klass:

Õpetaja:.....

TAIMELEHTEDE KLOOROFÜLLISISALDUSE FOTOMEETRILINE MÄÄRAMINE

Fotomeetria alused

Kindla energia suurusega (lainepikkusega) elektromagnetilise kiirguse neeldumine ja eraldumine on iseloomulik paljudele molekulidele ja sõltub elektronide liikumisest aine erinevate energiatasemetel vahel vastavalt kvantmehaanika seadustele. Kiirguse neeldumist teatud aine poolt iseloomustab neeldumisspekter, mis sõltub aine struktuurist ja on seega ainele spetsiifiline. Neeldumisspektri võib jagada kolmeks piirkonnaks: ultraviolet- (200-400 nm), nähtava valguse- (400-750 nm) ja infrapunane (750nm - 50mm) spekter. Spektris esinevad maksimumid vastavad antud aines neelduvate kvantide energiasaldusele (lainepikkusele). Näiteks klorofüll a neelab nähtavas piirkonnas punast ja sinist valgust, neeldumismaksimumidega etanoolis 665 nm (punane) ja 432 nm (sinine) juures.

Valguse neeldumist teatud aine lahuses iseloomustab lahuse optiline tihedus ehk absorptsioon (A)

$$A = \log \frac{I_0}{I_T}$$

I_0 – lahusele langeva valguse intensiivsus;

I_T - lahust läbinud valguse intensiivsus;

Valguse neeldumist lahuse poolt iseloomustavad kaks põhilist seadust:

- lahust läbiva valguse absorptsioon sõltub lahustunud aine molekulide arvust s.t. lahuse kontsentratsioonist .
- Lahust läbiva valguse absorptsioon sõltub ka lahusekihi paksusest.

Need sõltuvused on kombineeritud Lambert – Beer'i seaduses

$$A = \epsilon C l$$

A – lahuse optiline tihedus e. absorptsioon

ϵ - absorptsioonikoefitsient (proportsionaalsuskonstant),
dimensiooniga näiteks $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$;

C – lahuse kontsentratsioon;

l - valgusekiire teel oleva lahusekihi paksus (cm).

Kasutades Lambert-Beer'i seadust on lahuse absorptsiooni (optilise tiheduse) abil võimalik määrata aine kontsentratsiooni lahuses.

$$C = \frac{A}{\epsilon * l}$$

Suhet I_t/I_0 nimetatakse läbilaskvuseks (T).

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = -\log T = \epsilon Cl$$

Kui valgus intensiivsusega I_0 ja kindla lainepikkusega läbib antud aine või ühendi lahuse, siis läbinud valguse (I_t) intensiivsus nõrgeneb neeldumise tõttu. Molaarse absorptsiooni koefitsient ϵ tähistab ühemolaarse lahuse optilist tihedust, kui lahusekihi paksus on 1 cm. Konkreetse aine molaarse absorptsiooni koefitsienti on tavaliselt võimalik leida vastavatest tabelitest või ka eksperimentaalselt, mõõtes puhta aine erinevate kontsentratsioonide absorptsiooni ja konstrueerides selle alusel graafiku. Graafiku sirge osa tõus vastab aine molaarse absorptsiooni koefitsiendile.

Eksperimentaalselt mõõdetakse lahuse optilist tihedust spektrofotomeetriga või kolorimeetriga. Mõõtes tundmatu kontsentratsiooniga lahuse optilise tiheduse ja teades aine absorptsioonikoefitsiendi väärtust, on Lambert - Beeri seadust kasutades võimalik välja arvutada lahuse kontsentratsioon. Neeldumist mõõdetakse võimaluse korral lainepikkusel, mis vastab maksimaalsele neeldumisele, see annab suurima tundlikkuse. Neeldumist võib mõõta ka vähem neelavatel lainepikkustel, siis tuleb arvestada, et absorptsioonikoefitsient on teistsugune kui maksimumis. Absorptsiooni teatud kindlal lainepikkusel tähistatakse tavaliselt lainepikkusega subindeksis. Näiteks A_{666} tähistab optilist tihedust 666 nm juures. Võrdlusküvetis on lahusti, et elimineerida lahusti mõju neeldumisele. Mõõtmisel nähtavas valguses kasutatakse klaasist ja plastmassist küvette, mõõtmisel ultravioletis kvartsküvette.

Lahuse kontsentratsiooni on võimalik leida ka kaliibrimisgraafiku abil. Kaliibrimisgraafikuks nimetatakse graafikut, mis esitab optilise tiheduse väärtusi aine erinevatel kontsentratsioonidel.

Enne absorptsiooni mõõtmist tuleb olla veendunud, et küvetid on puhtad, õigest materjalist, kriimustamata, väljastpoolt kuivad, täidetud vajaliku kõrguseni ja paiknevad küvetihoidjas õigesti.

Kui on tegemist kattuvaid neeldumisspektreid omavate ainete seguga, siis on ühe konkreetse aine kontsentratsiooni leidmiseks kasutatav valem keerulisem. Kuna neeldumisspektrid on aditiivsed s.t. kui teatud lainepikkusel neelavad mitu ühendit, siis summaarne valguse neeldumine võrdub iga aine poolt neelatava valguse summaga. Seetõttu näiteks klorofüll a kontsentratsiooni määramisel 660 nm juures tuleb lahutada klorofüllil b neeldumine sellel lainepikkusel. Klorofüllil b neeldumist 660 nm juures on võimalik arvutada, teades neeldumist klorofüll b neeldumismaksimumi juures ja neeldumisspektri kuju s.t. mitu korda 660 nm juures neeldumine väheneb võrreldes klorofüll b neeldumisega maksimumis. Arvestada tuleb ka sellega, et pikaajalisel lahuse valguse käes seismisel klorofüll la guneb.

Tööülesanne - Määrata klorofüllide a ja b sisaldus taimelehtedes

Töövahendid: portselanuhmer, Bunseni kolb, 25 ml mõõtkolb (2 tk), veejoapump, klaasfiltrid, katseklaasid, lehtrid, prepareerimisvahendid, CaCO_3 , etanool, taimelehed, spektrofotomeeter ja selle küvetid, kaalud, kalibreeritud pipetid.

Töö läbiviimine

0,5g taimelehti homogeniseerida portselanuhmris väikese koguse (5 ml) absoluutse etanooliga lisades keskkonna hapustumise ja klorofüllil lagunemise vältimiseks skalpelli otsaga CaCO_3 -e. Ekstrakt filtreerida läbi kurdfiltril 25 ml mõõtkolbi või kanda kvantitatiivselt üle klaasfiltrile ja filtreerida Bunseni kolbi vaakumpumba abil. Mõlemal juhul ekstraheerimist korratakse väikeste etanooli kogustega seni,

kuni sade on värvitu ja kogu klorofüll eraldatud. Ühendatud filtraadid mõõtkolvis viiakse 25 ml-ni etanooliga. Pigmente võib taimekudedest eraldada ka teiste lahustitega (näit: atsetoon jne.).

Klorofüllide a ja b sisalduse määramiseks valatakse saadud ekstrakt 1cm läbimõõduga küveti. Teine küvett täidetakse lahustiga. Küvetid asetatakse spektrofotomeetri küvetikambrisse ja määratakse lahuse optiline tihedus A klorofüllide a ja b neeldumismaksimumidel. Klorofüllide a ja b sisaldus leitakse vastavatest valemitest (????????? jt. ?????? ?????????? ?? ?????????? ??????????. 1975):

96%- lises etanoolis, (Wintermans, De Mots)

$$C_a \text{ (mg/l)} = 13,70 \cdot A_{665} - 5,76 \cdot A_{649}$$

$$C_b \text{ (mg/l)} = 25,80 \cdot A_{649} - 7,60 \cdot A_{665}$$

$$C_a + C_b \text{ (mg/l)} = 6,10 \cdot A_{665} + 20,04 \cdot A_{649} = 25,1 \cdot A_{654}$$

Tulemused ja vormistamine

Andmed, mille alusel on võimalik arvutada klorofüllide a ja b sisaldus esitada järgnevas tabelis:

Lahus -ti	Lehtede kaal (g)	Ekstrakti ruumala (ml)	Optiline tihedus 665 nm	Optiline tihedus 649 nm	Klorofüllide a ja b sisaldus 1g lehtedes	Klorofüllide a ja b sisaldus mmoolides lehepinna m ² kohta

Taimse materjali kaalutist ja lahjendust arvestades leida klorofüllide a ja b sisaldus millimoolides ruutmeetri lehepinna kohta. 1g lehtede pindala on ~55 cm², klorofüllide a molekulmass on 894, klorofüllil b 908.

Küsimused

1. Milline on Lambert - Beeri seaduse matemaatiline kuju?
2. Mis on absorptsioonikoefitsient ja kuidas seda on võimalik väljendada?
3. Mida mõõdetakse spektrofotomeetritega?
4. Mis on transmissioon ja kuidas see on seotud absorptsiooniga?
5. Miks on klorofüllide a ja b sisalduse arvutamise valemid keerulisemad kui Lambert – Beeri seaduse üldvalem? Mida tähistavad numbrid klorofüllide kontsentratsiooni määramise valemis?
6. Milliseid küvette võib kasutada mõõtmistel ultravioletses ja nähtavas spektri piirkonnas?
7. Kuidas on võimalik eksperimentaalselt määrata absorptsioonikoefitsiendi suurust?
8. Millistes ühikutes väljendatakse optiline tihedus?
9. Miks klorofüll valguse käes lahuses laguneb?
10. Miks klorofüllide lahusesse viimisel on vajalik aluseline (leeliseline) pH (CaCO₃ lisamine)?