

# Razvoj metode za fluorimetrijsko određivanje klorofila a

---

**Smoljo, Josipa**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:547434>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno – biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Josipa Smoljo**

7265/BT

**RAZVOJ METODE ZA FLUORIMETRIJSKO  
ODREĐIVANJE KLOROFILA A**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Fizikalna kemija

**Mentor:** Doc. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić

**Zagreb, 2018.**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Mojci Čakić Semenčić na trudu i pomoći pri izradi ovoga završnoga rada. Također, zahvaljujem se doc. dr. sc. Filipu Šupljiki te svim djelatnicima Laboratorija za fizikalnu kemiju i koroziju na ukazanom povjerenju i strpljivosti.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno – biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Završni rad

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### Razvoj metode za fluorimetrijsko određivanje klorofila *a*

*Josipa Smoljo, 7265*

**Sažetak:** Klorofil *a* je zeleni pigment prisutan u biljkama, cijanobakterijama i algama te je ključan u procesu fotosinteze. U prehrambenoj industriji njegovi se derivati koriste kao prirodna bojila biljnoga podrijetla, a u posljednje vrijeme raste broj literaturnih primjera u kojima se klorofilu *a* pripisuje antikancerogena, antimutagena i antioksidativna aktivnost. Koncentracija klorofila *a* u biljnim ekstraktima u laboratoriju se rutinski određuje mjerenjem apsorpcije pri apsorpcijskom maksimumu klorofila *a* (~660 nm) te primjenom empirijskih jednadžbi. Imajući u vidu veću osjetljivost i selektivnost fluorimetrije kao analitičke metode u odnosu na UV/VIS spektrofotometriju te dvojbenu pouzdanost empirijskih jednadžbi, cilj ovoga rada bio je razvoj metode za fluorimetrijsko određivanje koncentracije klorofila *a* u biljnim ekstraktima. Standard klorofila *a* izoliran je iz cijanobakterije *Arthrospira platensis* primjenom tankoslojne preparativne kromatografije.

**Ključne riječi:** klorofil *a*, fluorescencijska spektroskopija, *Arthrospira platensis*

**Rad sadrži:** 29 stranica, 15 slika, 2 tablice, 38 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** doc. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić

**Datum obrane:**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Chemistry and Biochemistry**  
**Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**The development of a fluorimetric method for the determination of chlorophyll *a***

***Josipa Smoljo, 7265***

**Abstract:** Chlorophyll *a* is a green pigment present in plants, cyanobacteria and algae and is crucial in the photosynthesis process. Besides the usage of its derivatives as natural dyes of plant origin in food industry, there is a growing number of literary examples in which anticancer, antimutagenic and antioxidant activity is attributed to chlorophyll *a*. Concentration of chlorophyll *a* in plant extracts is routinely determined in the laboratory by measuring the absorbance at the absorption maximum of chlorophyll *a* (~660 nm) and using empirical equations. Having in mind greater sensitivity and selectivity of fluorimetry as analytical method compared to UV/VIS spectrophotometry and reliability of empirical equations, the aim of this study was to develop a method for fluorimetric determination of chlorophyll *a* concentration in plant extracts. Chlorophyll *a* used as standard was isolated from cyanobacteria *Arthrospira platensis* by preparative thin layer chromatography.

**Keywords:** chlorophyll *a*, fluorescence spectroscopy, *Arthrospira platensis*

**Thesis contains:** 29 pages, 15 figures, 2 tables, 38 references

**Original in:** croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Mojca Čakić Semenčić, Assistant Professor

**Defence date:**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1 Klorofil .....	2
2.1.1 Struktura klorofila, vrste klorofila i njihova zastupljenost .....	2
2.1.2 Biološka funkcija klorofila .....	6
2.1.3 Degradacija klorofila .....	6
2.1.4 Primjena klorofila i pripadajućih derivata .....	8
2.2 Spirulina ( <i>Arthrospira platensis</i> ) .....	9
2.3 Spektroskopsko određivanje klorofila .....	10
2.3.1 UV/VIS spektroskopija .....	11
2.3.2 Fluorescencijska spektroskopija .....	13
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>15</b>
3.1 Biljni materijali .....	15
3.2 Kemikalije.....	15
3.3 Aparatura i pribor:.....	15
3.4 Metode rada .....	16
3.4.1 Ekstrakcija pigmenata iz Spirulina sp. ....	16
3.4.2 Izolacija standarda klorofila <i>a</i> iz acetonskog ekstrakta Spirulina sp.....	16
3.4.3 Ekstrakcija pigmenata i izolacija klorofila iz rikole ( <i>Eruca sativa</i> ) .....	17
3.4.4 UV/VIS spektroskopsko određivanje koncentracije standarda klorofila <i>a</i> .....	18
3.4.5 Izrada baždarnog dijagrama za fluorimetrijsko određivanje koncentracije klorofila <i>a</i> .....	19
3.4.6 Fluorimetrijsko određivanje koncentracije klorofila <i>a</i> u ekstraktu rikole.....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>21</b>
4.1 Uvod .....	21
4.2 Izolacija klorofila <i>a</i> iz <i>Spirulina sp.</i> ....	21
4.3 Izrada baždarnog dijagrama.....	21
4.4 Ekstrakcija pigmenata i izolacija klorofila <i>a</i> iz rikole .....	23
4.5 Fluorimetrijsko određivanje koncentracije klorofila <i>a</i> u ekstraktu rikole.....	23
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>26</b>
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>27</b>

## 1. UVOD

Klorofili su zeleni pigmenti čija je osnovna struktura tetrapirolski porfirinski prsten u čijem je središtu koordiniran ion magnezija. Ovi pigmenti prisutni su u biljkama, cijanobakterijama i algama te su ključni u procesu fotosinteze, pri čemu glavnu ulogu ima klorofil *a*. Klorofil i njegovi derivati koriste se u industriji kao prehrambeni aditivi koji pripadaju skupini bojila za različite prehrambene proizvode. Iako su klorofili najzastupljeniji pigmenti u biljkama te je lisnato povrće njihov bogat bogat izvor, klorofili nisu stabilni spojevi. Uslijed skladištenja i prerade voća i povrća bivaju enzimski ili kemijski degradirani u klorofilide odnosno feofitine. Uslijed demetalacije klorofilida ili hidrolize feofitina djelovanjem jake kiseline nastaju žuto-smeđi feoforbidi, a biljke gube zelenu boju.

Koncentracija klorofila *a* u biljnim ekstraktima rutinski se određuje UV-VIS spektrofotometrijom pri apsorpcijskom maksimumu klorofila *a* (~660 nm) te primjenom različitih empirijskih jednadžbi. Ipak, usporedbom s prethodnom metodom fluorimetrija je osjetljivija, selektivnija i pouzdanija te njena primjena u određivanju koncentracije pigmenata eliminira upotrebu empirijskih jednadžbi.

Cilj ovoga rada bio je: (i) izolacija standarda klorofila *a* iz cijanobakterije *Arthrospira platensis* (spirulina) primjenom tankoslojne preparativne kromatografije (ii) razvoj metode za fluorimetrijsko određivanje koncentracije klorofila *a* u biljnim ekstraktima.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Klorofil

Klorofil (Chl) je zeleni pigment koji se nalazi u kloroplastima biljnih stanica (Slika 1), gdje sudjeluje u procesu fotosinteze, odnosno nastajanja organskih tvari iz ugljikova dioksida i vode pomoću svjetlosne energije (Jinasena i sur., 2016).



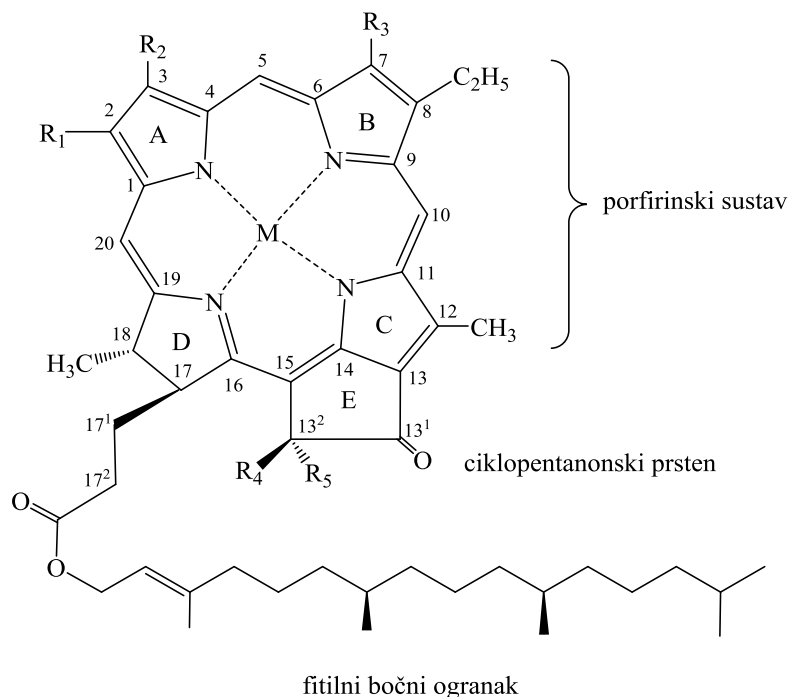
Slika 1: Kloroplasti u biljnim stanicama (Anonymous 1, 2018)

#### 2.1.1 Struktura klorofila, vrste klorofila i njihova zastupljenost

Termin „klorofil“ obuhvaća obitelj spojeva, pigmenata koji su kompleksi tetrapirolskog porfirinskog prstena s magnezijem. Na slici 2 te u tablici 1 prikazane su strukture najčešće prisutnih klorofila i njihovih derivata. Kod viših biljaka na reducirani porfirinski kromofor esterskom vezom vezan je terpenoidni alkohol fitol koji čini molekulu klorofila lipofilnom. Molekula klorofila relativno je velika; porfirinska glava veličine je približno 1,5 x 1,5 nm, a fitilni lanac dug je oko 2 nm. Konjugirane dvostruke veze prisutne u klorofilu omogućavaju delokalizaciju  $\pi$  elektrona u prstenastom sustavu, a time i brojna oksidacijsko-redukcijska stanja važna za prijenos energije iz jedne pobuđene klorofilne molekule do susjedne. Vezivanje (isključivo) dvovalentnog magnezijevog atoma na dušikove atome porfirinskog prstena ključno je za apsorpciju svjetlosne energije, a time i fotosintezu. Elektronska struktura magnezija omogućuje promjenu raspodjele elektrona porfirinskog prstena kako bi se producirala jaka, pobuđena stanja. Ovisno o supstituentima, primarno vinilnim i metilnim skupinama na



položajima 3 i 7, molekule klorofila u većoj mjeri apsorbiraju sunčevu svjetlost pojedinih valnih duljina. Supstituenti poput formilnih skupina na ova dva položaja, primjerice u klorofilu *b* i *d*, odgovorni su za povećanje ili smanjenje apsorpcije u plavom i crvenom dijelu spektra (Houghton i Hendry, 1996).



Slika 2: Opća strukturna formula klorofila i njihovih derivata

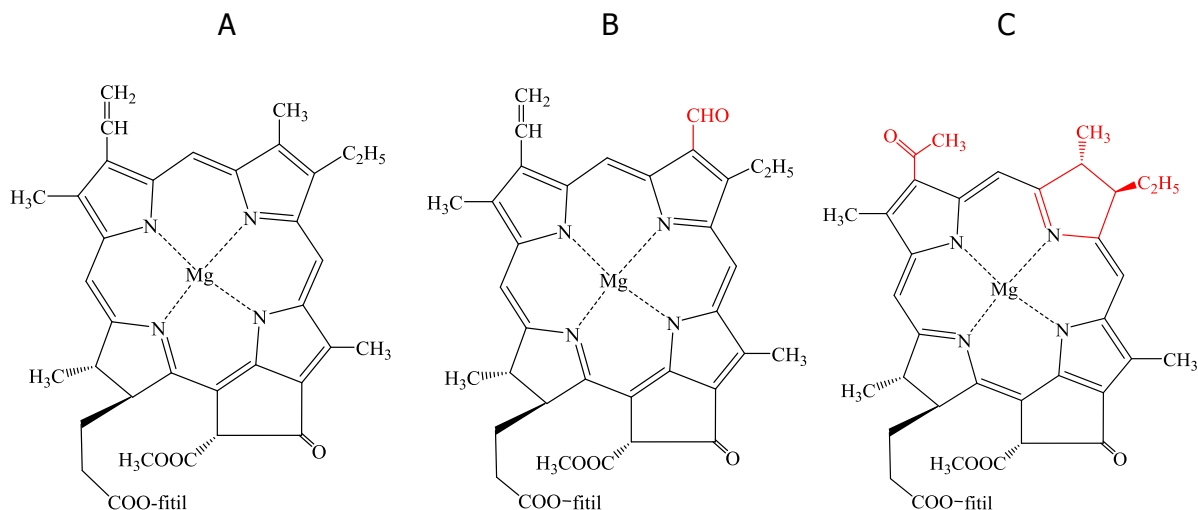
Tablica 1: Supstituenti i centralni atom klorofila i njihovih derivata

	M	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Klorofil <i>a</i>	Mg	CH <sub>3</sub>	CH=CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	H	COOCH <sub>3</sub>
Klorofil <i>d</i>	Mg	CH <sub>3</sub>	CH=CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	H
Feofitin <i>a</i>	2H	CH <sub>3</sub>	CH=CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	H	COOCH <sub>3</sub>
Klorofil <i>b</i>	Mg	CH <sub>3</sub>	CH=CH <sub>2</sub>	CHO	H	COOCH <sub>3</sub>
Klorofil <i>b'</i>	Mg	CH <sub>3</sub>	CH=CH <sub>2</sub>	CHO	COOCH <sub>3</sub>	H
Feofitin <i>b</i>	2H	CH <sub>3</sub>	CH=CH <sub>2</sub>	CHO	H	COOCH <sub>3</sub>
Klorofil <i>d</i>	Mg	CH <sub>3</sub>	CHO	CH <sub>3</sub>	H	COOCH <sub>3</sub>
Klorofil <i>f</i>	Mg	CHO	CH=CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	H	COOCH <sub>3</sub>

U živoj stanici klorofili su slabim nekovalentnim vezama povezani s polipeptidima, a ti su kompleksi ugrađeni u tilakoidne membrane kloroplasta. Kompleksi polipeptida i klorofila

okruženi su karotenoidima ili ksantofilima (ovisno o vrsti organizma) te tokoferolima (obitelj hidrofobnih molekula, u ljudskoj prehrani poznatiji kao vitamin E). Na svakih desetak molekula klorofila nalazi se približno jedna ili dvije molekule prethodno navedenih spojeva. Karotenoidi djeluju kao pomoćni pigmenti koji prenose apsorbiranu energiju na klorofil *a* te su i antioksidativna zaštita od visoko reaktivnih kisikovih radikala i singletnih kisika. Tokoferoli također uklanjaju singletni kisik i djeluju kao terminalna zamka za različite štetne radikale i lipidne perokside. Hidrofobni fitilni rep diktira točnu orijentaciju svake klorofilne molekule u lipidnim membranama (Price i Hendry, 1991).

Klorofil *a* i mnogi njegovi derivati, poznatiji pod nazivom klorini, po strukturi su dihidroporfirini. Svi prirodni klorofili imaju peti ili ciklopentanonski prsten *E* i temelje se na strukturi poznatijoj kao feofitin (Houghton i Hendry, 1996). Druga serija spojeva, poznata kao bakterioklorofili su fotosintetički pigmenti, povezani s klorofilima, koji se javljaju u raznim fototrofnim bakterijama. Grupe koje sadrže bakterioklorofil provode fotosintezu, ali ne proizvode kisik te koriste valne duljine svjetlosti koje ne apsorbiraju niti biljke niti cijanobakterije. Struktura bakterioklorofila *a* temelji se na strukturi tetrahidropirolina u kojemu su dva pirolna prstena reducirana. Na slici 3 prikazana je struktura klorofila *a*, klorofila *b* i bakterioklorofila *a*. Kao što se može primjetiti, klorofil *a* i klorofil *b* međusobno se razlikuju samo u supstituentu na C7 atomu; klorofil *a* sadrži  $-CH_3$ , a klorofil *b*  $-CHO$  skupinu.



Slika 3: Klorofil *a* (A), klorofil *b* (B) i bakterioklorofil *a* (C)

Klorofil *b* uvijek se u prirodi nalazi uz klorofil *a* te je u manjim količinama od klorofila *a*, a njihov omjer varira između 1:2 i 1:5 (Strain i Svec, 1966; Lange i sur., 1981). Jedini primjer prirodnog izvora klorofila *a* uz koji se ne nalazi i klorofil *b* su cijanobakterije i crvene bakterije, međutim umjesto cikličke strukture tetrapirola klorofili *a* takvih izvora sadrže lineariziranu formu (Houghton i Hendry, 1996). U tablici 2 prikazana je distribucija prirodnih klorofila. Varijacije u strukturi deset poznatih klorofila relativno su skromne. One se najčešće javljaju na položajima 3, 7 i 8, a u usporedbi s klorofilom *a* mnoge uključuju oksidaciju. Alternative fitilnoj skupini na položaju 17 nalaze se u nekim fotosintetskim bakterijama i algama, no može se zaključiti kako je originalna Mg-porfirinska struktura očuvana u svim poznatim fotosintetskim organizmima. Klorofil je ključan u procesu fotosinteze, iako drugi pigmenti, naročito ksantofili i određeni karotenoidi imaju pomoćnu, ali bitnu ulogu. Taj je proces najmanje 2600 milijuna godina star te se u svim svojim detaljima nije značajno mijenjao svo ovo vrijeme.

Tablica 2: Zastupljenost prirodnih derivata klorofila (Houghton i Hendry, 1996)

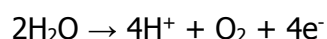
Klorofil	Organizam
<i>A</i>	-svi fotosintetski organizmi uključujući i više biljke, sve alge i fotosintetske bakterije Cyanophyta i Prochlorophyta
<i>B</i>	-vaskularne biljke, alge Chlorophyta i Euglenophyta i bakterijske vrste Pyrrophyta
<i>C</i>	-smeđe alge (Phaeophyta), dinoflagellates (svjetleći bičaši), Bacilariofita, Chrysophyta, Prasinophyta and Cryptophyta
<i>D</i>	-u nekim crvenim algama (Rhodophyta) i Chrysophyta
<i>E</i>	-Xanthophyta

Klorofil su prvi izolirali Joseph Bienaimé Caventou i Pierre Joseph Pelletier 1817. godine. U vrijeme svog rada, znanstvenici su znali da zelene biljke koriste ugljikov dioksid, a oslobađaju kisik. Godine 1883. njemački fiziolog Julius von Sachs pokazao je da klorofil nije raspršen po cijeloj biljnoj stanici, već da se nalazi u posebnim strukturama, kloroplastima, a također je dobio i zasluge za dokazivanje uloge klorofila u fotosintezi. Klorofil *a* i *b* izolirao je i pročistio njemački znanstvenik Richard Willstätter, koji 1915. godine osvojio Nobelovu nagradu za

otkrivanje kemijske strukture klorofila u formi mreže atoma ugljika, vodika i kisika koji okružuju jedan atom magnezija. Petnaest godina kasnije (1930.) Hans Fisher dobiva Nobelovu nagradu za otkriće kemijske strukture hemoglobina, uz zapažanje da je ona u jednom svom dijelu veoma slična strukturi klorofila. 1965. godine američki znanstvenik Robert Burns Woodward osvaja Nobelovu nagradu za potpuno određivanje strukture molekule klorofila (The Royal Swedish Academy of Sciences, 2018).

### 2.1.2 Biološka funkcija klorofila

U biljkama su različite vrste klorofila povezane s određenim proteinima ili polipeptidima i uklopljene u hidrofobne, lipidne membrane kloroplasta odnosno tilakoide. U kloroplastima je glavna molekula klorofila organizirana u funkcionalne strukture koje apsorbiraju fotone vidljive svjetlosti. No, bitno je naglasiti kako samo molekule klorofila *a* koje se nalaze u reakcijskim centrima mogu pretvarati svjetlosnu energiju u kemijsku. Izložene punoj sunčevoj svjetlosti grupe klorofilnih molekula, koje nazivamo antene, apsorbiraju približno 40 do 45 fotona u sekundi. Uslijed apsorpcije svjetlosti njihovi elektroni prelaze iz osnovnog u pobuđeno stanje, a prilikom relaksacije oslobođena energija pobuđuje elektrone susjedne molekule. Može se reći kako se energija inicijalnog fotona prenosi između molekula klorofila na susjedne molekule te se naposljetku koncentrira u manjem broju specijaliziranih reakcijskih centara. Zahvaljujući dovoljnoj količini rezonancijom prenesene energije molekule klorofila *a* u reakcijskim centrima bivaju oksidirane, a manjak elektrona nadoknađuje se oksidacijom vode:



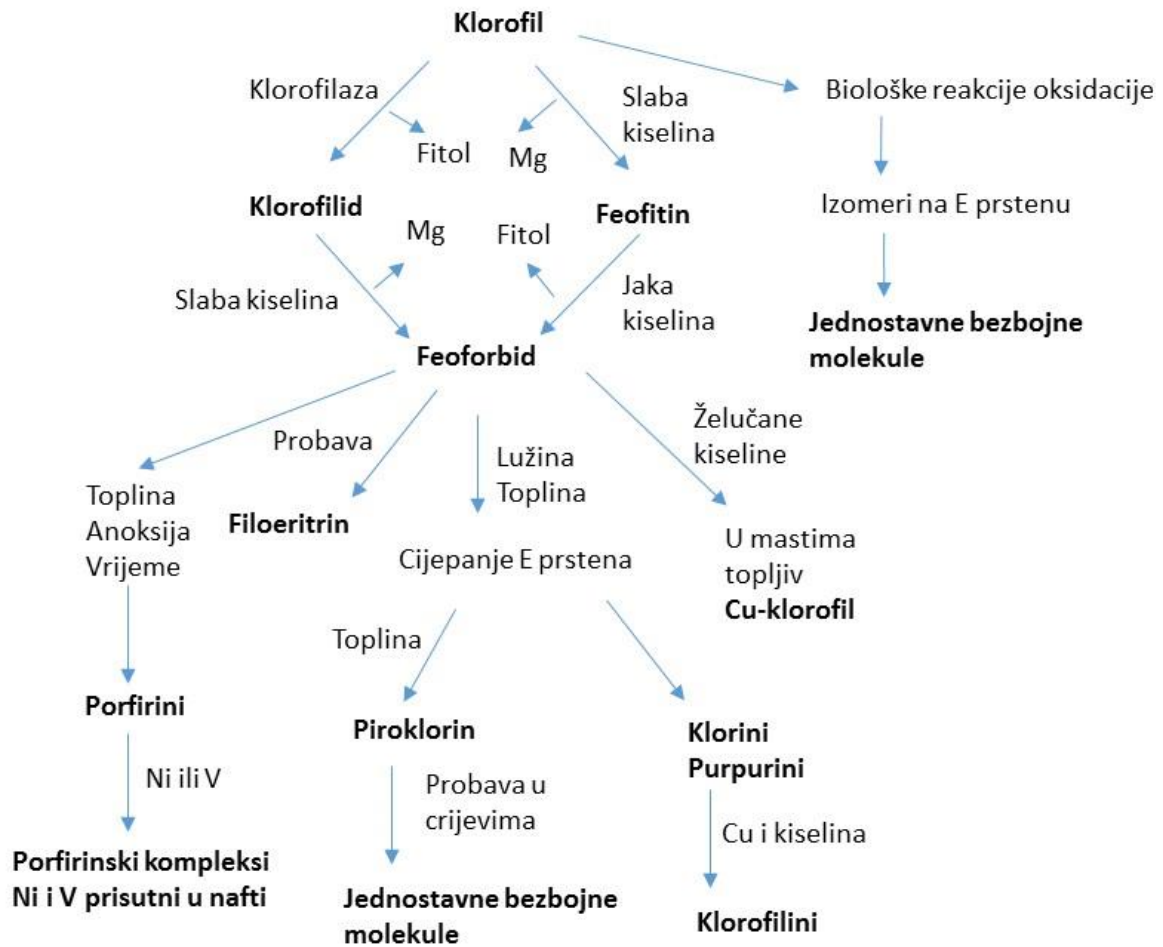
Protoni nastali u prethodnoj reakciji, zajedno s elektronima oslobođenima iz klorofila, reduciraju oksidirani koenzim nikotinamid adenin dinukleotid fosfat u NADPH, a gradijent protona koristi se za sintezu ATP-a. Produkti primarnih procesa, odnosno energija pohranjena u ATP-u i redukcijski potencijal NADPH, služe u reakcijama biosinteze organskih molekula iz ugljikova dioksida (Houghton i Hendry, 1996).

### 2.1.3 Degradacija klorofila

Tijekom životnog vijeka u biljkama se paralelno, no različitim brzinama, odvijaju procesi biosinteze klorofila i njegove degradacije. Najuočljivija promjena uzrokovana destrukcijom klorofila je promjena boje lišća iz zelene u žutu. Smatra se kako je brzina degradacije najveća

u početnoj fazi (zelenoj fazi sadnica) i na kraju životnog vijeka (tijekom starenja listova te zrenja plodova). Potonji procesi, koji uključuju neto gubitak klorofila, popraćeni su dubokim fizičkim promjenama u neposrednom okruženju pigmenata. Ove promjene uključuju promjenu fluidnosti tilakoidnih membrana i peroksidaciju tilakoidnih proteina kao rezultat djelovanja različitih oblika aktivnog kisika. Valja naglasiti kako je faza u kojoj dominira degradacija znatno kraća od razdoblja biosinteze. Primjerice, u sjevernim umjerenim područjima, listopadna drveća razvijaju zeleno lišće tijekom nekoliko dana, često tjedna te im lišće može biti u potpunosti zeleno do 5 mjeseci. U tom vremenskom periodu degradacija je vrlo spora, ali početkom listopada većina, ako ne i sav klorofil biva uništen kroz 3 do 4 dana. Osim *in vivo* degradacije, bitno je istaknuti i kako gotovo svaki način procesiranja i skladištenja zelenog povrća također uzrokuje razgradnju klorofila.

Slika 4 prikazuje shemu puteva *in vivo* i *in vitro* razgradnje klorofila. Uslijed djelovanja slabe kiseline molekula klorofila gubi ion magnezija, a produkt demetalacije je maslinasto-smeđi feofitin. U pojedinim biljnim vrstama u prirodnim, ali i u industrijskim uvjetima enzim klorofilaza katalizira hidrolizu fitilnog estera pri čemu nastaje klorofilid. Uslijed demetalacije klorofilida ili hidrolize feofitina djelovanjem jake kiseline nastaje feoforbid. Osim djelovanjem kiselina i enzima destrukcija klorofila može biti izazvana i svjetlošću, kisikom, povišenom temperaturom i fizičkim stresom (Hortensteiner, 1999).



Slika 4: Shema degradacije klorofila

#### 2.1.4 Primjena klorofila i pripadajućih derivata

Klorofil i njegovi derivati, poznati pod nazivom klorofilini, koriste se u industriji kao stabilna, netoksična, fiziološki bezopasna bojila za mliječne proizvode, jestiva ulja, juhe, žvakače, pića, kozmetiku te lijekove (Madrid i Madrid, 1990; Francis, 2000; Marquez i Borrmann, 2009). Zabilježena su i različita terapijska svojstva klorofila kao što je protuupalno djelovanje, ubrzavanje procesa zacjeljenja rana, svojstva imunološkog moderatora itd. (Chernomorsky i Segelman, 1988). Nadalje, klorofil i njegovi derivati pokazuju anti-mutagenu i anti-kancerogenu aktivnost (Matney, 1980; Dashwood i sur., 1991; Sarkar i sur., 1994; Ferruzzi i sur., 2002). Zbog antioksidacijskih, protuupalnih i detoksificirajućih svojstava klorofil i njegovi derivati našli su primjenu u lijekovima i dodacima prehrani (Chernomorsky i sur.,

1999; Fernandes i sur., 2007; Ferruzzi i Blakeslee, 2007). Također, mogu se koristiti za proizvodnju aditiva za gorivo radi poboljšanja karakteristika izgaranja ugljičnih goriva (Jordan, 1998.)

## 2.2 Spirulina (*Arthrospira platensis*)

Spirulina (*Arthrospira platensis*) je višestanična, filamentozna cijanobakterija (modrozeleno alga.) *Arthrospira* (Slika 5) je fotosintetizirajuća gram-negativna, netoksična cijanobakterija čiji rast potiče sunčeva svjetlost, visoke temperature i izrazito alkalni uvjeti.



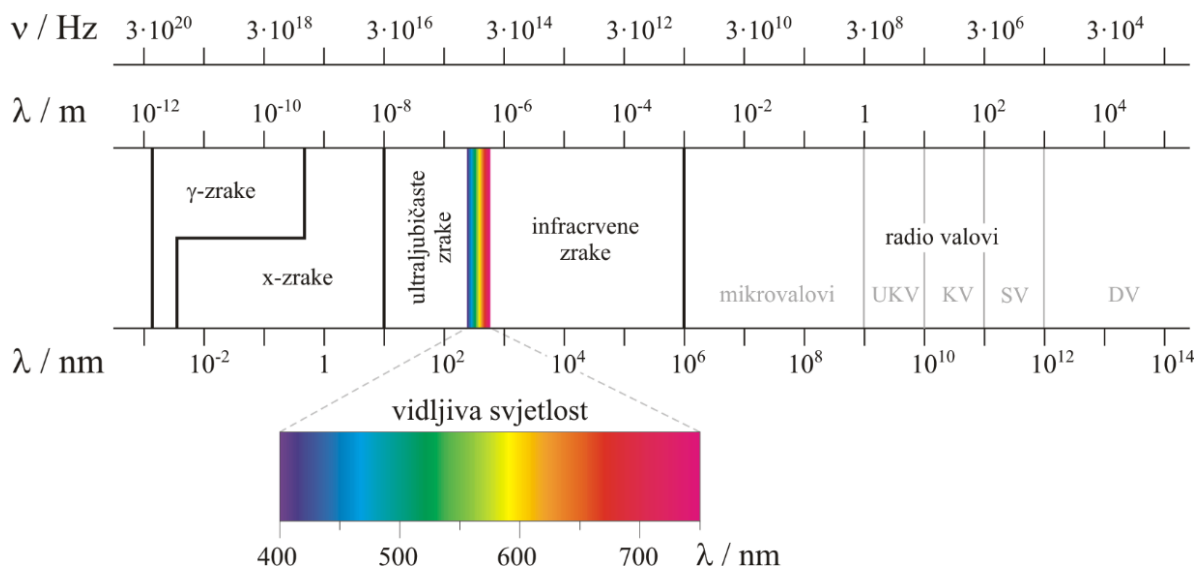
Slika 5: *Spirulina platensis* pod povećanjem 400 puta (UTEX Culture Collection of Algae, 2018)

Spirulina sadrži velike količine proteina, vitamina i minerala te je najbogatiji izvor beta-karotena. Sadrži i iznimno visoku razinu klorofila i to isključivo klorofila *a* (Encyclopedia Britannica, 2018). Značajnu popularnost stekla je u industriji zdrave hrane, suplement je namjenjen ljudskoj i stočnoj prehrani te se koristi u akvakulturi (Wan i sur., 2016). Spirulina raste u vodi i može se lako prikupljati i obrađivati. Stoljećima je u prehrani koriste ljudi koji žive u blizini alkalnih jezera, gdje je njezino prirodno stanište, poput jezera Čad na području Kanema i jezera Texcoco u Meksiku (Ciferri i Tiboni, 1985; Sotiroudis i Sotiroudis, 2013). Zbog svojih raznovrsnih primjena, danas se uzgaja i proizvodi u velikim otvorenim staklenicima ili u staklenicima s kontroliranim uvjetima diljem svijeta. U posljednje vrijeme načinjene su opsežne studije kako bi se procjenila terapijska vrijednost spiruline u liječenju niza bolesti, uključujući hiperkolesterolemiju, hiperglikemiju, kardiovaskularne bolesti, upalne bolesti, karcinom i

virusne infekcije (Deng i Chow, 2010). Također, raste interes za spirulinom kao izvorom nutraceutika, a provedena su i istraživanja imunooaktivnog inzulina izoliranog iz spiruline. Najveća izolirana količina inzulina iz spiruline je 33,9  $\mu\text{g/g}$ , a prisutnost inzulina dodatno je potvrđena pomoću SDS-PAGE-a, Western blottinga i HPLC-a upotrebom goveđeg inzulina kao markera (Answer i sur., 2011).

### 2.3 Spektroskopsko određivanje klorofila

Metode instrumentalne analize koje koriste elektromagnetska zračenja valnih duljina infracrvenih i ultraljubičastih valova, mikrovalova i X-zraka u svrhu određivanja strukture molekula nazivaju se spektroskopskim metodama. Elektromagnetsko zračenje pokazuje svojstva čestice i vala. Prema valnim svojstvima elektromagnetsko zračenje sastoji se od okomito oscilirajućeg električnog i magnetskog polja, dok se prema čestičnim svojstvima sastoji od „paketa” energije koji se nazivaju fotonima. Elektromagnetski spektar obuhvaća veliko područje valnih duljina i energija. Osnovna podjela elektromagnetskog spektra prikazana je na slici 6.



Slika 6: Spektar elektromagnetskog zračenja (Kemijski rječnik, 2018)

Svaka čestica (atom, ion, molekula) ima osnovno energetska stanje, odnosno stanje najniže energije. Do apsorpcije fotona dolazi jedino ako je energija fotona jednaka energetska razlici osnovnog i nekog višeg energetska stanja čestice (Skoog i Leary, 1992). Energija s



fotona prelazi na česticu, koja zatim prelazi u pobuđeno stanje. Nakon kratkog vremena (od  $10^{-6}$  do  $10^{-9}$  s) pobuđena se vrsta relaksira do osnovnog stanja prenoseći višak energije drugim česticama u okolini. Vijek trajanja pobuđene vrste je toliko kratak da je koncentracija pobuđenih čestica u bilo kojem trenutku zanemariva, a količina toplinske energije koja se otpušta tijekom relaksacije je toliko mala da se ne može detektirati. Iz navedenog se može zaključiti da se tijekom apsorpcijskih mjerenja neznatno utječe na energiju promatranog sustava.

Transmitancija je mjera količine neapsorbiranog zračenja, dok je apsorbancija ( $A$ ) definirana kao logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja ( $P_0$ ) i propuštenog zračenja ( $P$ ) kroz uzorak.

$$A = \log(P_0/P) \quad (1)$$

Apsorpcija svjetlosti kroz otopine može se matematički opisati Beer-Lambertovim zakonom:

$$A = \epsilon bc \quad (2)$$

gdje je  $A$  apsorbancija na danoj valnoj duljini svjetlosti,  $\epsilon$  je molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent ( $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti,  $b$  je duljina puta svjetlosti kroz uzorak, a  $c$  je množinska koncentracija tvari u otopini.

Beer-Lambertov zakon uspješno opisuje apsorpcijske sposobnosti razrijeđenih otopina, najčešće do koncentracije  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ . Kemijska odstupanja od Beer-Lambertovog zakona je lako predvidjeti iz podataka o konstantama ravnoteže reakcija i molarnih apsorptivnosti. Ona se pojavljuju kada vrste koje apsorbiraju disociraju, asociiraju ili daju produkt drugačijih apsorpcijskih vrijednosti od analitovih apsorpcijskih vrijednosti. Instrumentalna odstupanja obuhvaćaju primjenu polikromatskog zračenja te prisutnost zalutalog zračenja preko površine leća, filtera, prizmi itd. (Skoog i Leary, 1992).

### 2.3.1 UV/VIS spektroskopija

Molekulska spektroskopija temeljena na ultraljubičastom i vidljivom zračenju široko se primjenjuju za kvantitativnu analizu te za identifikaciju i određivanje brojnih organskih i anorganskih vrsta. UV/VIS spektroskopija je jedna od najčešćih metoda u kvantitativnoj analitičkoj kemiji zbog široke primjenjivosti, jednostavnosti, točnosti, (vrlo) dobre selektivnosti te velike osjetljivosti. UV/VIS spektroskopijom određuju se molekulske vrste koje apsorbiraju

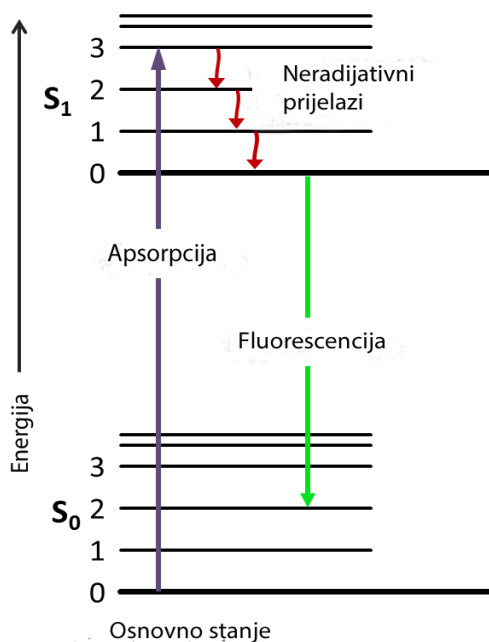
ultraljubičasto ili vidljivo zračenje. U ultraljubičasto spektralno područje spadaju valne duljine od 200 nm do 400 nm te raspon energije od 300 do 600 kJ/mol, a u vidljivo spektralno područje valne duljine od 400 nm do 800 nm kojima odgovara raspon energije od 150 do 300 kJ/mol. Za apsorpciju ultraljubičastog i vidljivog zračenja u organskim molekulama odgovorni su vezni te slobodni elektroni. Kako bi se organski spoj mogao spektrofotometrijski odrediti potrebno je da sadrži barem jednu kromofornu skupinu, odnosno nezasićenu funkcionalnu skupinu. Veliki broj organskih i anorganskih spojeva imaju apsorpcijske vrpce u UV/VIS području elektromagnetskog spektra. Kao dodatna prednost ovoj spektroskopskoj metodi ide u prilog i činjenica da je relativno lako postići eksperimentalne i instrumentalne uvjete u kojima vrijedi Beer-Lambertov zakon (Harvey, 1999).

Klorofil i njegovi derivati su obojeni organski spojevi koji zbog visoke delokalizacije molekulskih orbitala duž periferne strukture porfirina apsorbiraju u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Presudan utjecaj na intenzitet i položaj apsorpcijskih vrpca klorofila u VIS spektrima ima raspodjela  $\pi$ -elektronske gustoće. Preklapanja  $\pi$ -orbitala u dimerima ili oligomerima klorofila dovode do daljeg batokromnog pomaka apsorpcijskih maksimuma za desetak nanometara. Apсорpcija u VIS području može se koristiti i kao odlična osnova za proučavanje donor-akceptorskih interakcija klorofila *a*. U monomernoj formi, u kojoj molekule otapala okružuju molekulu klorofila, Mg-atom se ponaša kao akceptor elektrona (npr. u slučaju acetona). U oligomerima, u kojima se jedna molekula klorofila povezuje s drugom molekulom klorofila, Mg-atom iz jedne molekule klorofila igra ulogu akceptora i veže se za karbonilnu grupu druge molekule klorofila, koji tom prilikom ima ulogu elektron donora. S povećanjem broja povezanih molekula u oligomeru klorofila, apsorpcijski maksimum njegovog VIS spektra pomiče se k većim valnim duljinama kao posljedica dodatnog preklapanja  $\pi$ -orbitala makrocikličnog sustava (Cotton i sur., 1978).

Vidljivi (VIS) dio spektra sunčevog zračenja čini oko 90% ukupne sunčeve energije koja padne na površinu Zemlje. Pri višim intenzitetima VIS zračenja može doći do oštećenja fotosintetskog aparata što može dovesti do značajnog smanjenja sadržaja klorofila u biljkama (Van i Garrard, 1976). Struktura klorofila je značajno ugrožena uslijed izlaganja većim količinama UV zračenja (UV-B, ali i UV-A, 315-400 nm) i vidljive svjetlosti, posebno u *in vitro* uvjetima kada za razliku od *in vivo* uvjeta u biljkama, nije pokrenut nijedan od više različitih mehanizama zaštite klorofila od degradacije (S. Petrović, 2016).

### 2.3.2 Fluorescencijska spektroskopija

Fluorimetrija je spektroskopska metoda koja se bazira na interakciji elektromagnetskog zračenja s uzorkom. Fluorescencijski spektrometri imaju radno područje unutar ultraljubičastog i vidljivog dijela elektromagnetskog spektra, odnosno u rasponu valnih duljina od 200 nm do 800 nm (Harvey, 1999). Fluorescencijska spektroskopija je puno osjetljivija te selektivnija u odnosu na UV/VIS spektrofotometriju što je čini prikladnom metodom za *in vivo* detekciju specifičnih spojeva. Fluorescencija daje informacije ne samo o strukturnim detaljima molekula, već i o dinamici degradacije unutar date okoline (*in vitro*, *in vivo*, *in situ*). Ova metoda se danas ubraja u red najpogodnijih, neinvazivnih, visoko osjetljivih, brzih, direktnih i jeftinih kvantitativnih metoda (Maxwell i Johnson, 2000). Obje spektroskopske metode (fluorescencijska i UV/VIS spektroskopija) uključuju korištenje izvora svjetlosti te mogućnost odabira određenih valnih duljina. Također, obje metode se oslanjaju na apsorpciju svjetlosti pri čemu dolazi do pobuđivanja elektrona, a mogu se koristiti i za određivanje koncentracije ispitivane tvari. Ipak fluorimetrija, za razliku od UV/VIS spektroskopije, može pratiti i emisiju svjetlosti kada se elektroni vraćaju iz pobuđenog u osnovno stanje.



Slika 7: Shematski prikaz apsorpcije i fluorescencije

Apsorpcijom zračenja molekula prelazi iz osnovnog ( $S_0$ ) u pobuđeno stanje ( $S_1$ ). Iz određenog višeg vibracijskog stanja u pobuđenom elektronskom stanju molekula vibracijskom relaksacijom (neradijativnim prijelazima) prelazi u osnovno vibracijsko stanje. Emisijom zračenja, procesom fluorescencije, molekula zatim prelazi iz pobuđenog elektronskog stanja u osnovno elektronsko stanje (Slika 7).

Broj molekula koje fluoresciraju malen je zbog prirode apsorpcije i emisije. Vjerojatnost dviju tvari da apsorbiraju i emitiraju na jednakim valnim duljinama vrlo je mala što omogućuje visoku selektivnost. Fluorescencijska spektroskopija je izrazito osjetljiva metoda zbog činjenica da je fotone lako detektirati te da molekule ne emitiraju vidljivu svjetlost u standardnim uvjetima, osim ako ne fluoresciraju ili fosforesciraju (Wesolowski, 2014). Fluorescencijske metode su za jedan do tri reda veličine osjetljivije od ostalih apsorpcijskih metoda (Skoog i Leary, 1992).

A. Weissler i C.E. White u „Handbook of Analytical Chemistry“ naveli su više od 100 primjera najvažnijih organskih i biokemijskih tvari koje fluoresciraju, a među navedenim biljnim preparatima nalazi se i klorofil.

Eksperimentalno je određeno da strukture s aromatskim prstenovima daju najintenzivnije i najupotrebljivije molekulske fluorescencijske emisije. Snaga fluorescencijskog zračenja  $F$  proporcionalna je snazi zračenja pobudnog snopa koji se apsorbira u sustavu:

$$F = K' \cdot (P_0 - P) \quad (3)$$

pri čemu je  $P_0$  snaga upadnog snopa,  $P$  je snaga snopa nakon prolaza kroz otopinu,  $b$  je duljina puta kroz sredstvo, a  $K'$  konstanta ovisna o kvantnoj učinkovitosti fluorescentnog sustava. Fluorescencijsko zračenje se može dovesti u vezu s koncentracijom  $c$  fluorescentne čestice pomoću Beerovog zakona:

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot c} \quad (4)$$

pri čemu  $\varepsilon$  označava molarnu apsorptivnost fluorescentne vrste.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Biljni materijali

Za izradu baždarnog dijagrama korištena je *Spirulina platensis* u prahu tvrtke Encian, dobivena iz ekološkog uzgoja, a koncentracija klorofila *a* određena je u ekstraktu rikole (*Eruca sativa* L.) kupljene na tržnici.



Slika 8: *Eruca sativa* L. (Anonymous 2, 2018)

#### 3.2 Kemikalije

- aceton (Gram-Mol, pro analysi)
- bezvodni natrijev sulfat (Gram-Mol, pro analysi)
- destilirana voda
- kalcijev karbonat (Kemika, pro analysi)
- metanol (J. T. Baker, HPLC gradient grade)
- petroleter (Carlo Erba, for analysis)
- silikagel (Merck, Kieselgel 60 HF<sub>254</sub>)

#### 3.3 Aparatura i pribor:

- analitička vaga
- automatske pipete
- Erlenmayerova tikvica
- filter papir

- UV/ViS spektrofotometar PerkinElmer Lambda 25
- fluorimetar PerkinElmer LS 55
- graduirana pipeta, 20 mL
- kivete
- lijevak za odjeljivanje
- menzura, 100 mL
- ploče za tankoslojnu kromatografiju sa slojem silikagela
- rotacioni vakuum uparivač
- sinter lijevak
- staklene čaše, 50 i 100 mL
- špatula
- tikvica s okruglim dnom, volumena 100 mL
- vakuum sisaljka

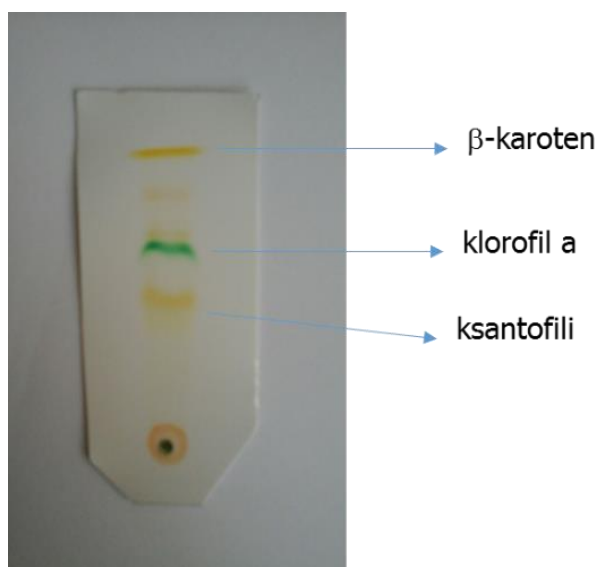
### **3.4 Metode rada**

#### **3.4.1 Ekstrakcija pigmenata iz *Spirulina sp.***

U epruvetu (Falcon), umotan u aluminijsku foliju, izvaže se 1 g *Spirulina sp.* u prahu, 300 mg CaCO<sub>3</sub> i doda 20 ml acetona. Sadržaj epruvete dobro se promiješa, a dobiveni ekstrakt profiltrira te koncentrira na rotacijskom vakuum uparivaču pazeći pritom da temperatura vodene kupelji ne prijeđe 25 °C.

#### **3.4.2 Izolacija standarda klorofila *a* iz acetonskog ekstrakta *Spirulina sp.***

Razdvajanje pigmenata i izolacija klorofila *a* iz acetonskog ekstrakta *Spirulina sp.* provodi se preparativnom tankoslojnom kromatografijom na silikagelu. Postupku je prethodilo kromatografiranje uzoraka na malim pločicama silikagela kako bi se utvrdila mobilna faza u kojoj se klorofil *a* razdvaja od preostalih pigmenata u ekstraktu i pritom se kao optimalna pokazala smjesa petroletera i acetona u omjeru 75%:25% (Slika 9). R<sub>F</sub>-vrijednost (omjer udaljenosti koju je prešla pojedina komponenta i one koju je istovremeno prešla mobilna faza) klorofila *a* u ovom eluensu iznosi 0,65.



Slika 9: Tankoslojna kromatografija (vlastita fotografija)

Kada se utvrdi pogodan kromatografski sustav, acetonski ekstrakt nanosi se na staklene ploče sa silikagelom te se u tami, pri sobnoj temperaturi, eluira približno 60 minuta u kadici za kromatografiju. Po završetku, ploča se izvadi iz kadice i nakratko posuši. Klorofil *a*, adsorbiran na silikagel, špatulom se sastruže sa ploče i prenese na sinter lijevak. Desorpcija sa silikagela provodi se višestrukim ispiranjem acetonom sve dok se silikagel ne obezboji. Otopina klorofila *a* u acetonu upari se do suha.

### 3.4.3 Ekstrakcija pigmenata i izolacija klorofila iz rikole (*Eruca sativa*)

U tarioniku se 5 minuta homogenizira 5 g rikole i 300 mg  $\text{CaCO}_3$  u 20 mL acetona. Dobiveni ekstrakt profiltrira se u okruglu tikvicu te uparava na približno 25 °C kako bi se uklonio aceton. U tikvicu se potom doda 30 mL vode i 30 mL petroletera te se sadržaj prelije u lijevak za odjeljivanje (Slika 10). Gornji, petroleterski sloj ispusti se u suhu Erlenmayerovu tikvicu a donji, vodeni sloj izmučkava se po 30 mL petroletera dok se ne obezboji. Objedinjeni organski slojevi posuše se bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriraju te upare do suha. Izolacija klorofila iz ekstrakta provodi se preparativnom tankoslojnom kromatografijom na silikagelu na isti način kao što je opisano u postupku 3.5.2.



Slika 10: Razdvajanje organske i vodene faze pomoću lijevka za odjeljivanje (vlastita fotografija)

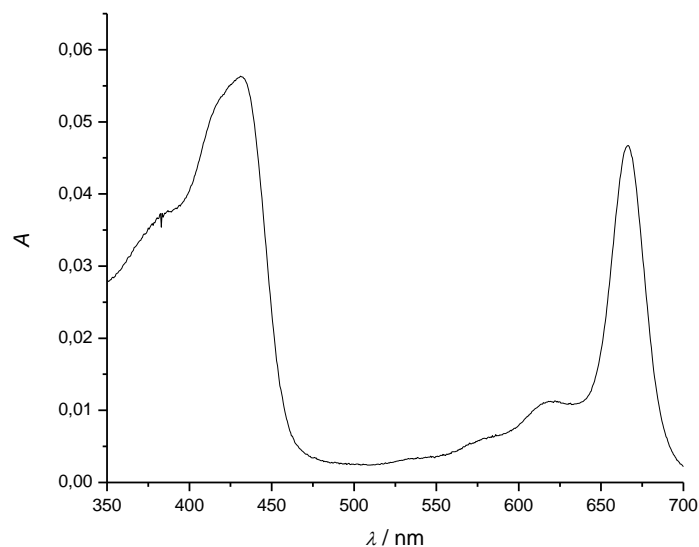
#### 3.4.4 UV/VIS spektroskopsko određivanje koncentracije standarda klorofila *a*

Parametri UV/ViS spektrofotometra:

- *start wavelength*: 350 nm
- *end wavelength*: 700 nm
- *data interval*: 0,5 nm
- brzina snimanja: 480 nm/min

Klorofil *a*, dobiven iz acetonskog ekstrakta *Spirulina sp.* (3.4.2.), otopi se u metanolu spektroskopske čistoće. Apsorbancija metanolne otopine klorofila *a* mjeri se u dvoznačnom UV/ViS spektrofotometru, pri čemu se u jednu kvarcnu kivetu stavlja čisti metanol, a u drugu otopina klorofila *a* nepoznate koncentracije. Očita se apsorbancija otopine pri valnoj duljini od 660 nm (Slika 11) te se uz poznavanje molarnog apsorpcijskog koeficijenta  $\epsilon = 32\,600\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  pri toj valnoj duljini i duljine puta  $l = 1\text{ cm}$ , pomoću Beer-Lambertovog zakona izračuna koncentracija otopine klorofila *a*.





Slika 11: UV/ViS spektar spiruline

### 3.4.5 Izrada baždarnog dijagrama za fluorimetrijsko određivanje koncentracije klorofila *a*

Parametri fluorimetra:

- *start wavelenght*: 500 nm
- *end wavelenght*: 750 nm
- *pobuda (excitation)*: 405 nm
- *ex. slit*: 10 nm
- *em. slit*: 5 nm
- *brzina snimanja*: 400 nm/min

Prvo se snimi fluorescencijski emisijski spektar čistog metanola, koji se prilikom obrade podataka oduzima od fluorescencijskog emisijskog spektra metanolne otopine klorofila *a*. Nakon toga se u istu fluorimetrijsku kivetu doda alikvot otopine klorofila *a* kako bi početna koncentracija klorofila *a* iznosila  $1 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> te se snimi fluorescencijski emisijski spektar pripremljene otopine. Postupno se dodaju alikvoti otopine klorofila *a* te se snimaju fluorescencijski emisijski spektri otopina sve dok ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije prestane biti linearno ovisna o koncentraciji.

### **3.4.6 Fluorimetrijsko određivanje koncentracije klorofila *a* u ekstraktu rikole**

Dobiveni ekstrakt *Eruca sativa L.* (3.4.3.) otopi se u 6 mL metanola spektroskopske čistoće te se koristi kao ishodna otopina za fluorimetrijska mjerenja.

U fluorimetrijskoj kiveti snimi se fluorescencijski emisijski spektar čistog metanola, koji se prilikom obrade podataka oduzima od fluorescencijskog emisijskog spektra metanolne otopine klorofila *a* iz ekstrakta *Eruca sativa L.* Nakon toga se u istu fluorimetrijsku kivetu doda 5  $\mu$ L ishodne otopine ekstrakta *Eruca sativa L.* te se snimi fluorescencijski emisijski spektar.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Uvod

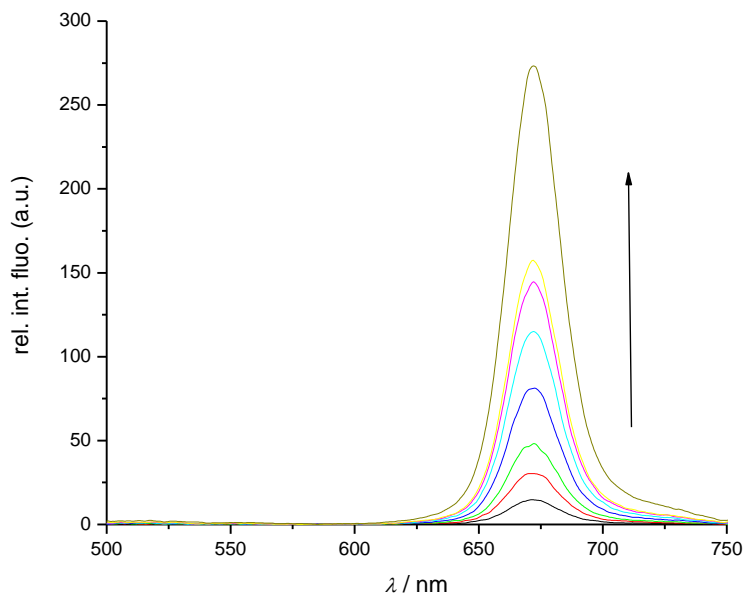
Cilj ovoga rada je razvoj metode za fluorimetrijsko određivanje koncentracije klorofila *a* u biljnim ekstraktima. Prvi dio rada posvećen je izolaciji standarda klorofila *a* iz spiruline te konstrukciji baždarnog dijagrama pomoću kojeg se određivanjem relativnog intenziteta fluorescencije pri 673 nm može odrediti koncentracija klorofila *a* u ispitivanom ekstraktu. U drugom dijelu rada određena je nepoznata koncentracija klorofila *a* u dva acetonska ekstrakta rikole.

### 4.2 Izolacija klorofila *a* iz *Spirulina sp.*

Za izolaciju standarda klorofila *a* korištena je *Spirulina sp.* jer ta višestanična cijanobakterija, evolucijski uvjetovano, sadrži isključivo klorofil *a*, a ne i klorofil *b* (Encyclopedia Britannica, 2018). Odabirom spiruline bitno je olakšana izolacija čistog standarda iz acetonskog ekstrakta pomoću preparativne tankoslojne kromatografije jer bliske  $R_f$  vrijednosti klorofila *a* i klorofila *b* u brojnim eluensima otežavaju njihovo dobro razdvajanje. Za ekstrakciju fotosintetskih pigmenata iz spiruline u prahu kao otapalo je korišten aceton jer su pigmenti u njemu dobro topljivi te se zbog velike hlapljivosti aceton lako uklanja iz ekstrakta na rotacijskom vakuum uparivaču, već pri sobnoj temperaturi, čime se sprječava degradacija klorofila djelovanjem povišene temperature. Tijekom homogenizacije smjese spiruline i acetona dodan je kalcijev karbonat kojim se, zbog bazičnih svojstava, svodi na minimum moguća konverziju klorofila *a* u feofitin. Zbog prethodno opisanih svojstava aceton je korišten i za desorpciju klorofila *a*, razdvojenog od ostalih pigmenata, sa stacionarne faze.

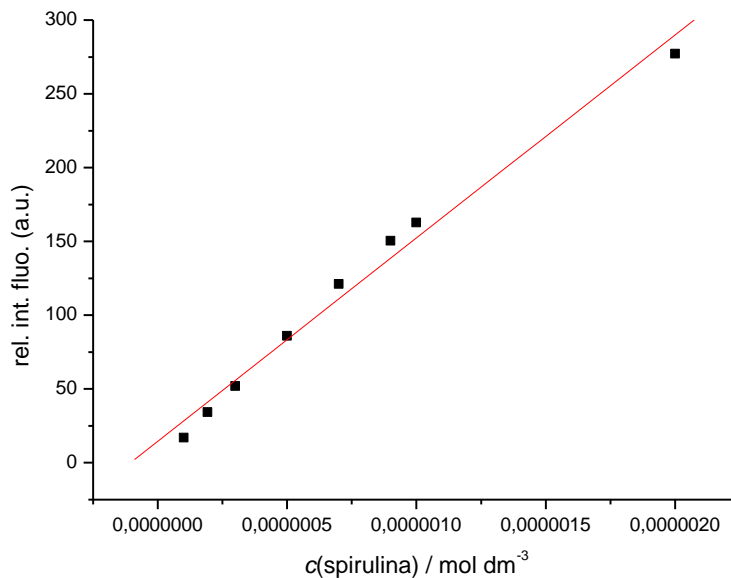
### 4.3 Izrada baždarnog dijagrama

Fluorimetrijskim mjerenjem određivano je osam različitih metanolnih otopina klorofila *a* iz *Spirulina sp.* u rasponu koncentracija od  $1 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> do  $2 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> (Slika 12).



Slika 12: Fluorescencijski emisijski spektar klorofila *a* izoliranog iz spiruline za konstrukciju baždarnog dijagrama kod pobude  $\lambda_{\text{exc}} = 405$  nm

Dobiveni relativni intenziteti fluorescencije pri maksimalnoj valnoj duljini  $\lambda_{\text{max}} = 673$  nm prikazani su u ovisnosti o koncentraciji pri čemu je konstruiran baždarni dijagram (Slika 13).



Slika 13: Baždarni dijagram dobiven iz fluorescencijskog emisijskog spektra klorofila *a* izoliranog iz *Spirulina sp.* pri  $\lambda_{\text{max}} = 673$  nm

#### 4.4 Ekstrakcija pigmenata i izolacija klorofila *a* iz rikole

Ekstrakcija fotosintetskih pigmenata načinjena je iz dva uzorka rikole jednake mase. Kao otapalo koristio se aceton, uz dodatak  $\text{CaCO}_3$ , zbog karakteristika navedenih reagenasa opisanih u poglavlju 4.3. Nakon homogenizacije i filtracije, aceton se iz ekstrakta uklanja uparavanjem na rotacijskom vakuum uparivaču pri sobnoj temperaturi. Nakon uparavanja u tikvici zaostaje voda i čvrsti ostatak pigmenata netopljivih u vodi. Zaostala voda je porijeklom iz rikole te ju pri ovim uvjetima nije moguće upariti. U navedenu heterogenu smjesu dodaje se voda i petroleter kako bi se u lijevku za odjeljivanje razdvojila organska faza (koja sadrži otopljene pigmente) od vode. Budući da ekstrakt rikole među ostalim pigmentima sadrži i kartenoide koji „gase“ fluorescenciju klorofila (Shinkarev i Govindjee, 1993), prije fluorimetrijskog određivanja koncentracije klorofila *a* u ekstraktu oni su uklonjeni preparativnom tankoslojnom kromatografijom. Kao što je vidljivo na slici 9, nepolarni karotenoidi putuju uz frontu smjese petroletera i acetona (75% : 25%) kao eluensa te se time jednostavno uklanjaju od preostalih pigmenata u ekstraktu. Bitno je naglasiti kako rikola, kao i većina biljaka, sadrži oba tipa klorofila, no fluorimetrijskom određivanju koncentracije klorofila *a* ne mora prethoditi njihovo potpuno razdvajanje tankoslojnom kromatografijom jer uslijed pobude pri 405 nm fluorescira isključivo klorofila *a*.

#### 4.5 Fluorimetrijsko određivanje koncentracije klorofila *a* u ekstraktu rikole

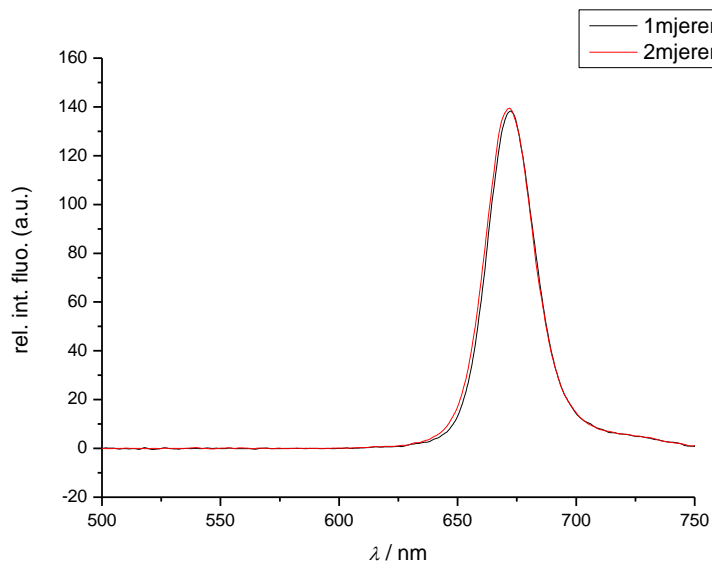
Koncentracija klorofila *a* u ekstraktu rikole (*Eruca sativa*) određuje se iz baždarnog dijagrama (Slika 13) prema jednadžbi pravca (6):

$$y = 1,38 \cdot 10^8 x + 14,59 \quad (6)$$

Preuređenjem jednadžbe (6) dobiva se eksplicitna jednadžba za određivanje koncentracije klorofila *a* u ekstraktu *Eruca sativa* L. :

$$c(\text{klorofil } a) = \frac{\text{rel. int. fluo}(\lambda_{\text{max}} = 673 \text{ nm}) - 14,59}{1,38 \cdot 10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}} \quad (7)$$

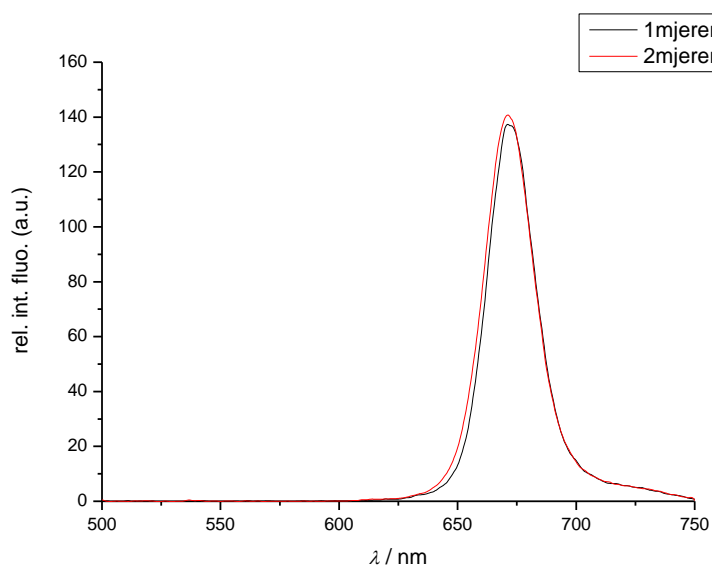
Mjerenje svakog ekstrakta *Eruca sativa* L. ponovljeno je dva puta da bi se utvrdila preciznost same metode (slike 14 i 15).



Slika 14: Fluorescencijski emisijski spektar prvog ekstrakta rikule, mjeren dva puta, kod pobude  $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$

Uzima se prosječni relativni intenzitet fluorescencije (rel. int. fluo) dva napravljena mjerenja pri  $\lambda_{\text{max}} = 673 \text{ nm}$  za račun koncentracije klorofila  $a$  u prvom ekstraktu rikule:

$$c(\text{klorofil } a, \text{ ekstrakt1}) = \frac{138,7 - 14,59}{1,38 \cdot 10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}} = 9,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$$



Slika 15: Fluorescencijski emisijski spektar drugog ekstrakta rikule, mjeren dva puta, kod pobude  $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$

Uzima se prosječni relativni intenzitet fluorescencije (rel. int. fluo) dva napravljena mjerenja pri  $\lambda_{\text{max}} = 673 \text{ nm}$  za račun koncentracije klorofila *a* u drugom ekstraktu rikule:

$$c(\text{klorofil a, ekstrakt2}) = \frac{138,2 - 14,59}{1,38 \cdot 10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}} = 9,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$$

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti da ne postoji statistički značajna razlika između dva mjerenja istog ekstrakta kao niti između dva različita ekstrakta *Eruca sativa L.*, čime se može potvrditi točnost fluorimetrijske metode za određivanje koncentracije klorofila *a* iz ekstrakta *Eruca sativa L.*

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom je radu razvijena i testirana metoda za fluorimetrijsko određivanje koncentracije klorofila *a* u biljnim ekstraktima:

- standard klorofila *a* za fluorimetrijsko određivanje koncentracije klorofila *a* u biljnim ekstraktima izoliran je iz spiruline
- koncentracija standarda klorofila *a* određena je primjenom UV/VIS spektroskopije
- prikazom ovisnosti relativnih intenziteta fluorescencije pri maksimalnoj valnoj duljini  $\lambda_{\max} = 673$  nm u ovisnosti o koncentraciji klorofila *a* konstruiran je baždarni dijagram
- koncentracija klorofila *a* u ekstrakta *Eruca sativa L.* određena je fluorescencijskom spektroskopijom
- točnost metode potvrđena je dupliranim ekstrakcijama i dupliranim mjerenjima fluorescencije iz svakog ekstrakta *Eruca sativa L.*



## 6. POPIS LITERATURE

- Anonymous 1 (2018) <<http://www.alltomvetenskap.se/nyheter/hur-fungerar-fotosyntesen?page=4>> Pristupljeno: 28. svibnja 2018.
- Anonymous 2 (2018) <Pinova [http://pinova.hr/hr\\_HR/aktualno/rikula-lat-eruca-sativa](http://pinova.hr/hr_HR/aktualno/rikula-lat-eruca-sativa)> Pristupljeno 6. ožujka 2018.
- Answer R., Khursheed S., Fatma, T. (2011) Detection of immunoactive insulin in Spirulina. *Journal of Applied Phycology* **24**: 583 - 591.
- Chernomorsky S. A., Segelman A. B. (1988) Biological activities of chlorophyll derivatives. *New Jersey Medicine* **85**: 669 - 673.
- Chernomorsky S., Segelman A., Poretz R. D. (1999) Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumour cell growth. *Teratogenesis Carcinogenic and Mutagenesis* **19**: 313 - 322.
- Ciferri O., Tiboni O. (1985) The biochemistry and industrial potential of Spirulina. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**: 503 - 526.
- Cotton T. M., Loach P. A., Katz J. J., Ballschmiter K. (1978) Studies of chlorophyll-chlorophyll and chlorophyll-ligand interactions by visible absorption and infrared spectroscopy at low temperatures. *Photochemistry and Photobiology.* **21**: 735-749.
- Dashwood R. H., Breinholt V., Bailey V. (1991) Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B1 (AFB1)-DNA binding in vivo and anti-mutagenic activity against AFB1 and two heterocyclic amines in the Salmonella mutagenicity assay. *Carcinogenesis* **12**: 939 - 942.
- Deng R., Chow T. J. (2010) Hypolipidemic, antioxidant and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. *Cardiovasc. Ther.* **28**: 33 - 45.
- Encyclopedia Britannica (2018) <<https://www.britannica.com/science/blue-green-algae>>. Pristupljeno: 14. veljače 2018.
- Fernandes T. M., Gomes B. B., Lanfer-Marquez U. M. (2007) Apparent absorption of chlorophyll from spinach in an assay with dogs. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **8**: 426 - 432.
- Ferruzzi M. G., Blakeslee J. (2007) Digestion, absorption, and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research* **27**: 1 - 12.

- Ferruzzi M. G., Bohm V., Courtney P. D., Schwartz S. J. (2002) Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *Journal of Food Science* **67**: 2589 - 2595.
- Francis F. J. (2000) Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology, John Wiley and Sons, str. 391.
- Harvey, D. (1999) Modern Analytical Chemistry, McGraw-Hill.
- Hortensteiner S. (1999) Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, **56**: 330 - 347.
- Houghton J.D., Hendry G. A. F. (1996) Natural Food Colorants, Springer, str. 131 - 156.
- Jinasena M. A. M., Amarasinghe A. D. U. S., Amarasinghe , B. M. W. P. K., Prashantha M. A. B. J. (2016) Extraction and degradation of chlorophyll a and b from *Alternanthera sessilis*. *J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka* **44**: 11 - 21.
- Jordan F. L. (1998) Chlorophyll Based Fuel Additive for Reducing Pollutant Emissions. US Patent 5826369.
- Kemijski rječnik (2018) <<https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=spektar+elektromagnetskog+zra%C4%8Denja>> Pristupljeno 26. veljače 2018.
- Lange O. L., Nobel P. S., Osmond C. B., Ziegler H (1981) Physiological Plant Ecology I, Springer, str. 57 - 107.
- Madrid R., Madrid J. M. (1990) Los colorantes en la alimentacion. *Alimentacion, Equipos y Tecnologia* **9**: 185 - 191.
- Marquez U. M. L., Borrmann D. (2009) Chlorophylls. Handbook of Natural Colorants, John Wiley and Sons, str. 247.
- Matney T.S. (1980) Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutation Research* **77**: 245 - 250.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659 – 668.
- Petrović S. (2016) Stability of chlorophyll on oxidative stress in water medium and liposomes, doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu.

Price A., Hendry G. A. F. (1991) Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant Cell Environ.* **14**: 477 - 484.

Sarkar D., Sharma A., Talukder G. (1994) Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. *Mutation Research* **318**: 239 - 247.

Shinkarev, V.P., Govindjee (1993) Insight into the relationship of chlorophyll a fluorescence yield to the concentration of its natural quenchers in oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7466 – 7469.

Skoog D. A., Leary J. J. (1992) Principles of Instrumental Analysis, 4. izd., Saunders College Pub., str. 490 - 592.

Sotiroudis T. G., Sotiroudis G. T. (2013) Health aspects of Spirulina (Arthrospira) microalga food supplement. *J. Serb. Chem. Soc.* **78**: 395 - 405.

Strain H. H., Svec W. A. (1966) The Chlorophylls, Academic Press, str. 21 – 66.

The Royal Swedish Academy of Sciences (2018) <<https://www.nobelprize.org/>>  
Pristupljeno: 28. svibnja 2018.

UTEX culture collection of algae (2018) <<https://utex.org/products/utex-lb-2340>>.  
Pristupljeno: 14. veljače 2018.

Van T. K., Garrard L. A. (1976) Effect of UV-B-radiation on net photosynthesis of some C3 and C4 plants. *Soil and Crop Science* **35**: 1-3

Wan D., Wu Q., Kuča K. (2016) Spirulina. Nutraceuticals, Elsevier, str. 569 - 583.

Wesolowski, M.C. (2014) Integrating Biology into the General Chemistry Laboratory: Fluorometric Analysis of Chlorophyll *a*, *Journal of Chemical Education* **91**: 1224 - 1227.

White C. E., Weissler A. (1964) Fluorometric Analysis. *Anal. Chem.* **36 (5)**: 116 – 129.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

  
\_\_\_\_\_  
Ime i prezime studenta