

Kinetika degradácie chlorofylu

M. GRODOVSKÝ, M. HRBÁLOVÁ

Súčasťou chlorofylovej molekuly je komplexne viazaný horčík. Molekula chlorofylu je veľmi podobná molekule hemoglobínu, obe sú stavané zo štyroch pyrolových komponent viazaných navzájom a s ústredným kovovým atómom. Zdá sa, že aj ich funkcie sú dosť podobné. Ako je hemoglobín s centrálnne viazaným železom zodpovedný za transport kyslíka a dýchanie živočíšnych tkání, tak chlorofyl zaobstaráva viazanie kyslíčnika uhličitého a fotosyntézu zelených rastlín. Venuje sa preto veľká pozornosť tak otázkam fyziologickým, so zameraním na funkciu chlorofylu pri fotosyntéze, ako tomu nasvedčuje aj nedávny úspešný pokus o totálnu syntézu chlorofylu, ako aj otázkam stanovenia jednotlivých foriem chlorofylu a otázkam kinetiky jeho chemických premien.

Medzi najdôležitejšie premeny patrí výmena horčíka za dva vodíky, ktorá prebieha najmä vplyvom vodíkových iónov, lebo má za následok nápadnú zmenu farby, a to v zmysle jej zoslabenia, prípadne zhoršenia. Otázka výmeny horčíka za vodíkové ióny má svoj praktický aj teoretický aspekt. Prvý je určený najmä výrobcami zeleninových výrobkov, ktorí používajú kyslý nálev do výrobkov, ako sú nakladané uhorky, prípadne sterilizovaný hrášok. Zo skúseností vieme, že modro-zelená farba uhoriek sa v kyslom náleve mení na svetlozelenú, prípadne v horších prípadoch až na slamovožltú. Podobne je to aj u sterilizovaného hrášku a ostatnej zeleniny.

Z teoretického hľadiska zaujíma potravinárskych chemikov kinetika premeny — degradácie, prípadne — v drastickjších podmienkach — deštrukcie chlorofylu na príslušný feofytín, alebo ešte nižší degradačný stupeň. Sleduje sa pritom najmä vplyv prostredia, ako je pH, teplota, prítomnosť kyslíka alebo iných katalyzátorov, ktoré túto premenu urýchľujú. Venuje sa pozornosť otázke, ktoré faktory by sa dali využiť na jej spomalenie alebo zastavenie. Zaujímavé je pritom i stanovenie poriadku kinetickej reakcie, ako tomu nasvedčujú práce Joslyna, Mackiney-a (1) a v poslednom čase Schanderla a i. (2).

V tejto práci chceme venovať pozornosť kinetike zmien chlorofylu v závislosti od pH a teploty.

Experimentálna časť

Chlorofyl potrebný pre modelové pokusy získal sa extrakciou listov špenátu acetónom podľa metódy Smith-Beniteza (3). Extrahované rastlinné farbivo sa

prenieslo do petroléтеру, acetón sa dôkladne vymyl a petroléterový extrakt sa po zahustení delil na stĺpci práškovej sacharózy s 3 % prídavkom škrobu.

Chromatogram sa vyvinul premývaním s petroléterom (b. v. do 60 °C) s malým prídavkom polárnejšieho rozpustidla (1—3 % acetónu, alebo izopropylalkoholu). Oddelené zóny sa znovu extrahovali a opätovne čistili chromatografickým delením, kým sa nezískali čisté komponenty — chlorofyl *a* a *b*. Zahusťovanie a chromatografia sa robili v rozptýlenom svetle, chromatografické kolonky sa chránili pred svetlom obalom z čierneho papiera.

Čistota preparátov sa overovala premeraním spektra v rozmedzí 400—700 nm.

Vyčistené pigmenty sa rozpustili v acetóne, prípadne v cyklohexanóne a uchovávali v mraziacej časti chladničiek pri cca 10—15 °C pod nulou. Alikvotné časti sa použili pre modelové pokusy.

Modelové pokusy s čistým pigmentom sa konali v otvorených skúmavkách pri definovanej teplote a pH. Pre teploty do 50 °C používal sa 80 % acetónový roztok spolu s 20 % zriedenej kyseliny soľnej, ktorej normalita bola 10^{-4} N, takže pH roztoku sa pohybovalo blízko 4. Pre teploty nad 50 °C použil sa roztok pigmentu v cyklohexanóne, okyselenom 10^{-4} N kyselinou šťavelovou. Cyklohexanón sa pred použitím trepal 1 hodinu s práškovou potašou, aby sa odstránili kyslo reagujúce prímеси (zvyšky kyseliny adipovej?).

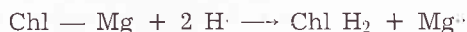
Pre zabezpečenie porovnateľnosti výsledkov premeralo sa absorpčné spektrum chlorofylov *a* a *b* rozpustených v cyklohexanóne v celom rozsahu viditeľného spektra 400—700 nm na spektrofotometri VSU-1, nezistili sa však rozdiely voči spektru v acetóne.* V rovnomerných časových úsekoch odoberali sa vzorky, v ktorých sa stanovila optická hustota a vypočítal sa podiel degradovaného pigmentu. Na výpočet sa používali rovnice odvodené Vernonom (4).

Mimo toho vykonali sa pokusy s hráškom, vlastne s hrachovým pyrénom, pripraveným zo zeleného hrášku odrody Lancet z JRD Kráľová pri Senci. Pyrén sa pripravilo zmixovaním hrášku na Pragomixe, naplnilo v množstve 10 g do sklenej skúmavky, ktorá sa po zatavení zohrievala v glycerínovom kúpeli pri teplotách 110—130 °C po rozličnú dobu.

Chlorofyl sa stanovoval v hráškovom pyrénom pred zohrievaním (základná hodnota) a po tepelnom zásahu spektrofotometricky v acetónovom eluáte. Na výpočet sa použili ako Vernonove rovnice, tak aj Dietrichove (6).

Výsledky a diskusia

Závislosti, ktoré sa zistili v modelových pokusoch s čistými komponentami *a* a *b* chlorofylu vyhovujú kinetike reakcií prvého poriadku. Hoci podľa súmárnej rovnice



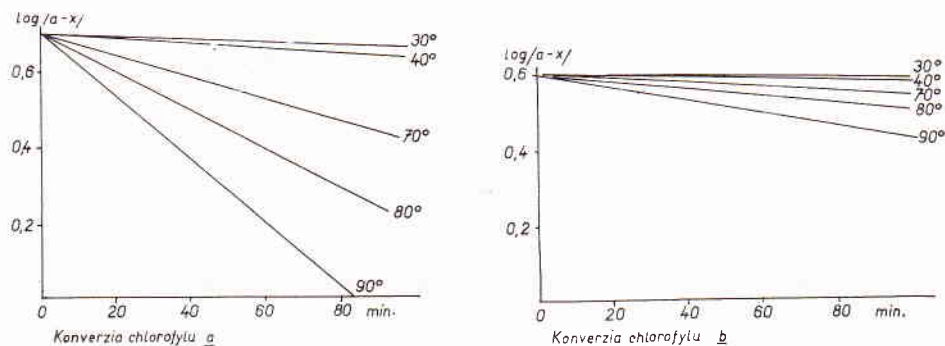
ide prinajmenej o bimolekulárnu rovnicu, priebeh je podobne ako pri inverzii sacharózy v kyslom prostredí, pseudomolekulárny. Koncentrácia H^+ iónov v našom prípade sa volila tak, aby prevyšovala koncentráciu pigmentu v roztoku najmenej 10 X. Tým sa dosiahlo, aby reakcia, ak je prípadne druhého poriadku, degenerovala na reakciu prvého poriadku.

* Získané spektrá sme uverejnili v prvej časti tejto práce (5).

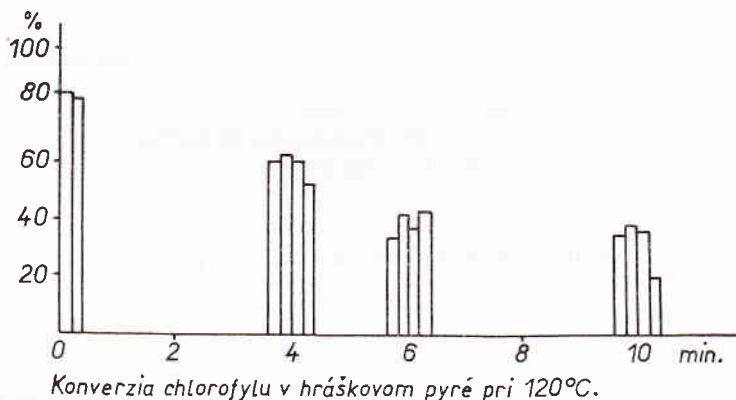
Pri sledovaní konverzie čistého pigmentu stačí stanovovať optickú hustotu len pri jednej vybranej vlnovej dĺžke. My sme tak sledovali konverziu chlorofylu *a* pri vlnovej dĺžke 432 nm a pre kontrolu aj pri 665 nm. Pre chlorofyl *b* sme vybrali vlnové dĺžky 461 nm a 649 nm.

Koncové hodnoty sa odčítali po pridaní práškovitej kyseliny šťavelovej (asi na špic noža), ktorá urýchlila totálnu konverziu na príslušný feofytín.

Grafy príslušnej závislosti konverzie od času možno vynášať aj priamo vynesением závislosti optickej hustoty od času, my sme použili v grafe 1 a 2 (konverzia chlorofylu *a* a chlorofylu *b*) závislosť $\log(a-x)$ na čase.



Graf 1.



Graf 2. Prvý stĺpček — chlorofyl *a*, druhý stĺpček — chlorofyl *b*, tretí stĺpček — celkový chlorofyl, štvrtý stĺpček — celkový chlorofyl podľa Dietricha.

Z grafov vidno nápadne rýchlejší rozpad chlorofylu *a*, približne 6 X rýchlejší ako u chlorofylu *b*, čo je v dobrej zhode aj s pozorovaniami Schanderla a spol. (2).

Pokusy so zahrievaním hráškového pyrě nedopadli tak jednoznačne. Na grafe 2 sú vynesené hodnoty získané pri sledovaní konverzie chlorofylu (celkového) v zemletom zelenom hrášku zohrievanom v zatavenej trubičke pri 120°C v glycerínovom kúpeli.

Obsah chlorofylu *a* a *b*, ako aj celkový obsah chlorofylu (prvý až tretí stĺpček

na grafe) vypočítal sa podľa rovníc Vernona (4), a to pre chlorofyl *a* ako priemer výsledku podľa rovnice 1 a 4, pre chlorofyl *b* priemer rovnice 2 a 5 a pre celkový chlorofyl z rovnice 3 a 6. Štvrtý stĺpček je vypočítaný podľa rovnice uverejnenej Dietrichom. Ako vidno, obsah chlorofylu v šiestej a 10 minúte je skoro totožný, jedine hodnota vypočítaná podľa Dietricha (6) je polovičná. Zdá sa, že sa konverzia chlorofylu po určitej dobe zastavila, v tomto prípade asi pri hodnotách okolo 40 % pôvodného množstva. Môže to byť zapríčinené väzbou chlorofylu, o ktorom vieme, že je časťou veľkého bielkovinového komplexu, tzv. chloroplastu. Táto väzba akoby pôsobila ako ochrana, prípadne nastáva rekombinácia chlorofylovej molekuly. Otázka si vyžaduje ďalšie práce na objasnenie. Môže tu spolupôsobiť aj fakt, že sa zohrievanie konalo v uzavretom priestore bez prídavku kyseliny. Podobné výsledky ako s hráškovým pyrénom sa získali aj pri zohrievaní špenátu na teploty 110–130 °C.

Z á v e r

Sledovala sa konverzia chlorofylu *a* a *b* v modelových pokusoch v závislosti od pH a teploty (30–90 °C). Pri nadbytku H⁺ iónov reakcia prebieha podľa prvého poriadku. Pri zohrievaní biologického materiálu (hráškové pyrém, špenát) v zatavenej ampule pri teplotách 110–130 °C sa zdá, akoby sa reakcia po určitom čase zastavila.

L i t e r á t ú r a

1. Joslyn M. A. a Mackiney G., J. Am. Chem. Society **60**, 1132 (1938)
2. Schanderl S. H., Chichester C. O. a Marsh G. L., J. Org. Chem., **27**, 3865 (1962)
3. Smith J. H. a Benitez A., Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Sv. IV, 144 (1955)
4. Vernon L. P., Anal. Chemistry **32**, 1144 (1960)
5. Grodovský M. a Hrbáľová M., Bulletin V., 23 (1966)
6. Dietrich W. C., Food Technology 12, 428 (1958).

Кинетика деградации хлорофилла

Выводы

Авторы исследовали конверсию хлорофилла *a* и *b* в модельных опытах в зависимости от pH и температуры (30 — 90 °C). При избытке H⁺ ионов реакция подчиняется реакциям 1 — го порядка. При подогреве биологического материала (пюре из горошка, шпинат) в закупоренной ампуле при температуре 110 — 130 °C, кажется, как бы реакция после определенного времени прекратилась.

Kinetics of the Chlorophyll Degradation

Summary

There has been studied how dependent on pH and the temperature (30–90 °C) is the conversion of the chlorophyll *a* and *b* in the model experiments. At the surplus of H⁺ ions the reaction runs along the first order. By heating the biological material (pea purée, spinach) in the sealed vial at the temperatures of 110 to 130 °C it seems that the reaction discontinued after a definite time.