

Spremljanje količine klorofilov v listju skozi čas jeseni

Raziskovalno področje: **KEMIJA**

Raziskovalna naloga

Avtorica: **Ema Božič**

2. letnik

Mentorica: Tanja Cvirn Pavlin, prof.

Ljubljana, 2022



Vsebina

1. Povzetek	5
2. Ključne besede	5
3. Uvod	6
3.1. Opravitev problema	6
3.2. Hipoteze	6
4. Teoretični del	7
4.1. Spekter vidne svetlobe	7
4.2. Kemija jesenskega listja	8
4.3. Fotosinteza barvila in njihova zgradba	8
4.3.1. Klorofili	9
4.3.2. Feofitini	10
4.3.3. Karotenoidi	11
4.3.4. Antocianidini	12
4.4. Topila, njihova zgradba in polarnost	13
5. Eksperimentalni del	15
5.1. Metode in potek dela	15
5.1.1. Nabiranje vzorcev	15
5.1.2. Ekstrakcija	17
5.1.3. Tankoplastna kromatografija	19
5.1.4. Vidna spektroskopija	21
6. Rezultati in ugotovitve	25
6.1. Ekstrakcija	25
6.2. Tankoplastna kromatografija	25
6.3. Vidna spektroskopija	28
7. Zaključek	37

7.1.Potrditev / zavrnitev hipotez	37
7.2.Dodatek	38
8. Literatura	40

Seznam tabel

Tabela 1: R _f vrednosti barvil, prisotnih v listih drena.	26
Tabela 2: R _f vrednosti barvil, prisotnih v listih oreha.	26
Tabela 3: Absorbanca klorofila a in klorofila b, masa klorofila a oz. klorofila b /g listja – v listih oreha iz različnih časovnih obdobij, ter razmerje mas	31
Tabela 4: Absorbanca klorofila a in klorofila b, masa klorofila a oz. klorofila b /g listja – v listih drena iz različnih časovnih obdobij, ter razmerje mas	33

Seznam grafov

Graf 1: Spreminjanje mase klorofila a v listih oreha, nabranih v različnih časovnih obdobjih	31
Graf 2: Spreminjanje mase klorofila b v listih drena, nabranih v različnih časovnih obdobjih	32
Graf 3: Primerjava spremenjanja mas klorofilov v listih oreha, nabranih v različnih časovnih obdobjih	32
Graf 4: Spreminjanje mase klorofila a v listih drena, nabranih v različnih časovnih obdobjih	33
Graf 5: Spreminjanje mase klorofila b v listih drena, nabranih v različnih časovnih obdobjih	34
Graf 6: Spreminjanje mase klorofila a in b v listih drena, nabranih v različnih časovnih obdobjih	34
Graf 7: Spreminjanje mase klorofila a v listih oreha in drena, nabranih v različnih časovnih obdobjih	35
Graf 8: Spreminjanje mase klorofila b v listih oreha in drena, nabranih v različnih časovnih obdobjih	35

Seznam slik

Slika 1: Spekter vidne svetlobe vsebuje valovne dolžine med 380 in 750 nm.	7
Slika 2: Spekter vidne svetlobe je del elektromagnetnega spektra.	7
Slika 3: Spreminjanje vpadnega kota svetlobe Sonca v različnih letnih časih.	8

Slika 4: Formuli klorofila a in klorofila b	10
Slika 5: Karotenoide delimo v dve veliki skupini, karotene in ksantofile.	11
Slika 6: Formuli β -karotena in ksantofila violaksantina.	12
Slika 7: Formula enega od antocianidinov, delfnidina.	13
Slika 8: Strukturna formula heksana.	13
Slika 9: Strukturna formula acetona.	13
Slika 10: Strukturna formula diklorometana.	14
Slika 11: Dren v različnih časovnih obdobjih.	15
Slika 12: Listje oreha v različnih časovnih obdobjih.	16
Slika 13: Natehtano in narezano listje drena.	17
Slika 14: Ostanek na filtrirnem papirju po filtraciji.	17
Slika 15: Terilnice z vzorci po filtraciji.	18
Slika 16: Liji s filtrirnimi papirji in terilnice po filtraciji.	18
Slika 17: Filtrati.	18
Slika 18: Filtrati, pripravljeni za hrambo v hladilniku.	19
Slika 19: Določitev retencijskega faktorja.	20
Slika 20: Ekstrakti, pripravljeni za TLC.	20
Slika 21: TCL plošča z vzorci v kromatografski kadički (dren) in primer razvitega kromatograma (oreh).	21
Slika 22: Praskanje klorofila a in klorofila b s kromatografske plošče.	23
Slika 23: Uporabili smo spektrofotometer SpectroVis Plus (Vernier).	23
Slika 24: Vzorci silikagela z adsorbiranimi klorofili.	24
Slika 25: Snemanje absorpcijskih spektrov.	24
Slika 26: Kromatogram barvil iz listov drena, nabranih v treh različnih časovnih obdobjih.	25
Slika 27: Določitev barvil na razvitem kromatogramu.	27
Slika 28: Kromatograma, kjer sta bila klorofila še prisotna, ter kromatograma ob večji prisotnosti feofitinov.	28
Slika 29: Absorpcijski spekter fotosintežnih barvil v zelenem listju.	28
Slika 30: Absorpcijski spekter klorofila a.	29
Slika 31: Absorpcijski spekter klorofila a iz listja oreha, nabranega 28. 9.	29

1. Povzetek

V nalogi smo preučevali, katera barvila so prisotna v jesenskem listju in kako se spreminja količina klorofilov v različnih jesenskih časovnih obdobjih v listiju navadnega oreha (*Juglans regia*) in drena (*Cornus sp.*). Vzorce listja smo nabrali v različnih jesenskih obdobjih (28. septembra, 7. oktobra, 19. oktobra, 2. novembra in 9. novembra). Barvila smo ekstrahirali iz listov in jih ločili z metodo tankoplastne kromatografije. Količino klorofila a in klorofila b smo zasledovali z metodo vidne spektroskopije.

Potrdili smo, da so v listih prisotne zmesi barvil, med katerimi so ksantofili, klorofila a in b, feofitina, karotenii. Ugotovili smo, da količina klorofila a in klorofila b pada glede na kasnejši datum nabiranja vzorcev listov, da pa zmanjševanje količine klorofilov ni linearo s časom nabiranja vzorcev. Ugotovili smo, da je razmerje med klorofiloma a in b med vzorci listov različnih dreves različno, prav tako se razmerje spreminja med vzorci listov istega drevesa, nabranih v različnih obdobjih jeseni.

2. Ključne besede

barvila v jesenskem listju, ekstrakcija, tankoplastna kromatografija, metoda vis spektroskopije, količina klorofilov

3. Uvod

3.1. Opredelitev problema

V jesenskem času se listju spremeni barva iz zelene v druge, jesenske barve listja, kot so rdeča, oranžna, rumena, rjava. Cilj te raziskovalne naloge je bil ugotoviti prisotnost barvil v jesenskem listju in spremljati količino klorofilov v vzorcih listja, nabranih v različnih jesenskih časovnih obdobjih.

3.2. Hipoteze

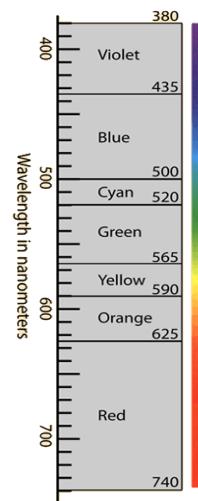
Po pregledu literature smo zastavili naslednje hipoteze:

1. V listih je prisotna zmes različnih barvil, klorofila a, klorofila b, feofitina in karotenoidov.
2. V kasneje nabranih listih bo manjša količina prisotnih klorofilov; bolj pozno v jeseni, kot bo listje nabранo, manj klorofilov bo prisotnih.
3. Razmerje med klorofilom a in klorofilom b se ne bo spremenjalo med časovno različno nabranimi vzorci.
4. Če so vzorci listja nabrani v enakomerinem časovnem razmaku, bo padanje koncentracije klorofilov linearne.
5. Različni vzorci listov različnih dreves bodo imeli enako spremenjanje koncentracije klorofila a in klorofila b.
6. Različni vzorci listov različnih dreves bodo imeli enako razmerje med klorofilom a in klorofilom b.

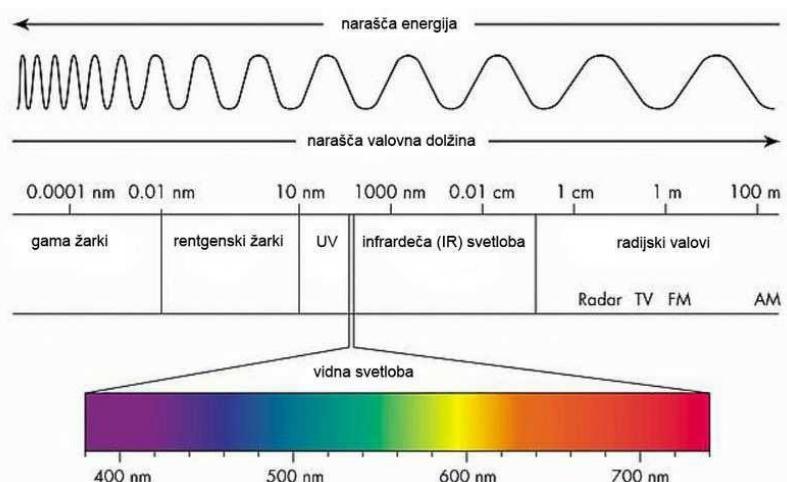
4. Teoretični del

4.1. Spekter vidne svetlobe

Je del elektromagnetskega spektra, ki smo ga ljudje sposobni zaznati z našim čutilom za vid, očmi. To so valovne dolžine svetlobe od 380 do 740 nm, spekter v tem intervalu valovnih dolžin imenujemo vidna svetloba. Spektralne barve so vijolična, modra, zelena, rumena, oranžna in rdeča. Oko je najbolj občutljivo na zeleni del spektra. Barve, ki jih zaznamo, predstavljajo več različnih valovnih dolžin, npr. vijolične barve imajo valovno dolžino med 380 in 450 nm. Spekter vidne svetlobe je zvezan in tako med zaznanimi barvami ni očitnih meja.



Slika1 : Spekter vidne svetlobe vsebuje valovne dolžine med 380 in 740 nm.



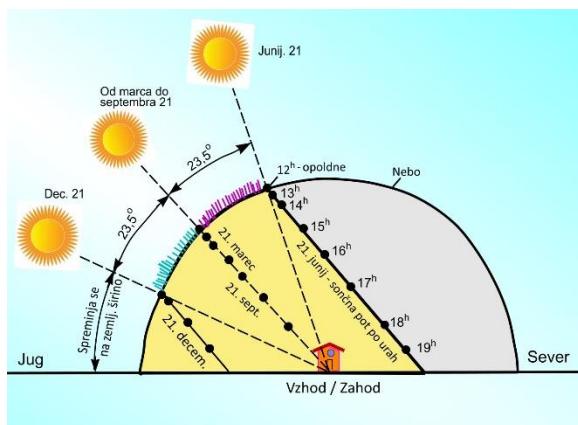
Slika 2: Spekter vidne svetlobe je del elektromagnetskoga spektra.

4.2. Kemija jesenskega listja

V jesenskem času se listju spremeni barva iz zelene v druge, jesenske barve listja, kot so rdeča, oranžna, rumena, rjava.

Klorofili, glavna fotosintezna barvila, se v jeseni ne tvorijo več, saj je pogoj za njegovo tvorbo svetloba, ki je bogata s krajšimi valovnimi dolžinami.

Ko se jeseni dnevi krajsajo, se pot Sonca čez nebo zniža in jakost svetlobe se zmanjšuje. Zemlja sprejme sončne žarke pod manjšim kotom, sončni žarki zaradi naše geografske lege prepotujejo daljšo razdaljo skozi naše ozračje, pri čemer se izločijo valovne dolžine modrega dela spektra.



Slika 3: Spreminjanje vpadnega kota svetlobe Sonca v različnih letnih časih.

Ko se klorofili razgradijo, opazimo barve drugih barvil, na primer oranžno in rumeno pomožnih fotosinteznih barvil, karotenoidov. V jeseni se zmanjšuje količina hrani in vode v listih, zato se celice ob robovih listov spreminjajo v pluto. Iz glukoze, ujetne v listih, se tvorijo antocianidini, ki liste obarvajo rdeče. Intenzivnost rdeče barve je odvisna od jakosti svetlobe in zaloge glukoze v listu, ko se je prekinil dotok hrani. Velike temperaturne razlike med dnevom in nočjo ter večje količine glukoze pripomorejo k intenzivnejši rdeči barvi. Rjavo barvo jesenskemu listju dajejo tanini. Ti se ohranijo najdlje, celo ko listje odpade in ga prekrije sneg.

4.3. Fotosintezna barvila in njihova zgradba

Fotosinteza je kemijski proces, ko (poenostavljeno) iz ogljikovega dioksida in vode nastane glukoza in kisik. Proses fotosinteze omogoča absorpcija svetlobe, svetlobo

pa absorbirajo fotosinteza barvila. Ko foton svetlobe trči v molekulo fotosinteznega barvila, se nekaj svetlobe odbije, nekaj pa je molekula absorbira. Ker pa barvila absorbirajo samo določene valovne dolžine svetlobe, je v rastlini običajno prisotno več različnih fotosinteznih barvil. Skupine barvil, ki sodelujejo pri procesu fotosinteze, so klorofili, karotenoidi in fikobilini. Ti se med seboj razlikujejo v kemijski zgradbi in s tem povezani absorpciji svetlobe.

4.3.1. Klorofili

So zelena listna barvila. V rastlini se tvorijo dolgo časa, od nekaj dni do nekaj tednov, v rastlini v povprečju ostanejo okoli pet mesecev, nato pa razpadejo zelo hitro, v samo treh do štirih dneh.

Klorofili absorbirajo vijolične, rdeče in modre komponente vidnega spektra svetlobe. Naše oko zazna odbiti del spektra svetlobe zeleno.

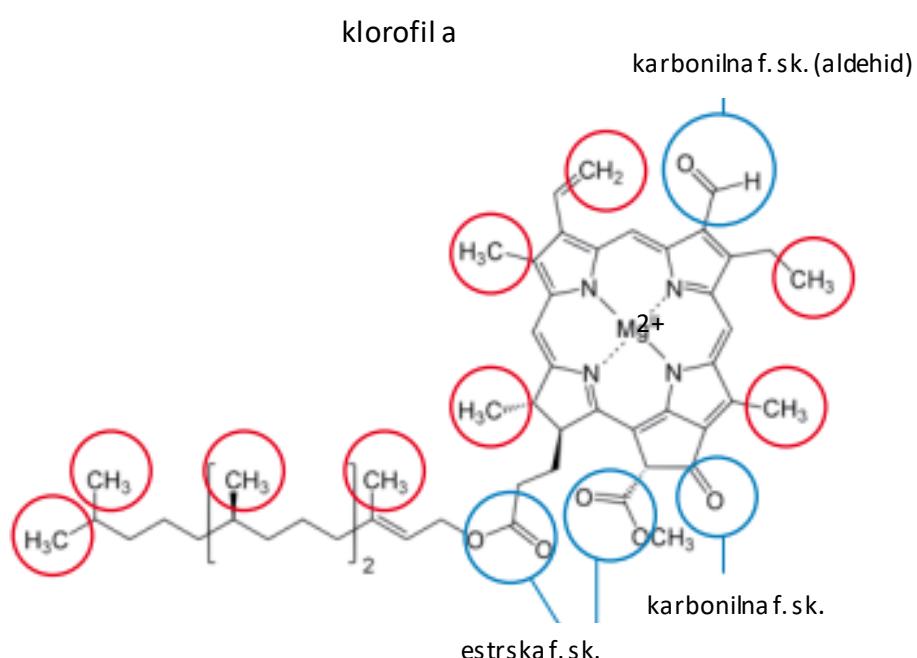
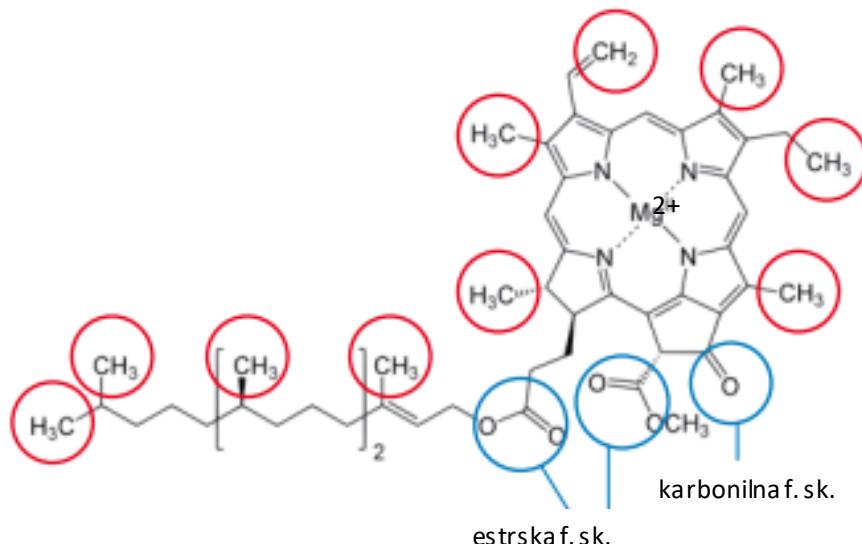
Klorofili so derivati pirola, imajo policiklično strukturo štirih pirolovin obročev, v sredini imajo s koordinacijsko vezjo vezan magnezijev kation (Mg^{2+}) ter ogljikovodikovo verigo. Najbolj pogosta klorofila v zelenih rastlinah sta klorofil a in klorofil b.

Klorofil a

Klorofila a je v rastlinah prisotnega več kot klorofila b. Absorbira predvsem rdeči del vidnega spektra svetlobe, najvišjo absorbanco ima pri valovni dolžini 663 nm. Je manj polaren od klorofila b. Barva klorofila a pri tankoplastni kromatografiji je temnejše barve in z mobilno fazo potuje višje od klorofila b (ob izbrani mobilni fazi petroleter /aceton/diklorometan). Najbolj je stabilen v bazičnem okolju, v kislem okolju pa se pretvori v feofitin a.

Klorofil b

Klorofil b absorbira modri del vidnega spektra svetlobe, njegova absorbanca je najvišja pri valovni dolžini 645 nm. Je bolj polaren od klorofila a. Tako kot klorofil a je bolj stabilen v bazičnem okolju. Pri tankoplastni kromatografiji je svetlejše barve od klorofila a. Če je izoliran, hitro razpade. V kislem okolju izgubi magnezijev kation in se pretvori v feofitin b.



klorofil b

Slika 4: Formuli klorofila a in klorofila b, z rdečo obrobo so označene metilne skupine ($-CH_3$) in metilidenska ($=CH_2$) skupina, z modro obrobo etrska in karbonilna funkcionalna skupina. Zaradi karbonilne funkcionalne (aldehidne) je klorofil b bolj polaren od klorofila a.

4.3.2. Feofitini

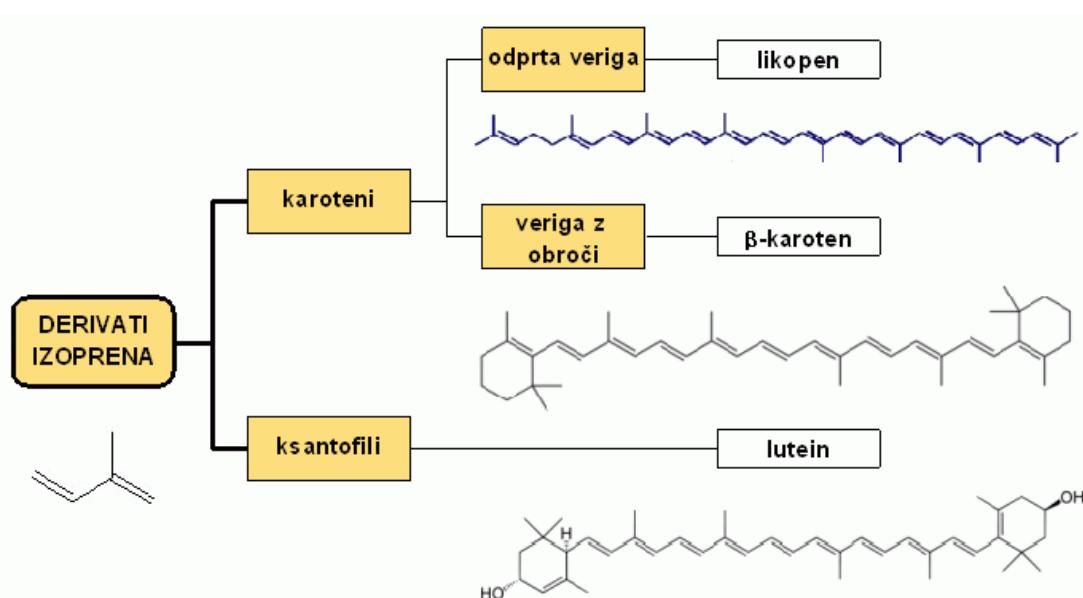
Nastanejo, ko v kislem okolju klorofil a in klorofil b izgubita magnezijev kation. Nastali spojini sta nepolarni in topni v nepolarnih topilih. Njuna barva je

rumenorjava. Veliko rastlin ju vsebuje poleg klorofilov. Pri tankoplastni kromatografiji, pri izbiri mobilne faze petroleter/aceton/diklorometan, se ne ločita. Prisotna sta predvsem proti koncu jeseni.

4.3.3. Karotenoidi

Karotenoide vsebujejo vse rastline kot pomožna fotosintezna barvila. V rastlinah imajo dve vlogi, absorbirajo modrozeleni del spektra svetlobe in ščitijo klorofile pred poškodbami zaradi premočne svetlobe.

Karotenoidi so derivati izoprena, strukturno so molekule z dolgo ogljikovodikovo verigo z velikim številom dvojnih vezi, kar jim daje obarvanost. Njihove molekule so nepolarne in tako so topni v nepolarnih topilih. Delijo se v dve skupini, karotene in ksantofile.



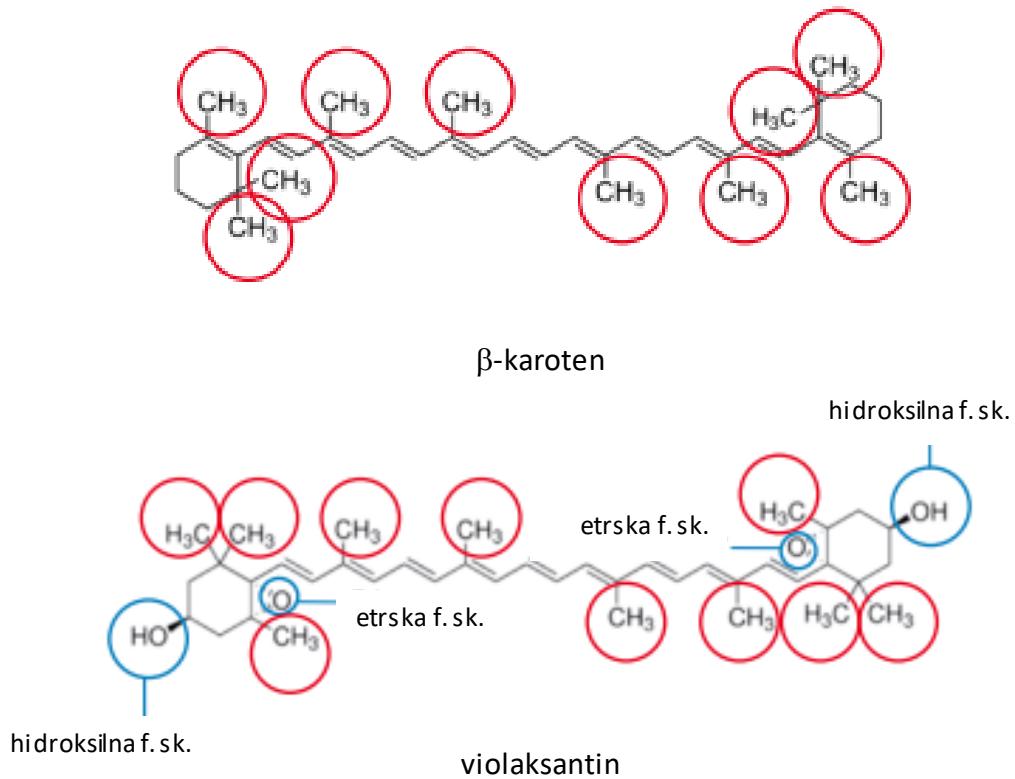
Slika 5: Karotenoide delimo v dve veliki skupini, karotene in ksantofile. Osnovni gradniki karotenoidov so nepolarne molekule.

Karoteni

Dolge ogljikovodikove verige so lahko sklenjene ali odprte. Pri tankoplastni kromatografiji (ob izbiri mobilne faze petroleter/aceton/diklorometan) potujejo najvišje od vseh barvil in so običajno oranžne, včasih rdečkaste barve.

Ksantofili

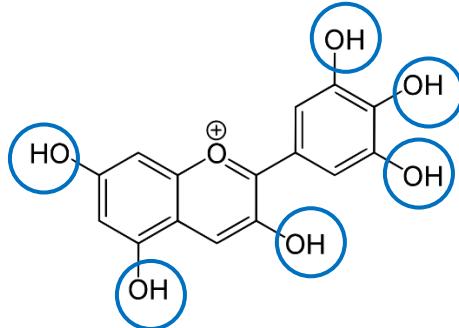
Zaradi prisotnosti hidroksilne skupine (-OH) so bolj polarni od karotenov, kar omogoča kromatografsko ločbo ksantofilov od karotenov. Zanje je značilna rumena barva.



Slika 6: Formuli β -karotena in ksantofila violaksantina, z rdečo obrobo so označene metilne skupine ($-\text{CH}_3$), z modro obrobo hidroksilna in etrska funkcionalna skupina. Zaradi hidroksilnih in etrskih funkcionalnih skupin je violaksantin bolj polaren od β -karotena.

4.3.4. Antocianidini

Antocianidini so zaradi večjega števila hidroksidnih skupin polarne molekule, dobro topne v vodi. Pri tankoplastni kromatografiji (ob izbiri mobilne faze petroleter/aceton/diklorometan) ostanejo na startni črti.

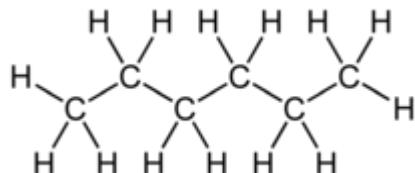


Slika 7: Formula enega od antocianidinov, delfinidina. Z modro obrobo so označene hidroksilne funkcionalne skupine, ki dajejo molekuli polarnost.

4.4. Topila, njihova zgradba in polarnost

Pravilo raztplavljanja snovi pravi, da se podobno raztplavlja v podobnem, kar pomeni, da se podobno zgrajene snovi razapljujejo v podobno zgrajenih topilih. Glede na zgradbo in polarnost molekul barvil izbiramo topila za eksperimentalni del. Pri delu smo uporabili različna topila za ekstrakcijo, tankoplastno kromatografijo in kot topilo pri vidni spektroskopiji heksan, aceton, petroleter, diklorometan.

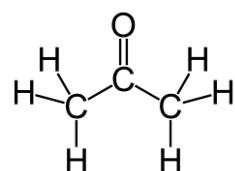
Heksan



Slika 8: Strukturna formula heksana.

Heksan spada med alkane, ima molekulsko formulo C_6H_{14} . Njegovi osnovni gradniki so nepolarne molekule. Je brezbarvna tekočina.

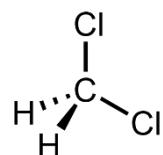
Aceton



Slika 9: Strukturna formula acetona.

Aceton (propanon) velja za univerzalno topilo, meša se z večino organskih topil in vodo. Njegova molekulska formula je C_3H_6O in je najpreprostejši keton, je polarna spojina. Je brezbarvna tekočina.

Diklorometan



Slika 10: Strukturna formula diklorometana.

Zaradi zgradbe je diklorometan polarna molekula, a se kljub temu z vodo ne meša. Njegova molekulska formula je CH_2Cl_2 . Je brezbarvna tekočina.

Petroleter

Petroleter je zmes ogljikovodikov, ki je lahko lapna; zaradi te svoje lastnosti je dobila ta brezbarvna tekočina ime eter, čeprav ne vsebuje etrske funkcionalne skupine. Osnovni gradniki so nepolarne molekule. Pri delu sem uporabila petroleter z vrelisjo 40-60°C (vsebuje ogljikovodike s petimi in sedmimi ogljikovimi atomi in manj kot 5% heksana)

5. Eksperimentalni del

5.1. Metode in potek dela

5.1.1. Nabiranje vzorcev

Kot vzorce smo izbrali liste dreves navadnega oreha (*Juglans regia*) in drena (*Cornus sp.*). Vzorce listov smo nabirali jeseni 2021: 28. septembra, 7. oktobra, 19. oktobra, 2. novembra in 9. novembra. Vzorce smo shranili v plastične vrečke, ustrezno označili (vrsta drevesa, datum) in shranili v zmrzovalnik.

Za eksperimentalni del smo zmrznjene liste prenesli v šolski zmrzovalnik.



28. 9. 2021



7. 10. 2021



7. 10. 2021



7. 10. 2021



14. 10. 2021



19. 10. 2021



26. 10. 2021

Slika 11: Dren v različnih časovnih obdobjih.



28. 9. 2021



7. 10. 2021



7. 10. 2021



14. 10. 2021



19. 10. 2021



26. 10. 2021

Slika 12: Listje oreha v različnih časovnih obdobjih.

5.1.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija trdno-tekoče je metoda izolacije, ki izkorišča topnost spojin iz trdnega vzorca v ekstrakcijskem topilu. Kot ekstrakcijsko topilo smo izbrali zmes acetona in heksana v razmerju 10 : 1.

V terilnico smo s škarjami narezali 5,0 g listja, dodali dve čajni žlički kremenčevega peska in ekstrakcijsko topilo, 20,0 mL acetona in 2,0 mL heksana. S pestilom smo zmes trli 2 minuti in pol. Dobljeno suspenzijo smo prefiltrirali skozi navaden filtrimi papir. Filtrat smo shranili v majhno stekleničko, ki smo jo ovili z aluminijevom folijo in shranili v hladilniku za nadaljnjo uporabo.



Slika 13: Natehtano in narezano listje drena.



Slika 14: Ostanek na filtrirnem papirju po filtraciji.



Slika 15: Terilnice z vzorci po filtraciji.



Slika 16: Liji s filtrirnimi papirji in terilnice po filtraciji.



Slika 17: Filtrati.



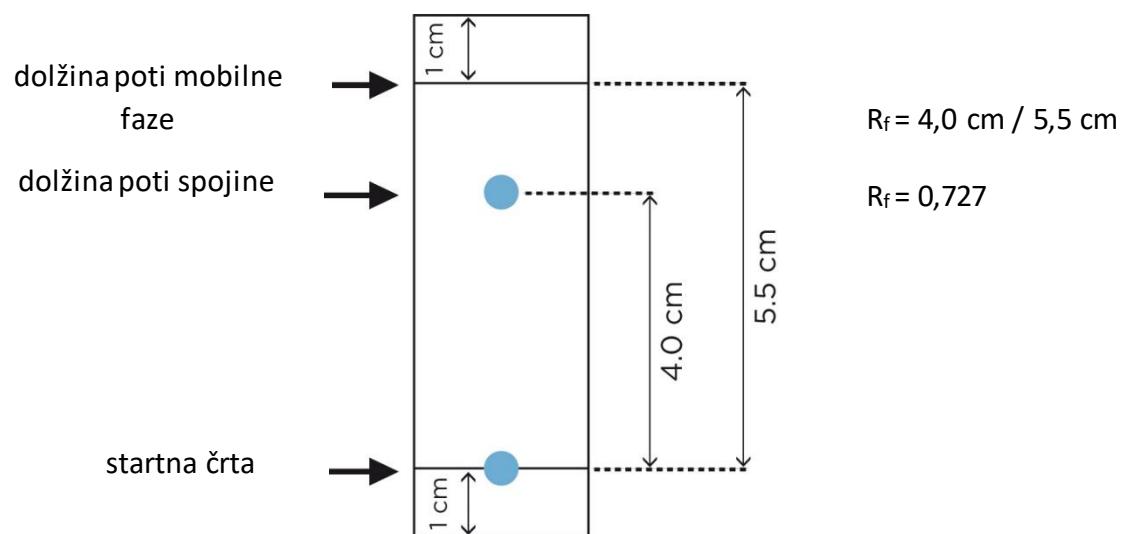
Slika 18: Filtrati, pripravljeni za hrambo v hladilniku.

5.1.3. Tankoplastna kromatografija (TLC)

Tankoplastna kromatografija (angl. TLC ali *Thin Layer Chromatography*) je kromatografska tehnika, ki se uporablja za ločevanje zmesi. Izvaja se na plošči iz stekla, plastike ali aluminijeve folije, ki je prekrita s tanko plastjo adsorpcijskega materiala. Ta material je po navadi silikagel, aluminijev oksid ali celuloza. Plast adsorpcijskega materiala se imenuje stacionarna faza. Po nanosu vzorca na ploščo se ploščo pomoči v topilo ali zmes topil, ki predstavljajo mobilno fazo. Ta potuje po plošči s pomočjo kapilarnega gibanja. Ločitev snovi s kromatografskimi metodami je lahko povezana z dvema procesoma, ki običajno potekata vzporedno: s porazdelitvijo med fazama, ki se ne mešata – stacionarno in mobilno (porazdelitvena kromatografija) in hitrostjo adsorpcije in desorpcije (adsorpcijska kromatografija).

Za identifikacijo spojin na kromatogramu uporabljamo vrednost R_f – retencijski faktor. To je razmerje poti, ki jo opravi spojina, in poti, ki jo opravi topilo v istem času. Če spojina potuje s fronto topila, je vrednost $R_f = 1$, če spojina ostane na startu, je vrednost $R_f = 0$. Ker je vrednost R_f odvisna od eksperimentalnih pogojev, praviloma vzporedno delamo s standardom.

Primer določitve R_f :



Slika 19: Določitev retencijskega faktorja.

Kot stacionarno fazo smo uporabili TLC ploščo TLC silica gel 60, velikosti 10 cm x 10 cm. Na startno črto smo z mikropipeto nanesli 40 µl ekstraktov posameznih barvil. V kromatografski kadički, ki je kot mobilno fazo vsebovala zmes petroletra, acetona in diklorometana v razmerju 3 : 1 : 1, smo razvili kromatograme. Ko je mobilna faza s kapilarnim vlekom pripravljena približno 1,5 centimetra do vrha plošče, smo ploščo vzeli iz kromatografske kadičke in na njej takoj označili pot mobilne faze. Na plošči smo označili lise posameznih barvil, izmerili dolžine poti mobilne faze in barvil ter izračunali R_f posameznih barvil. S pomočjo literature smo barvila določili.



Slika 20: Ekstrakti, pripravljeni za TLC.



Slika 21: TCL plošča z vzorci v kromatografski kadički (dren) in primer razvitega kromatograma (oreh).

5.1.4. Vidna spektroskopija

Z vidno spektroskopijo preučujemo lastnosti snovi preko njihove interakcije z vidno svetljavo. Vzorec barvila v kiveti vstavimo v spektrofotometer in merimo absorbanco snovi v odvisnosti od valovne dolžine, posnamemo absorpcijski spekter barvila. Vrhovi v absorpcijskem spektru predstavljajo absorpcijske maksimume posameznih barvil in so zanje značilni. Če izmerimo absorpcijo barvila pri točno določenih valovnih dolžinah, lahko izračunamo vsebnost barvila v vzorcu. Kvantitativna določitev barvila je odvisna od vzorca, uporabljenim topilom in uporabljenim spektrofotometrom.

Za določitev vsebnosti klorofila a in klorofila b v vzorcih listja izmerimo absorbanco:
za klorofil a pri valovni dolžini $\lambda = 663 \text{ nm}$, klorofil b pri valovni dolžini $\lambda = 645 \text{ nm}$

Večja kot je koncentracija klorofila v vzorcu, večji bo delež svetlobe določene valovne dolžine, ki jo bo vzorec absorbiral. To povezavo kvantitativno opredeli Beer-Lambertov zakon:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A ... absorbanca

ε ... milimolarni ekstinkcijski koeficient [$L \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

c ... množinska koncentracija vzorca [mmol L^{-1}]

l ... dolžina poti svetlobe skozi raztopino vzorca (dolžina kivete) [cm]

Množinsko koncentracijo barvila v raztopini lahko izračunamo po tej enačbi, če poznamo ekstinkcijski koeficient. Le-ta je odvisen od topila in valovne dolžine svetlobe, ki jo uporabimo. Ekstinkcijska koeficiente:

$$\varepsilon (\text{klorofil a, 100% aceton, pri } \lambda = 663 \text{ nm}) = 78,75 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon (\text{klorofil b, 100% aceton, pri } \lambda = 645 \text{ nm}) = 47,00 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Ker smo želeli določiti maso klorofila v gramu listov, smo upoštevali:

- da smo vzorec klorofila s TLC plošče raztopili v 3,0 mL acetona (V_2)
- da je to 40,0 μL vzorca (V_3) iz začetne prostornine 22,0 mL (V_1), ki je vsebovala barvila iz 5,0 g listja (m)

Postavili smo enačbo za izračun količine klorofila v vzorcu:

$$c (\text{klorofil a}) = \frac{A_{663}}{\varepsilon (\text{klorofil a}) \cdot l}$$

$$m (\text{klorofil a}) = \frac{A_{663} \cdot V_2 \cdot V_1 \cdot M (\text{klorofil a})}{\varepsilon (\text{klorofil a}) \cdot l \cdot V_3 \cdot m}$$

S TCL plošče smo s spatulo spraskali klorofil a in klorofil b. Vsako barvilo smo raztopili v 3,0 mL acetona in posneli absorpcijske spektre.



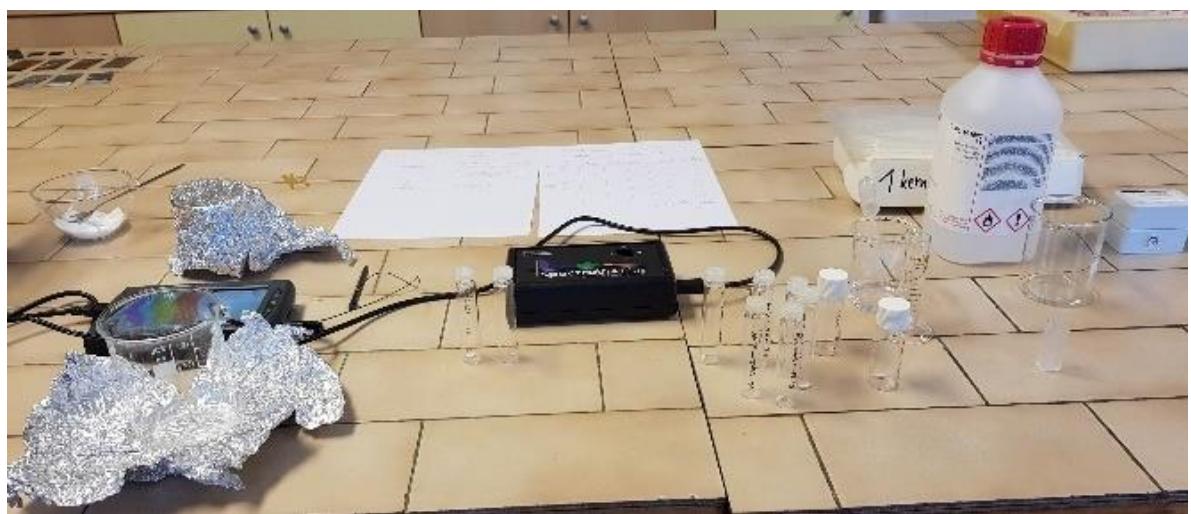
Slika 22: Praskanje klorofila a in klorofila b s kromatografske plošče.



Slika 23: Uporabili smo spektrofotometer SpectroVis Plus (Vernier).



Slika 24: Vzorci silikagela z adsorbiranimi klorofili.



Slika 25: Snemanje absorpcijskih spektrov.

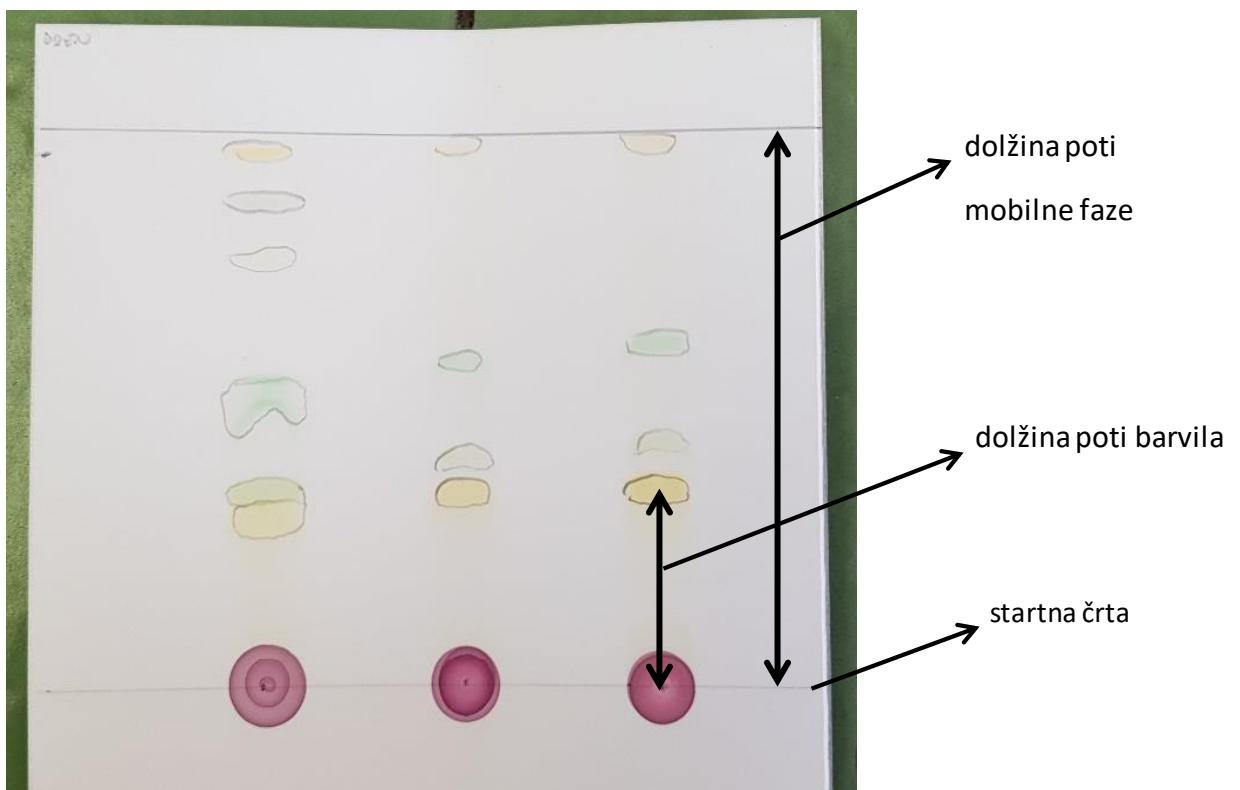
6. Rezultati in ugotovitve

6.1. Ekstrakcija

Pri ekstrakciji so se barvila ekstrahirala in nastale so raztopine različnih barv. Že organoleptično smo lahko ocenili, da je prisotnih klorofilov v vzorcih, nabranih v kasnejših časih jeseni, manj, saj ekstrakti niso bili več enako zelene barve. Glede na izbiro ekstrakcijskih topil, acetona in heksana, smo ekstrahirali barvila, katerih molekule so različno polarne.

6.2. Tankoplastna kromatografija

Pri razvitih kromatogramih so se pojavile lise posameznih barvil, ki so potovala z mobilno fazo. Izmerili smo dolžino poti mobilne faze in dolžino poti posameznih barvil in izračunali R_f .



Slika 26: kromatogram barvil iz listov drena, nabranih v treh različnih časovnih obdobjih

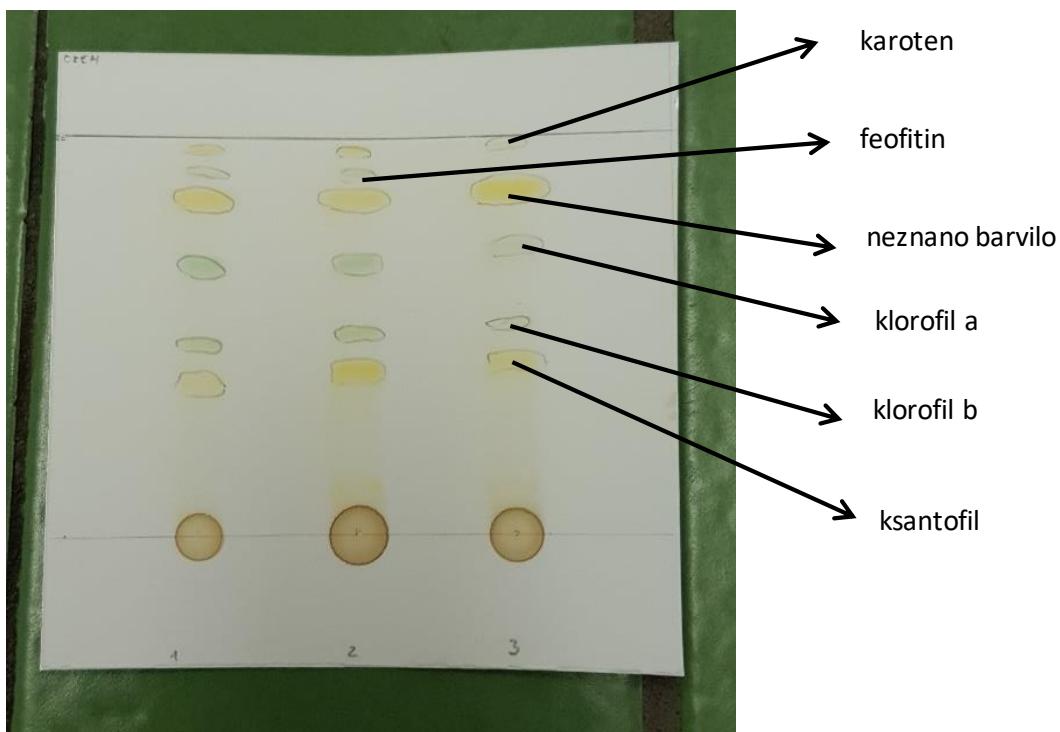
Tabela 1: R_f vrednosti barvil, prisotnih v listih drena; d dolžina poti barvila

datum barvilo	28. 9. 2021		7. 10. 2021		19. 10. 2021		2. 11. 2021		9. 11. 2021	
	R_f	d	R_f	d	R_f	d	R_f	d	R_f	d
ksanofil	0,73	2,6	0,40	2,8	0,30	2,0	0,34	2,3	0,35	2,3
klorofil a	0,41	2,9	0,44	3,1	0,36	2,4	0,41	2,7	0,44	2,9
klorofil b	0,59	4,1	0,60	4,2	0,48	3,2	0,59	3,9	0,62	4,1
neznano	/	/	/	/	0,79	5,2	/	/	/	/
feofitin	/	/	/	/	0,88	5,8	/	/	/	/
karoten	0,99	6,9	0,99	6,9	0,97	6,4	0,97	6,4	0,97	6,4
topilo	1,00	7,0	1,00	7,0	1,00	6,6	1,00	6,6	1,00	6,6

Tabela 2: R_f vrednosti barvil, prisotnih v listih oreha; d dolžina poti barvila

datum barvilo	28. 9. 2021		7. 10. 2021		19. 10. 2021		2. 11. 2021		9. 11. 2021	
	R_f	d	R_f	d	R_f	d	R_f	d	R_f	d
ksanofil	0,33	2,3	0,39	2,7	0,38	2,4	0,41	2,6	0,42	2,7
klorofil a	0,39	2,7	0,43	3,0	0,47	3,0	0,50	3,2	0,52	3,3
klorofil b	0,56	3,9	0,56	3,9	0,67	4,3	0,67	4,3	0,72	4,6
neznano	/	/	/	/	0,81	5,4	0,83	5,3	0,86	5,5
feofitin	0,81	5,7	0,83	5,8	0,92	5,9	0,94	5,8	/	/
karoten	0,99	6,9	0,99	6,9	0,97	6,2	0,97	6,2	0,97	6,2
topilo	1,0	7,0	1,00	7,0	1,00	6,4	1,00	6,4	1,00	6,4

Po primerjavi s podatki iz literature smo določili barvila, prisotna v listih.



Slika 27: Določitev barvil na razvitem kromatogramu

Neznan barvilo je verjetno razkrojni produkt, saj so barvila po izolaciji iz listov zelo občutljiva in lahko hitro razpadajo. Občutljiva so predvsem na svetlogo in visoko temperaturo.

Ugotovimo, da so v listih prisotna različna barvila, ki so se pri tankoplastni kromatografiji ločila glede na svojo polarnost in sposobnost adsorpcije. Karoten ima največjo vrednot R_f , praktično potuje s topilom. S tankolastno kromatografijo ločimo klorofila a in b. Tako ima ob izbiri mobilne faze petroleter/aceton/diklorometan klorofil a večjo vrednost R_f kot klorofil b, saj je manj polaren.

Ugotovimo, da s časom klorofila razpadata in nastajata feofitina.



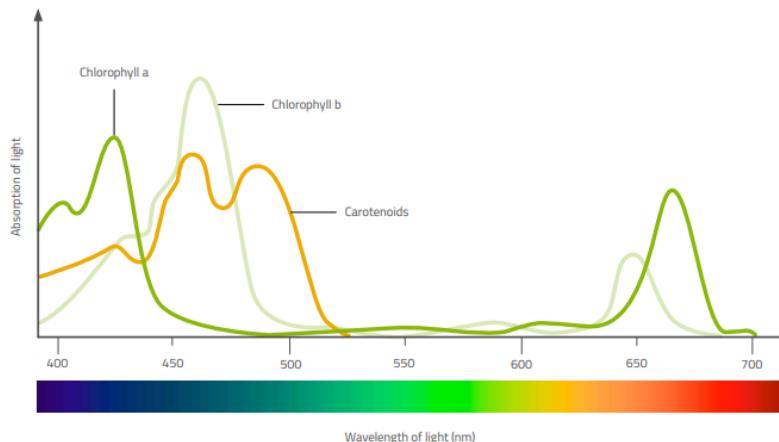
Slika 28: Kromatograma, kjer sta bila klorofila še prisotna, ter kromatograma ob večji prisotnosti feofitinov.

Sklepamo, da sta klorofila razpadla na feofitina. Feofitina se v prisotnosti mobilne faze petroleter/aceton/diklorometan v razmerju 3/1/1 ne ločita.

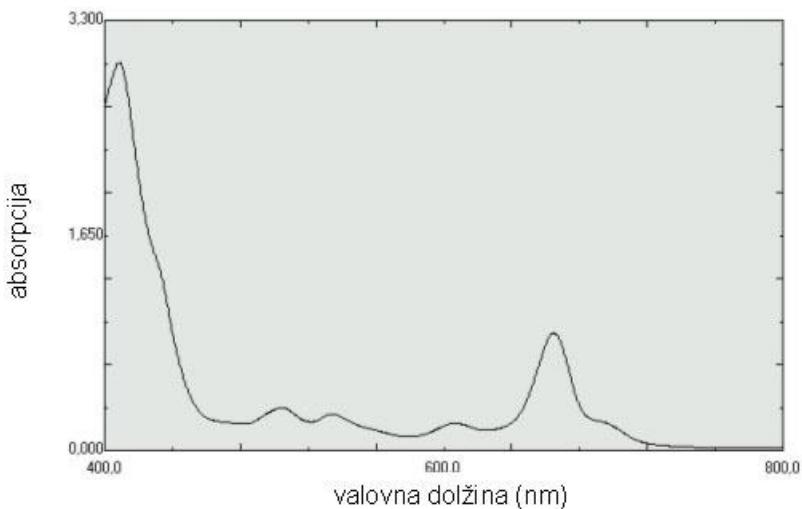
6.3. Vidna spektroskopija

Posneli smo absorpcijske spektre barvil iz vzorcev listja, nabranega v različnih časovnih obdobjih jeseni. Izmerili smo absorbanco klorofila a in klorofila b pri izbranih valovnih dolžinah svetlobe v vzorcih listov.

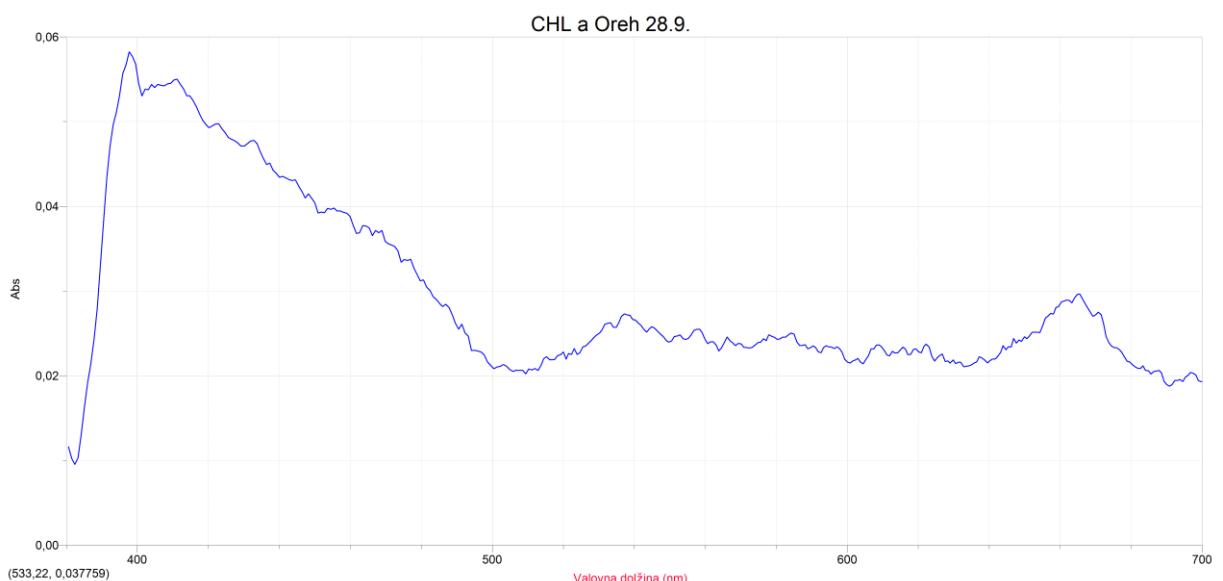
Slike prikazujeta absorpcijski spekter fotosinteznih barvil iz literature in primer absorpcijske spekture klorofila a v listih oreha, nabranih 28. 9..



Slika 29: Absorpcijski spekter fotosinteznih barvil v zelenem listju



Slika 30: Absorpcijski spekter klorofila a



Slika 31: Absorpcijski spekter klorofila a iz listja oreha, nabranega 28. 9.

Na absorpcijskem spektru klorofila a lahko vidimo absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 663 nm (absorbanca 0,028).

Za določitev vsebnosti klorofila a in klorofila b v vzorcih listja smo izmerili absorbanco in izračunali vsebnost klorofila a in klorofila b v vzorcih. Za izračun smo uporabili Beer-Lambertov zakon.

Ker smo želeli določiti maso klorofila v gramu listov, smo upoštevali:

- da merimo absorbanco klorofila a pri valovni dolžini $\lambda = 663$ nm; ε (klorofil a, 100% aceton, pri $\lambda = 663$ nm) = $78,75 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$,
- da merimo absorbanco klorofila b pri valovni dolžini $\lambda = 645$ nm; ε (klorofil b, 100% aceton, pri $\lambda = 645$ nm) = $47,00 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$,
- da smo vzorec klorofila s TLC plošče raztopili v $3,0 \text{ mL}$ acetona (V_2),
- da je to $40,0 \mu\text{L}$ vzorca (V_3) iz začetne prostornine $22,0 \text{ mL}$ (V_1), ki je vsebovala barvila iz $5,0 \text{ g}$ listja (m),
- da je molska masa klorofila a $893,5 \text{ g/mol}$, molska masa klorofila b pa $907,65 \text{ g/mol}$.

Enačba za izračun:

$$c \text{ (klorofil a)} = \frac{A_{663}}{\varepsilon \text{ (klorofil a)} \cdot l}$$

$$m \text{ (klorofil a)} = \frac{A_{663} \cdot V_2 \cdot V_1 \cdot M \text{ (klorofil a)}}{\varepsilon \text{ (klorofil a)} \cdot l \cdot V_3 \cdot m}$$

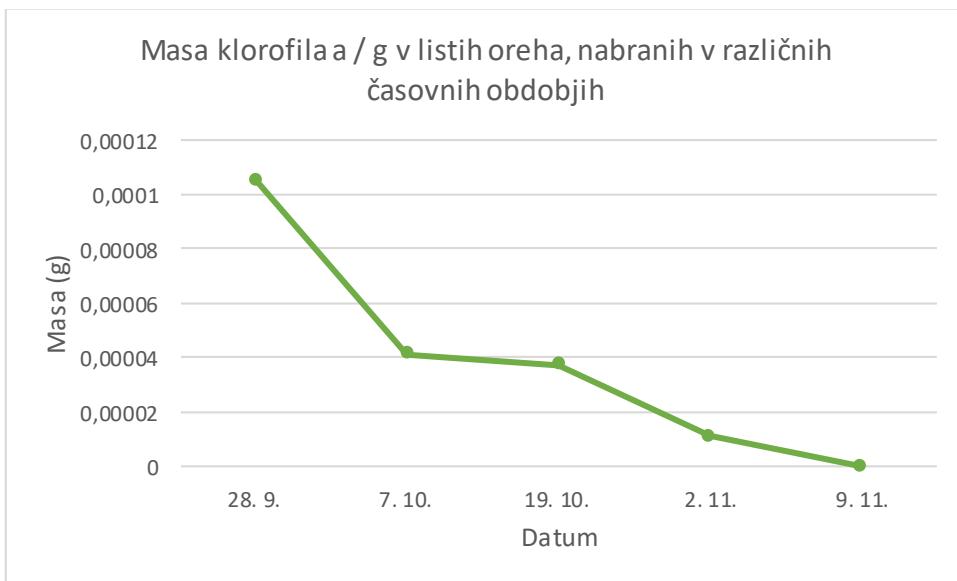
Primer izračuna za klorofil a iz listja oreha, nabranega 28. 9.

$$m \text{ (klorofil a)} = \frac{0,028 \cdot 3,0 \text{ mL} \cdot 22,0 \text{ mL} \cdot 893,5 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 0,0001}{78,75 \frac{\text{mL}}{\mu\text{molcm}} \cdot 1,0 \text{ cm} \cdot 40,0 \mu\text{L} \cdot 5,0 \text{ g}}$$

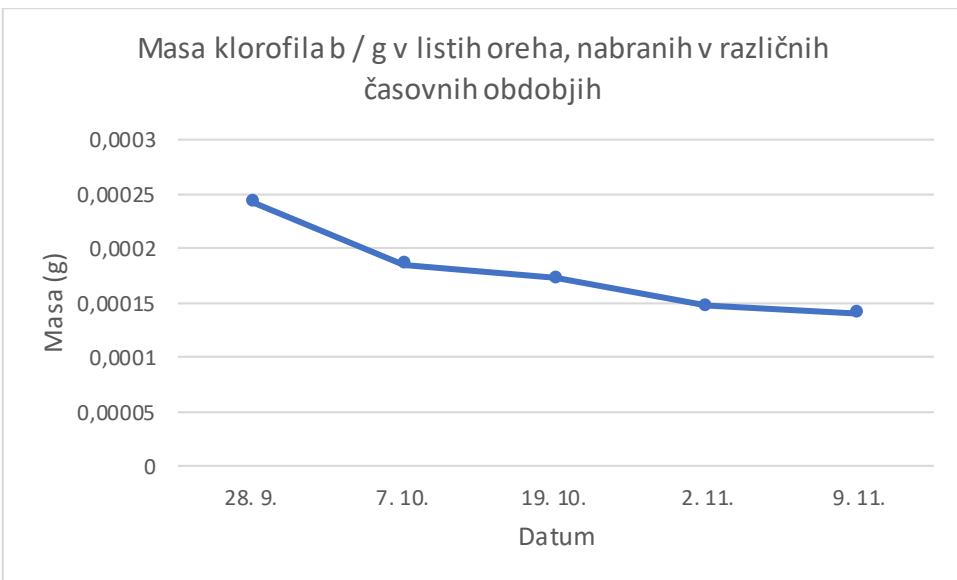
$$m \text{ (klorofil a)} = 0,000105 \text{ g}$$

Tabela 3: Absorbanca klorofila a in klorofila b, masa klorofila a oz. klorofila b /g listja – v listih oreha iz različnih časovnih obdobij, ter razmerje mas

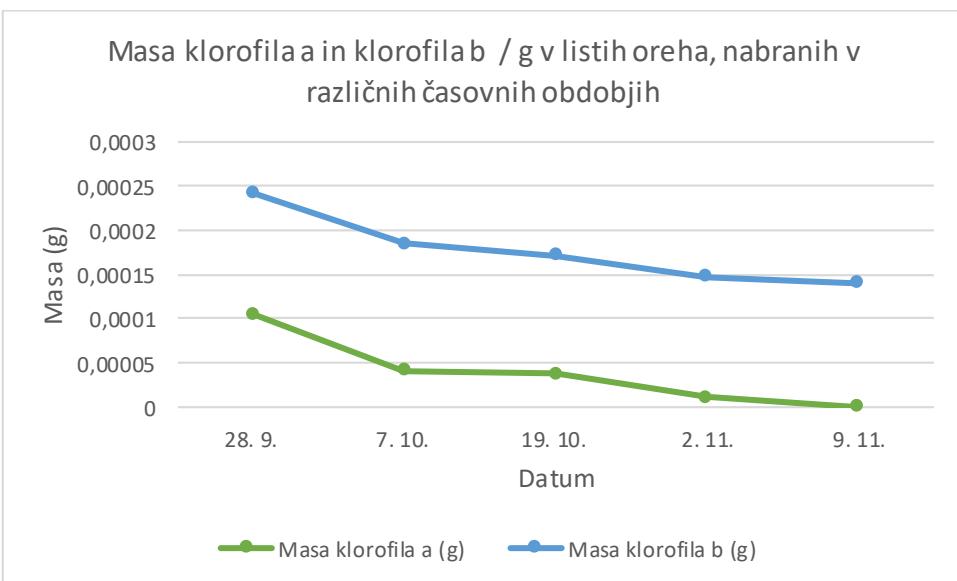
Datum	Klorofila	Absorbanca	Masa (g)	Razmerje	Opombe
28. 9.	klorofil a	0,028	$1,05 \cdot 10^{-4}$	1 / 2,31	/
	klorofil b	0,038	$2,42 \cdot 10^{-4}$		
7.10.	klorofil a	0,011	$4,12 \cdot 10^{-5}$	1/ 4,49	/
	klorofil b	0,029	$1,85 \cdot 10^{-4}$		
19. 10.	klorofil a	0,010	$3,74 \cdot 10^{-5}$	1 / 4,60	/
	klorofil b	0,027	$1,72 \cdot 10^{-4}$		
2. 11.	klorofil a	0,003	$1,12 \cdot 10^{-5}$	1 / 13,1	/
	klorofil b	0,023	$1,47 \cdot 10^{-4}$		
9. 11.	klorofil a	0,000	0	/	klorofila a ni
	klorofil b	0,022	$1,40 \cdot 10^{-4}$		



Graf 1: Spreminjanje mase klorofila a v listih oreha, nabranih v različnih časovnih obdobjih



Graf 2: Spreminjanje mase klorofila b v listih oreha, nabranih v različnih časovnih obdobjih



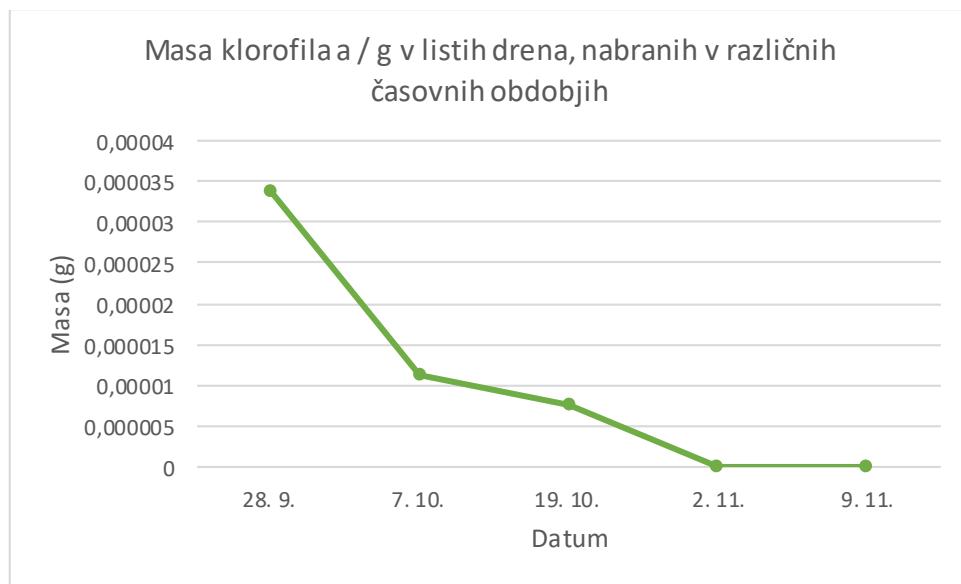
Graf 3: Primerjava spremnjanja mas klorofilov v listih oreha, nabranih v različnih časovnih obdobjih

Iz tabele 3 in grafov 1, 2, 3 ugotovimo, da količina klorofila a in klorofila b v listih oreha, nabranih v različnih časovnih obdobjih, pada. Ugotovimo, da se količina klorofilov ne zmanjšuje linearno. Največji padec v količini klorofila a je med 28. 9. in 7. 10.. Klorofila a 9. 11. v listih ni bilo več. Klorofil a se razgrajuje drugače, hitreje kot klorofil b, tako da se razmerje med obema spremeni iz klorofil a / klorofil b = 1 / 2,

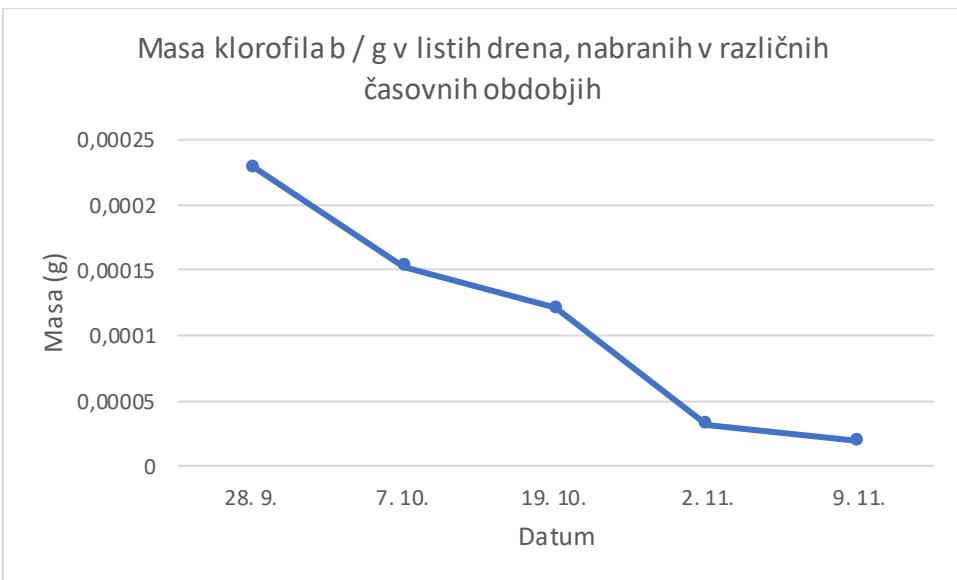
31 pri prvem nabiranju listov (28. 9.) na 1 / 13,1 pri predzadnjem nabiranju listov (2. 11.).

Tabela 4: Absorbanca klorofila a in klorofila b, masa klorofila a oz. klorofila b /g listja – v listih drena iz različnih časovnih obdobij, ter razmerje mas

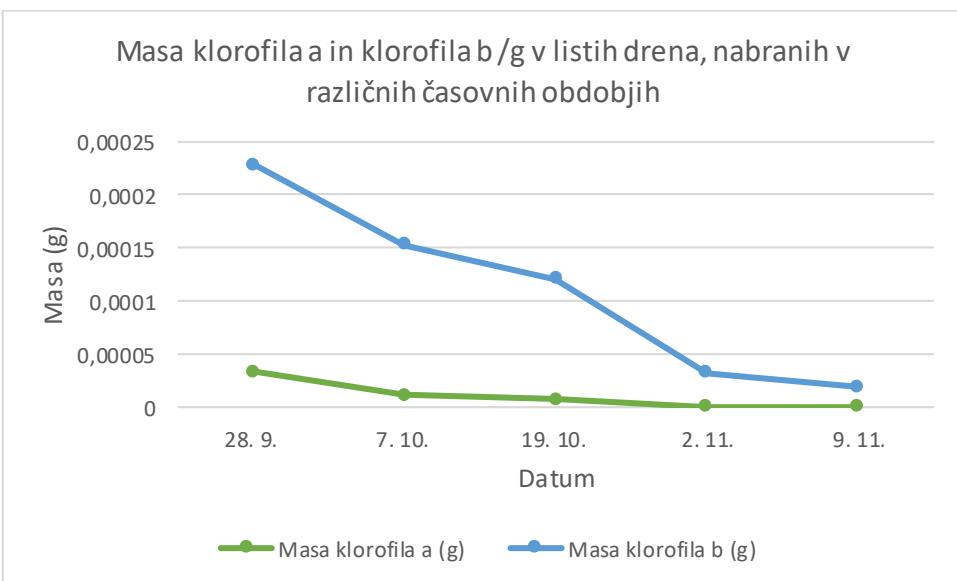
Datum	Klorofila	Absorbanca	Masa (g)	Razmerje	Opombe
28. 9.	klorofil a	0,009	$3,37 \cdot 10^{-5}$	1 / 6,81	
	klorofil b	0,036	$2,29 \cdot 10^{-4}$		
7.10.	klorofil a	0,003	$1,12 \cdot 10^{-5}$	1 / 13,7	
	klorofil b	0,024	$1,53 \cdot 10^{-4}$		
19. 10.	klorofil a	0,002	$7,49 \cdot 10^{-6}$	1 / 16,2	
	klorofil b	0,019	$1,21 \cdot 10^{-4}$		
2. 11.	klorofil a	0,000	0	/	klorofila a ni
	klorofil b	0,005	$3,19 \cdot 10^{-5}$		
9. 11.	klorofil a	0,000	0	/	klorofila a ni
	klorofil b	0,003	$1,91 \cdot 10^{-5}$		



Graf 4: Spreminjanje mase klorofila a v listih drena, nabranih v različnih časovnih obdobjih



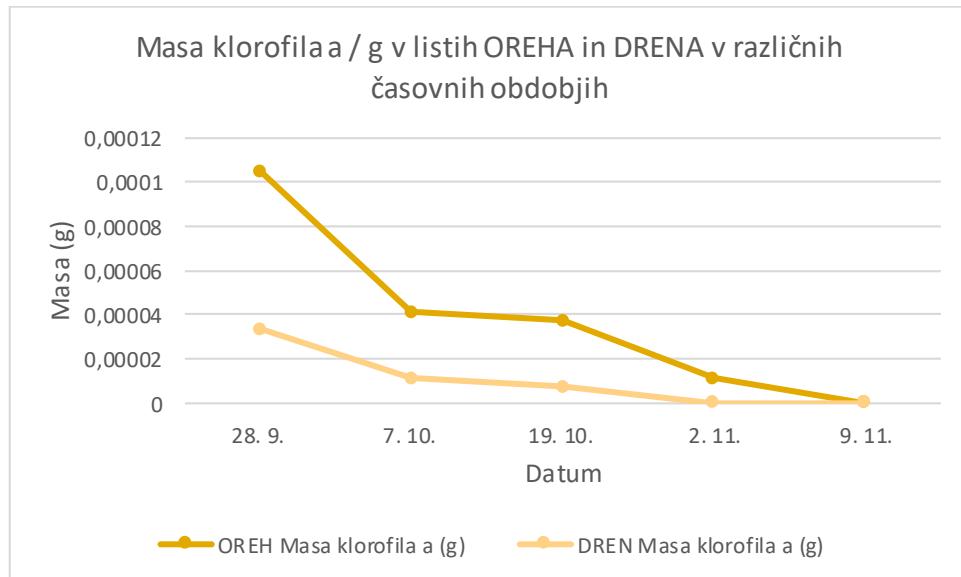
Graf 5: Spreminjanje mase klorofila b v listih drena, nabranih v različnih časovnih obdobjih



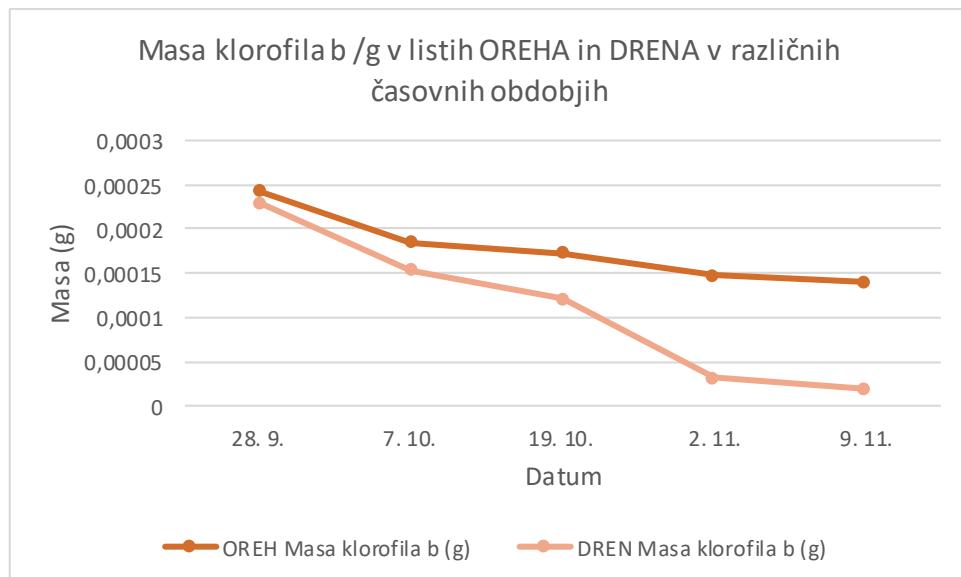
Graf 6: Spreminjanje mase klorofila a in b v listih drena, nabranih v različnih časovnih obdobjih

Iz tabele 4 in grafov 4, 5, 6 ugotovimo, da se tudi pri drenu količina klorofila a in klorofila b zmanjšuje. Zmanjševanje količine klorofilov ni linearne. Pri drenu je že ob prvem nabiranju (28. 9.) klorofila a malo (razmerje med klorofilom a in klorofilom b je 1 / 6,81. Razlika v količini klorofilov a in b se povečuje s kasnejšim nabiranjem

listov. Tudi pri listih drena se klorofil a razgrajuje hitreje kot klorofil b in ga v zadnjih dveh nabiranjih (2. 11., 9. 11.) ni več.



Graf 7: Spreminjanje mase klorofila a v listih oreha in drena, nabranih v različnih časovnih obdobjih



Graf 8: Spreminjanje mase klorofila b v listih oreha in drena, nabranih v različnih časovnih obdobjih

Iz grafov 7 in 8 ugotovimo, da se sprememjanje količine klorofilov v listih oreha razlikuje od sprememjanja količine klorofilov v listih drena. Zanimivo je, da je količina

klorofila a že ob prvem nabiranju listov (28. 9.) manjša v listih drena, medtem ko se količina klorofila b med listi oreha in drena pri prvem nabiranju ne razlikuje veliko, potem pa se klorofil b pri drenu razgrajuje hitreje.

7. Zaključek

7.1. Potrditev / zavrnitev hipotez

1. hipoteza: V listih je prisotna zmes različnih barvil, klorofila a, klorofila b, feofitina in karotenoidov.

To hipotezo lahko potrdimo. Po ekstrakciji v ustreznih topilih in tankoplastni kromatografiji smo ugotovili, da je v listih prisotnih več različnih barvil. Ugotovili smo, da so to ksantofili, klorofila a in b, karoten, feofitin.

2. hipoteza: V kasneje nabranih listih bo manjša količina prisotnih klorofilov; bolj pozno v jeseni, kot bo listje nabранo, manj bo prisotnih klorofilov.

To hipotezo lahko potrdimo. Iz meritev absorbance klorofilov in izračuna količine klorofilov ugotovimo, da količina tako klorofila a kot klorofila b v listih obeh vrst (oreha in drena) s časom nabiranja listov pada od 28. 9. do 9. 11.. Klorofila a v zadnjem vzorcu oreha ni več, pri drenu klorofila ni več v vzorcih, nabranih 2. 11. in 9. 11..

Še dodatno to hipotezo potrjuje dejstvo, da je bila v kasnejših časovnih obdobjih na kromatografski plošči vidna izrazitejša prisotnost feofitinov in veliko manjša prisotnost klorofila a in klorofila b.

3. hipoteza: Razmerje med klorofilom a in klorofilom b se ne bo spreminalo med časovno različno nabranimi vzorci.

To hipotezo zavrnemo. Z merjenjem absorbance in določitvijo razmerja med količino klorofila a in klorofila b ugotovimo, da se to razmerje med vzorci, nabranimi v različnih časovnih obdobjih, spreminja. Spreminja se v prid klorofila b, saj se v listih oreha razmerje spremeni od klorofil a / klorofil b = 1 / 2,31 (28. 9.) na klorofil a / klorofil b = 1 / 13,1 (2. 11., potem klorofila a ni).

V listih drena se razmerje obeh klorofilov spremeni od klorofil a / klorofil b = 1 / 6,81 (28. 9.) na klorofil a / klorofil b = 1 / 16,2 (19. 10., potem klorofila a ni). Najmanjše razlika je med vzorcema listov oreha, nabranega 7. 10. in 19. 10..

4. hipoteza: Če so vzorci listja nabrani v enakomerinem časovnem razmaku, bo padanje koncentracije klorofilov linearno.

To hipotezo zavrnemo. Z merjenjem absorbance in določitvijo spreminjanja količine klorofilov ugotovimo, da se njihova količina ne zmanjšuje linearno. Listov nismo nabirali v enakih časovnih razmakih, seveda je vplivov na zmanjševanje količine klorofilov veliko. Veljalo bi spremljati temperaturo in druge vremenske pojave (npr. oblačnost, padavine) ob vzorčenju.

5. hipoteza: Različni vzorci listov različnih dreves bodo imeli enakospreminjanje koncentracije klorofila a in klorofila b.

To hipotezo zavrnemo. Ko določimo spreminjanje količine klorofila a in količine klorofila b v listih oreha in drena, ugotovimo, da se količini ne spremnjata enako v obeh drevesnih vrstah.

6. hipoteza: Različni vzorci listov različnih dreves bodo imeli enako razmerje med klorofilom a in klorofilom b.

To hipotezo zavrnemo. Po določitvi razmerja med klorofiloma a in b ugotovimo, da je že v prvem vzorcu (28. 9.) med listi oreha in drena razlika, razmerje med klorofilom a in klorofilom b v orehu je klorofil a / klorofil b = 1 / 2,31, v listih drena pa klorofil a / klorofil b = 1 / 6,81, v vzorcu iz 7. 10. je razmerje med klorofilom a in klorofilom b v orehu je klorofil a / klorofil b = 1 / 4,49, v listih drena pa klorofil a / klorofil b = 1 / 13,7, v vzorci iz 19. 10. pa je razmerje med klorofilom a in klorofilom b v orehu je klorofil a / klorofil b = 1 / 4,60, v listih drena pa klorofil a / klorofil b = 1 / 16,2.

7.2. Dodatek

Zaradi situacije v letošnjem šolskem letu (karantene, bolezni, omejitve dostopa) smo vse meritve kljub dogovoru o delu na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo opravili v šolskem laboratoriju. Tako smo uporabili opremo in kemikalije, ki smo jih imeli na voljo. Glede na literaturo smo na primer spremenili

cestavo predlagane mobilne faze, namesto triklorometana smo uporabili bolj polaren diklorometan.

Primerjati bi veljalo barvila in vsebnost klorofilov v listih več različnih dreves. Tako smo imeli poleg listov oreha in drena nabrane tudi liste favorja in asimine, a nam teh vzorcev žal ni uspelo raziskati.

Ekstrakcijo, kromatografijo in merjenje absorbance bi veljalo opraviti v kratkem času. Ekstraktov barvil (kljub temu, da je bila temperatura približno 4°C in so bili zaviti v aluminijovo folijo), prav tako pa klorofilov, adsorbiranih na silikagel, ne bi pustili v hladilniku dalj kot tri dni. Za daljše časovno obdobje bi jih zamrznili. Izkazalo se je, da so po določenem času ekstrahirani klorofili kljub zaščiti razpadli.

8. Literatura

Boh, B. (1997), Barva in naravna barvila, Kemija v šoli, Letnik 9, str. 2

Boh, B.; Cvirn, T. in Ferk V. (2000). Barvila in naravna barvila. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije

Boh, B.; Cvirn, T. in Ferk, V. (2000). Barvila in naravna barvila, Delovni zvezek za izbirne vsebine kemije za gimnazije in srednje strokovne šole. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije

Cvirn T. (1999). *Prispevek k obravnavi naravnih barvil pri pouku kemije na osnovnošolskem in srednješolskem nivoju* (Diplomska naloga). Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana

Tarragó-Celada, J., Fernández Novell, J. M.. Colour, chlorophyll and chromatography, *Science in school*, Issue 47 str. 42, pridobljeno s https://www.eso.org/public/products/schools/sis_0047/ (4. 2. 2022)

Šturm. N., Laboratorijska tehnika, spletni učbenik, pridobljeno s <http://lat-2-letnik.splet.arnes.si/tankoplastna-kromatografija/> (15. 3. 2022)

Agilent Technologies, The Basics of UV-Vis Spectroscopy, pridobljeno s <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/primer-uv-vis-basics-5980-1397en-agilent.pdf> (8. 3. 2022)

Barvila:

E-učbenik, <https://eucbeniki.sio.si/kemija3/1283/index8.html> (1. 3. 2022)

E-učbenik, <https://eucbeniki.sio.si/kemija3/1283/index1.html> (1. 3. 2022)

https://www.mb.sik.si/datoteke/Knji%C5%BEenica%20s%20kav%C4%8Da/Raziskova_Ine_naloge/Barvila.pdf (1. 3. 2022)

Karoteni:

<http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Karoten> (1. 3. 2022)

<http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Karoten> (1. 3. 2022)

E<https://eucbeniki.sio.si/kemija3/1283/index3.html> (1. 3. 2022)

Fotosinteza:

https://sl.wikipedia.org/wiki/Valovna_dol%C5%BEina (1. 3. 2022)

<https://sl.wikipedia.org/wiki/Fotosinteza> (1. 3. 2022)

<https://en.wikipedia.org/wiki/Photosynthesis> (1. 3. 2022)

Ekstinkcijski koeficient klorofila a in klorofila b

Jeffrey S. W., <https://epic.awi.de/id/eprint/28828/1/Jef1997j.pdf> (11. 2. 2022)

<https://epic.awi.de>

Topnost:

<https://sl.wikipedia.org/wiki/Topnost> (15. 3. 2022)

<https://eucbeniki.sio.si/nar7/976/index3.html> (15. 3. 2022)

E-učbenik, <https://eucbeniki.sio.si/kemija1/498/index2.html> (15. 3. 2022)

Kromatografija:

<http://ijpsr.com/bft-article/an-overview-on-thin-layer-chromatography/?view=fulltext> (11. 2. 2022)

<https://www.globalresearchonline.net/journalcontents/v18-1/18.pdf>

<http://ijpsr.com/bft-article/an-overview-on-thin-layer-chromatography/?view=fulltext> (1. 3. 2022)

<https://www.globalresearchonline.net/journalcontents/v18-1/18.pdf>

https://sl.wikipedia.org/wiki/Tankoplastna_kromatografija (1. 3. 2022)

https://en.wikipedia.org/wiki/Thin-layer_chromatography (1. 3. 2022)

Ekstrakcija:

<https://sl.wikipedia.org/wiki/Ekstrakcija> (8. 3. 2022)

Spektroskopija:

<https://sl.wikipedia.org/wiki/Spektroskopija> (8. 3. 2022)

Valovna dolžina

E-učbenik, <https://eucbeniki.sio.si/nar7/1222/index4.html> (16. 3. 2022)

https://sl.wikipedia.org/wiki/Valovna_dol%C5%BEina (17. 3. 2022)

Vidni spekter:

https://sl.wikipedia.org/wiki/Vidni_spekter (15. 3. 2022)

E-učbenik, <https://eucbeniki.sio.si/kemija9/1110/index2.html> (17. 3. 2022)

Viri slik:

Slika 1: Spekter vidne svetlobe: valovna dolžina.

<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/vision/specol.html> (21. 3. 2022)

Slika 2: Spekter vidne svetlobe.

<https://svetilaled.files.wordpress.com/2013/04/svetloba.jpg> (15. 3. 2022)

Slika 3: Pot Sonca poleti in pozimi.

<http://www.pef.uni-lj.si/gorani/terenske.html#19.Spremembe> (14. 3. 2022)

Slika 4: Formuli klorofila a in klorofila b.

<https://www.scienceinschool.org/article/2019/colour-chlorophyll-and-chromatography/> (4. 2. 2022)

Slika 5: Karotenoide delimo v dve veliki skupini, karotene in ksantofile.

<https://eucbeniki.sio.si/kemija3/1284/index1.html> (4. 2. 2022)

Slika 6: Formuli β -karotena in ksantofila violaksantina.

<https://www.scienceinschool.org/article/2019/colour-chlorophyll-and-chromatography/> (4. 2. 2022)

Slika 7: Formula enega od antocianidinov, delphinidina.

<https://en.wikipedia.org/wiki/Delphinidin> (12. 3. 2022)

Slika 8: Strukturna formula heksana.

<https://www.wikiwand.com/sh/Heksan> (12. 3. 2022)

Slika 9: Strukturna formula acetona.

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acetone-displayed.png> (12. 3. 2022)

Slika 10: Strukturna formula diklorometana.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Natta_projection_of_dichloromethane.svg (12. 3. 2022)

Slika 19: Določitev retencijskega faktorja.

Honors Chemistry on line,

<https://sites.google.com/site/honorschemistryonline/unit-1-properties-of-matter/5-classification-of-matter/lab-5-chromatography> (17. 3. 2022)

Slika 29: Absorpcijski spekter fotosinteznih barvil v zelenem listju.

Tarragó-Celada, J. & Fernández Novell, J. M., Colour, chlorophyll and chromatography. Science in school, Issue stran 42,

https://www.eso.org/public/products/schools/sis_0047/ (4. 2. 2022)

Slika 30: Absorpcijski spekter klorofila a.

Pomen naravnih barvil v fizioloških procesih, http://www.kii3.ntf.uni-lj.si/ekemija/file.php/1/output/pomen_barvil/index.html (4. 2. 2022)