

Prírodné farbivá. III. Chlorofyly

ALEXANDER PRÍBELA—MÁRIA TAKÁCSOVÁ

Súhrn. Prezentujú sa poznatky o chemických, fyzikálnochemických a technologických vlastnostiach chlorofylov a ich derivátov. Zmeny primárnych pigmentov sú ovplyvnené rôznymi podmienkami, najmä vysokou teplotou, pH prostredím a prítomnosťou kovových zložiek potravín. V procese technologického spracovania sa môžu vytvárať z chlorofylov feofytíny, chlorofylidy a feoforbidy, ktoré menia farbu výsledného odtieňa výrobku. Na sledovanie chlorofylov sa používajú najmä spektrofotometrické metódy, zriedkavejšie fluorimetrické metódy. Rozdelenie jednotlivých zelených pigmentov sa urobí chromatografickými technikami.

Chlorofyl predstavuje významnú farebnú zložku niektorých druhov spracúvaného ovocia a zeleniny. Vzhľadom na to, že zelená farba týchto produktov sa má čo najviac zachovať počas spracovania a skladovania, musí sa technologickým operáciám venovať potrebná pozornosť. Tento problém sa stáva aktuálnym najmä v súvislosti so spracovaním niektorých zelených, nedozretých plodov pri mechanizovanom zbere týchto plodín (rajčiny, paprika). Ak sa má riešiť problém bezstratového zberu, potom sa hľadajú cesty optimálneho zužitkovania týchto nezrelých plodov. Pozornosť treba venovať i spracovaniu špenátu, keďže jeho farba pri zmrazení je ukazovateľom úrovne výroby.

Technologické operácie väčšinou vplyvajú na obsah chloryfyly tým, že v dôsledku tepelných zásahov, vplyvom aktivity enzýmu chlorofylázy, ako aj v dôsledku úpravy pH prostredia dochádza k zmenám týchto základných pigmentov. Na objektívne hodnotenie farby surových, prípadne spracúvaných konzervárskych surovín sa využívajú najmä najmä spektrálne metódy, ktorými možno posúdiť vplyvy technologických operácií a skladovania na farbu finálnych produktov.

Prof. Ing. Alexander Pribela, DrSc., Ing. Mária Takácsová, CSc., Katedra sacharidov a konzervácie potravín, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Fyzikálnochemické vlastnosti chlorofylových pigmentov

Farebnosť plodov spôsobuje prítomnosť mnohých pigmentov, z nich významné postavenie majú zelené pigmenty, najmä chlorofyly, vyskytujúce sa v chloroplastoch. Funkcia chlorofylov ako katalyzátora asimilácie CO_2 je predovšetkým v premene svetelnej energie na chemickú, pričom sa z jednoduchých zložiek syntetizujú zložitejšie chemické látky. Z potravinárskeho hľadiska považujeme aj chlorofyly a ich deriváty za významnú senzorickú zložku, pretože dodáva výrobkom určitú charakteristickú farbu.

Chlorofyly sa považujú za zelený asimilačný pigment. In vivo sú chlorofyly viazané na zložitý lipoproteínový komplex s priemernou molekulovou hmotnosťou okolo 200 000. Lipoproteínový komplex chlorofylov obsahuje priemerne 20,2 % rozpustných a 48,7 % nerozpustných bielkovín. Z 30 % lipidov rozpustných v éteri je 10 % zmydelniteľných a 20 % nezmydelniteľných. Roztoky chlorofylov v organických rozpúšťadlách sa vyznačujú brilantnou červenou fluorescenciou, ktorá sa často využíva na ich charakterizáciu. Lipoproteínový komplex je pomerne labilný a už pri extrakcii organickými rozpúšťadlami sa rozrušuje. Táto zmena komplexu sa prejavuje potom i v zmene spektra. Maximum v červenej časti oblasti spektra sa posúva ku kratším alebo dlhším vlnovým dĺžkam podľa použitého rozpúšťadla. Časté diferencie zistené pri meraní absorpčných maxim pigmentov sú ešte stále predmetom diskusie, keďže veľmi často ide o komplikované, navzájom sa ovplyvňujúce vzťahy.

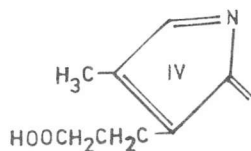
V etiolovaných rastlinách vzniká ako prekursor chlorofylu protochlorofylid, ktorý má maximum absorpcie v oblasti 635–650 nm. Po osvetlení takýchto rastlín dochádza v priebehu niekoľkých milisekúnd až sekúnd (0,005–30 s) k fotoreprodukcii protochlorofylidu na chlorofylid. Túto zmenu (pozorovanú napr. na etiolovaných listoch fazule) sprevádza v pomerne dobrej časovej zhode premena parakryštalickej prolamelárnej štruktúry chloroplastu na voľne rozloženú tvorbu vezikúl [1].

Absorpčné maximum okolo 650 nm reprezentuje proteínový komplex protochlorofylidu (holochróm). Po osvetlení sa protochlorofylid redukuje na chlorofylid.

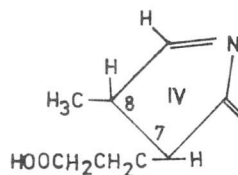
Premena protochlorofylidu na chlorofylid sa vyvoláva pôsobením svetelnej energie na dvojité väzbu pyrolového jadra v polohe 7,8, čím sa dvojitá väzba nasýti.

Vzniknutý chlorofylid sa ďalej esterifikuje fytolom za vzniku molekuly chlorofylu. Rýchlosť reakcie esterifikácie závisí od osvetlenia, avšak prebieha i v tme.

Chlorofyly patria do skupiny biologických pigmentov charakterizovaných pyrolovými jadrami. Z chemického hľadiska sú to zlúčeniny indiferentnej povahy. V suchom stave je to tmavozelený prášok s kovovým leskom, jeho etanolový



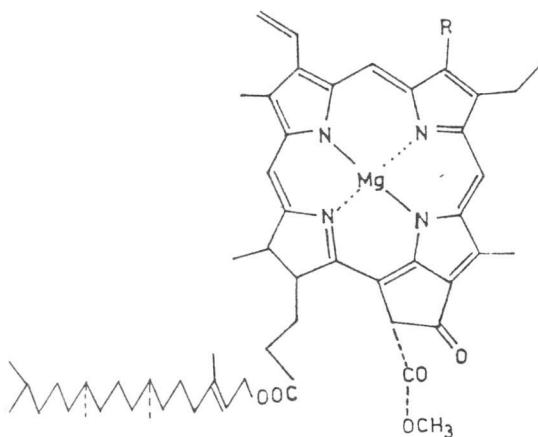
protochlorofylid
protochlorophyllide



chlorofylid
chlorophyllide

roztok je modrozelený. Chlorofyl je uložený v chloroplastoch, viazaný na bielkovinu. V porfyrínovom jadre obsahuje chelátovo viazaný dvojmocný horčík. Horčík je v molekule viazaný kovalentnými i koordinačne kovalentnými, pomerne labilnými väzbami. Jeho väzba nemá iónový charakter. V molekule chlorofylu sú tri karboxylové skupiny, z nich dve sú esterifikované (fytolom a metanolom) a tretia je viazaná na laktónový kruh. Prítomnosť štyroch dusíkových atómov, z nich dva sú viazané na horčík, je príčinou hydrofilného charakteru porfyrínového jadra.

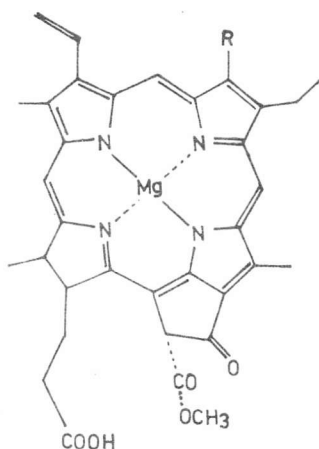
Nepatrným rozdielom v usporiadaní atómov na druhom pyrolovom kruhu sa molekuly od seba líšia a označujeme ich ako chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. Štruktúrny vzorec chlorofylu *a* má v polohe 3c druhého pyrolového jadra metylovú skupinu, chlorofyl *b* má namiesto metylovej skupiny addehydickú skupinu.



chlorofyl *a*, R—CH₃ (modrozelený)
chlorofyl *b*, R—COH (žltozelený)
chlorophyll *a*, R—CH₃ (blue-green)
chlorophyll *b*, R—COH (yellow-green)

V chloroplastoch rastlín sa okrem chlorofylu *a* a chlorofylu *b* našli ešte formy, označené ako chlorofyl *c* a chlorofyl *d*. Chlorofyl *a* sa vyskytuje vo všetkých zelených rastlinách, zatiaľ čo ostatné formy chlorofylu sú zastúpené len sporadicky. Uvádza sa, že pomer chlorofylu *a* k chlorofylu *b* je okolo 2 : 4 [2].

Zo štruktúrneho vzorca vidno, že ide o diester kyseliny dikarboxylovej a dvoch alkoholov, metanolu a vysokomolekulárneho nenasýteného alkoholu — fytolu. Práve prítomnosť fytolu dáva chlorofylom lipoidné vlastnosti, prejavujúce sa v rozpustnosti chlorofylov v lipofilných rozpúšťadlách. Esterickú väzbu medzi karboxylovou skupinou chlorofylovej molekuly a alkoholickou skupinou (fytolu) rozrušuje enzým chlorofyláza za vzniku chlorofylidov. Chlorofyláza sa líši od ostatných enzýmov tým, že pôsobí aj v koncentrovaných alkoholových roztokoch. Chlorofyly svojou štruktúrou pripomínajú niektoré dôležité enzýmy (napr. peroxidázu, katalázu) a živočíšne farbivo hem.



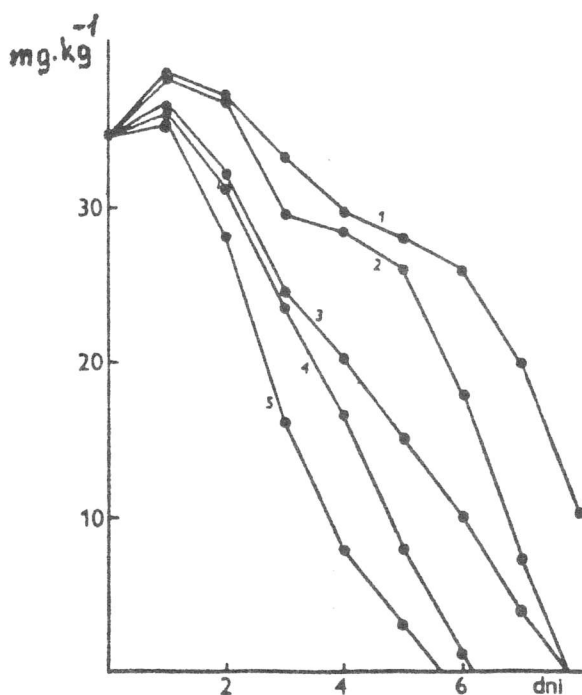
chlorofylid *a*, R—CH₃
 chlorofylid *b*, R—COH
 chlorophyllide

Zmeny chlorofylov počas skladovania surovín

Štúdium zmien chlorofylu a jeho derivátov všeobecne je veľmi rozšírené. Veľká pozornosť sa tomuto problému venuje z hľadiska produkcie hmoty, ktorá sa potom rôznym spôsobom využíva v poľnohospodárskom alebo v potravinárskom priemysle. Oveľa menej konkrétnych údajov sme našli o zmenách chlorofylov počas skladovania konzervárskych surovín, či už ide o krátkodobé skladovanie pred spracovaním, alebo dlhodobé skladovanie trvanlivých druhov ovo-

cia a zeleniny. Všeobecne platí, že pri zrení plodov a pri skladovaní dochádza k odbúravaní chlorofylov. Aby však tento proces nastal, je potrebná určitá minimálna teplota. Ak teplota mikroklimy neprekročí 10 °C, tak napr. rajčiny ostávajú zelené a zmeny chlorofylov sú zanedbateľné.

Vplyv žiarenia pri rôznych vlnových dĺžkach na rozpad chlorofylu v rajčinách študoval Jen [3] (obr. 1). Na rajčiny sa pôsobilo svetlom s rovnakou vyžarovanou energiou pri 650, 570, 500 nm. Najvyšší rozpad chlorofylu sa dosiahol pri červenom svetle, konkrétne pri vlnovej dĺžke 650 nm. V porovnaní s neožiarenými rajčinami bol rozpad výraznejší v ožiarených vzorkách. Vcelku sa nepozorovala zmena pomeru množstva chlorofylu *a* k chlorofylu *b*.



Obr. 1. Degradácia chlorofylu v zelených rajčinách ožiarených rôznymi druhmi svetla [3].

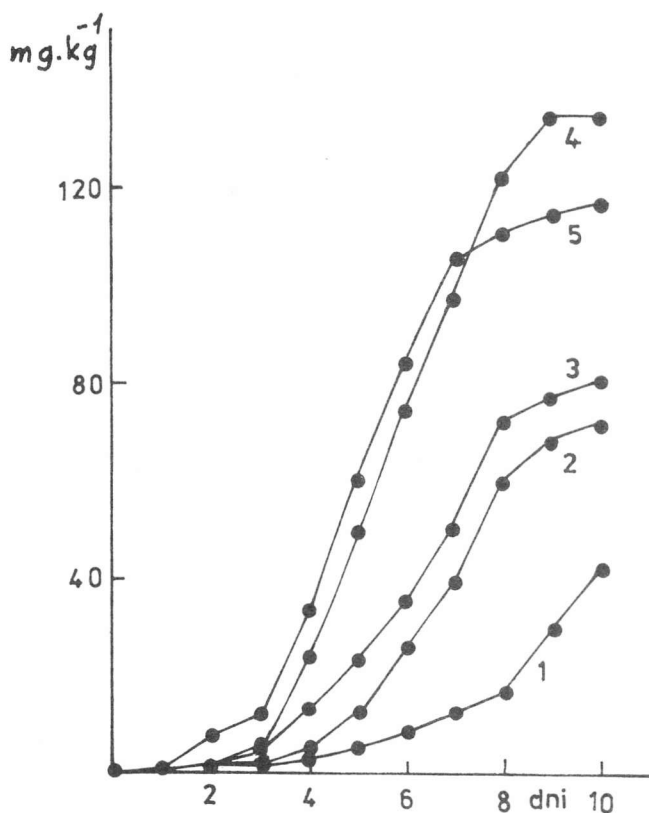
1 — tmavé, 2 — zelené, 3 — biele, 4 — modré, 5 — červené.

Fig. 1. Chlorophyll degradation in green tomatoes irradiated by the sources with various wavelength characteristics. x-axis — days, y-axis — chlorophyll concentration. 1 — dark, 2 — green, 3 — white, 4 — blue, 5 — red.

Súčasne so svetelnou degradáciou chlorofylov vzrastal obsah karotenoidov, ako to vyplýva z obr. 2. Z priebehu tvorby karotenoidov v závislosti od času ožiarenia vidno, že najrýchlejšie sa tvorili karotenoidy po ožiarení rajčín červe-

ným a modrým svetlom, zatiaľ čo biele, zelené a tmavé svetlo sa prejavilo pomalšou tvorbou karotenoidov.

Skladovaním štyroch druhov zeleniny (sladká paprika, petržlen, mrkva, pór) pri teplote miestnosti a pri zníženej teplote počas deviatich dní sa zistilo, že pri nižšej teplote sa farba sladkej papriky a mrkvy podstatne nezmenila. Podobná situácia bola s paprikou skladovanou pri 20 °C. Výrazný úbytok chlorofylu nastal v petržlene skladovanom pri nízkej a izbovej teplote [4]. Aj nesprávnym skladovaním mrazenej zelenej fazuľky sa podstatne zvýšili straty chlorofylu oproti správne skladovaným [5].



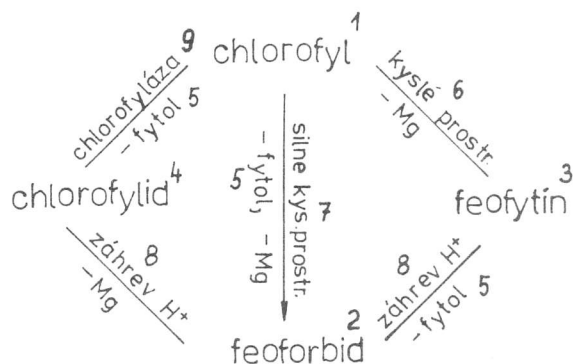
Obr. 2. Syntéza karotenoidov v zelených rajčinách po osvetlení rôznymi druhmi svetla [3].

1 — tmavé, 2 — zelené, 3 — biele, 4 — modré, 5 — červené.

Fig. 2. Carotenoids synthesis in green tomatoes after irradiation by the sources with various wavelength characteristics. x-axis — days, y-axis — carotenoids content. For 1—5 see explantation in Fig. 1.

Vplyv technologických operácií na obsah chlorofylových farbív

Obsah chlorofylových farbív sa sleduje najčastejšie v konzervárenskom priemysle pri tepelnom spracovaní zeleniny obsahujúcej chlorofyly. Chlorofyly sú veľmi citlivé na teplotu predovšetkým v kyslom prostredí, keď sa pri zohrevení jeho molekuly veľmi rýchlo uvoľní horčík, ktorý sa nahradí vodíkom, pričom vznikne feofytín [6]. Výrobky s vyšším obsahom feofytínu strácajú typickú tmavozelenú farbu čerstvej zeleniny. Zmeny chlorofylu sú zrejmé z obr. 3.



Obr. 3. Schéma zmien chlorofylu vplyvom kyselín, zohrevu a chlorofylázy.

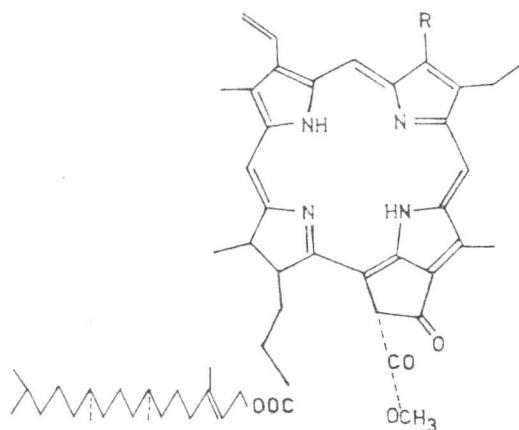
Fig. 3. Chlorophyll changes diagram due to the presence of acids, heating and chlorophyllase.

¹Chlorophyll, ²Pheophorbide, ³Pheophytine, ⁴Chlorophyllide, ⁵Phytol, ⁶Acid medium ⁷Strongly acid medium, ⁸Heating, ⁹Chlorophyllase.

Okrem teploty a pH prostredia je dôležitou podmienkou pre tvorbu feofytínov dĺžka zahrievania produktu. Štúdiom rýchlosti feofytinizácie sa dospelo k záveru, že ide o reakciu prvého poriadku. Pre zachovanie zelenej farby plodov sa preto odporúča použiť vysokú teplotu pôsobiacu krátky čas, a pokiaľ to technologické podmienky dovoľujú, zvýšiť pH na hodnotu 6 až 7 [7, 8].

Na zlepšenie chlorofylovej stálosti v zelenej fazuľke sa odporúča pH prostredia upraviť zmesou MgCO_3 a $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ na 6,1. Takto sa stabilita chlorofylov zvýšila až o 20 % oproti pokusu, kde pH nebolo upravené uvedenými látkami. Bez pridania MgCO_3 a $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ sa zachovalo iba 46 % z pôvodného obsahu chlorofylov [9].

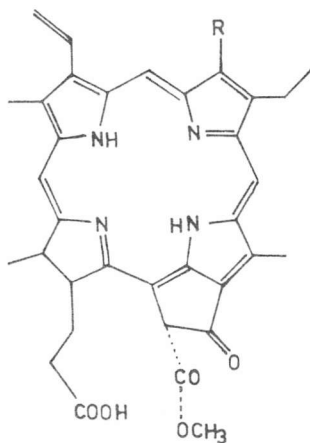
Vplyv teploty na zmenu chlorofylov v špenáte sledovali Tan a Francis [10], ktorí zistili, že pri zvýšenej teplote sa rýchlejšie rozkladá chlorofyl *a* ako chlorofyl *b*. S rovnakým výsledkom sa tieto otázky študovali v práci [7]. Sterilizáciou uhoriek a jej vplyvom na obsah chlorofylov sa zaoberá práca [11]. Zistilo sa, že pri teplote 80 °C počas 20 min sa obsah chlorofylov v sterilizovaných uhorkách v plastických obaloch znížil o 33 %.



feofytín *a*, R—CH₃
 feofytín *b*, R—COH
 pheophytine

Vplyv rôznych spôsobov sterilizácie na obsah chlorofylov v hrášku sa ukázal zaujímavý v tom, že pri blanširovaní pri 96 °C 5 min klesol pôvodný obsah chlorofylov na 91 %, pri teplote 100 °C za 15 min na 77 % a pri predĺžení času na 45 min na 57 %. Pri sterilizácii pri 121 °C bol pokles obsahu chlorofylov ešte vyšší, a to pri stacionárnej sterilizácii 59 % a pri rotačnej sterilizácii 64 % [12]. Nezistili sa podstatnejšie rozdiely medzi stratami chlorofylu *a* a chlorofylu *b*.

Najdôležitejší vplyv sa javí počas zahrievania, pretože jeho predĺžovaním sa



feoforbíd *a*, R—CH₃
 feoforbíd *b*, R—COH
 pheophorbide

straty chlorofylov zvyšujú exponenciálne. Dlhodobým pôsobením tepla a kyslého prostredia dochádza k odštiepeniu ftylovej skupiny za vzniku feoforbido. Feoforbidy na rozdiel od feofytínov majú tmavšie zelené sfarbenie.

Farba chlorofylu sa stabilizuje v prítomnosti meďnatých iónov, keď dochádza k výmene horčika za meďnatý kation. Týmto spôsobom sa v minulosti vyfarbovali plody ringlôt. Dnes je farbenie meďou zakázané, vzhľadom na negatívne vlastnosti meďi ako katalyzátora oxidácie najmä kyseliny askorbovej. Pokiaľ je meď viazaná do komplexu, celkove sa neprejavuje v zažívacom trakte negatívne. Škodlivo sa prejavuje meď voľná, ktorá sa pri spracovaní neodstráni la vypieraním. Posledná operácia môže (okrem oxidačných zmien) negatívne vplývať na obsah výživových zložiek tým, že sa látky rozpustné vo vode zo suroviny vyplavujú. Dnes považujeme zmenu chlorofylov za menej znehodnocujúci znak akosti ako škody, ktoré by vznikli exogénnym zvyšovaním meďnatých iónov.

Z výživového hľadiska je oveľa menej škodlivý hliník, ktorý má podobné účinky ako meď čo do stability zelenej farby, pritom však nie je zďaleka tak reaktívny ako meď. Je známy celý rad komplexov chlorofylov s kovovými iónmi, ktoré podrobne študovali White a Jones [13] a Urunov [14]. V prítomnosti iónov železa prechádza zelená farba chlorofylov do špinavosivého odtieňa, v prítomnosti iónov cínu a hliníka do hnedého odtieňa.

Inak sú chlorofyly relatívne stále a ich straty pri spracovaní a skladovaní potravinárskych produktov sú relatívne malé.

Prehľad metód stanovenia chlorofylov

Najfrekvencovanejšie sú fotomerické metódy založené na meraní absorban- cie v maximách [15]. Oveľa sporadickejšie sú metódy založené na titracii horčika komplexónom [16] alebo meraní fluorescencie chlorofylov [17].

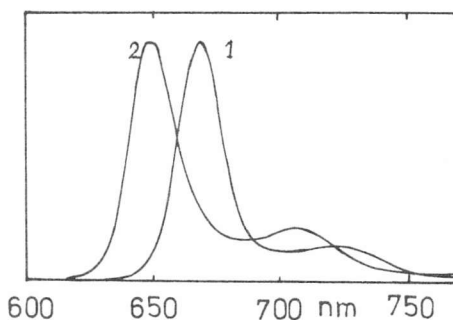
Problematike sledovania obsahu celkových chlorofylov a ich derivátov sa venovala veľká pozornosť. Problémom pri fotometrickom stanovení chlorofylov je pomerne zastúpenie jednotlivých chlorofylov, ich štiepných produktov, ako aj niektorých interferujúcich látok, ktoré môžu rôznym spôsobom ovplyvniť absorbanciu v maximách. Menej môžu výslednú hodnotu ovplyvniť i jednotlivé analytické operácie pri stanovení chlorofylov, ako aj spôsob prípravy vzorky, inaktivácia enzýmu chlorofylázy, použitie organických rozpúšťadiel, správna voľba absorpčného maxima.

Pred vlastnou extrakciou sa odporúča inaktivovať chlorofylázy buď tepelným zásahom, napr. ponorením vzorky do 90°C teplej vody na 5 min, buď povarením vzorky 2 min, až potom sa odporúča vzorky homogenizovať a extra- hovať. Niektorí autori sa však domnievajú, že použitím vhodných organických

rozpušťa diel (acetónu, prípadne zmesi acetónu a metanolu) dochádza k inkatácii enzýmov denaturáciou apofermentu [2].

Na extrakciu chlorofylov sa najčastejšie používa acetón v rôznych koncentráciách, prípadne zmes acetónu a metanolu, ďalej zmes metanolu a petroléru (2 : 1). Získané extrakty sa odporúčajú prečistiť preextrahovaním do dietyléru [18], i keď iní nepovažujú túto operáciu za potrebnú [19]. Na vlastné premeranie absorbancie nie sú jednotné názory, najmä pokiaľ ide o vlnové dĺžky a spôsoby výpočtu celkových chlorofylov a ich zložiek [2]. Obsah chlorofylov sa predpokladá aj z rozdielu odrazivosti (remisie) pri vlnových dĺžkach 710 a 780 nm [21]. Ukázalo sa, že korelačný koeficient medzi remisiou a obsahom chlorofylov je veľmi vysoký ($r = 0,98$). Vzorka zhomogenizovaná na pretlak (kašu) sa rozpresťuje do vrstvy a meria sa reflexné spektrum, ktoré sa vyhodnotí. Okrem toho sa na stanovenie chlorofylov v poslednom čase využíva NIR (reflektancia v blízkej infračervenej oblasti), ktorá je vhodná na sériové analýzy [28].

Zriedkavejšie sa na stanovenie chlorofylov využíva červená fluorescencia, ktorá sa spravidla meria pri 650 a 670 nm, pričom fluoreskujúce žiarenie sa budí pri vlnovej dĺžke 365 nm. Fluorescenčné metódy sú mimoriadne citlivé, avšak nie dosť špecifické (obr. 4).



Obr. 4. Fluorescenčné spektrá chlorofylov v éteri [6]. 1 — chlorofyl *a*, 2 — chlorofyl *b*.

Fig. 4. Fluorescence spectra of chlorophylls in ethylether. 1 — chlorophyll *a*, 2 — chlorophyll *b*.

Na sledovanie jednotlivých zložiek pigmentov zvyčajne treba použiť vhodné rozdeľovacie techniky; tým sa dosiahne oddelenie interferujúcich látok a jednotlivé zložky možno presnejšie stanoviť. Separačné stanovenia sú však prácne a reprodukovateľnosť stanovenia je spravidla horšia.

Na rozdelenie rastlinných pigmentov sa spravidla používajú všetky druhy chromatografií, najmä však stĺpcová, tenkovrstvová, papierová a v poslednom čase bola rozpracovaná vysokoúčinná kvapalinová chromatografia [18, 19, 22, 23].

Stĺpcová chromatografia

Okrem klasických adsorbentov sa pri stĺpcovej chromatografii používa i celý rad netradičných a najmä menej polárnych látok ako je škrob, celulóza, sacharóza, ale tiež Mg_2O_3 , a niektoré špeciálne náplne, ako napr. Bio-glas a pod. Pri použití škrobu ako adsorbenta na rozdelenie chlorofylov sa používa zmes benzínu (b. v. 100—400 °C), benzénu, chloroformu, acetónu a izopropylalkoholu v pomere 60 : 35 : 1,25 : 0,55 : 0,06. Ako rozpúšťadlo sa pri rozdeľovaní chlorofylov na celulóze používa petroléter a potom zmes petroléteri s 1 % izopropylalkoholu. V tejto sústave sa dobre oddelí chlorofyl *a* od chlorofylu *b*. Sacharóza je častým adsorpčným materiálom pri rozdeľovaní chlorofylov za použitia zmesi 0,5 % *n*-propanolu v petroléteri, alebo zmesi acetónu (5 až 25 %) a petroléteri. Na rozdelenie chlorofylov od feofytínov sa použila zmes adsorbentov, napr. 70 % sacharózy a 30 % kukuričného škrobu [10]. Dobrý výsledok s rozdelením chlorofylových farbív sa dosiahol i pri použití práškového polyetylénu [15, 22, 24, 25].

Extrakt y chlorofylov zo špenátu sa oddeľovali na chromatografickom stĺpci so špeciálnou náplňou Bio-glas. Touto technikou sa získali relatívne čisté chlorofyly. Na rozdelenie sa použila zmes petroleja, cyklohexánu, dimetylformamidu a vody (30 : 30 : 20 : 1) [26].

Chromatografia na tenkých vrstvách

Pri rozdeľovaní chlorofylov na tenkých vrstvách sa spravidla využívajú adsorpčné materiály, ktoré sú zhodné s materiálmi pri stĺpcovej chromatografii.

Niekedy sa využíva okrem adsorpčnej chromatografie aj rozdeľovacia tenkovrstvová chromatografia, keď sa napr. kremelina impregnuje rastlinným olejom a vyvíja zmesou metanolu, acetónu a vody v pomere 20 : 4 : 3. Veľmi častým adsorbentom pri rozdeľovaní chlorofylov je silikagél, buď sám, buď v rôznych zmesiach, napr. silikagél a CaCO_3 sadra a škrob v rôznych pomeroch. V literatúre sa uvádzajú aj dvojrozmerné techniky chromatografického oddeľovania na silikagéli, napr. v prvom smere sa použije sústava petroléter, acetón, metanol v pomere 10 : 2,5 : 0,25 a v druhom smere zmes petroléter, acetón, *n*-propanol (8 : 2 : 0,5). Vhodná kombinácia je tiež silikagél za použitia sústavy benzén, izopropylalkohol, voda v pomere 100 : 10 : 0,5 [15, 27].

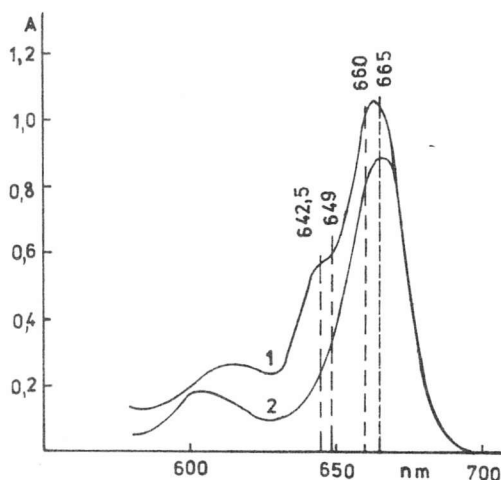
Chromatografia na papieri

Papierová chromatografia využíva rozdelenie chlorofylových pigmentov v sústave petrolér—benzén—acetón v pomere 4 : 1 : 0,5. Určitou nevýhodou tejto techniky rozdelenia je, že oddelené škvrny nemajú symetrický tvar, ale sú pretiahnuté, čo zhoršuje identifikáciu jednotlivých zložiek. Na potlačenie asy-

metrie škvŕn sa využíva impregnácia chromatografického papiera s nepolárny-
mi látkami, napr. parafínový olej a pod., alebo sa papier impregnuje CaCO_3
a vyvíja zmesou petroléter, 5 % a 1 % *n*-butanol. Na vyhodnotenie oddelených
škvŕn z tenkovrstvových alebo papierových chromatogramov sa využíva okrem
spektrofotometrickej metódy aj denzitometrické vyhodnotenie.

Z fotometrických metód sa nám na stanovenie zelených pigmentov osvedčila
metóda, keď sa vzorka homogenizovala 3 až 5 min pri frekvencii 5000 min^{-1} . 10
až 20 g homogenátu sa prenesie do tretej misky, pridá sa 0,1 g CaCO_3 a 3 g
premytého morského piesku. Postupne sa vzorka extrahuje malými dávkami
(asi po 5 ml) zmesi acetón a voda (85 : 15), opakovane rozotieraním s pieskom,
kým nezostane acetón bezfarebný. Extrakty sa zlievajú do 50 ml odmernej
banky, ktorá sa potom doplní po značku acetónom. Extrakt sa prefiltruje cez
hustý filtračný papier. Ďalší podiel filtrátu, ktorý musí byť číry, sa použije na
zmeranie absorbancie.

Absorbancia sa meria na spektrofotometri, ktorý predtým preveríme na
správnosť nastavenia vlnových dĺžok napr. ortuťovou výbojkou. Odporúčame
premerať absorbanciu acetónových extraktov pri vlnovej dĺžke 665 nm (zodpo-
vedá maximu chlorofylu *a*) a pri vlnovej dĺžke 649 nm (zodpovedá maximu
chlorofilu *b*). Ako slepý pokus sa použije 85 % vodný roztok acetónu. Namera-
né hodnoty absorbancie pri vlnovej dĺžke 665 nm majú byť v rozmedzí 0,3 až
0,7, pri vlnovej dĺžke 649 nm sú hodnoty spravidla nižšie (obr. 5).



Obr. 5. Časť spektier pigmentov extraktu čerstvých a sterilizovaných uhoriek. 1 — čerstvá suro-
vina, 2 — sterilizovaný výrobok.

Fig. 5. Spectra of extracted pigments from fresh and sterilized cucumbers. 1 — fresh primary
material, 2 — sterilized product.

Obsah celkového chlorofylu (CH_c), chlorofylu a (CH_a) a chlorofylu b (CH_b) sa počíta z nameraných hodnôt podľa vzťahov:

$$\text{CH}_c = \frac{(6,45 A_1 + 17,72 A_2) r}{n l},$$

$$\text{CH}_a = \frac{(11,63 A_1 - 2,39 A_2) r}{n l},$$

$$\text{CH}_b = \frac{(20,11 A_2 - 5,18 A_1) r}{n l},$$

kde A_1 je absorbancia pri 665 nm, A_2 — absorbancia pri 649 nm, n — navážok vzorky v g, l — dĺžka kvety v cm, r — objem extraktu v ml.

Údaje vyjadrujú obsah chlorofylu v $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Čas trvania analýzy aj s prípravou vzorky na jedno stanovenie sa počíta asi 1 h. Pri sériových stanoveniach za 8 h možno urobiť asi 10 stanovení. Metóda je pomerne rýchla a presná. Miera presnosti pri spektrofotometrickom stanovení celkového chlorofylu vyjadrená ako relatívna smerodajná odchýlka sa pohybuje väčšinou od 1,8 do $\pm 10\%$.

Literatúra

1. BOGARD, L., In: *Harvesting the Sun*. New York, Academic Press 1967, s. 191.
2. VERNON, L. P., *Anal. Chem.*, 32, 1960, s. 114.
3. JEN, J., *J. Food Sci.*, 39, 1974, s. 907.
4. TOHAM, F.—SAITO, S., *J. Agric. Sci. (Tokyo)*, 19, 1974, s. 11.
5. PHILIPPON, J.—RONET-MAYER, M. A., *Congress of Food Science and Technology*, lb, 1974, s. 102.
6. SMITH, J. H. C.—BENITEZ, A., In: *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. IV. Paech, K. —Tracey, M. V. (Eds). Berlin, Springer-Verlag 1955, s. 458.
7. WAKABAYASHI, T., *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.*, 33, 1986, s. 835.
8. KYZLINK, V.; *Základy konzervace potravin*, Praha, SNTL 1980.
9. JAMES, P.—SWEENEY, J. P., *Food Technol.*, 24, 1970, s. 128.
10. TAN, C. T.—FRANCIS, F. J., *J. Food Sci.*, 20, 1962, s. 231, 379.
11. HISATAKE, M.—MAHAMISHI, M., *Food Sci. Technol.*, 20, 1973, s. 429.
12. ZBORAN, J.: Diplomová práca. Bratislava, Chemickotechnologická fakulta SVŠT 1978.
13. WHITE, R. C.—JONES, J. D.—GIBBS, E., *J. Agric. Food Chem.*, 25, 1977, s. 143.
14. URUMOV, T.: *Metallkomplexe von Chlorophyllderivaten*. Doktorská dizertačná práca. TU München 1975.
15. PRÍBELA, A. a kol.: *Vypracovanie objektívnej metódy na hodnotenie farby citrusových koncentrátov a chlorofylu*. Záverečná správa. Bratislava, Chemickotechnologická fakulta SVŠT 1979.
16. ROBINSON, H. M. C.—RATBUN, J. C.—CAN, J., *Biochem. Physiol.*, 37, 1959, s. 225.
17. RÁCIK, J.—MEGO, V., *Chem. Zvesti*, 15, 1961, s. 384.

18. DAVÍDEK, J. a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravin. Praha, SNTL 1977.
19. HORVATOVIČOVÁ, A., *Biológia*, 24, 1969, s. 783.
20. WATADA, A. E.—MORIS, K. H.—WORTHINGTON, J. T., *J. Food Sci.*, 41, 1976, s. 329.
21. DAUN, K. J., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53, 1976, s. 767.
22. WATANABE, K.—HIROTA, S.—TAKAHASHI, B., *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.*, 33, 1986, s. 616.
23. DAOOD, H. G. a kol., *J. Chromatogr.*, 472, 1989, s. 296.
24. SWEENEY, J. P.—MARTIN, M. E., *Food Technol.*, 15, 1961, s. 263.
25. Official Methods of Associations of Official Agricultural Chemists. 10. vyd. Washington, Assoc. Offic. Agric. Chemists 1965.
26. GLYNUE-JONES, E.—MARSHALL, R.—HANN, R. A.—READ, G., *J. Chromatogr.*, 114, 1975, s. 232.
27. HORVATOVIČOVÁ, A.—FRIČ, F., *Biológia*, 19, 1964, s. 820.
28. TKACHUK, R. a kol., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 1988, s. 381.

Do redakcie došlo 5. 2. 1992

Natural colours. III. Chlorophylls

Summary

Information on chemical, physicochemical and technological properties of chlorophylls and their derivatives is presented. The changes in primary pigments are influenced by various conditions, mainly by high temperature, pH value and metal components present in foods. In the course of technological processing, chlorophylls can be converted into pheophytins, chlorophyllides and pheophorbides, which alter the final colour tone of the product. To investigate chlorophylls, primarily spectrophotometric and infrequently fluorimetric methods can be used. Separation of single green pigments is carried out by chromatographic techniques.

Натуральные красители. III. Хлорофилы

Резюме

Приводятся знания о химических, физикохимических и технологических свойствах хлорофилей и их производных. На изменения первичных пигментов сильно влияют разные условия главным образом высокая температура, pH среды, и присутствующие металлические компоненты пищевых продуктов. В процессе технологической обработки могут из хлорофилей образоваться феофитины, хлорофиллиды и феофорбиды, которые меняют цвет результирующего оттенка продукта. Для исследования хлорофилей применяются главным образом спектрофотометрические методы, реже флуорометрические методы. Распределение отдельных зеленых пигментов проводится хроматографическими методами.