

MAŁGORZATA DŻUGAN

Zakład Chemii Ogólnej i Fizjologicznej
Wydział Biologiczno-Rolniczy Uniwersytetu Rzeszowskiego
e-mail: mdzugan@univ.rzeszow.pl

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA STABILNOŚĆ ZIELONYCH BARWNIKÓW ROŚLIN

Chlorofile, zielone barwniki roślinne, charakteryzują się dużą wrażliwością na czynniki środowiskowe, wywołujące przemiany struktury magnezo-porfirynowej i związaną z nimi zmianę barwy. Metodą spektrofotometryczną określono zawartość chlorofilu w acetonowych ekstraktach ze świeżych liści pokrzywy (240 mg/dm^3), melisy (210 mg/dm^3) oraz mięty (150 mg/dm^3). Proporcje występowania chlorofilu a i b kształtowały się na poziomie 3:1 dla pokrzywy i melisy oraz 1:1 dla mięty. Badano wpływ światła, temperatury, rodzaju rozpuszczalnika oraz obecności utrwalacza ($0,1\% \text{ CuSO}_4$) na stabilność ekstraktów chlorofilowych. Badane ekstrakty zachowywały pełną aktywność wyłącznie podczas przechowywania w temperaturze 4°C bez dostępu światła.

Słowa kluczowe: chlorofil, stabilność, czynniki środowiskowe

I. WSTĘP

Chlorofile są najbardziej rozpowszechnionymi barwnikami roślinnymi. Występują w liściach i innych eksponowanych na światło, zielonych częściach roślin. Chlorofil jest zlokalizowany w chloroplastach, gdzie występuje, obok karotenoidów, w postaci kompleksu ze specyficznym białkiem - chloroplastyną. Liście zawierają średnio około 0,25% barwników chlorofilowych, 0,03% ksantofili i 0,015% karotenów [3].

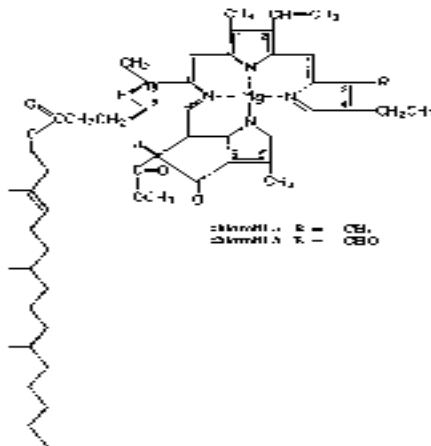
Chlorofile odgrywają bardzo ważną rolę w procesach biosyntezy zachodzących w zielonych częściach roślin. Razem z karotenoidami biorą udział w procesie absorpcji energii świetlnej i jej zamianie na energię chemiczną, wykorzystywaną w endoergicznym procesie syntezy związków organicznych z substancji prostych: CO_2 i H_2O

Chlorofile są magnezoporfirynami. Do porfiryń zaliczane są związki, których podstawowy szkielet stanowi cykliczny układ czterech pierścieni pirolowych połączonych poprzez grupy metinowe (Rys. 1). Jest to układ podobny do struktury żelazoporfirynowej występującej w hemoglobinie, cytochromie i katalazie. W centrum pierścienia porfiryнового wbudowany jest dwuwartościowy jon magnezu, połączony z atomami azotu

* *Pracę recenzowała:* dr hab. Maria Droba, prof. Uniwersytetu Rzeszowskiego

pierścieni pirolowych. Dla chlorofilu charakterystyczne jest występowanie przy skrajnych atomach węgla pierścieni pirolowych następujących podstawników: reszty kwasu propionowego zestryfikowanej 20-węglowym alkoholem terpenowym – fitolem oraz grupy karboksylowej zestryfikowanej metanolem [5].

U roślin wyższych występuje chlorofil *a* (niebieskozielony) i *b* (zielonożółty), przy czym odmiana *a* (z grupą $-\text{CH}_3$ przy C-3) jest głównym fotoreceptorem i jej zawartość w chloroplastach jest 2-4 razy wyższa niż chlorofilu *b* (z grupą $-\text{CHO}$ przy C-3). Chlorofil *a* różni się od chlorofilu *b* wyłącznie podstawnikiem przy trzecim atomie węgla (Rys. 1).



Rys. 1. Wzór strukturalny chlorofilu [1]

Fig. 1. Construction of the chlorophyll's molecule [1]

Chlorofile są uważane za najmniej trwałe barwniki roślinne. Charakterystyczną zieloną barwę zachowują tylko w żywych nieuszkodzonych tkankach. W chloroplastach są one powiązane ze specyficznymi białkami, fosfolipidami i sulfolipidami oraz z innymi składnikami i w tej formie są stabilne. Naruszenie tych natywnych struktur przez ogrzewanie, odwadnianie lub działanie rozpuszczalnikami, przyspiesza przemiany chlorofilu i powoduje zmiany barwy [5]. W czasie składowania i przetwarzania produktów roślinnych zachodzą zmiany zabarwienia, których szybkość i charakter zależą od warunków prowadzenia procesu. Do czynników przyspieszających przemiany chlorofilu zalicza się: wysoką temperaturę, kwaśne środowisko, enzymy (chlorofilazę, lipooksygenazę i lipazę) oraz tlen i światło. Kierunki przemian i barwa powstających produktów zależą w dużej mierze od pH środowiska [2,6].

Barwniki chlorofilowe łatwo ulegają rozpadowi pod wpływem kwasów i zasad, ale struktura i właściwości powstających produktów są w obydwu przypadkach różne. W środowisku kwaśnym dochodzi do wymiany jonu magnezu na dwa jony wodorowe, a w zależności od stężenia kwasu powstaje rozpuszczalna w tłuszczach, oliwkowozielona *feofityna* ($\text{pH} < 7$) lub rozpuszczalny w wodzie, pozbawiony dodatkowo fitolu brunatny *feoforbid* ($\text{pH} < 7$). W obecności zasad zachodzi hydroliza obydwu wiązań estrowych bez usunięcia magnezu – powstające w tych warunkach *chlorofiliny* zachowują charakterystyczną dla chlorofilu zieloną barwę, a ich sole potasowe i sodowe są dobrze rozpuszczalne w wodzie lub w wyniku działania

chlorofilazy tworzą się rozpuszczalne w wodzie *chlorofilidy* wolne od fitolu, ale zawierające jeszcze grupę metoksylovą [6].

Charakterystyczną właściwością chlorofilu jest możliwość łatwej wymiany jonów Mg^{2+} na jony innych metali dwuwartościowych. Efektem tych reakcji jest najczęściej zmiana barwy, np. wprowadzenie jonów Fe^{2+} daje pochodne chlorofilu o barwie szarobrunatnej a wprowadzenie do cząsteczki chlorofilu jonów Cu^{2+} lub Zn^{2+} powoduje zwiększenie stabilności naturalnej zielonej barwy. Chlorofile miedziowane charakteryzują się stabilną zieloną barwą, a miedź wbudowana w pierścień nie jest uwalniana w przewodzie pokarmowym, nie jest więc szkodliwa dla zdrowia [4].

Barwniki chlorofilowe stosuje się w przemyśle żywnościowym, farmaceutycznym i kosmetycznym, ale ich niska trwałość jest czynnikiem ograniczającym ich stosowanie. Obecnie produkuje się następujące preparaty barwników chlorofilowych:

- *Chlorofil* rozpuszczalny w tłuszczach, miedziowany i niemiedziowany, w postaci koncentratów olejowych, etanolowych lub sypkich preparatów;
- *Chlorofilina miedziowana*, rozpuszczalna w wodzie, w postaci sypkich preparatów soli sodowych lub potasowych.

Poza dużą siłą barwiącą chlorofile mają także pewne właściwości biologiczne: wykazują działanie bakteriostatyczne oraz ułatwiają regenerację uszkodzonych tkanek [8].

Celem pracy była ocena wpływu wybranych czynników na trwałość chlorofilów ekstrahowanych z liści roślin i zaprezentowanie modyfikacji stosowanej metody do warunków szkolnych.

II. MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowiły świeże liście pokrzywy (*Urtica dioica* L.), melisy (*Melissa officinalis* L.) i mięty (*Mentha arvensis* L.). W celu wyekstrahowania barwników, 2 g liści rozcierano w porcelanowym moździerzu z rozdrobnionym pumeksem i ługowano kilkakrotnie porcjami rozpuszczalnika o łącznej objętości 50 ml (stosowano 80% aceton i 96% gorący etanol).

Zawartość chlorofilu *a* i *b* w uzyskanych ekstraktach oznaczano metodą spektrofotometryczną [1]. Każdorazowo wyznaczono widmo absorpcyjne chlorofilu przy pomocy spektrofotometru Specol-11, mierząc absorbancję przy zmiennej długości fali (co 5 nm) w zakresie 350-750 nm, zerując aparat po każdej zmianie długości fali względem rozpuszczalnika. Z widma odczytywano wartości absorbancji przy długości fali 645 i 663 nm (A_{645} i A_{663}). Zawartość chlorofilu ogólnego (*C*) oraz formy *a* (C_a) i *b* (C_b) obliczano z zależności podanych przez MacKinney'a:

$$C = 20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}$$

$$C_a = 12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$$

$$C_b = 22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}$$

Stabilność ekstraktów acetonowych i metanolowych badano przechowując je w szczelnie zamkniętych butelkach z ciemnego szkła:

- na oknie (ekspozycja na światło słoneczne, zmienna temperatura 20-25°C)
- w lodówce (w ciemności, stała temperatura 4°C).

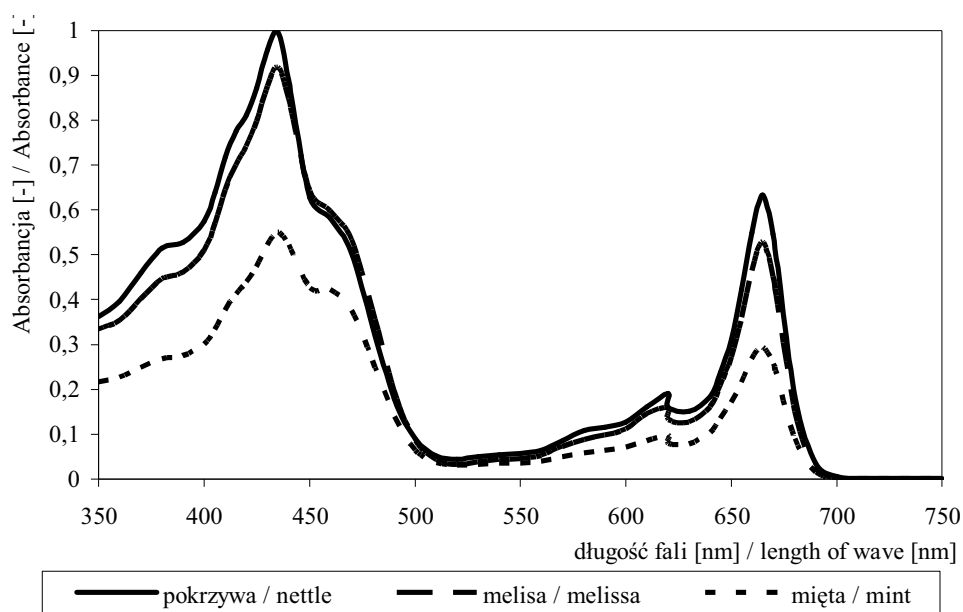
Zawartość chlorofilów badano w ekstraktach świeżych i przechowywanych j.w. przez 30, 60, 90 i 135 dni.

Wpływ jonów miedzi na stabilność barwników chlorofilowych szacowano dla ekstraktów utrwalonych dodatkiem 0,1 i 0,5% $CuSO_4$ i przechowywanych na oknie i w lodówce przez 30 dni.

III. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Ekstrakcja barwników chlorofilowych z liści badanych roślin 80% acetonem prowadziła do całkowitego wyługowania barwników, na 2g liści zużywano 50 ml rozpuszczalnika. W oparciu o wartość absorpcji 10-ciokrotnie rozcieńczonych wyciągów przy długości fali 645 i 663 nm, wyznaczoną z widma absorpcyjnego chlorofilów (Rys. 2), można posługując się zależnością MacKinney'a obliczyć zawartość chlorofilu ogółem oraz form *a* i *b* w uzyskanych ekstraktach acetonowych.

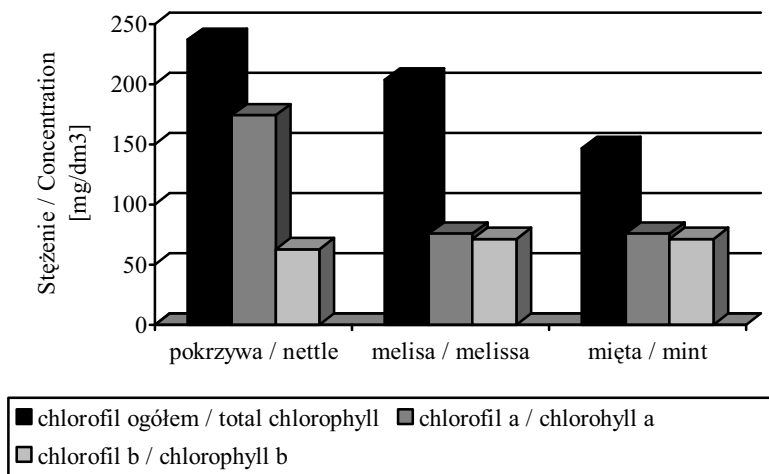
Największą zawartość chlorofilu stwierdzono w ekstrakcie z pokrzywy (240 mg/dm^3), ekstrakty z melisy i mięty zawierały odpowiednio: 210 i 150 mg/dm^3 (Rys. 3). Proporcje występowania chlorofilu *a* i *b* w liściach badanych roślin kształtowały się na poziomie 2,6:1 dla pokrzywy, 2,5:1 i dla melisy i 1,2:1 dla mięty. Przyjmuje się, że chlorofile występują w roślinach w proporcji 3:1 [5]. Uzyskane wyniki wskazują na niższą zawartość chlorofilu *a* w liściach mięty.



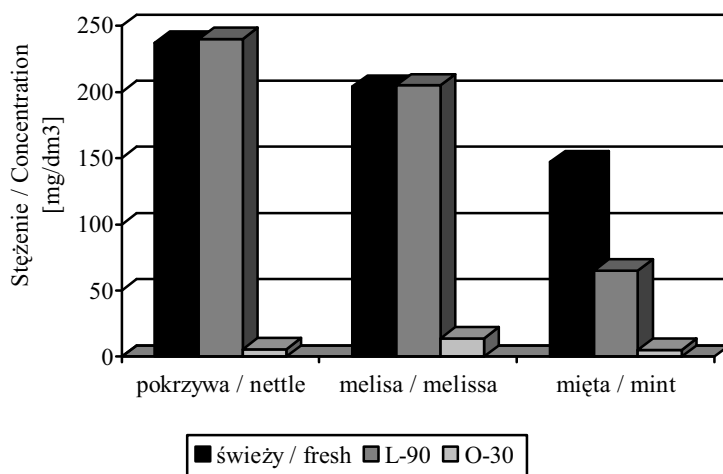
Rys. 2. Widmo absorpcyjne chlorofilów ekstrahowanych 80% acetonem

Fig.2. Absorption spectrum of chlorophylls extract in 80% acetone

Mimo zastosowania szczelnych butelek z ciemnego szkła (ograniczających działanie światła słonecznego) wszystkie ekstrakty chlorofilowe traciły zieloną barwę po 30 dniach przechowywania „na oknie” (Rys. 4). Ekstrakty przechowywane w lodówce były bardziej stabilne. W temp. 4°C i bez dostępu światła nawet po 90 dniach przechowywania, zawartość chlorofilu utrzymywała się na wysokim poziomie, niemal 100% dla pokrzywy i mięty, natomiast dla melisy obserwowano spadek około 50%.



Rys. 3. Zawartość chlorofilów w acetonowych ekstraktach z liści badanych roślin
 Fig. 3. Chlorophylls content in acetone extracts from leaves of examined plants



Rys. 4. Stabilność acetonowych ekstraktów chlorofilowych przechowywanych w lodówce przez 90 dni (L-90) i na oknie przez 30 dni (O-30)
 Fig. 4. Stability of acetone extracts of chlorophylls stored 90 days in the refrigerator (L-90) and 30 days on the window (O-30)

Chlorofile charakteryzują się dużą wrażliwością na wysoką temperaturę (nagrzewanie przez słońce) i działanie światła. Ulegają rozkładowi do pochodnych o brunatno zielonej barwie. W temperaturze 4°C i bez dostępu światła zachowują pełną aktywność.

Ekstrakcja barwników zielonych etanolem jest mało efektywna. W celu otrzymania wyciągu etanolowego o intensywnie zielonej barwie stosuje się następujące metody:

- Ekstrakcję wrzącym 96% etanolem,
- Otrzymanie stałego chlorofilu w procesie wielostopniowej ekstrakcji mieszaniną aceton:eter (1:1), następnie oczyszczanie otrzymanego wyciągu przez ekstrakcję wodą (usuwanie acetonu) i 80% metanolem (usuwanie ksantofili) a następnie wydzielanie stałego chlorofilu przez odparowanie rozpuszczalników [1].

Do ekstrakcji chlorofilu z liści pokrzywy zastosowano 96% wrzący etanol. Część tak otrzymanego wyciągu rozcieńczono wodą do stężenia etanolu 40% i obydwa przechowywano przez 30 dni w lodówce i na oknie (Tab. 1). W środowisku 96% etanolu ekstrakt zachowywał swoją barwę po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C, ale narażony na działanie światła i wyższej temperatury tracił około 50% zawartości chlorofilu. W środowisku 40% etanolu trwałość barwnika była jeszcze mniejsza, spadek poziomu chlorofilu (o 60%) występował nawet podczas przechowywania ekstraktu w lodówce.

Dodatek CuSO_4 (0,1% w/v) do ekstraktu z liścia pokrzywy w 96% etanolu zwiększał intensywność zielonej barwy wyciągu oraz jego stabilność. Po 30 dniach przechowywania ekstraktu na oknie nie stwierdzono zmian w zawartości chlorofilów. Natomiast utrwalanie siarczanem (VI) miedzi (II) nie było skuteczne w przypadku ekstraktu rozcieńczonego do 40% etanolu (Tab. 1). Utratę barwy stwierdzono nawet przy zwiększeniu stężenia utrwalacza do 0,5%.

Tabela 1 - Table 1

Stabilizacja etanolowych ekstraktów z liści pokrzywy
Stabilization of ethanol extracts of nettle's leaves

Rodzaj ekstraktu <i>Kind of extract</i>	Zawartość chlorofilu [% aktywności wyjściowej] <i>Content of chlorophyll [% of total contents]</i>		
	Świeży / Fresh	Przechowywany 30 dni <i>Kept 30 days</i>	
		w lodówce <i>in refrigerator</i>	na oknie <i>on the window</i>
96% etanol	100%	105%	50%
96% etanol+ 0.1% CuSO_4	120%	118%	130%
40% etanol	100%	40%	5%
40% etanol+0.1% CuSO_4	105%	50%	10%
40% etanol+0.5% CuSO_4	110%	45%	11%

Stosowana metoda badania stabilności barwników chlorofilowych polegała na ilościowym pomiarze zawartości barwników w ekstraktach poddawanych działaniu różnych czynników. Utrata aktywności biologicznej tych barwników na skutek zmian struktury magnezoporfirynowej, związana jest z utratą charakterystycznej zielonej barwy. W warunkach szkolnych istnieje możliwość badania wpływu różnych czynników na aktywność chlorofilu w oparciu o wizualną ocenę zmiany zabarwienia ekstraktów roślinnych. np. w celu oceny wpływu kwaśnych opadów (o różnym pH) na poziom barwników odpowiedzialnych za procesy fotosyntezy [7].

IV. LITERATURA

1. Ciszewska R., Przeszlakowska M., Sykuta A., Szynal J.: Przewodnik do ćwiczeń z biochemii. AR Lublin. s. 174-185. 1997.
2. Czapski J.: Naturalne barwniki spożywcze - kierunki rozwoju. Przemysł Spożywczy. 4. s. 16-17.1999.
3. Horubała A.: Podstawy przechowalnictwa żywności. PWN Warszawa. s. 184-219.1975.
4. Orzechowska A., Błasińska I., Jeżewska M.: Barwniki naturalne w żywności. Przemysł Spożywczy. 9. s. 275-277. 1994.
5. Sikorski Z. E. (red.): Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. WNT Warszawa. s. 399-424. 1994.
6. Sikorski Z.E. (red.): Chemia żywności. WNT Warszawa. s. 408-411. 2001.
7. Stankiewicz M., Wawrzyniak-Kulczyk M.: Poznaj-Zbadaj-Chroń środowisko w którym żyjesz. WSiP Warszawa. s. 16-26. 1997.
8. Stasiak A., Wilska-Jeszka J.: Właściwości i możliwości stosowania w przemyśle spożywczym miedziowanych i niemiedziowanych barwników chlorofilowych. Przemysł Spożywczy. 1. s. 15-17. 1993.

FACTORS INFLUENCING ON THE STABILITY OF GREEN DYES FROM PLANTS

Summary

Chlorophylls, green vegetable dyes, are characterized by a high sensitivity to environmental factors, bounded with modifications of molecule's structure and chromatotropism connected with them. The content of chlorophyll was determined using spectrophotometric method in acetone extracts of fresh leaves of nettle (240 mg/dm³), melissa (210 mg/dm³) and mints (150 mg/dm³). The proportions of occurrence of chlorophyll a and b form were on the level 3:1 for the nettle and melissa as well as 1:1 for the mint. An influence of the light, the temperature, the kind of solvent and presence of fixative (0.1% CuSO₄) was being examined to the stability of chlorophyll extracts. Tested essences kept full activity when kept in 4°C without the light only.

Key words: chlorophyll, stability, environmental factors