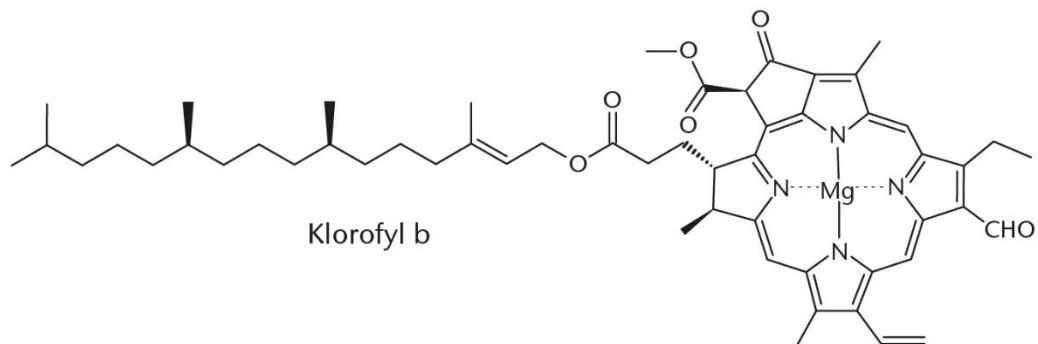
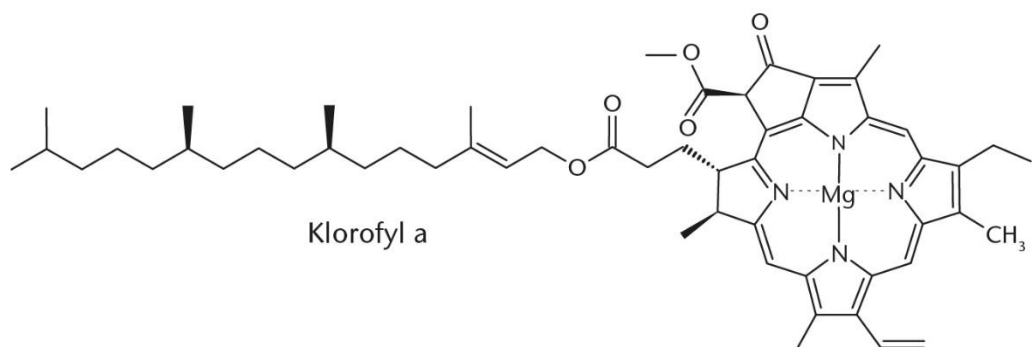


Klorofyl og andre pigmenter



Introduktion

I denne øvelse undersøger I ekstraktion af farvepigmenter, primært klorofyl, fra grannåle eller blade. I måler absorbansen af ekstrakterne med et spektrofotometer.

Undervejs introduceres I til begreberne, som tilpasses efter fag og niveau:

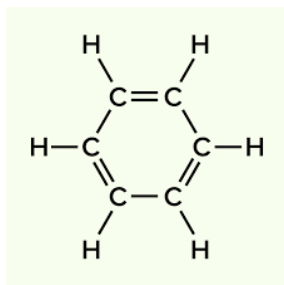
- Delokaliserede elektroner og konjugerede dobbeltbindinger
- Chromofore og auxochrome grupper
- Fotosyntese og fotosyntesepigmenter
- Ekstraktion, herunder polaritet og blandbarhed
- Spektrofotometri og absorbans
- Lambert Beers lov

Teoretisk baggrund

I naturen ses mange forskellige farver, især hos planter og dyr. I denne øvelse fokuserer I på farvepigmenter i grannåle og evt. blade, især klorofyl.

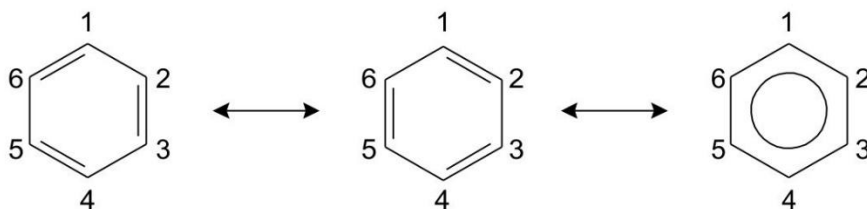
Delokaliserede elektroner og konjugerede dobbeltbindinger

Benzenringens struktur er nok velkendt. Den kan opskrives således:



Figur 1: Benzen

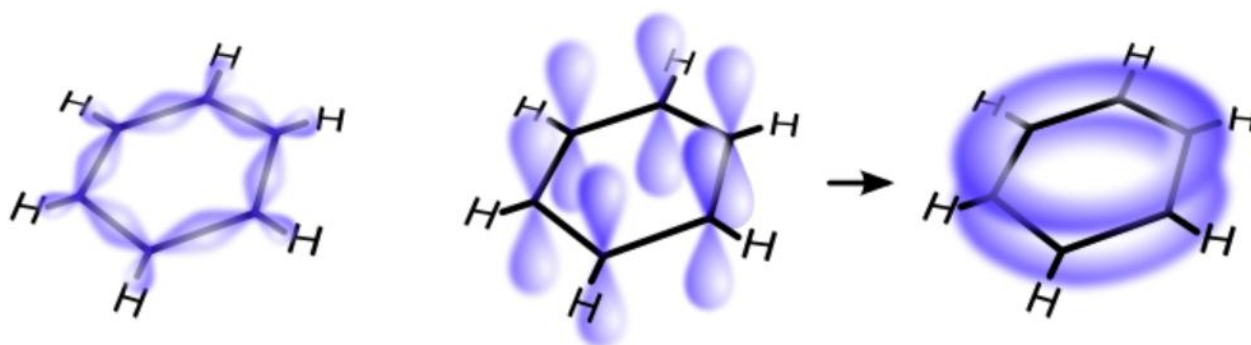
Men dette er en forsimplet udgave. Andre repræsentationsformer er



Figur 2: Flere repræsentationsformer for benzen

I virkeligheden er der ikke tale om en dobbeltbinding mellem hvert andet C-atom. Som bekendt har C-atomer 4 elektroner i yderste skal, og kun 3 af disse bruges til at lave elektronparbindinger, en binding til hvert nabo-C-atom og en binding til et H-atom. Den sidste elektron fra hvert C-atom ligger og svæver rundt i det, der kaldes en delokaliseret elektronsky, hvor elektronerne befinder sig lige så ofte over som under det plane molekyle. Dette illustreres med cirklen i midten af molekylet på illustrationen til højre i figur 2.

Dykker man lidt dybere ned i bindingsteorien, er CC-bindingerne og CH-bindingerne σ -bindinger dannet af hybridiserede sp^2 -orbitaler, se figur 3 til venstre. Ud over de p-orbitaler, der bruges i disse bindinger, har hvert C-atom endnu en elektron i en p-orbital, se den midterste figur. Det er disse elektroner, der bevæger sig over og under den plane ringstruktur og udgør den delokaliserede π -elektronsky, se figuren til højre.



Figur 3: Bindende og ikke-bindende orbitaler i benzen

Til venstre: σ -bindinger dannet af hybridiserede sp^2 -orbitaler. I midten: p-orbitaler, der ikke indgår i σ -bindingerne.

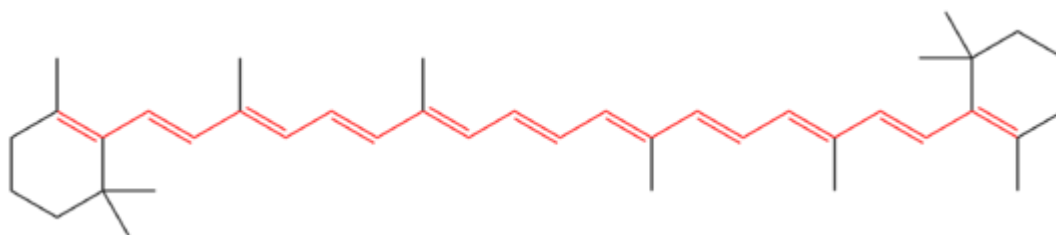
Til højre: den delokaliserede π -elektronsky

Opgave 1

- Byg en model af en benzenring, og brug modellen til at vise/forklare begrebet "delokaliserede elektroner"

Delokaliserede elektroner spiller en stor rolle i forhold til farvestoffer. Mange organiske stoffer med farve indeholder et stort antal dobbeltbindinger, der ofte er konjugerede, hvilket betyder, at de adskilles af præcis én enkeltbinding. Konjugerede dobbeltbindinger resulterer i delokaliserede elektroner, på samme vis som det sås i benzen.

Et eksempel er β -caroten, der giver gulerødder deres farve. I strukturformlen herunder har vi markeret de konjugerede dobbeltbindinger med rød.

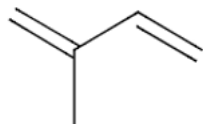


Figur 4: strukturen af β -caroten med angivelse af konjugerede dobbeltbindinger

En grov tommelfingerregel er, at et organisk stof er farvet, hvis det indeholder minimum 8 konjugerede dobbeltbindinger. I figur 4 kan I se, at β -caroten indeholder 11, og derfor er stoffet farvet.

En benzenring indeholder derimod kun 3 konjugerede dobbeltbindinger, se figur 1, og er derfor i sig selv farveløs. Men indgår den i et større molekyle, kan den bidrage med sine 3 konjugerede dobbeltbindinger til det samlede elektronregnskab.

β -caroten tilhører gruppen af farvestoffer, der samlet kaldes *carotenoider*. Carotenoiderne bygger man alle op af samme grund-byggesten, nemlig 2-methylbuta-1,3-dien (isopren)



Figur 5: 2-methylbuta-1,3-dien (isopren)

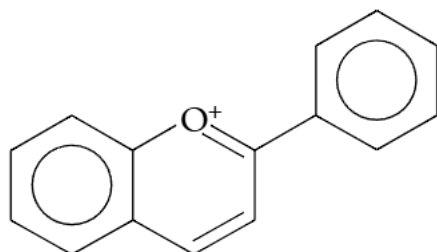
Opgave 2

- Argumenter for, at det systematiske navn for isopren er korrekt

Carotenoiderne har flere funktioner hos planter, blandt andet optager de - sammen med andre farvepigmenter - energi fra solen i planternes fotosyntese. Bladenes indhold af carotenoider ses om efteråret, når det grønne klorofyl nedbrydes, mens de gule, orange og røde carotenoider stadig er i bladene, mere herom senere.

En anden stor gruppe af farvestoffer hos planter er anthocyaniner. Det er blandt andet stoffer fra denne gruppe, der er med til at give jordbær, blommer, solbær, hindbær og brombær deres farve.

Grundstrukturen for anthocyaninerne ser således ud:



Figur 6: grundstrukturen af anthocyaniner

Det ses, at molekylet indeholder to aromatiske ringe. På grund af den specielle struktur i den midterste ring har denne også aromatisk karakter, og dermed kommer molekylet op på i alt 8 konjugerede dobbeltbindinger.

Ofte bindes der flere hydroxygrupper til de aromatiske ringe, hvilket gør stofferne mere opløselige vand.

Opgave 3

- Argumenter for, hvorfor tilføjelse af hydroxygrupper til strukturen vist i figur 6 gør molekylet mere opløseligt i vand.

Chromofore og auxochrome grupper

Ud over konjugerede dobbeltbindinger er chromofore grupper med til at give farve, da de indeholder et eller flere ledige elektronpar, der kan indgå i puljen af delokaliserede elektroner. Det betyder, at et molekyle godt kan være farvet, selvom det indeholder mindre end 8 konjugerede dobbeltbindinger, bare det så i stedet indeholder chromofore grupper

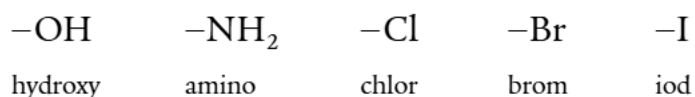
De chromofore grupper er



Figur 7: chromofore grupper

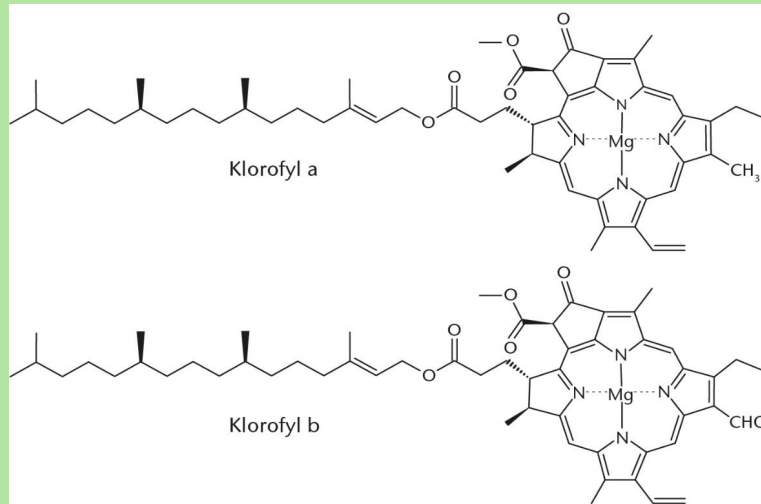
Endelig findes også farvemodificerende (auxochrome) grupper, der kan ændre farveintensiteten og farvetonen.

De auxochrome grupper er:



Figur 8: auxochrome grupper

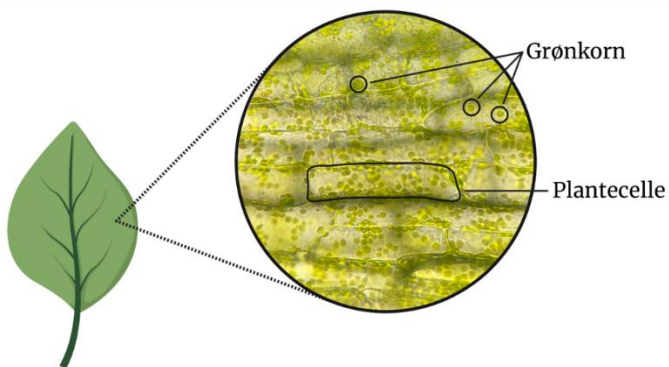
Forklar, hvorfor at de to molekyler er farvede



Fotosyntese og fotosyntesepigmenter

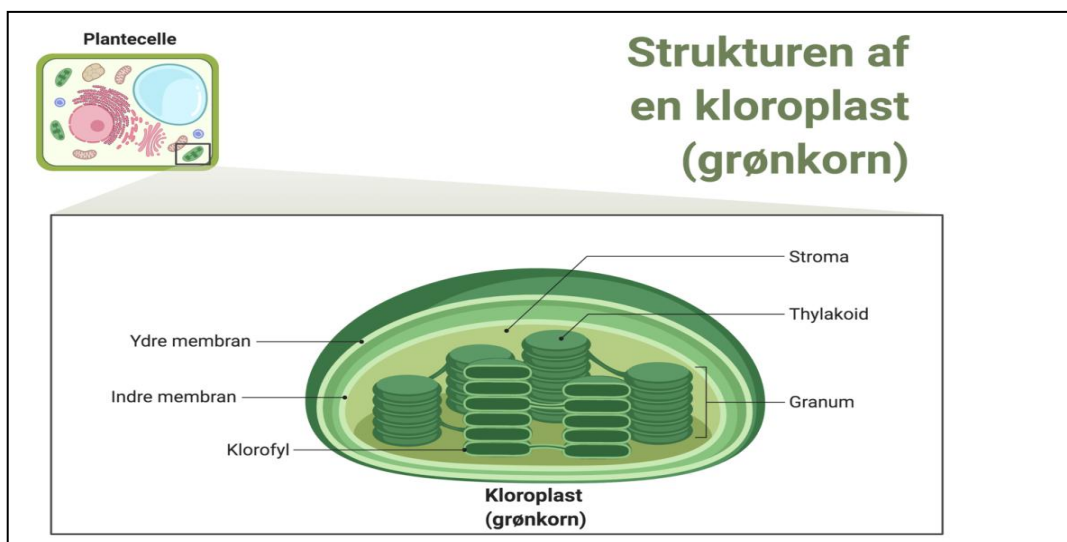
Farvepigmenternes funktion i planter er overordnet at absorbere energi fra solen.

Billedet herunder er et lysmikroskop-foto af vandpest (*Elodea Canadensis*). Man kan se, hvordan de rektangulære planteceller ligger systematisk organiseret, og derudover ses en masse små, runde grønne strukturer. Det er kloroplaster (grønkorn), og farven skyldes klorofylmolekylerne



Figur 9: Foto af blad fra vandpest taget gennem lysmikroskop. Man kan se de rektangulære planteceller med små, runde grønkorn i. Bladet er to cellelag tykt, og man kan se cellevæggene i begge lag. Figuren er fra [Grønkorn - Biotech Academy](#)

Figuren herunder (figur 10) zoomer ind på et af de små kloroplaster (grønkorn)



Figur 10: opbygningen af kloroplast. Figuren er fra [Grønkorn - Biotech Academy](#)

Figur 10 viser strukturen af kloroplasterne. Yderst ligger en dobbeltmembran, som omgiver og afgrænser stroma. Inde i stroma ligger mange membransække, kaldet thylakoider.

Thylakoiderne er organiseret i stakke, og en sådan stak kaldes et granum (flertal: grana).

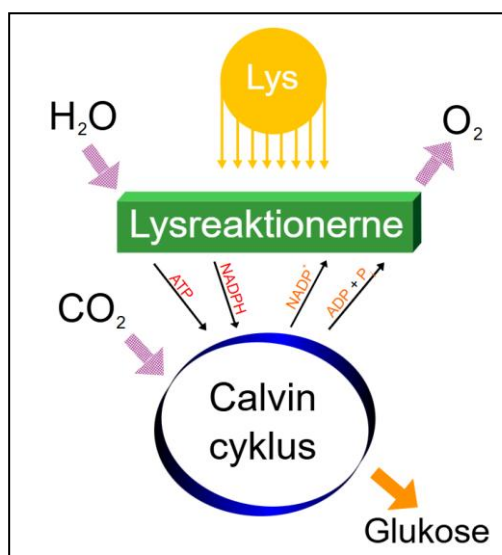
Fotosyntesen hos planter er opdelt i lysprocesser og mørkeprocesser. Lysprocesserne foregår i thylakoidmembranen, som ligesom andre membraner i og omkring celler hovedsageligt består af lipider/fedtstoffer.

Ud over lipider indeholder thylakoidmembranerne et stort antal enzymsystemer. I nogle af disse enzymsystemer, kaldet fotosystemer, placerer proteinerne farvepigmenterne.

Opgave

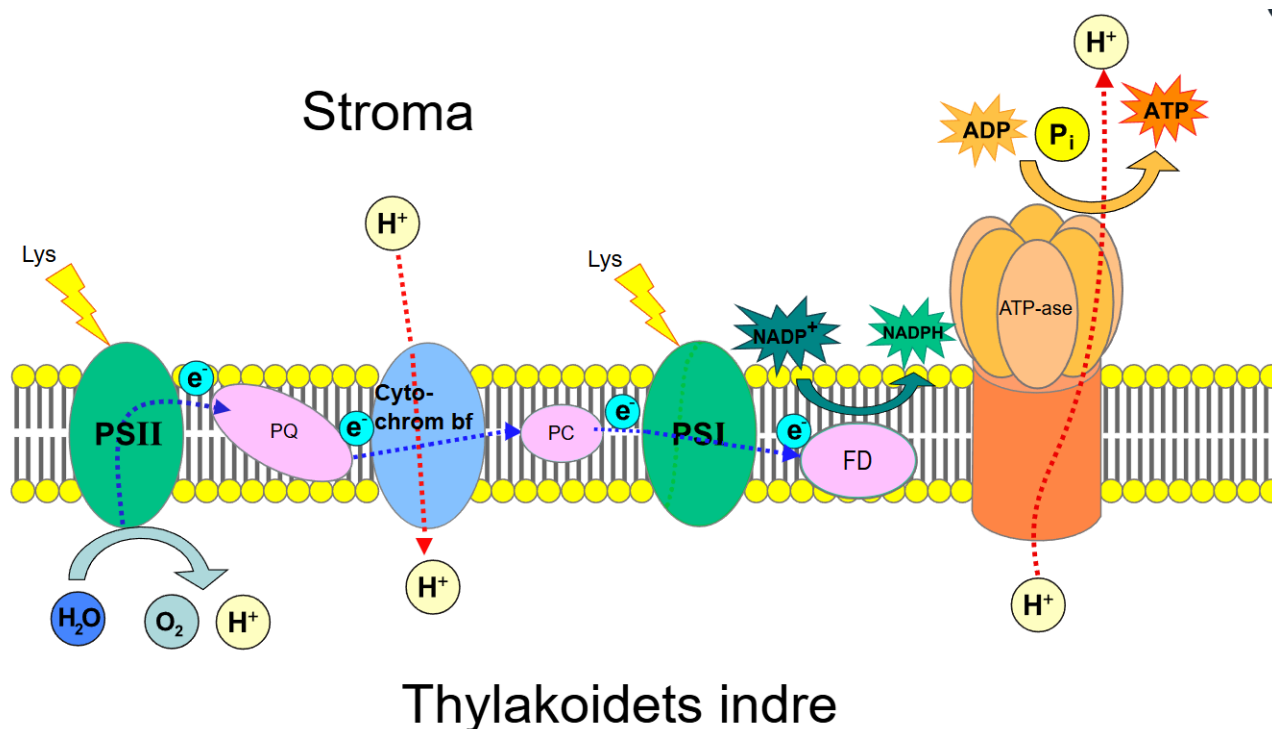
- Se igen på strukturen af klorofylmolekylerne, og argumentér for at dele af molekylerne kan indlejres i thylakoidmembranen.

I lysprocesserne omdanner planten lysenergi til kemisk bundet energi i form af ATP og NADPH, samtidig med at H_2O spaltes til O_2 . Planten bruger den kemisk bundne energi til at reducere CO_2 til glukose. Denne proces foregår i stroma og kaldes Calvins Cyklus. Navnet ”mørkeprocesser” skyldes, at reaktionerne her ikke kræver tilstedeværelse af lys (men de afhænger af lys, fordi produkterne fra lysreaktionerne er nødvendige for at mørkeprocesserne kan ske).



Figur 11: skematisk oversigt over fotosyntesen. Figuren er fra https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simple_photosynthesis_overview.svg

Flere forskellige enzymsystemer indgår i lysprocesserne, og figur 12 herunder illustrerer dette.



Figur 12: thylakoidmembranen. Figuren er fra https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thylakoid_membrane_3.svg

Når lys med en bestemt bølgelængde rammer pigmenterne i fotosystem 2 (PSII på figur 12), absorberer de energien – forstået på den måde, at en elektron rammes og slås ud af sin normale position. Elektronen bliver nu energirig. Hos langt de fleste ”almindelige” molekyler, der rammes af lys, sker det samme, men kort efter falder elektronen tilbage på plads, og energien tabes som varme.

I thylakoidmembranen sidder en elektronacceptor (plastoquinon, PQ) i nærheden, som overtager elektronen og reduceres. Herved opstår der en positiv ladning i den oprindelige pigmentstruktur, der har mistet en elektron, og en negativ ladning i den modtagende struktur, plastoquinon. Plastoquinon afleverer elektronen videre til en ny modtager, som igen leverer den videre osv. I alt indgår seks enzymsystemer/komplekser i processen, før elektronen til sidst overføres til NADP^+ , der under optag af H^+ reduceres til NADPH – et energirigt molekyle.

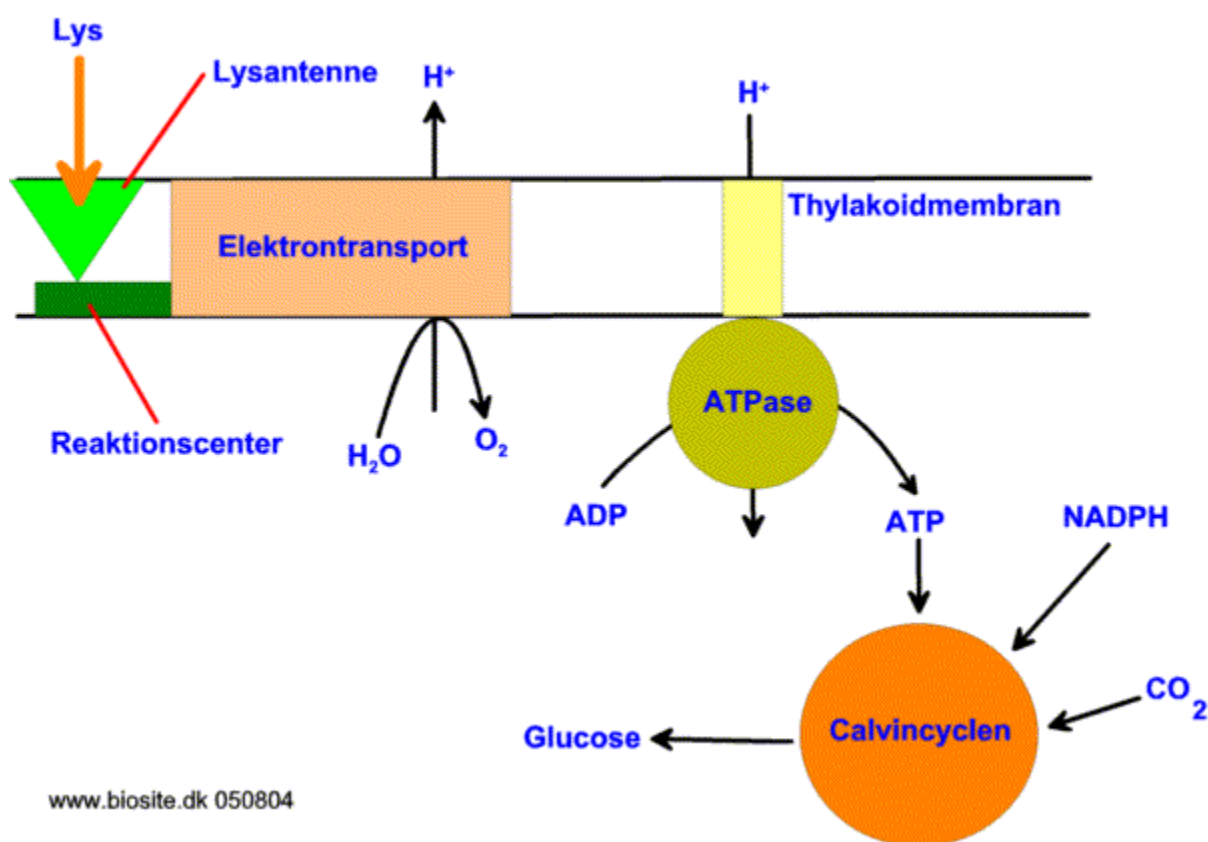
De elektroner, som i starten af processen blev slået ud af fotosystem 2, erstatter planten med elektroner fra H_2O . Vandet oxideres herved til O_2 og protoner/hydroner. Det er på dette trin, at ilt dannes i fotosyntesen.

Som det fremgår af figur 12, kan lys excitere elektroner både i fotosystem 2 (PSII) og fotosystem 1 (PSI).

Undervejs, mens elektronerne transporteres gennem kæden af enzymkomplekser, pumper systemet protoner/hydroner ind i thylakoidmatrix, hvilket skaber en koncentrationsforskel af protoner/hydroner inde i og uden for thylakoiderne. Koncentrationsforskellen får hydronerne til at søge ud igen, og de kan kun passere gennem ATP-syntase, der populært sagt minder om en svingdør. Når hydronerne løber igennem ATP-syntasen, drejer den rundt, og processen danner ATP ($\text{ADP} + \text{P} \rightarrow \text{ATP}$).

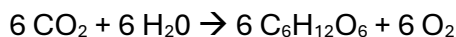
En skematisk oversigt over fotosyntesen ses i figur 13 herunder:

Fotosyntesen - skematisk oversigt



Figur 13: fotosyntesen, skematisk oversigt. Figuren er fra [Fotosyntese - omdannelsen af lysenergi til kemisk energi](#)

Det samlede reaktionsskema for fotosyntesen ender med at være

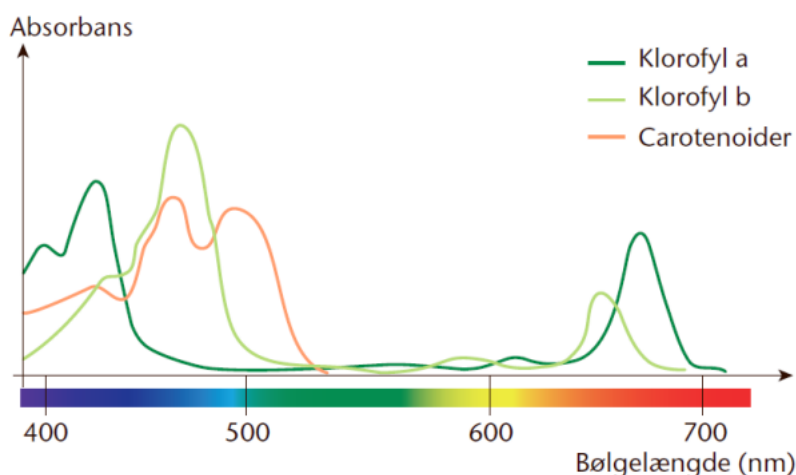


Processen kræver lys, og planten omdanner lysets energi til kemisk bundet energi.

På figur 14 herunder ses absorptionsspektret for klorofyl A, klorofyl B og carotenoiderne.

Det ses, at de tre typer pigmenter supplerer hinanden, således at lys med bølgelængderne 390-520 og 630-700 nm bliver absorberet. Jo mere lys planterne kan absorbere, jo mere glukose danner de.

I området 520-630 nm sker der ingen absorption. Lyset reflekteres i stedet, og da lyset med disse bølgelængder er grønt, reflekteres den grønne farve, så bladene fremstår grønne.

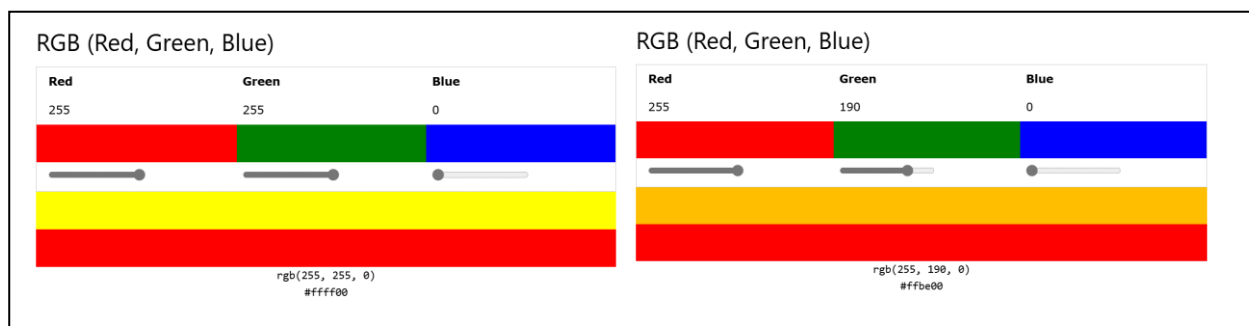


Figur 14: Absorptionsspektret for klorofyl a, klorofyl b og carotenoider

Planterne nedbryder og gendanner løbende klorofyl, men gendannelsen kræver solenergi. Om efteråret er solenergien for lav, og mængden af klorofyl i bladene bliver derfor meget mindre. Planterne trækker byggestenene til klorofylmolekylerne ind fra bladene og gemmer dem i knopperne til næste års blade. Carotenoiderne forbliver derimod i bladene.

Om efteråret absorberer kun carotenoiderne lys. Ser man på absorptionsspektret, viser det, at der nu ikke længere sker absorption i det orange/røde område. Orange/rødt lys reflekteres derfor ligesom det grønne lys, og det er grunden til, at efterårsløv får de karakteristiske gyldne farver.

Figur 15 på illustrerer dette. For mere om lys og farver henvises til fysikforløbet.



Figur 15: farver. På hjemmesiden [HTML Color Picker](#) kan man lege med forskellige farver. På figuren til venstre reflekteres alt det røde og grønne lys, mens det blå absorberes. Det resulterer i en gul farve (den øverste bjælke). På figuren til højre reflekteres alt det røde lys stadig, men hvis bare en smule af det grønne lys absorberes, bliver den resulterende farve mere orange.

Opgave

Klorofyl nedbrydes om efteråret, så der kun er carotenoider tilbage i bladene.

- Sammenhold absorptionsspektret for carotenoiderne (figur 14) med de to skærbilleder (figur 15), og forklar hvorfor bladene om efteråret får forskellige nuancer af gule og orange farver.

Ekstraktion

Opgave

Når du brygger te, ekstraherer du forskellige stoffer fra tebladene, f.eks. smagsstoffer og farve.

- Diskutér hvilke faktorer der påvirker, hvor meget der ekstraheres, og forklar hvorfor.
- Hvis der ekstraheres for lidt, kalder vi det "tynd te". Hvis der ekstraheres for meget, kalder vi det "stærk te".
- Udtrykket "stærk te" er misvisende. Hvad burde vi i stedet kalde det?

Hvis man vil ekstrahere klorofyl og/eller andre farvepigmenter fra blade, skal man være opmærksom på følgende:

- Farvepigmenterne ligger, som tidligere nævnt, indlejret i thylakoidmembranerne. Derfor skal man ødelægge plantecellerne, så pigmenterne kan frigives.
- For at trække pigmenterne ud skal man bruge en væske med samme polaritet som pigmenterne, ellers kan de ikke blandes med væsken.

Flere forskellige faktorer påvirker, hvor meget pigment man ekstraherer. Eksempler er:

- Mængden af nåle/blade
- Hvor effektivt plantecellerne ødelægges
- Trækketiden
- Hvor godt pigmenterne kan blandes med opløsningsmidlet
- Temperaturen
- Omrøring

Opgave

Var det de samme faktorer, som I selv havde tænkt på i opgaven om te?

- Hvis ikke, så diskuter hvordan hver af de nye faktorer påvirker mængden af klorofyl, der ekstraheres.
- Kan I finde andre faktorer?

Spektrofotometri, absorbans og Lambert Beers lov

Det ekstraherede klorofyl testes med et spektrofotometer.

I et spektrofotometer sender man planpolariseret lys gennem den farvede opløsning, og apparatet registrerer, hvor meget af lyset der passerer ud på den anden side – og dermed hvor meget af lyset opløsningen absorberer.

Først nulstiller man spektrofotometret med det rene opløsningsmiddel, og intensiteten af det lys, der passerer hele vejen gennem opløsningsmidlet, sættes til I_0 . Derefter udskifter man opløsningsmidlet med den farvede opløsning, og intensiteten af det lys, der passerer igennem, måles. Denne intensitet kaldes I .

Absorbansen af opløsningen defineres ved: $A = \log I_0/I$

Jo mere farvet en opløsning er (med andre ord: jo mere koncentreret den er), desto mindre bliver I , og desto større bliver absorbansen.

Opgave

- Lav en model af, hvad der sker i spektrofotometret. Brug modellen til at illustrere, hvordan absorbansen afhænger af koncentrationen af det farvede stof, der måles.

Man kan variere bølgelængden på det lys, der sendes gennem opløsningen, og dermed få et spektrum, der viser absorbansen ved forskellige bølgelængder. På den måde er absorptionsspektret for klorofylmolekylerne og carotenoiderne (figur 14) blevet fremstillet.

Man kan også vælge at arbejde ved én bestemt bølgelængde. I så fald skal det være en bølgelængde, hvor det farvede molekyle absorberer. For klorofyl a giver det mening at arbejde ved bølgelængderne 390–450 nm, og for klorofyl b ved 420–500 nm.

Jo flere farvede molekyler væsken indeholder, desto mere lys absorberer de.

Der gælder følgende matematiske sammenhæng, kaldet Lambert Beers lov:

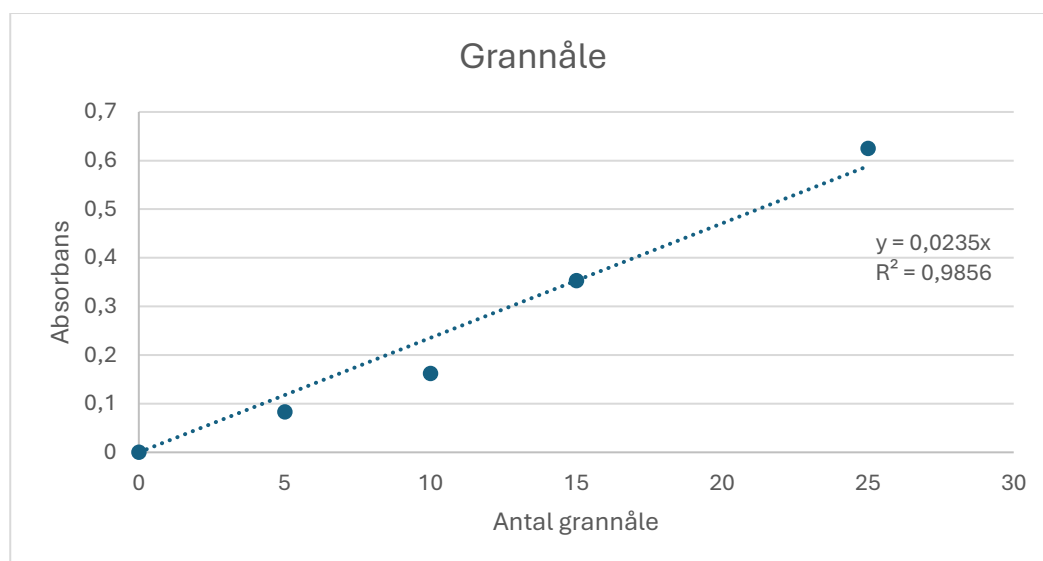
$$Abs = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$$

Hvor:

- ϵ_{λ} er ekstensionskoefficienten (en stofkonstant)
- l er kuvettebredden (1 cm)
- c er koncentrationen.

Absorbansen afhænger dermed lineært af koncentrationen. Grafisk afbildes absorbansen som funktion af koncentrationen, og da både ϵ_{λ} og l er konstante, kan produktet $\epsilon_{\lambda} \times l$ aflæses som hældningskoefficienten.

I denne øvelse kender vi ikke koncentrationerne af klorofyl. Men da vi forventer, at den faktor, der varierer, vil resultere i variation af klorofylkoncentrationerne, kan vi sætte den undersøgte faktor ud af x-aksen. Et eksempel:



Figur 16: Absorbansen som funktion af antal grannåle

Figur 16 viser en tydelig lineær sammenhæng: Jo flere grannåle man ekstraherer på, desto større bliver absorbansen. $\epsilon\lambda \times l = 0,0235$, og da $l = 1$ cm, gælder det, at $\epsilon\lambda = 0,0235$.

Opgave

- Argumenter for, at antal grannåle, der ekstraheres på, kan bruges som et udtryk for klorofylkoncentrationen

Grafen i figur 16 kaldes en standardkurve. Når man har lavet en standardkurve ud fra absorbansmålinger på kendte opløsninger, kan man bestemme koncentrationen (i dette eksempel: antal grannåle) i en ukendt prøve ved at måle prøvens absorbans og indsætte værdien i funktionsforskriften.

Eksperimentelt

Formål

Formålet med øvelsen er at ekstrahere klorofyl (og andre farvepigmenter) fra grannåle eller blade og teste, om en selvvalgt faktor påvirker den mængde, der ekstraheres.

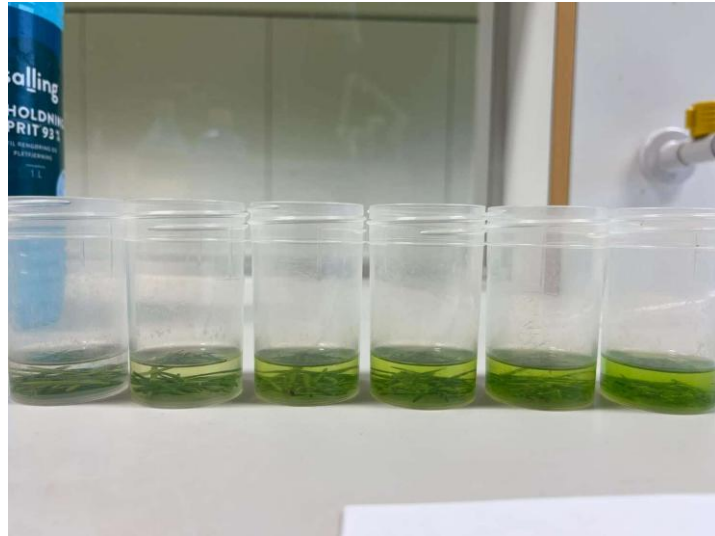
Materialer

- **Prøveglas:** Med rødt låg
- **Teskeer:** Til håndtering af materiale
- **Spektrofotometer:** Fælles
- **Kolorimeter:** Til sammenlignende målinger
- **Kuvetter:** Til måling
- **Engangspipetter:** Til præcis dosering
- **Pincet:** Til håndtering af nåle/blade
- **Grannåle/blade:** Prøvemateriale
- **Husholdningssprit:** Ethanol som ekstraktionsmiddel

Overvej

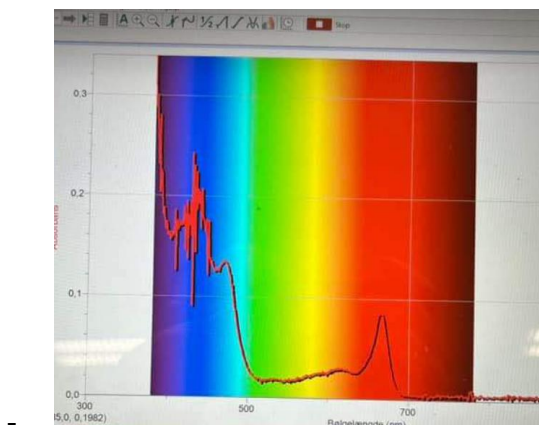
- **Ekstraktion:** I ekstraherer klorofyl fra grannåle/blade. Klorofyl sidder indlejret i thylakoidmembranen, så cellevægge, cellemembran mv. skal destrueres, før klorofyl kan ekstraheres. Som ekstraktionsmiddel bruges husholdningssprit.
- **Faktorer:** Diskutér i grupper, hvilke faktorer der påvirker, hvor meget klorofyl der ekstraheres.
- **Valg af faktor:** Vælg én faktor, I vil variere. Ikke alle faktorer kan lade sig gøre i felten.
- **Kontrol:** Hold alle andre faktorer konstante. Hvorfor er det vigtigt?
- **Variable:** Identificér mulige variable. Hvad skal I være opmærksomme på for at sikre, at alle faktorer holdes konstante?

Udfyld jeres overvejelser samt kolonne 2 i tabellen på side 20.



Fremgangsmåde

- Indsaml nåle eller blade.
- Læg det ønskede antal i seks forskellige prøveglas.
- Kvas/mos nålene i det første prøveglas i to minutter med en teske (medmindre kvasetiden er jeres variabel; i så fald kvaser I i henhold til jeres tabel).
- Hæld husholdningssprit over (det er vigtigt, at I bruger samme volumen hver gang, medmindre volumenet er den faktor, I vil variere).
- Lad det trække i to minutter (medmindre trækketiden er jeres variabel; i så fald lader I det trække i henhold til jeres tabel).
- Fisk nålene/bladene op med en pincet, og skru låg på glasset.
- Gentag proceduren med glas 2 i henhold til jeres tabel.
- Gentag proceduren med glas 3 i henhold til jeres tabel.
- Gentag proceduren med glas 4 i henhold til jeres tabel.
- Gentag proceduren med glas 5 i henhold til jeres tabel. ?
- Kalibrér spektrofotometret med husholdningssprit, da det er jeres opløsningsmiddel.
- Fyld ca. 3 mL af den første opløsning i en tom kuvette.
- Kør et bølglængdescan for at få absorptionsspektret.
- Vælg den bølglængde, I vil arbejde videre med.
- Tag et billede af skærmen.



- Indstil kolorimetret til den ønskede bølgelængde.
- Kalibrér kolorimetret med en kuvette fyldt med husholdningssprit.
- Sæt kuvetten med den første opløsning i og aflæs absorbansen. Notér værdien i tabellen.
- Hæld opløsningen tilbage i sit prøveglas, og overfør ca. 3 mL af den næste opløsning til kuvetten.
- Mål absorbansen og fortsæt på samme måde med de resterende opløsninger.



Overvejelser og resultater

- **Faktor, der varierer:** (skriv hvilken faktor I vælger at variere, fx trækketid, volumen eller temperatur)
- **Faktorer, der skal holdes konstante:** (skriv hvilke faktorer I holder konstante, fx mængde blade, type opløsningsmiddel, omrøring, kuvettebredde)
- **Materiale til ekstraktion:** (skriv om I ekstraherer klorofyl fra grannåle eller blade)
- **Volumen af ethanol (husholdningssprit):** (skriv hvor meget ethanol I bruger. Husk at bruge samme volumen hver gang. Volumen skal være stort nok til at dække alle grønne plantedele, men ikke så stort, at klorofylkoncentrationen bliver for lille)
- **Hypotese (med kort teoretisk begrundelse):** (skriv jeres forventning til resultatet og begrund kort med teori, fx: "Vi forventer, at længere trækketid giver højere absorbans, fordi flere pigmenter når at blive opløst i opløsningsmidlet.")

Glas	Variabel (antal nåle, kvasetid, trækketid, andet?)	Absorbans
1		
2		
3		
4		
5		
6		

Databehandling og diskussion

- Tegn en graf, der viser absorbansen som funktion af den valgte variabel. Undersøg, om resultaterne stemmer overens med Lambert-Beers lov – er der en lineær sammenhæng mellem variablen og absorbansen?
- Diskutér mulige fejlkilder og usikkerheder ved forsøget. Hvad kan påvirke resultaterne, og hvordan kunne forsøget optimeres?
- Forestil jer, at I får en ukendt grøn opløsning, som er fremstillet på præcis samme måde som jeres egne opløsninger. Absorbansen af opløsningen er målt til 0,576. Hvad kan I beregne ud fra disse oplysninger?
- I dette forsøg har I arbejdet med klorofyl. Diskutér, hvad standardkurver og absorbansmålinger ellers kan bruges til.