

PROTOCOLLO PER LA DETERMINAZIONE CLOROFILLE E CAROTENOIDI

Porra et al.1989

- 1) Omogenare circa **0.15-0.30 g** (meglio 0.15 g) di materiale vegetale (registrare il peso esatto) a secco con una aliquota di sabbia. Aggiungere successivamente **500 μ L** per volta di **acetone 80%** (circa 3 volte per un volume totale di **1.5 mL**). Ripulire il mortaio ed il pestello con ulteriori **1 mL** di acetone all'80% e mettere anche questo nella stessa Eppendorf utilizzata in precedenza.
- 2) L'estrazione ottimale è eseguita con mortaio ghiacciato e su ghiaccio per ridurre la volatilità dell'acetone e al buio per non interferire con l'attività delle clorofilla)
- 3) Mettere l'estratto in Eppendorf e centrifugare con centrifuga da tavolo (**7000 rpm per 3'**). NB: ricordarsi di chiudere sempre bene le Eppendorf per l'alta volatilità dell'acetone.
- 4) Recuperare il surnatante con capillare e immetterlo in un cilindro graduato da 10 mL
- 5) Risospendere il pellet in acetone 80% (da 0.5 a 1 mL)
- 6) Centrifugare come sopra e ripetere i punti 3 e 4 fino a quando il pellet non sarà completamente scolorito e privo di pigmenti.
- 7) Al termine di tutti i lavaggi annotare il **volume finale** di ogni campione che è presente nel cilindro graduato da 10 mL. Questo servirà alla fine per calcolare la concentrazione delle clorofille e dei carotenoidi nel materiale vegetale di partenza.
- 8) La lettura allo spettrofotometro viene eseguita con **cuvette al quarzo** perché utilizzo l'acetone che aggredisce quelle in plastica.
 - **663 nm**: assorbimento preferenziale clorofilla *a*
 - **648 nm**: assorbimento preferenziale clorofilla *b*
 - **470 nm**: assorbimento preferenziale carotenoidi

FORMULE CALCOLO CONCENTRAZIONE (valide solo per acetone 80% come eluente)

1) **Chl a** = $12.25 * ABS_{663} - 2.55 * ABS_{648}$ ($\mu\text{g/mL}$)

2) **Chl b** = $20.31 * ABS_{648} - 4.91 * ABS_{663}$ ($\mu\text{g/mL}$)

3) **Chl a+b** = $17.76 * ABS_{648} + 7.34 * ABS_{663}$ ($\mu\text{g/mL}$)

4) **Car** = $(1000 * ABS_{470} - 1.82 * [\text{chl a}] - 85.02 * [\text{chl b}]) / 198$ ($\mu\text{g/mL}$)

ESEMPIO NUMERICO

Peso = 0.2745g **ABS₆₆₃** = 0.590 **ABS₆₄₈** = 0.274 **mL finali**: 4.1

fd = $V_f / V_{ext} = 3$

- **Chl a** = $7.2275 - 0.6987 = 7.158 \mu\text{g/mL}$ (nel sample analizzato diluito $fd=3$)
- $7.158 * fd = 21.47 \mu\text{g/mL}$ (sample originario)
- $21.47 \mu\text{g/mL} * 4.1\text{mL} = 88.03 \mu\text{g}$ (in tutto il peso iniziale preso)
- $88.03 / 0.2745 = 320.69 \mu\text{g/g FW}$