



KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ROSTLIN

**Teoretický úvod:**

# ROSTLINNÁ BARVIVA

**PLASTIDOVÁ • VAKUOLÁRNÍ**



Praktikum fyziologie rostlin

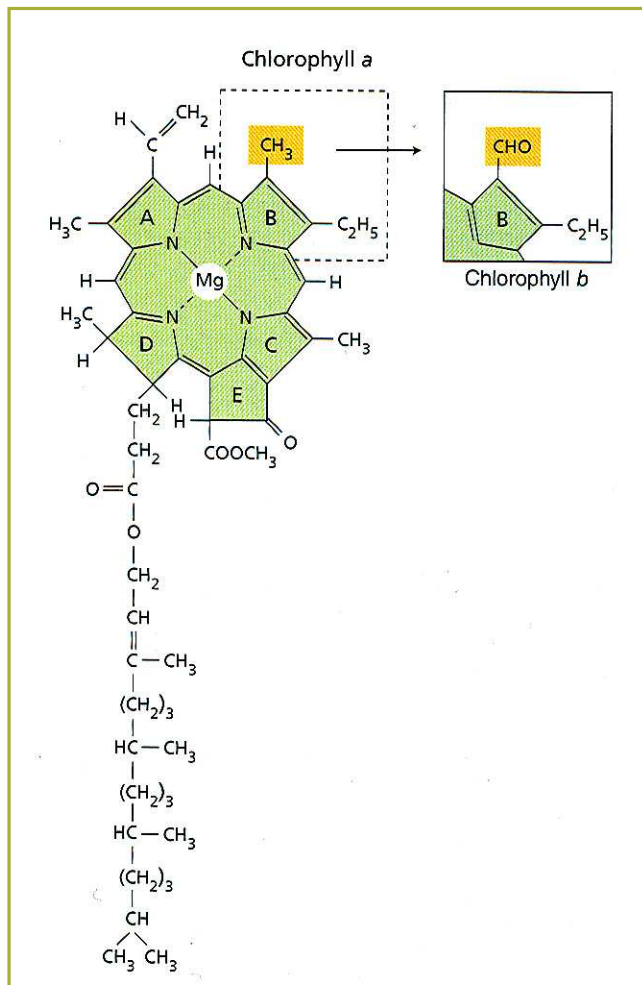
# ROSTLINNÁ BARVIVA

Rostliny obsahují mnoho různých **látek schopných absorbovat záření** ve viditelné oblasti spektra elektromagnetické sluneční radiace. Souborně se tyto látky označují jako **barviva** či **pigmenty**, protože působí zbarvení rostlin. Chemicky i funkčně jsou barviva velmi různorodá. Jejich společným a charakteristickým rysem je větší počet **konjugovaných dvojných vazeb** v molekule. Chemicky tyto látky patří nejčastěji do skupiny **cyklických nebo lineárních tetrapyrólů, karotenoidů a flavonoidů**, často se vážou s proteiny, s cukry nebo s ionty kovů.

Dle lokalizace v buňce se barviva dělí na **plastidová a vakuolární**.

## 1. Plastidová barviva

se nacházejí v plastidech, v nichž se také syntetizují. Charakter těchto barviv je **lipoidní** (lipochromy). Extrahují se nepolárními organickými rozpouštědly (acetonem, alkoholy, éterem). Chemicky patří mezi **cyklické tetrapyroly** (obr.1a) a **karotenoidy** (obr.1b).

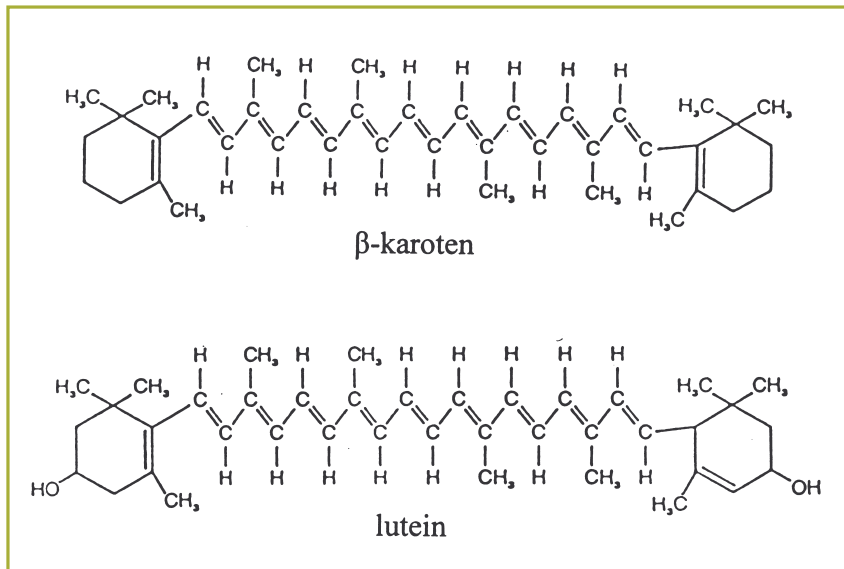


### **Obr.1a** Cyklické tetrapyroly

Látky s **porfyrinovým skeletem** - absorbují především záření v oblasti fialové, modré a červené, odrážejí a propouštějí světlo zelené a jako zelené se tedy jeví. U vyšších rostlin se vyskytují **chlorofyly a, b**. (Převzato z Taiz a Zeiger 2002).

### **1.1. Fotosyntetická funkce chlorofylů a karotenoidů**

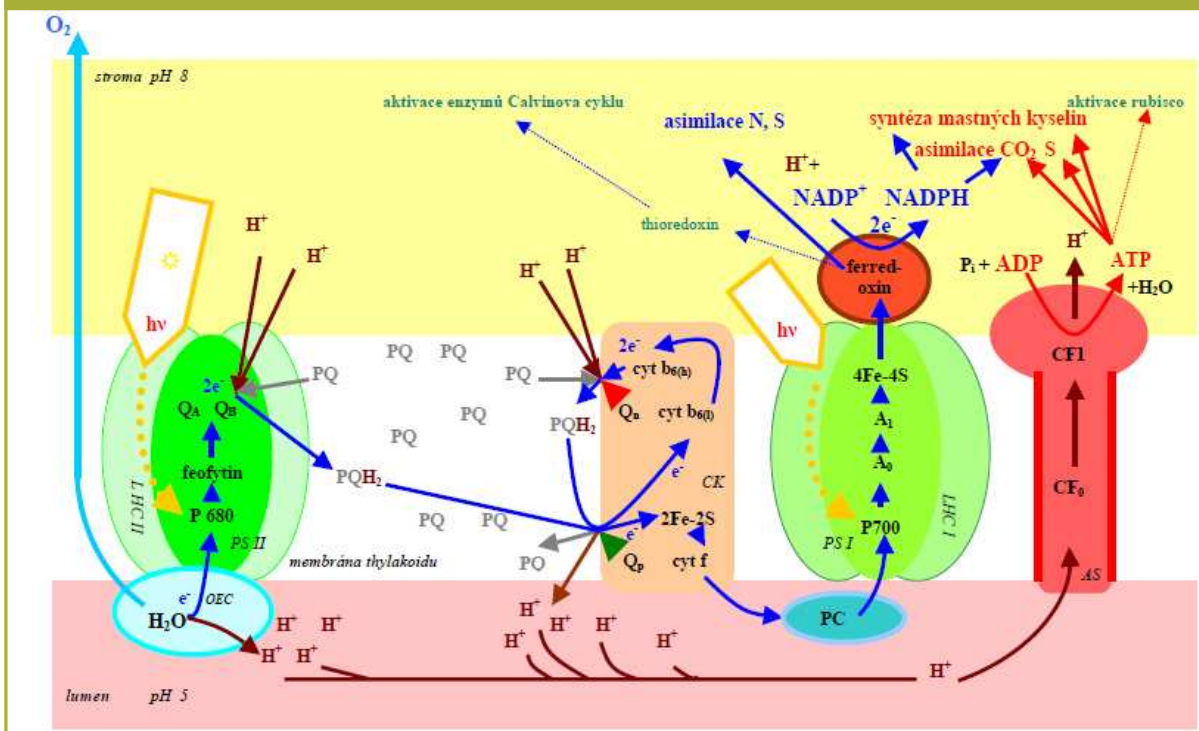
Chlorofyly a, b,  $\beta$ -karoten a xantofyly jsou absorpční složkou světlosběrných (anténních) komplexů (LHC II a I, z angl. *light harvesting complex*), chlorofyl a je absorpční složkou v reakčních centrech fotosystému I i II. **Feofytin**, cyklický tetrapyrrol, který nemá centrální atom Mg (Mg je nahrazen dvěma atomy H), se podílí na přenosu elektronu z chlorofylu a na chinony v reakčním centru fotosystému II (**obr. 2 a box 1**).



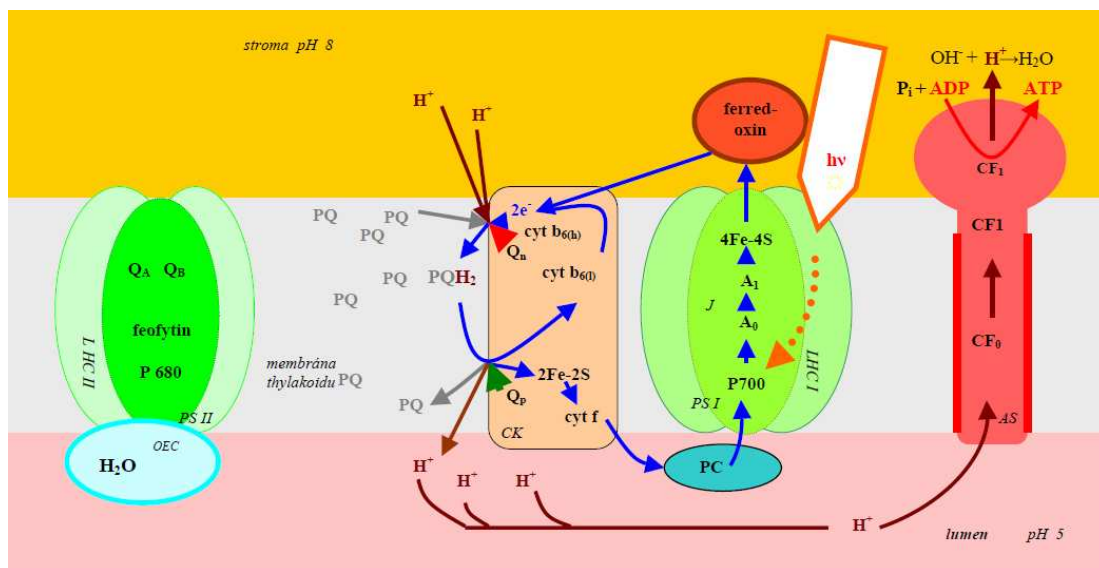
### Obr.1b Karotenoidy

Absorbují v modré a fialové oblasti spektra, odrážejí a propouštějí světlo zelené, žluté, oranžové a červené, jeví se jako žluté až oranžové. Jsou v chromoplastech květů a plodů, v chloroplastech a etioplastech. Nejčastěji se vyskytují  **$\beta$ -karotén** a xantofyly.

### Obr. 2 Zapojení plastidových barviv v přenosu elektronů v primární fázi fotosyntézy (popis procesu viz. Box 1)



**Necyklický přenos elektronu fotosyntetickým aparátem v primární fázi fotosyntézy**

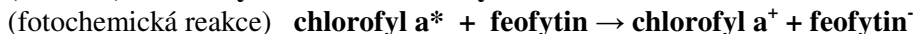
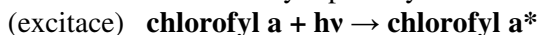


### Cyklický přenos elektronu fotosyntetickým aparátem v primární fázi fotosyntézy

LHC II, I - světlosběrné komplexy (z angl. *light harvesting complex*). *hv* - foton. P 680 - chlorofyl a v reakčním centru fotosystému II, P 700 – chlorofyl a v reakčním centru fotosystému I. OEC - komplex rozkládající vodu a uvolňující kyslík (z angl. *oxygen evolving complex*).  $Q_A$ ,  $Q_B$  - chinony vázané na proteiny reakčního centra fotosystému II. PQ - plastochinon (oxidovaná forma),  $PQH_2$  - plastochinon (redukováná forma). cyt  $b_6$ , cyt f - cytochromy  $b_6$ , f.  $Q_p$  - vazebné místo pro redukovaný plastochinon,  $Q_n$  - vazebné místo pro oxidovaný plastochinon, PC - plastocyanin.  $A_0$ ,  $A_1$  – proteiny reakčního centra fotosystému I. Fe-S - proteiny obsahující železo a síru v cytochromovém komplexu (Rieskeho protein) a ve fotosystému I.  $CF_0$ ,  $CF_1$  - peptidové složky ATP-syntázy.

### **Box 1. Děje primární fáze fotosyntézy** (podle Pavlová 2006, Fyziologie rostlin)

Energie fotonu (*hv*) absorbovaná fotosyntetickými pigmenty fotosystému II (*PS II*) je přenesena do reakčního centra II, předána jedné molekule chlorofylu a (P680) ze specifického páru a způsobí její excitaci – vzniká chlorofyl  $a^*$ . Absorpcí energie se výrazně změní redoxní potenciál molekuly chlorofylu a (stane se negativním, obvykle udávaná změna je z +1,1V na – 0,6V). V excitovaném stavu je jeden elektron na vnějším orbitalu vázán slabě a přejde na molekulu feofytinu, která má k elektronu vyšší afinitu než excitovaná molekula chlorofylu a (chlorofyl  $a^*$ ). Dojde k separaci (oddělení) náboje, tj. k předání elektronu z molekuly chlorofylu a (donoru) na molekulu feofytinu (akceptor). Molekula chlorofylu a se oxiduje na chlorofyl  $a^+$ , molekula feofytinu se redukuje na feofytin. V těchto reakcích se energie elektromagnetického záření mění na fotochemickou, dojde k uvolnění elektronu a energie se dále mění na energii chemických oxidačně redukčních reakcí. Tyto procesy lze schematicky znázornit následovně:



Tím je zahájena řada chemických reakcí redukčně-oxidačního charakteru.

Z feofytinu je elektron předán na molekulu plastochinonu  $Q_A$ , vázanou na protein D2, jejíž redoxní potenciál je kladnější (méně záporný) než u feofytinu.  $Q_A$  se redukuje na  $Q_A^-$ . Charakter interakce  $Q_A$  s proteinem D2 umožňuje přenos pouze jednoho elektronu. Elektron je transportován dále na  $Q_B$  (vázaný na D1), vzniká redukovaný semichinon  $Q_B^-$ .  $Q_A$  přijímá od feofytinu další elektron, uvolněný z chlorofylu a, transportuje ho na  $Q_B^-$  a vzniká  $Q_B^{2-}$ . K plné redukci plastochinonu jsou třeba nejen dva elektrony ale také 2 protony ( $2H^+$ ), které  $Q_B^{2-}$  přijme ze strany stromatu, čímž se mění na  $PQH_2$  (plastochinol). V redukováné formě je plastochinon vázán na D1 jen slabě, z vazebného místa se uvolní do membrány. Vazebné místo na D1 se obsadí jednou z molekul PQ, které v nadbytku volně difundují membránou thylakoidu. PQ má k vazebnému místu silnou afinitu a molekulu  $PQH_2$  vytěsňuje.



PQH<sub>2</sub> putuje membránou thylakoidu k **cytochromovému komplexu b<sub>6</sub>f (CK)** a váže se na místo **Q<sub>p</sub>**. Jeden elektron přechází na **Rieskeho protein**, dále na **cytochrom f** a pohyblivý přenašeč **plastocyanin (PC)** lokalizovaný v lumenu. Druhý elektron redukuje **cytochrom b<sub>1</sub>** (z angl. *low potential*) a dále přechází na **cytochrom b<sub>h</sub>** (z angl. *high potential*). Rieskeho protein i cytochromy přijímají pouze po 1e<sup>-</sup> a 2H<sup>+</sup>, které plastochinon přijal ze stromatu při redukci na D1 se uvolní do lumenu. Elektron, který byl přenesen na cytochrom b<sub>h</sub> redukuje molekulu PQ, která se navázala na vazebné místo **Q<sub>n</sub>**. Vzniká semichinon PQ<sup>-</sup>, elektron z dalšího PQH<sub>2</sub> redukuje semichinon na PQ<sup>2-</sup>. Dva potřebné protony PQ<sup>2-</sup> přijme plastochinon ze stromatu a vzniká PQH<sub>2</sub>. Tato molekula se uvolní a vazebné místo Q<sub>n</sub> obsadí jiná molekula PQ. Uvolněná molekula plně redukovaného plastochinonu PQH<sub>2</sub> se naváže na vazebné místo Q<sub>p</sub> a celý proces se opakuje, protony jsou opět uvolněny do lumenu. Tak každý elektron, který byl z PQH<sub>2</sub> předán cytochromu b<sub>1</sub>, přeneše ze stromatu do lumenu ještě jeden H<sup>+</sup>. Tato cesta elektronu přes cytochromy b na PQ vázaný v Q<sub>n</sub> a přemístění PQH<sub>2</sub> na vazebné místo Q<sub>p</sub> se nazývá cyklus Q (Q cyklus).

Plastocyanin je donorem elektronu pro **fotosystém I** a zprostředkovává přenos elektronu z cytochromového komplexu na PS I. Podobně jako ve fotosystému II, energie absorbovaná pigmenty v LHCI je přenesena do reakčního centra fotosystému I, způsobí excitaci jedné molekuly chlorofylu a ze specifického páru (P700). Uvolní se elektron, který přejde na první akceptor v RCI – akceptorovou molekulu chlorofylu a, značenou A<sub>0</sub>. Oxidovaná molekula chlorofylu a přijme elektron z plastocyaninu a vrátí se do základního stavu. Redukovaný **akceptorový chlorofyl a A<sub>0</sub><sup>-</sup>** předá elektron dalšímu přenašeči v RCI – **akceptoru A<sub>1</sub>** (fylochinon, vitamin K1).

Řetěz oxidoredukčních reakcí v RC I pokračuje přenesením elektronu na protein se strukturou **Fe-S**. Při tomto transportu se elektron v membráně přesune z oblasti bližší lumenu do oblasti přiléhající ke stromatu. Z centra Fe-S přejde elektron na molekulu **ferredoxinu**, která se v redukovaném stavu uvolní do stromatu.

Redukovaný ferredoxin je silné redukční agens, které ve stromatu redukuje řadu dalších látek. Jednou z nejdůležitějších je NADP<sup>+</sup>, redukcí vzniká **NADPH + H<sup>+</sup>**. Reakce je katalyzována ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductázou (NFR). Pro redukci NADP<sup>+</sup> je třeba dvou elektronů. Redukovaný kofaktor NADPH hraje nesmírně důležitou roli v **sekundární fázi fotosyntézy**, zprostředkuje uložení energie do relativně stálých chemických vazeb **sacharidů** a **mastných kyselin**. Vzniká pouze při necycleckém přenosu elektronu.

Redukovaný **ferredoxin** poskytuje elektrony také pro **redukci nitritového aniontu (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)** na kation amonný a pro **redukci iontu síranového (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)**. Dalším reakčním partnerem redukovaného ferredoxinu je **thioredoxin**, který hraje důležitou roli v **aktivaci enzymů Calvinova cyklu** a inaktivuje en-

zym, který katalyzuje úvodní reakci **cyklu pentózového**. Také tyto procesy jsou spojeny pouze s necycleckým přenosem elektronu.

Při necycleckém přenosu elektronu stejně jako při cyklickém přenosu elektronu plastochinon přenáší protony ze strany stromatu do lumenu. Oxidovaná molekula chlorofylu a (P 680) v RC II doplňuje elektron z vody, k jejímuž rozkladu dochází v proteinovém komplexu (OEC). Tento komplex je asociován s RCI<sub>II</sub> na straně lumenu. Při rozkladu vody zůstávají protony také v lumenu. Protože membrána thylakoidu je pro protony nepropustná, vzniká při rozkladu vody a přenosem protonů plastochinonem **rozdíl v koncentraci protonů na opačných stranách membrány thylakoidu, tzv. protonový gradient**. Rozdíl v koncentraci protonů znamená také rozdíl v pH (ΔpH). Na světle je pH stromatu kolem 8, v lumenu až 5.

Proton nese kladný náboj, vzniká tedy i rozdíl náboje (Δψ). Snaha po vyrovnání rozdílů koncentrací H<sup>+</sup> a rozdílů pH působí potenciální **protonmotorickou sílu, pmf (Δμ<sub>H+</sub>)**, která je využita k **syntéze ATP z ADP a anorganického fosfátu (Pi)**.

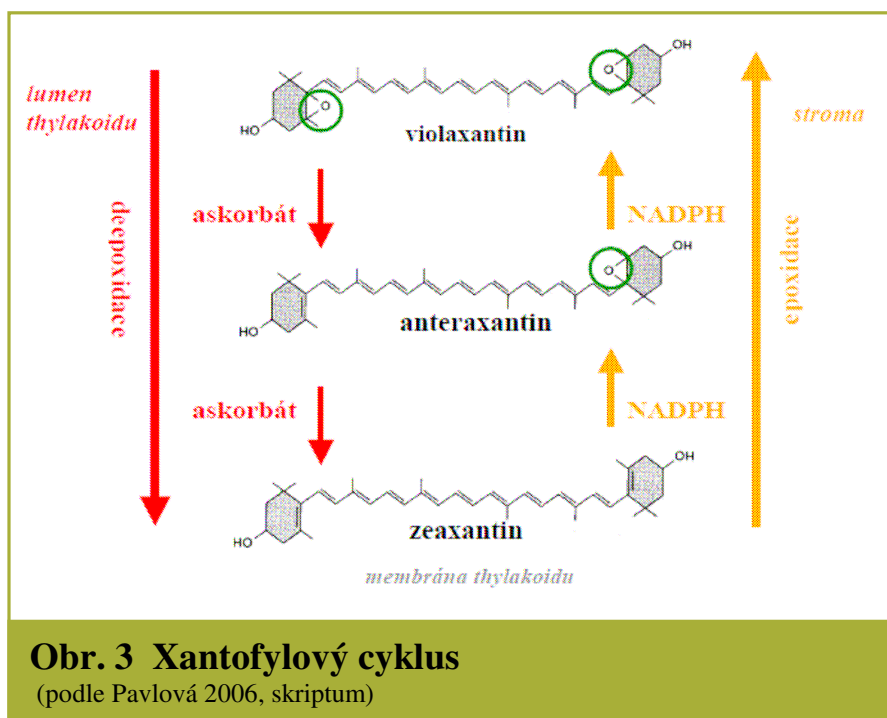
$$\text{pmf} = \Delta\mu_{\text{H}^+} = \Delta\text{pH} + \Delta\psi \quad \text{J} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Syntéza ATP z ADP a anorganického fosfátu (Pi) v chloroplastech se nazývá **foto-fosforylace** a je katalyzována chloroplastovou ATP-syntázou (AS).

## 1.2. Ochranná funkce karotenoidů

Molekuly karotenoidů vázané na vnitřní obalovou membránu chloroplastu a na membrány thylakoidů chrání fotosyntetický aparát před poškozením (např. fotooxidací) v situaci, kdy jsou hladiny ozáření tak vysoké, že absorbovaná energie nemůže být pro nedostatečnou funkční kapacitu fotosyntetického aparátu využita k tvorbě ATP a redukovaných forem redukčních agens (feredoxinu a NADPH). V těchto situacích probíhá deepoxidace violaxantinu na anteraxantin a zeaxantin - **xantofylový cyklus** (obr. 3). Tato ochrana je obzvláště důležitá v období deetiolace.

Při vysoké ozáření se výrazně zvyšuje hladina zeaxantinu, který má schopnost uvolňovat (disipovat) absorbovanou energii ve formě tepla. Zeaxantin vzniká z violaxantinu, který se nejprve deepoxiduje na anteraxantin, další deepoxidací se tvoří

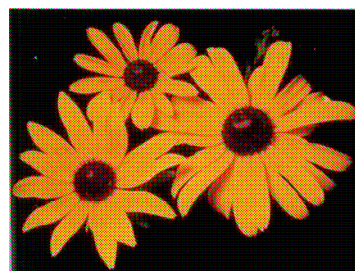


**zeaxantin.** Deepoxidace probíhá na lumenální straně membrány thylakoidu, reakce jsou katalyzovány deepoxidázami. Deepoxidázy jsou za neutrálního pH ve tmě v lumenu mobilní, na světle pH klesá, enzymy jsou aktivovány vysokou koncentrací protonů, připojují se k membráně thylakoidu a získávají přístup k substrátu. Kyslík, který se při deepoxydaci uvolňuje, tvoří vodu. Donorem vodíku je **kyselina askorbová**. Ve tmě nebo po snížení ozáření na vyhovující úroveň se hladina zeaxantinu snižuje. Epoxidací reakce, které vedou ke vzniku violaxantinu, probíhají na stromatální straně membrány thylakoidu, jsou katalyzovány jinými enzymy, kofaktorem reakce je **NADPH**.

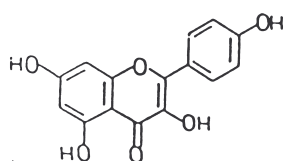
## 2. Vakuolární barviva - hydrochromy

Jsou syntetizována v cytoplasmě a lokalizována ve vakuolách. Jsou to barviva květů a plodů, jsou však obsažena i ve stoncích a listech. Vyskytují se především v povrchových vrstvách pletiv. Chemicky se jedná o **flavonoidy - antokyany, flavonoly a flavony** (obr.4). Antokyany jsou červené a modré, flavony a flavonoly jsou bělavé, žluté nebo nažloutlé. Flavonoidy absorbují především **ultrafialové záření**, některé z nich absorbují i záření ve viditelné oblasti spektra (antokyany). Jejich funkce spočívá v **ochraně před UV-zářením**. Současné hrají určitou roli i v sexuální reprodukční strategii (činí květy nápadnými a lákají hmyzí opylovače – viz. obr.5).

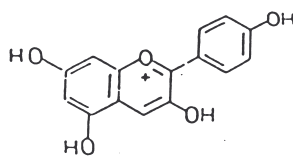
Tvorba antokyanů je ovlivňována více faktory, např. světlem a je zvýšena při deficienci N, P a S a jiných stresových stavech.



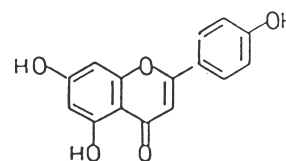
**Obr. 5** Květ *Rudbeckia* z pohledu člověka a včely.  
(Převzato z Taiz a Zeiger Plant Physiology. 2002.)



flavonol



anthokyanidin



flavon

**Obr. 4** Flavonoidy

### Literatura:

Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. (Eds.) - **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologist. 2000.

Pavlová L. **Fyziologie rostlin** (skriptum). Karolinum. 2006.

Taiz, L. and Zeiger, E. **Plant Physiology**. Sinauer Associates, Inc., Publishers. 2002.



Zadání praktických úloh k tématu:

# ROSTLINNÁ BARVIVA

## Přehled úloh k vypracování:

### Úkol 1: Plastidová barviva

- 1a) Extrahujte plastidová barviva z listů břečťanu
- 1b) Ověřte schopnost extrahovaných pigmentů absorbovat světlo, uvolňovat elektron, předávat ho akceptoru a přijímat elektron od donoru.

### Úkol 2: Vakuolární barviva

- 2a) V připraveném extraktu rozdělte flavonoidy papírovou chromatografií a s pomocí přiložené tabulky je zkuste zařadit do některé ze základních typů flavonoidů.



## Úkol č. 1: Plastidová barviva

### Cíl:

*Demonstrovat přítomnost plastidových barviv a jejich význam v přenosu elektronů.*

### Hypotéza, kterou v průběhu práce ověříme:

*Barviva je možné extrahovat, izolovat a změřit jejich absorpční spektra. V přítomnosti vhodného donoru a akceptoru elektronů lze ověřit jejich schopnost předávat elektrony v závislosti na světelné energii.*



### Dílčí úlohy:

**1a) Extrahujte plastidová barviva z listů břečťanu.**

**1b) Ověřte schopnost extrahovaných pigmentů absorbovat světlo, uvolňovat elektron, předávat ho akceptoru a přijímat elektron od donoru.**

### Úkol 1a) Extrahujte plastidová barviva z listů břečťanu

Extrahovaná barviva rozdělte chromatografií na tenké silikagelové vrstvě (Silufol, TLC). Zjistěte  $R_f$  (retenční faktor) jednotlivých zón. **Změřte absorpční spektra látek** v jednotlivých zónách ve viditelné oblasti záření.

**Princip:** Chlorofyly i karotenoidy se z rostlinného materiálu extrahují organickými rozpouštědly. Směs těchto látek lze na vhodném nosiči ve vhodné vyvíjecí chromatografické směsi rozdělit. **Chromatografie je metoda dělení směsí.** Směs látek nanesená na **stacionární fázi** (papír, tenkou vrstvu silikagelu) je vymývána **mobilní fází** (vyvíjecí směsí). Jednotlivé látky postupují ve směru pohybu mobilní fáze různou rychlostí (podle své rozpustnosti v mobilní fázi), oddělují se a vytvářejí charakteristické zóny. Pozice jednotlivých zón na chromatogramu se udává jako  **$R_f$**  (retenční faktor). Za určitých podmínek, daných mimo jiné chromatografickým nosičem a vyvíjecí směsí, je  $R_f$  pro danou látku hodnota charakteristická. Jednotlivé látky lze z chromatogramu eluovat (vymýt) organickým rozpouštědlem.

---

## Laboratorní postup:



### Potřeby pro přípravu extraktu:

- listy břečťanu
- aceton
- třecí miska
- písek
- CaCO<sub>3</sub>
- odměrný válec
- filtrační nálevka (frita)
- kádinka na filtrát
- vývěva

### Příprava extraktu: v této fázi musí být veškeré používané sklo naprosto suché !!!

Asi 8 listů břečťanu nastřihejte **co nejjemněji** do třecí misky, přidejte trochu písku a na špičku nože CaCO<sub>3</sub> pro neutralizaci prostředí (nízké pH může barviva při extrakci poškodit), přidejte asi 5 ml acetonu a rozetřete. Po důkladné homogenizaci přidejte ještě asi 15 ml acetonu a homogenát přefiltrujte za sníženého tlaku přes fritu do suché kádinky (použijte vývěvu). Schéma přípravy extraktu je na obr. č. 1.

### Potřeby pro úkol 1a:

- chromatografická komora
- baňka na přípravu chromatografické směsi
- odměrné nádobí (válec, pipeta a mikropipeta)
- chromatografická deska Silufol
- obyčejná tužka
- kapilára na nanášení chromatogramu
- benzin
- izopropanol
- dest. voda
- měřítko
- nůžky
- spektrofotometr s možností měřit absorpci látek při plynule se měnící vlnové délce

### Provedení úkolu 1a:

1. Ve vzdálenosti asi 2 cm od svislých okrajů chromatografické desky vyryjte rýhu asi 1 mm širokou pevným předmětem tak, abyste chromatografickou vrstvu silikagelu porušili a odstranili ji až na nosnou hliníkovou vrstvu. Omezíte tím okrajové nepravidelnosti chromatogramu.
2. Asi 2 cm od dolního okraje obyčejnou tužkou jemně naznačte linii startu, nesmíte však narušit kontinuitu chromatografické silikagelové vrstvy. Na tuto linii kapilárou naneste

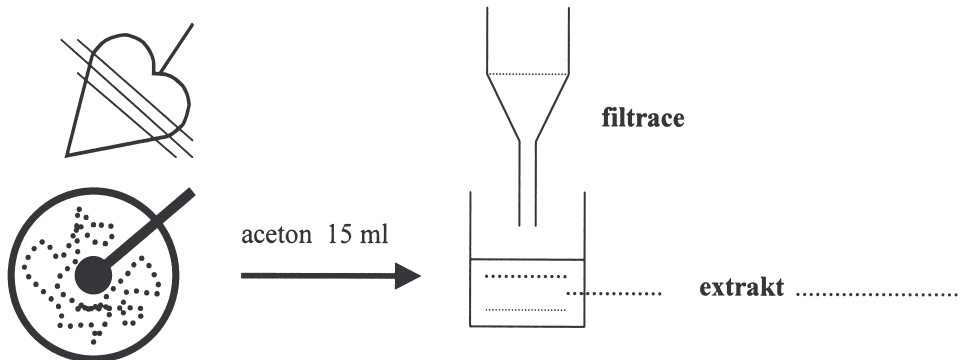
asi 6 až 8 vrstev extraktu. Mezi nanášením jednotlivých vrstev nechte chromatogram zaschnout.

3. **Příprava vyvíjecí směsi** : V baňce smíchejte: 50 ml benzínu + 5 ml izopropanolu + 0,125 ml dest. H<sub>2</sub>O (dávkujte mikropipetou).
4. Připravenou chromatografickou směs vlijte na dno chromatografické komory, desku postavte do komory co nejsvisleji - opřete ji o stěnu komory zadní, t.j. hliníkovou stranou - a komoru uzavřete. Přibližně za 20 - 30 min. dostoupí vyvíjecí směs - čelo chromatogramu - asi 2 cm od horního okraje desky.
5. V tomto stadiu desku vyjměte, tužkou označte čelo chromatogramu a stanovte **R<sub>f</sub>** jednotlivých barevných zón, t.j. poměr vzdáleností, které urazily jednotlivé zóny k celkové délce chromatogramu (vzdálenost start - čelo).

$$R_f = \frac{\text{vzdálenost start - zóna}}{\text{vzdálenost start - čelo}}$$

6. Jednotlivé zóny vystříhněte, rozstříhejte na malé kousky a v označených zkumavkách barviva eluujte 2 ml acetonu. **Proměřte absorpční spektra extrahovaných barviv** na spektrofotometru Helios  $\gamma$  ve viditelné oblasti. Do protokolu zapište, v kterých oblastech viditelného záření jednotlivá barviva absorbují (použijte tab. 1).

<b>Tabulka 1</b>	
<b>vlnová délka (rozsah v nm)</b>	<b>oblast (barva)</b>
320 – 400	UV-A
400 – 425	fialová
425 – 490	modrá
490 – 560	zelená
560 – 585	žlutá
585 – 640	oranžová
640 - 740	červená
740 a více	infračervená



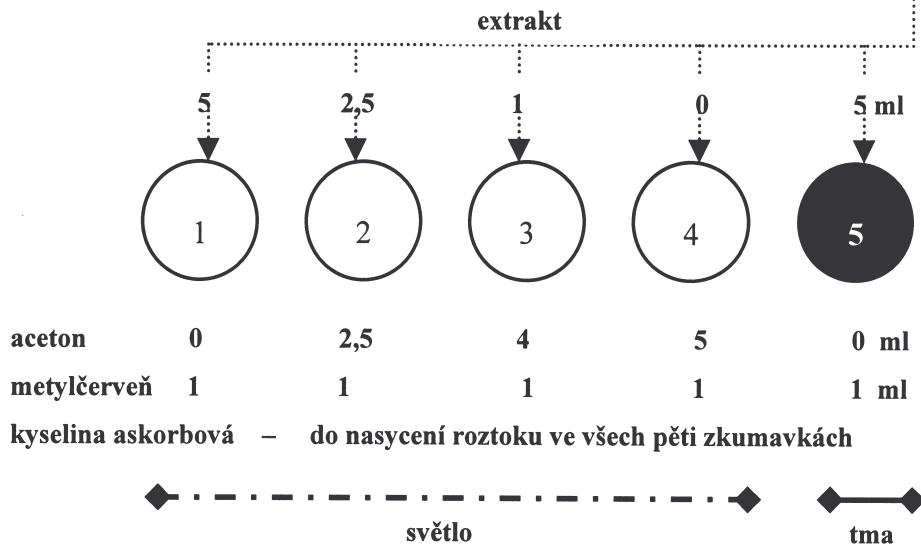
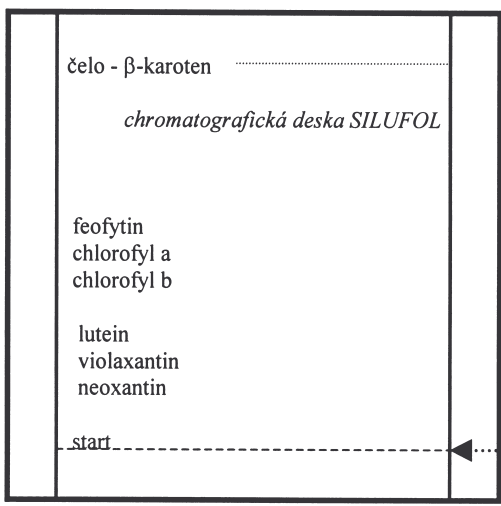
**homogenizace a extrakce**  
CaCO<sub>3</sub>, písek, aceton 5 ml

**chromatografie**  
chromatografická vyvíjecí směs:  
**benzin** 50 ml  
**izopropanol** 5 ml  
**H<sub>2</sub>O** 0,125 ml

směs nalijte na dno chromatografické komory

změřte R<sub>f</sub> jednotlivých zón

barviva eluujte do 2 ml acetonu a změřte jejich absorpční spektra



**Obr. 1: Schéma přípravy a zpracování extraktu**



## Úkol 1b: Ověřte schopnost extrahovaných pigmentů absorbovat světlo, uvolňovat elektron, předávat ho akceptoru a přijímat elektron od donoru.

**Princip:** Charakteristickou vlastností chlorofylů je schopnost absorbovat energii fotonu a uvolnit elektron. Systém, v němž bychom mohli pozorovat tento jev, musí obsahovat vedle chlorofylu, který uvolňuje a přijímá elektron, **akceptor** elektronu, který přijme elektron uvolněný z chlorofylu, a **donor** elektronu, který poskytne chlorofylu chybějící elektron. V našem experimentu bude donorem kyselina askorbová, akceptorem metylčerveň, která při změně redox stavu mění barvu (v redukované formě je žlutá).

### Laboratorní postup:

#### Potřeby pro úkol 1b:

- 5 zkumavek ve stojánku
- pipety (2x 5 ml, 1x 1ml)
- lžička
- kyselina askorbová
- aceton
- lampa
- alobal na zatemnění jedné z kontrolních variant
- 0,04% metylčerveň v etanolu



#### Provedení úkolu 1b:

1. Do zkumavek napipetujte dle tabulky 2. Zkumavku č.5 zatemněte (obalte alobalem).
2. Do všech zkumavek **přidejte kyselinu askorbovou** (jako substanci) v takovém množství, aby byl roztok nasycen (na dně zkumavky bude zůstávat nerozpuštěná látka).
3. Zkumavky č.1-4 vystavte světlu lampy (schéma obr. č. 1).

**Pozorujte**, za jak dlouho dojde v jednotlivých zkumavkách ke změně barvy z červenohnědé na zelenou (odbarvení metylčerveně). Čas zaznamenejte.

Tabulka 2			
č. zkumavky	acetonový extrakt (ml)	aceton (ml)	metylčerveň (ml)
1	5,0	0	1
2	2,5	2,5	1
3	1,0	4,0	1
4	0	5,0	1
5	5,0	0	1

## Úkol č. 2: Vakuolární barviva

### Otázka:

*Jaká vakuolární barviva jsou přítomná v extraktu květů?*



### Hypotéza, kterou v průběhu práce ověříme:

*Zastoupení vakuolárních barviv s různými absorpčními spektry koresponduje s barvou květu.*

### Dílčí úloha:

**2a)** V připraveném extraktu **rozdělte flavonoidy** papírovou chromatografií a s pomocí přiložené tabulky je zkuste zařadit do některé ze základních typů flavonoidů.

### Potřeby:

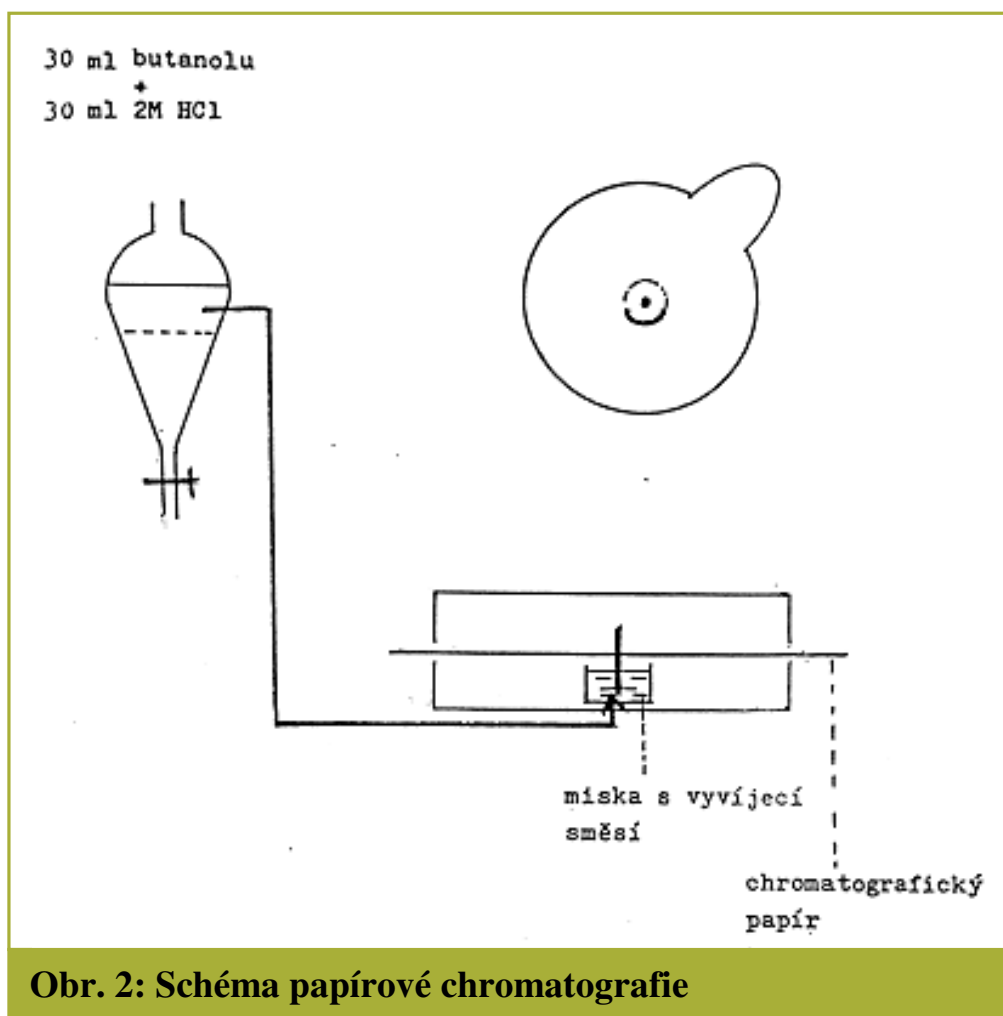
- extrakt - dostanete připravený od vedoucího praktika (rozdrcené květy (*Corydalis*, *Pelargonía*, *Salvia*) se přes noc vyluhují v 0,2M HCl, výluh se zfiltruje)
- chromatografický papír Whatman III
- obyčejná tužka
- nůžky
- kruhová chromatografická komora s nádobkou na vyvíjecí směs
- n-butanol
- 2M HCl
- 2 odměrné válce (50 ml)
- dělicí nálevka
- UV-lampa

### Provedení úkolu 2a:

1. Na 1/3 linie startu na chromatografickém papíru naneste kapilárou alespoň 6 vrstev (asi 0,2 ml) předem připraveného extraktu. Mezi nanášením jednotlivých vrstev použijte k sušení fén. Schéma papírové chromatografie je na obr. 2.
2. **Připravte vyvíjecí směs:** 30 ml n-butanolu a 30 ml 2M HCl protřepete v dělicí nálevce a vyčkejte oddělení fází. Spodní vrstvu (HCl nasycená butanolem) vypusťte a vylijte do nádob na odpad. Vrchní fázi (butanol nasycený HCl) převedete do nádobky pro vyvíjecí směs v chromatografické komoře.
3. Z proužku papíru stočíte knot, který prostrčíte otvorem ve středu chromatogramu a jeho spodní část umístíte do misky s vyvíjecí směsí a komoru uzavřete. Až čelo chromatogramu bude asi 1 cm od okraje komory, chromatografii ukončete a obyčejnou tužkou označte čelo.

4. **Chromatogram usušte v digestoři** a označte polohu viditelných barevných skvrn. Pak prohlédněte chromatogram ve světle UV-lampy, zóny označte. Vypočtěte  $R_f$  jednotlivých zón a pokuste se látky zařadit k jednotlivým typům s pomocí tabulky 3.
5. Do protokolu zaznamenejte počet a charakteristiky jednotlivých flavonoidů.

<b>Tabulka 3</b>			
	<b>zbarvení zóny</b>		
<b>typ flavonoidu</b>	<b>světlo</b>	<b>UV-záření</b>	<b>maximum absorpce (nm)</b>
antokyany	červené, růžové modré	šedé, světle fialové červené	475 - 560
flavony	bezbarvé	šedé, šedomodré jasně modré	330 - 355
flavonoly	žluté, oranžové	žluté	350 - 390



---

## **Vyhodnocení experimentů:**

Vypracujte protokoly, ve kterých zdokumentujete a vyhodnotíte získaná experimentální data. Zamyslete se nad jejich významem, pomoci Vám mohou následující otázky.



### **Otázky :**

Podařilo se ověřit hypotézy formulované na počátku experimentů?

Ve kterých oblastech viditelného záření mají absorpční maxima karotenoidy a cyklické tetrapyroly (chlorofyly a feofytin)?

Které faktory jsou nezbytné pro přenos elektronu v extraktu?

Jaká vakuolární barviva se podařilo izolovat v extraktu květů? Korespondují s barvou květu?