

УДК 633.864

RESEARCH OF EXTRACTION NATURAL PIGMENT CHLOROPHYLL

L. Saleba, D. Saribeykova, O. Condya

Kherson National Technical University

Key words:	ABSTRACT
derivatives of chlorophyll, extraction, organic solvents, parsley leaf, food dye.	The extraction process of polar solvents derivative of chlorophyll from natural raw materials is research on article. The spectral characteristics of extractions are built and the amount of derivatives of chlorophyll is expected depending on the state of raw material and type of organic solvent. The state of raw material (green or dried) is influence on efficiency of extraction of derivatives of chlorophyll. The nature of the spectra obtained by extraction of fresh raw materials is identical irrespective of the solvent, and the absorption intensity in the "methanol-ethanol-acetone" series increases. The amount of extracted chlorophyll from the dry raw material is 4 times larger and depends little on the solvent used. The results of TLC are confirm identical selectivity of the chosen extractants in relation to extractive natural dyes.
Article history: Received 23.03.2017 Received in revised form 10.04.2017 Accepted 06.05.2017	
Corresponding author: saleba@mail.ru	

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ ЕКСТРАКЦІЇ ПРИРОДНОГО ПІГМЕНТУ ХЛОРОФІЛУ І ЙОГО ПОХІДНИХ

Л.В. Салєба, канд.техн.наук

Д.Г. Сарібекова, д-р.техн.наук

О.С. Кондя, студ.

Херсонський національний технічний університет

У статті досліджено процес екстрагування полярними розчинниками хлорофілу і його похідних з рослинної сировини. Визначено, що стан сировини (суха чи свіжа) впливає на ефективність вилучення хлорофілу. Характер спектрів, отриманих при екстракції свіжої сировини, ідентичний незалежно від розчинника, а інтенсивність поглинання у ряді «метанол–етанол–ацетон» зростає. Кількість екстрагованого хлорофілу із сухої сировини більша в 4 рази і мало залежить від використаного розчинника. Результатами тонкошарової хроматографії підтверджена однакова селективність обраних екстрагентів щодо барвників, які містяться у сировині.

Ключові слова: похідні хлорофілу, екстракція, органічні розчинники, петрушка городня, харчовий барвник.

Постановка проблеми. В умовах сучасних харчових технологій, які включають різні види термічної обробки, а також при зберіганні продукти втрачають первісне забарвлення. Для відновлення їх органолептичних якостей використовують синтетичні і натуральні барвники. Останні вигідно відрізняються своєю безпекою. Серед природних барвників найбільш відомими є антоціани, хлорофіли і каротиноїди.

Як зелений барвник використовують хлорофіл і його похідні E 140—141 (i — ii) для надання оливкового відтінку продуктам при виробництві кремів, морозива, молочних десертів, майонезу і різних соусів. Згідно з нормативною документацією, даний барвник не має обмежень застосування і вноситься у кількості за технологічною необхідністю [1].

Крім можливості забарвлювати харчові продукти і косметичні вироби, ці пігменти проявляють бактерицидну й антиоксидантну дію і використовуються в медицині і ветеринарії для фотодинамічної терапії онкологічних захворювань [2; 3].

На даний момент відомо близько десяти хлорофілів. Вони відрізняються за хімічною будовою, забарвленням, поширенням серед живих організмів. Хлорофіл *a* і хлорофіл *b* – найбільш розповсюджені природні хлорофіли. У всіх вищих рослинах містяться хлорофіли *a* і *b*. Хлорофіл *c* виявлено у діатомових водоростях, хлорофіл *d* — у червоних водоростях. Крім того, відомі види бактеріохлорофілів, які містяться в клітинах фотосинтезуючих бактерій. У клітинах зелених бактерій є бактеріохлорофіли *c* і *d*, у клітинах пурпурних бактерій — бактеріохлорофіли *a* і *b*. Основними пігментами, без яких неможливий фотосинтез, є хлорофіл *a* для зелених рослин і бактеріохлорофіли для бактерій [4].

Хлорофіл міститься у всіх зелених рослинах із співвідношенням видів *a:b* приблизно 3:1. Вміст хлорофілів становить: у кропиві — 0,6 — 0,7% на суху масу, люцерні — 0,2 — 0,4%, злаках — 0,7% тощо [1].

За хімічною будовою хлорофіл є магнієвим комплексом похідного порфіна (тетрапірольного протопорфіну), молекула якого містить циклопентенове кільце при пірольному ядрі С в структурі макроциклу. Залежно від природи замісника *R* у пірольному циклі В розрізняють хлорофіл *a* і хлорофіл *b*. Молекула хлорофілу полярна, порфіринове ядро володіє гідрофільними властивостями, а фітольний кінець — гідрофобними. Ця властивість молекули хлорофілу обумовлює певне розташування в мембранах хлоропластів (рис. 1) [1].

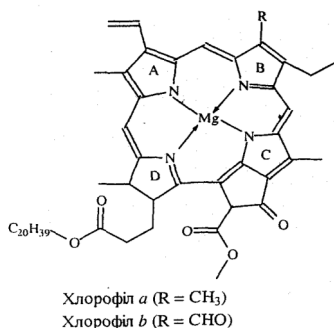


Рис. 1. Структурна формула хлорофілів *a* і *b*

Синтез хлорофілу в лабораторних умовах не вигідний через складність процесу, тому його основним джерелом є рослинна сировина, з якої барвник отримують шляхом екстракції.

Як екстрагент для вилучення жиророзчинних (ліпофільних) речовин використовують дозволені органічні розчинники (ацетон, етилметилкетон, дихлорметан, метанол, етанол, гексан, «надкритичний» діоксид вуглецю) і рослинні олії. Відомі дослідження використання двофазної системи розчинників, які не змішуються, що сприяє вилученню як ліофільних, так і гідрофільних біологічно-активних речовин, що особливо важливо при роботі з лікарськими травами [10; 11].

Процес екстрагування харчових барвників, як відомо, є складним багато-стадійним технологічним процесом, в основі якого лежить масообмін. Масообмін у системі тверде тіло–рідина визначається в основному опором, що утворюється граничним шаром і пов'язаний з дією сил тертя між контактуючими фазами й поверхневим натягом. Природна масовіддача за відсутності руху потоку відбувається внаслідок різниці хімічного потенціалу в різних точках системи і є тривалим процесом [5]. Ефективність процесу екстрагування залежить від великої кількості параметрів, серед яких: гідродинамічні умови, поверхня розділу фаз, тривалість екстрагування, в'язкість екстрагента, температура, введення поверхнево-активних речовин, пористість сировини.

До властивостей, що характеризують розчинники і які беруть до уваги при їх виборі, відносяться: селективність, розчинність, в'язкість, діелектрична проникність, дипольний момент, реакційна здатність, токсичність, вартість тощо. В групу високополярних розчинників входять вода, пропіленкарбонат, гідразин, формаїд, сірчана кислота; середньополярних розчинників — спирти, ацетон, нітрометан, нітробензол, ацетонітрил; неполярних розчинників — вуглеводні, хлороформ, дихлоретан, хлорбензол [6].

Мета статті: дослідження процесу екстракції біологічно-активних речовин, що дасть змогу вибрати оптимальну систему екстрагентів для більш ефективного вилучення хлорофілу і його похідних (ПХ) з петрушки городньої та використання їх як натурального харчового барвника.

Матеріали і методи. Для визначення ефективності дії розчинників та впливу стану сировини було проведено вилучення барвних речовин зі свіжої і сухої сировини (наземна частина петрушки огородньої листового виду) полярними екстрагентами (етиловий спирт, метиловий спирт, ацетон) при модулі 5 протягом 1,5 години при температурі 20 °С.

Після отримання екстрактів провели визначення електронних спектрів поглинання за допомогою прибору Spek-11, використовуючи кювети з кришками, відстань між гранями — 10 мм. Для кількісної оцінки вмісту хлорофілу використовували фотометричний метод Гетрі. Склад екстрагованих речовин досліджували хроматографічним методом (ТШХ).

Результати досліджень. Спектри поглинання екстрактів для свіжої сировини наведені на рис. 2, дані для сухої сировини наведені на рис. 3.

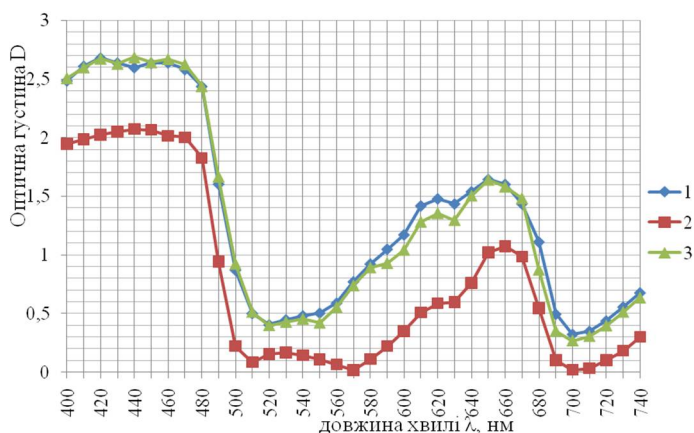


Рис. 2. Спектри поглинання екстрактів зі свіжої сировини полярними розчинниками: 1 — етанол, 2 — метанол, 3 — ацетон

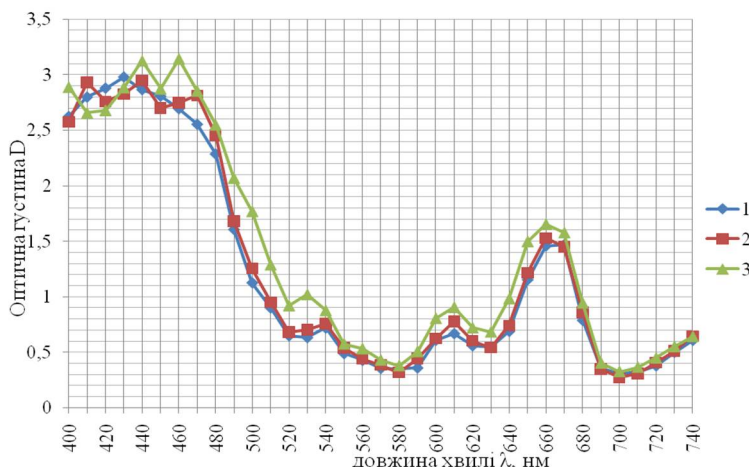


Рис. 3. Спектри поглинання екстрактів із сухої сировини полярними розчинниками:
1 — етанол, 2 — метанол, 3 — ацетон

Відомо, що хлорофіли мають два максимуми поглинання — в ділянці синього світла (хлорофіл *a* — 420 нм та хлорофіл *b* — 455 нм) і червоного світла (хлорофіл *a* — 662 нм та хлорофіл *b* — 644 нм) [12].

Характер отриманих нами спектральних кривих є ідентичним незалежно від розчинника, але інтенсивність поглинання дещо нижча при екстрагуванні похідних хлорофілу метанолом зі свіжої сировини. Можна помітити різницю при максимумі поглинання 620 нм, який виражений нечітко, що свідчить про недостатню чистоту колірного тону.

При екстрагуванні ПХ із сухої сировини інтенсивність оптичної густини екстрактів незалежно від обраного розчинника однакова. Порівняно з попередніми графіками слід відмітити наявність чітких максимумів при 530 — 540 нм, 610 нм та 660 нм.

Для грубої кількісної оцінки вмісту хлорофілу при вилученні з листової петрушки використовували фотометричний метод, в основі якого лежить зіставлення оптичної густини досліджуваних розчинів із серією забарвлених розчинів Гетрі з відомою концентрацією, що імітують природний діапазон вмісту хлорофілу в рослинах. Стандартний розчин Гетрі готували за таким складом: 2-процентний розчин біхромату — 50 мл; 1-процентний розчин сульфату міді — 28,5 мл; 2 н розчин гідроксиду амонію — 10 мл; вода дистильована — до 100 мл. 1 мл отриманого розчину відповідає за забарвленням 0,000085 г хлорофілу (85 мг/л) [7]. Оптичну густину досліджуваних розчинів визначали на КФК-2МП, використовуючи світло-червоний світлофільтр 670 нм і кювети з відстанню між гранями 10 мм. Як розчин порівняння використовували розчинник [8].

Вміст похідних хлорофілу в екстракті та в дослідному зразку розраховували за формулами (1), (2) та (3) відповідно:

$$C_{екс} (мг / л) = \frac{D}{b} \cdot 40; \quad (1)$$

$$C_{хл} (\%) = \frac{100DV}{1000 \cdot 1000mb} \cdot 40; \quad (2)$$

$$C_{xl} (mg / g) = \frac{DV}{1000mb} \cdot 40, \quad (3)$$

де D — оптична густина розчину; b — тангенс кута нахилу калібрувальної кривої; m — маса наважки, г; V — об'єм отриманої витяжки, %, 40 — коефіцієнт для переведення шкали калібрувального графіка.

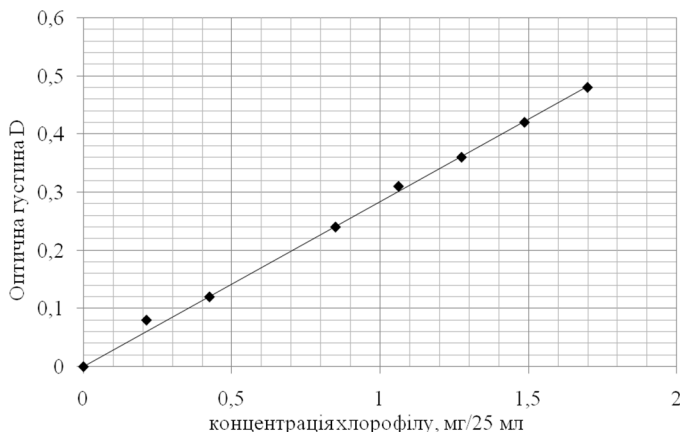


Рис. 4. Калібрувальний графік для визначення вмісту хлорофілу

Результати розрахунків наведені в табл. 1 і 2.

Таблиця 1. Результати екстракції полярними розчинниками зі свіжої сировини

Показник	Розчинник		
	етанол 96 %	метанол ч.д.а.	ацетон ч.д.а.
Концентрація ПХ в екстракті, мг/л	202,40	138,87	208,87
Кількість вилучених ПХ з сировини, %	0,101	0,069	0,104
Кількість вилучених ПХ з сировини, мг/г	1,011	0,694	1,044

Таблиця 2. Результати екстракції полярними розчинниками із сухої сировини

Показник	Розчинник		
	етанол 96 %	метанол ч.д.а.	ацетон ч.д.а.
Концентрація ПХ в екстракті, мг/л	828,73	815,77	889,58
Кількість вилучених ПХ з сировини, %	0,414	0,407	0,444
Кількість вилучених ПХ з сировини, мг/г	4,143	4,078	4,447

Таким чином, визначено, що при вилученні ПХ зі свіжої сировини ефективність розчинників у ряді «метанол–етанол–ацетон» зростає.

Ефективність вилучення етанолом та ацетоном вища, ніж при використанні метанолу на 45,6% та 50,4% відповідно. Це можна пояснити різним рівнем впливу на приклітинний шар протоплазми (плазмоліз), оскільки ефективність вилучення залежить від здатності розчинника зруйнувати зв'язок між стінкою клітини і шаром протоплазми.

При вилученні ПХ із сухої сировини ефективність вилучення зростає у ряді розчинників «метанол–етанол–ацетон». Ефективність вилучення ацетоном вища, ніж при використанні метанолу та етанолу, на 7—9%. Такі результати можна пояснити тим, що під час теплового сушіння стінки рослинних клітин втрачають

приклітинний шар протоплазми, наявність якого надає стінці характер мембрани — напівпроникної перегородки. Без цього шару клітинна стінка набуває властивостей пористої перегородки і через неї вільно можуть дифундувати речовини.

Оскільки важливо було дослідити склад екстрагованих речовин залежно від використаного розчинника, для аналізу складної суміші було використано хроматографічний метод. У процесі хроматографії через те, що різні компоненти мають різні коефіцієнти розподілу, компоненти дослідної суміші захоплюються рухомим розчинником і переміщуються з різними швидкостями. Найбільша швидкість зафіксована у компонентів суміші, які мають більшу спорідненість до рухомої фази. При цьому компоненти суміші відокремлюються один від одного і розподіляються на різних ділянках у вигляді зон або плям. На процес проведення хроматографії впливають вологість, концентрація пігментів, температура. Розділення пігментів можна проводити різними методами: колонковою, площинною хроматографією тощо [13; 14].

Одним із розповсюджених методів для швидкого поділу малих кількостей пігментів, що знаходяться в суміші, на окремі компоненти є метод тонкошарової хроматографії (ТШХ). Він є більш доступним з матеріальної точки зору і в той же час експресним методом розділення та ідентифікації. До теперішнього часу запропоновано багато варіантів цієї хроматографії: висхідні та низхідні, одномірні, двомірні і кругові хроматограми із застосуванням різних розчинників. Важливою перевагою одновимірної висхідної хроматографії є велика швидкість поділу й отримання достатньої кількості окремих пігментів.

Для підтвердження якісного складу вилучених сполук і селективності дії екстрагентів була проведена тонкошарова хроматографія (ТШХ) на пластинках Silufol UV — 254 у системі розчинника бензол:ацетон (4:1). Результати ТШХ приведені нижче (рис. 5).

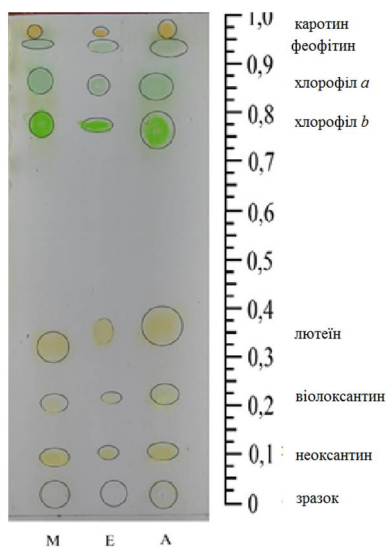


Рис. 5. Хроматограма вилучень з петрушки городньої, отриманих при екстрагуванні:
М — метанол ч.д.а., Е — етанол 96 %, А — ацетон ч.д.а.

За результатами ТШХ підтверджена однакова селективність даних екстрагентів щодо барвників, що містяться у сировині. В кожному екстракті виявлено

7 компонентів: каротин, феофітин, хлорофіл *a*, хлорофіл *b*, лютеїн, віолоксантин, неоксантин.

Оскільки органічні розчинники, які застосовують для вилучення ліпофільних речовин, чинять токсичну дію на організм людини, є вогне- і вибухонебезпечними, при екстрагуванні харчових барвників перевагу надають таким, що легко видаляються з екстракту і є менш шкідливими. Таким чином, за результатами досліджень як екстрагент рекомендовано використовувати 96% етиловий спирт.

Висновки. Встановлено, що такі екстрагенти, як етиловий і метиловий спирти, ацетон екстрагують з рослинної сировини однакові групи барвників, про що свідчать спектральні криві, які характеризуються ідентичністю. Результати ТШХ підтверджують ці дані — в кожному екстракті було виявлено сім однакових компонентів: каротин, феофітин, хлорофіл *a*, хлорофіл *b*, лютеїн, віолоксантин, неоксантин.

У ході експерименту встановлено, що стан сировини (суха чи свіжа) впливає на ефективність вилучення хлорофілу та його похідних екстрагентами. У свіжій сировині міститься приклітинний шар протоплазми, пов'язаний з клітинною стінкою, що діє як мембрана. При вилученні полярними розчинниками зі свіжої сировини ефективність розчинників у ряді «метанол–етанол–ацетон» зростають. При цьому ефективність етанолу та ацетону вища, ніж метанолу на 45,7% та 50,4% відповідно, що свідчить про низьку ефективність руйнування метанолом зв'язку клітинна стінка–шар протоплазми. В той же час при екстракції з сухої сировини ефективність ацетону вища тільки на 9%, тому, враховуючи меншу шкідливість, як екстрагент рекомендовано використовувати 96% етиловий спирт.

У готовому продукті — харчовому барвнику хлорофілі (Е 140) не повинно бути домішок сторонніх речовин, тому подальші дослідження передбачають пошук ефективних способів видалення супутніх барвників, таких як каротиноїди та ксантофіли.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ластухін, Ю.О. Харчові добавки. Е-коди. Будова. Одержання. Властивості: навч. посіб. / Ю.О. Ластухін. — Львів : Центр Європи, 2009. — 836 с.
2. Кардаш, О.В. Пігменти синьо-зелених водоростей та їх використання / О.В. Кардаш, А.В. Курейшевич, О.А. Васильченко // Проблеми екологічної біотехнології. — 2010. — № 2. — С. 16—29.
3. Макарова, Е.И. Прикладные аспекты применения микроводоростей — обитателей водных экосистем / Е.И. Макарова, И.П. Отурин, А.И. Сидякин // Экосистемы, их оптимизация и охрана. — 2009. — Вып. 20. — С. 120—133.
4. Андрианова, Ю.Е. Хлорофилл и продуктивность растений: учеб. для студ. / Ю.Е. Андрианова, И.А. Таврический. — М. : Наука, 2000. — 135 с.
5. Трейбал Р. Жидкостная экстракция: учебник / Р. Трейбал. — М. : Химия, 1966. — 724 с.
6. Райхардт К. Растворители и эффекты среды в органической химии: монография / К. Райхардт. — М. : Мир, 1991. — 763 с.
7. Гавриленко, В.Ф. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание: учеб. для студ. / В.Ф. Гавриленко, М.Е. Ладыгина, Л.М. Хандовина; под ред. Б.А. Рубина. — М. : Высшая школа, 1975. — 392 с.
8. Глаз, Н.В. Методические подходы к выбору условий пробоотбора и оценке содержания хлорофилла в листьях растений кукурузы / Н.В. Глаз, Н.И. Казакова, Л.В. Уфимцева // Вестник КрасГАУ. — 2015. — № 3. — С. 73—77.
9. Ефимов, А.А. Обоснование технологии получения хлорофилла из сине-зеленых водорослей как пищевой добавки / А.А. Ефимов // Российская академия естествознания. Фундаментальные исследования. — 2007. — № 11. — С. 82—84.

10. *Иванова, С.А.* Особенности массопереноса липофильных БАВ при экстрагировании сырья двухфазной системой экстрагентов / С.А. Иванова, В.А. Ванштейн, И.А. Каухова // Химико-фармацевтический журнал. — 2003. — Т. 37, № 8. — С. 30 — 33.

11. *Сорокин, В.В.* Изучение экстрагирующей способности одно- и двухфазных систем экстрагентов для извлечения флавоноидов из травы клевера лугового / В.В. Сорокин, В.А. Вайнштейн, И.Е. Карнаухова, Т.Х. Чибилев // Химико-фармацевтический журнал. — 2008. — Т. 42, № 8. — С. 23—25.

12. *Шлык, А.А.* О спектрофотометрическом определении хлорофиллов *a* и *b* / А.А. Шлык // Биохимия. — 1968. — Т. 33, вып. 2. — С. 275—285.

13. *Ахрем, А.А.* Тонкослойная хроматография: учеб. для студ. / А.А. Ахрем, А.И. Кузнецова. — М. : Наука, 1964. — 175 с.

14. Физиология растений: лаб. пр-кум / А.П. Кудряшов, Т.И. Дитченко, О. В. Молчан та ін. — Минск : БГУ, 2011. — 76 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ ПРИРОДНОГО ПИГМЕНТА ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Л.В. Салеба, Д.Г. Сарибекова, О.С. Кондя

Херсонский национальный технический университет

В статье исследован процесс экстракции полярными растворителями хлорофилла и его производных из растительного сырья. Состояние сырья (высушенное или сырое) влияет на эффективность извлечения хлорофилла. Характер спектров, полученных при экстракции свежего сырья, идентичен независимо от растворителя, а интенсивность поглощения в ряду «метанол–этанол–ацетон» растет. Количество экстрагированного хлорофилла из сухого сырья больше в 4 раза и мало зависит от применяемого растворителя. Результаты ТСХ подтверждена одинаковая селективность выбранных экстрагентов по отношению к извлекаемым природным красителям.

Ключевые слова: производные хлорофилла, экстракция, органические растворители, петрушка листовая, пищевой краситель.