

Stanovenie chlorofylu v surovinách a výrobkoch potravinárskeho priemyslu

M. GRODOVSKÝ, M. HRBÁLOVÁ

Termín „nutričná hodnota“ stáva sa heslom náuky o výžive. Dávno sú preč doby, kedy sa hodnota potraviny merala rovnakým meradlom ako výhrevnosť uhlia. Zistili sme a zisťujeme jednak na vlastnej škode, jednak zásluhou výskumu o výžive, že samotné kalórie nás neuživlia. Ku cti prišli mimo základných zložiek potravín a vitamínov i vlastnosti akcesorické ako sú farba, chuť, vôňa a úprava potraviny.

Jednou z dôležitých prídavných vlastností surovín a výrobkov rastlinného pôvodu je ich farba, konkrétne u zelených výrobkov obsah a forma prítomného chlorofylu. Množstvo zachovaného chlorofylu prezrádza nám totiž genézu výrobku, jeho osudy od zberu z poľa až po sterilizáciu v plechovke.

Chlorofyl vo vyšších rastlinách je zelené farbivo veľmi podobné svojou základnou kostrou krvnému farbivu — hemoglobínu, od ktorého sa líši najmä komplexne viazaným horčíkom. Samotný chlorofyl je prítomný v rastlinách vo dvoch formách označovaných *a* a *b*, líšiacich sa pobočným reťazcom na pravom hornom kruhu.

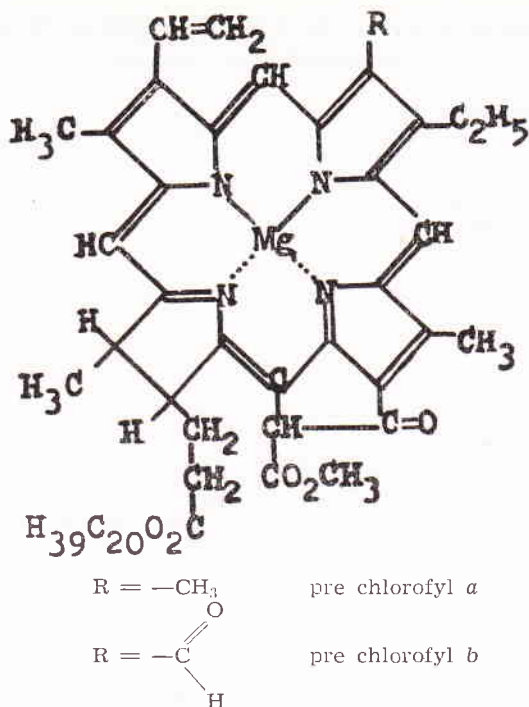
Účinkom enzýmu chlorofylázy prítomnom v niektorých rastlinách ako aj účinkom silných kyselín odštiepuje sa pobočný reťazec fytyl za vzniku chlorofylidov. Na spektrum vo viditeľnej oblasti však táto strata pobočného reťazca nemá vplyv (1, 2).

Omnoho závažnejšia je však zmena prebiehajúca už v slabo kyslom prostredí, napr. pri pH 4—5, spojená s viditeľnou zmenou farby a charakteristickým posunom maximálnej absorpcie. Táto zmena najviac zamestnávala a zamestnáva mysle potravinárskych chemikov a technologov, lebo výrazne ovplyvňuje vzhľad a tým i kvalitu zeleninových výrobkov.

Príčinou zmeny je reakcia, ktorú môžeme sumárne vyjadriť rovnicou:



Podľa tejto sumárnej rovnice mení sa zelený chlorofyl na šedivý feofytín. Štúdiu reakcie venovalo svoj um už veľa chemikov. Bude i našou snahou prispieť k problematike, najmä venovať sa kinetike konverzie chlorofylu na príslušný feofytín v závislosti od vonkajších činiteľov ako sú teplota a koncentrácia vodíkových iónov. V prvej časti tejto práce venujeme sa popisu metodiky a stanoveniu stupňa konverzie u niektorých surovín konzervárenského priemyslu.



Obr. 1.

Metodika

Príprava chlorofylu *a* a *b*

Čistý preparát chlorofylu *a* resp. *b* nie je bežne na trhu, pripravili sme si preto potrebné množstvá z rastlinného materiálu v hlavných rysoch podľa metódy popísanej Smithom a Benitezom (3).

50 g mrazeného špenátu sa v mixéri rozseká a súčasne extrahuje zmesou 200 ml acetónu a petroléru v pomere 1:1. Riedka kaša sa odsaje na nuči S-3, na ktorom je vrstva piesku kvôli lepšej filtrácii, zvyšok na filtri sa premyje acetónom, aby sa vylúžil všetok chlorofyl.

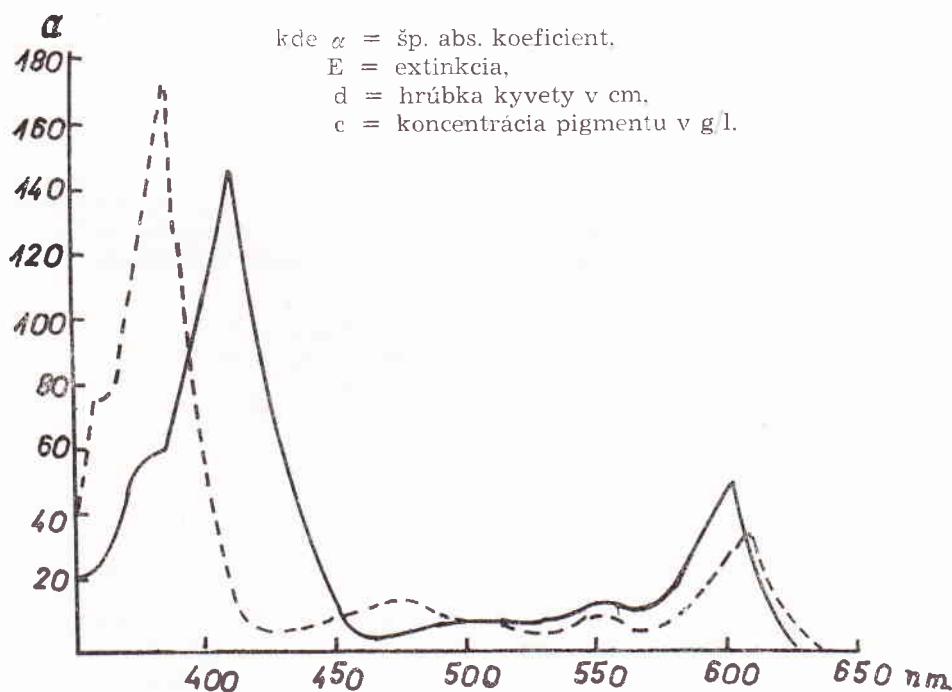
Roztok sa zbaví acetónu premývaním v deliacom lieviku, kde sa pridá ďalších 100 ml petroléru. Premýva sa nasýteným vodným roztokom uhličitanu horečnatého, najlepšie len krúživým pohybom, aby sa predišlo tvorbe emulzie. Xantofyly sa zväčša odstránia premytím petroléterového extraktu 70 % metanolom, 3 dávkami po 70 ml. Metanol sa odstráni opätovným premytím nasýteným roztokom uhličitanu horečnatého.

Chromatografická kolonka rozmerov 25×300 mm sa naplní asi do výšky 25 cm zmesou práškoveho cukru a škrobu v pomere 100:3, cukor sa predtým vysuší pri 80–100 °C po dobu 3–4 hodín. Navrch sa nasype asi 2 cm vysoká vrstva bezvodého síranu sodného. Úspech delenia závisí na správnej príprave kolonky, aby neostali vzduchové bublinky, ktoré by mohli dať vzniknúť kanálikom a tak znehodnotiť stĺpec. Kolonky možno plniť aj za mokra, u užších

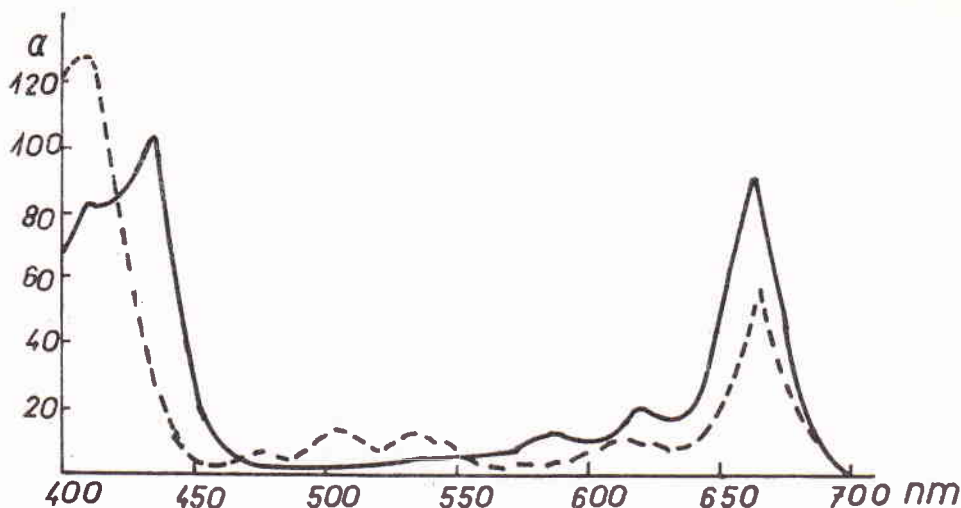
priemerov rúrok (pod 30 mm) však je rýchlejšie nasýpanie a utlačenie za sucha. V letných svetlých mesiacoch treba pracovať v chladnej a tmavšej miestnosti, prípadne kolonku chrániť tmavým obalom voči svetlu. Cez kolonku nechá sa pretekať petroleter, ktorého hladina sa musí udržiavať asi 3—5 mm nad stĺpcom a pipetou rovnomerne naniesie analyzovaný roztok, zahustený vo vákuu, na kolonku spomenutých rozmerov v množstve 0,5—1,0 ml. Stĺpec cukru po rozdelení zón olivovozeleného chlorofylu *b* od modrozeleného chlorofylu *a* sa vytlačí, zóny opatrne od seba mechanicky oddelia a eluujú acetónom. Acetónový roztok sa podrobí opäť celému postupu (vymytie, prevedenie do petroleteru atď.) aspoň dva razy, ktorým postupom sa získajú nakoniec roztoky čistých zložiek chlorofylu *a* a *b*.

Čistota preparátov sa najrýchlejšie zistí pomocou registračného spektrofotometra. Odchýlka od absorpčnej krivky získanej pomocou štandardného prípravku nám ju potvrdí alebo prezradí prítomnosť artefaktu. Zscheile a Comar (4) súdili na kontamináciu chlorofylu príslušným feofytínom podľa pomeru R_a , resp. R_b . Je to pomer špecifického absorpčného koeficientu chlorofylu v maxime červenej oblasti spektra k špecifickému absorpčnému koeficientu pri 505 (pre chlorofyl *a*), resp. 520 nm (pre chlorofyl *b*), kde majú jedno z absorpčných maxim príslušné feofytíny. Pomery nimi uvádzané sú 52,4 pre R_a , 18,9 pre R_b . Špecifický absorpčný koeficient je definovaný zlomkom

$$\alpha = \frac{E}{d \cdot c},$$



Obr. 2. Absorpčné spektrum chlorofylu *a* (plná čiara) a feofytínu *a* (prerušovaná čiara). — α — špecifický abs. koeficient, nm — vlnová dĺžka v nanometroch (10^{-9} m).



Obr. 3. Absorpčné spektrum chlorofylu b (plná čiara) a feofytínu b (prerušovaná čiara). — α — špecifický absorpčný koeficient, nm — vlnová dĺžka v nanometroch (10^{-9} m).

Stanovenie chlorofylov

Čisté preparáty chlorofylov sa použili na stanovenie absorpčných kriviek, ktoré súhlasili polohou maxim i tvarom s absorpčnými krivkami uvádzanými v lit. (3, 5). Malý rozdiel vo vlnových dĺžkach je zapríčinený nepresnosťou prístroja, resp. odchýlkou tabulovaných hodnôt od skutočných. Absorpčné krivky pre nedostatok príslušného registračného spektrofotometra sa získali na spektrofometri VSU-1 fy Carl Zeiss za použitia skleného hranola ako monochromatického zdroja a volfrámovej žiarovky.

Po prevedení chlorofylu na príslušný feofytín pôsobením niekoľkých kryštálov kyseliny šťavelovej premerali sa absorpčné krivky príslušného feofytínu. Tým sme zistili príslušné absorpčné maximá chlorofylu a príslušného feofytínu, aby sme mohli použiť rovnice odvodené Vernonom (5) na výpočet chlorofylu a a b a príslušných feofytínov.

Metodiku stanovenia chlorofylov ako aj stupňa konverzie na feofytín sme si overili na niektorých zelených surovinách, prípadne mraziarensky spracovaných výrobkoch. Spracovanie vzoriek bolo obdobné ako pri príprave vzoriek na prípravu čistých preparátov chlorofylu, samozrejme len po získaní acetónového extraktu, ktorý sa upravil tak, aby obsahoval 80 % acetónu. Najprv sa urobili merania pri príslušných vlnových dĺžkach na pôvodnej vzorke, potom pridaním pevnej kyseliny šťavelovej v prášku premenili sa chlorofyly na feofytíny a vykonali sa opäť merania pri vybraných vlnových dĺžkach. Merania sa použili na výpočet obsahu chlorofylu a a b, ako aj stupňa konverzie. Výsledky uvádza tabuľka:

Tabuľka 1

Por. čís.	Vzorka	Chlorofyl mg/100 g			Feofytín mg/100 g			% konverzie chlorofylu			Poznámka
		a	b	cel- kový	a	b	cel- kový	a	b	cel- kový	
1	Hrášok čerstvý Libichovický	9,7	4,4	14,1	1,7	1,7	3,4	14,91	27,86	19,42	
2	Hrášok čerstvý Edelperla	10,8	4,7	15,5	3,4	0,2	3,6	23,94	4,28	18,84	
3	Hrášok mrazený	9,4	4,3	13,7	1,1	0,4	1,5	10,47	8,51	9,86	
4	Špenát mrazený	40,5	21,7	62,2	21,6	9,3	30,9	34,78	30,0	33,19	
5	Fazuľka zelená maďarská	10,2	4,9	15,1	2,6	1,8	4,4	20,31	26,86	22,56	
6	Paprika Severka	8,1	5,3	13,4	2,6	4,4	7,0	24,29	45,36	34,31	tmavozelená
7	„ Kalinko	5,0	2,2	7,2	0,3	3,0	3,3	5,66	57,69	31,42	svetlejšia
8	„ PCR	1,4	1,0	2,4	0,2	0,1	0,3	12,5	9,09	11,11	svetlá zelená
9	„ Džulunská šípka	15,6	8,1	23,7	1,1	3,4	4,5	6,58	38,26	15,95	pfeferon (pálivá)
10	„ Česká ranná	3,1	1,9	5,0	1,1	2,1	3,2	26,19	52,5	39,02	
11	„ Hodonínska zelená	4,1	2,3	6,4	1,2	2,4	3,6	22,6	51,06	36,0	
12	„ Moravská ovocná	0,8	0,6	1,4	0,6	1,4	2,0	42,85	70,0	58,82	rajčinová svetlá

Diskusia

Z tabuľky vidno, že s výnimkou vzoriek č. 8 a 12 pomer chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* nemusí byť 3:1, ale môže byť i nižší, prípadne vyšší. Podobné výsledky mali i Vernon (5) a z domácich autorov Šesták (6). Rozdielny pomer pravdepodobne súvisí s vývojovým štádiom rastliny, prípadne i druhom. Na rozdiel od Vernona nezistili sme prednostnú premenu chlorofylu *a* na feofytín, percento konverzie chlorofylu *b* zdá sa nám však v niektorých prípadoch prívysoké. Možno je súvis so zjavom, ktorý pozoroval i Vernon, ovšem len v jednom prípade. Tomuto problému budeme venovať i naďalej pozornosť.

Výsledky uvádzané v tabuľke sú priemerom z výpočtov podľa rovníc 1 až 6 uvádzaných Vernonom.

Výhodou týchto rovníc je, že umožňujú stanoviť a sledovať jednotlivé komponenty zeleného farbiva a jeho konvertovanej splodiny feofytínu, čo má význam najmä pri sledovaní kinetiky konverzie v modelových roztokoch s izolovanými komponentami, i v rastlinnej tkáni, čo bude tiež predmetom ďalšej našej práce.

Súhrn

V článku je uvedený postup stanovenia jednotlivých chlorofylov (*a* a *b*), ako aj po konverzii vzniklých feofytínov. V tabuľke sú pripojené výsledky stanovenia chlorofylov v niektorých surovinách.

Literatúra

1. Schanderl S. H., Chichester C. O. a Marsh G. L., Degradation of Chlorophyll and Several Derivatives in Acid Solution. *J. Org. Chem.*, 27:3865, 1962.
2. Holt A. S. a Jacobs E. E., *Amer. J. Botany* 41:710, 1954.
3. Smith J. H. a Benitez A., *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Sv. IV., str. 144 a ď., 1955.
4. Zscheile F. P. a Comar C. L., *Botan. Gaz.* 102:463, 1941.
5. Vernon L. P., Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. *Anal. chem.*, 32:1144 — 1150, 1960.
6. Šesták Z., Ullmann J., Srovnání metod stanovení chlorofylů. *Rostlinná výroba* 10:1197 a ď., 1964.

Определение хлорофилла в сырьях и продуктах пищевой промышленности

Выводы

В статье приводится методика определения отдельных хлорофиллов (*a* и *b*), и феофитинов, возникших после конверсии. В таблице приведены результаты определения хлорофиллов в некоторых сырьях.

Bestimmung von Chlorophyll in Rohstoffen und den Erzeugnissen der Lebensmittelindustrie

Zusammenfassung

Im Artikel wird die Verfahrenstechnik einiger Chlorophylle (*a* und *b*), sowie auch nach der Konversion entstandener Pheophytine angeführt. In der Tabelle sind die Ergebnisse mit einigen Rohstoffen angegeben.