

บทปฏิบัติการเรื่อง PHOTOSYNTHETIC PIGMENT

จุดประสงค์ เพื่อให้ นักศึกษาสามารถแยกรงควัตถุออกจากใบพืช, บอกปริมาณของรงควัตถุบางชนิด และอธิบายการดูดแสงของรงควัตถุบางชนิดได้

บทนำ Pigment ที่เกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์แสงของพืชมีอยู่หลายชนิด อาทิ เช่น Chlorophyll-a, Chlorophyll-b, Chlorophyll-c, Chlorophyll-d, Carotene และ Xanthophyll

Pigment แต่ละชนิดมีความสามารถในการดูดแสงชนิดต่าง ๆ ได้ต่างกัน ตัวอย่างเช่น Chlorophyll-a และ Chlorophyll-b สามารถดูดแสงที่มีความยาวคลื่น 440 ถึง 460 nm. ได้ดี และ carotene จะสามารถดูดแสงที่มีความยาวคลื่นแสงระหว่าง 430 ถึง 490 nm. ได้ดี จากความสามารถเฉพาะในการดูดแสงของ pigment แต่ละชนิดนี้ เราสามารถบอกชนิด unknown pigment ได้ และเราสามารถหาปริมาณสาร Chlorophyll-a และ Chlorophyll-b ในใบพืชได้ด้วย

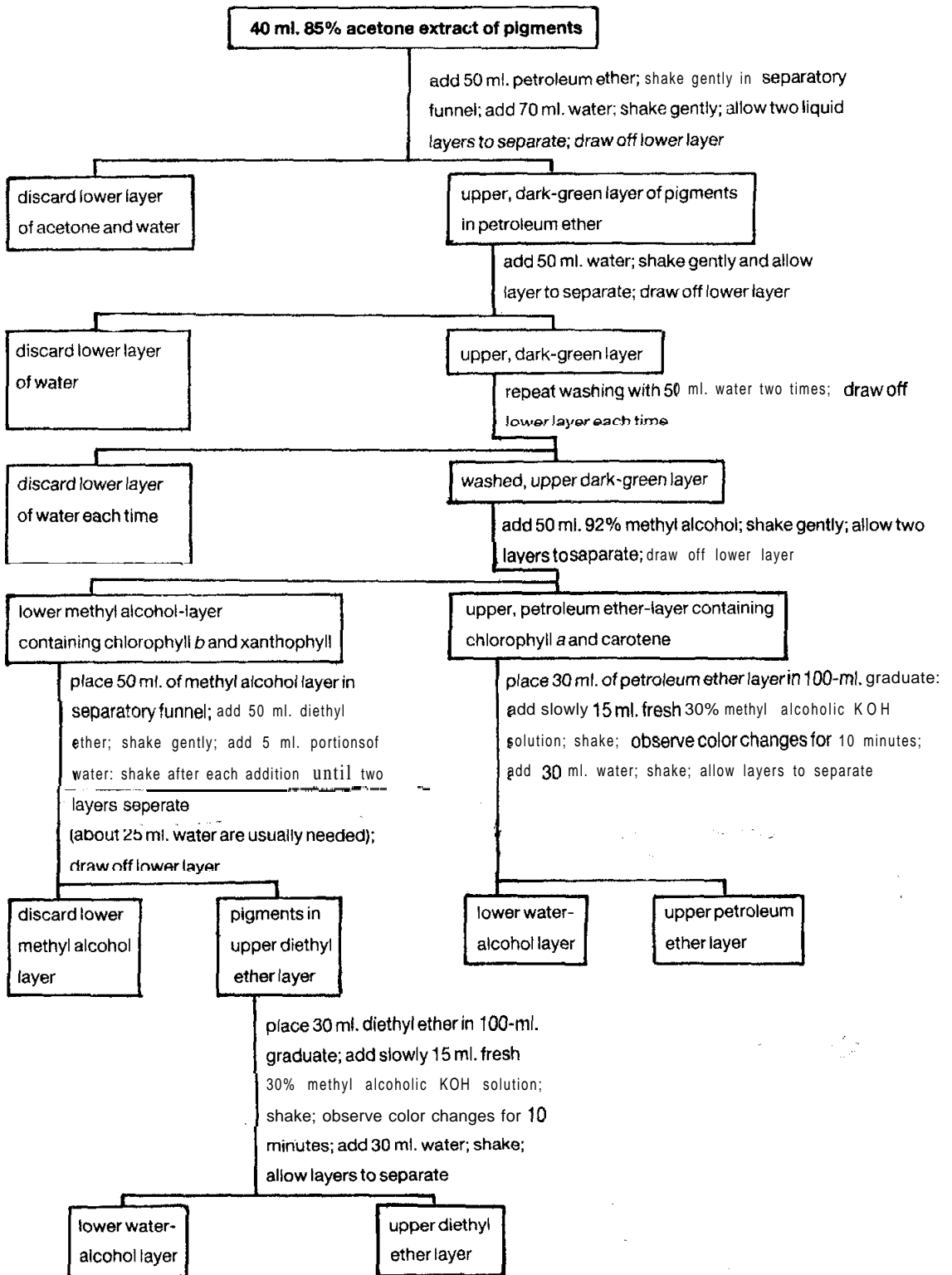
วัสดุและอุปกรณ์

1. ใบพืชสด 1 กรัม
2. มีดโกน
3. blender
4. filter flask 2.50 ml.
5. Büchner funnel
6. filter paper 1
7. Cylinder 100 ml.
8. volumatic flask 100 ml.
9. Separatory funnel 250 ml.
10. Spectrophotometer (400-700 nm)

11. vacuum pump
12. beaker 250 ml.
13. beaker 100 ml.
14. acetone 85% (V/V)
15. petroleum ether
16. methyl alcohol 92% (V/V)
17. diethyl ether
18. 30% methyl alcoholic KOH (30 gm. KOH in 70 ml. methanol)
19. distilled water

วิธีทำ

1. นำใบพืชสดมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปชั่งให้ได้น้ำหนักเท่ากับ 1 กรัม
2. นำใบพืชสดที่หั่นแล้ว 1 กรัมไปเข้าเครื่องบด โดยใช้ acetone 85% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ประมาณ 10 มิลลิลิตรใส่ลงในเครื่องบดประมาณ 2-5 นาที
3. นำของผสมไปเข้าเครื่องกรอง โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1
4. นำ filter extract ถ้ายกลงใน volumatic flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติม acetone 85% ลงไปใน volumatic flask ได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร
5. แบ่ง filter extract ออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่ง 60 มิลลิลิตร และส่วนที่สอง 40 มิลลิลิตร
6. นำ extract ส่วนที่หนึ่งไปเข้าเครื่อง spectrophotometer หา optical density (OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 644 nm. และ 663 nm. ใช้ acetone 85% เป็น blank บันทึกค่า OD ของ extract ลงในตารางที่ 1
7. หาค่า OD ของ extract ส่วนที่หนึ่ง โดยใช้ความยาวคลื่นแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm ดังนี้ 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 520, 540, 560, 580, 600, 620, 640, 650, 660, 670, 680, 690 และ 700 nm. บันทึกค่าลงในตารางที่ 2
8. นำ extract ส่วนที่สองไปแยกกรควัตถุออก ดังวิธีการแยกในหน้าต่อไป



9. ให้หาค่า OD ของ pigment extract ทั้ง 4 ชนิด โดยใช้ตัวทำละลายของ pigment extract แต่ละชนิดเป็น blank และใช้ความยาวคลื่นแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm. เช่นเดียวกับในข้อ 7 บันทึกค่า OD ของ pigment extract ลงในตารางที่ 3, 4, 5 และ 6
10. ให้สังเกตสีของ pigment extract แต่ละชนิด บันทึกลงในช่องว่างท้ายตารางที่ 3, 4, 5 และ 6

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงการดูดแสงของ pigment extract ของใบพืชสดเมื่อได้รับแสงที่มีความยาวคลื่น 644 และ 663 nm.

พืชที่ใช้ในการทดลอง.....

Wavelength of light (nm.)	optical density
844	
663	

คำนวณปริมาณ Chlorophyll-a และ -b ในใบพืชจากค่า OD ที่ได้

$$\begin{aligned}
 &1. \text{ Mg. Chlorophyll-dgm. tissue} \\
 &= 1.07 (\text{OD}_{663}) - 0.094 (\text{OD}_{644}) \\
 &= \\
 &=
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &2. \text{ Mg. Chlorophyll-b/gm. tissue} \\
 &= 1.77 (\text{OD}_{644}) - 0.280 (\text{OD}_{663}) \\
 &= \\
 &=
 \end{aligned}$$

ตารางที่ 2 แสดงการดูดแสงของ pigment extract จากใบพืชสดเมื่อได้รับแสงที่มี
คลื่นต่าง ๆ กัน

พืชที่ใช้ในการทดลอง.....

Wavelength of light (nm.)	Optical density
------------------------------	-----------------

Color of pigment extract.. ..

Identification of pigment.. ..

ละลายใน.....

ตารางที่ 3 แสดงการดูดแสงของ unknown pigment I เมื่อได้รับแสงที่มีความยาวคลื่นต่างๆ กัน

Wavelength of light (nm.)	Optical density
------------------------------	-----------------

Color of pigment extract.....

Identification of pigment.....

ละลายใน.....

ตารางที่ 4 แสดงการดูดแสงของ unknown pigment II เมื่อได้รับแสงที่มีความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน

Wavelength of light
(nm.)

Optical density

Color of pigment extract.....

Identification of pigment.....

ละลายใน.....

ตารางที่ 5 แสดงการดูดแสงของ unknown pigment III เมื่อได้รับแสงที่มีความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน

Wavelength of light
(nm.)

Optical density

Color of pigment extract

Identification of pigment

ละลายใน.....

ตารางที่ 6 แสดงการดูดแสงของ unknown pigment IV เมื่อได้รับแสงที่มีความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน

Wavelength of light (nm.)	Optical density
------------------------------	-----------------

Color of pigment extract.. ..

Identification of pigment.. ..

ละลายใน.....