

Raziskovalna naloga

Vsebnost klorofila v ekstraktih različnih topil



Področje: kemija

Avtorji: Taja Gabrovec, Jure Škamlec, Nik Bombek

Mentorica: Maja Smiljan

Somentorica: Lilijana Milošič

Ptuj, marec 2023

ZAHVALA

Zahvaljujemo se mentorici gospe Maji Smiljan, učiteljici kemije, za pomoč pri načrtovanju raziskovalnega dela, izvedbi poskusov in svetovanju pri pisanju raziskovalne naloge.

Zahvaljujemo se tudi podjetju Ikema in gospe Lilijani Milošič za možnost izvajanja spektrofotometrične določitve klorofila.

KAZALO VSEBINE

Povzetek	6
1. UVOD	7
1.1 Namen	7
1.2 Hipoteze	8
2. TEORETIČNI DEL	8
2.1 Pomen rastlin v naravi	8
2.1.1 Pomen rastlin za okolje	8
2.1.2 Pomen rastlin za človeka	9
2.2 Rastlinska celica	9
2.3 Zgradba in deli rastlin	10
2.3.1 List	10
2.3.2 Steblo	11
2.3.3 Korenina	12
2.4 Peteršilj (<i>Petroselinum crispum</i>)	13
2.5 Motovilec (<i>Valerianella locusta</i>)	13
2.6 Špinača (<i>Spinacia oleracea</i>)	14
2.7 Barvila v rastlinah	15
2.3.1 Klorofil	15
2.3.1.1 Pomen klorofila za živa bitja	17
2.3.2 Karotenoidi	18
2.3.3 Flavonoidi	18
2.4 Barvanje z naravnimi barvili	18
2.4.1 Jajca	19
2.4.1.1 Nastanek in zgradba jajčne lupine	20
2.4.2 Barvanje jajc	22
3. EKSPERIMENTALNI DEL	24
3.1 Materiali in pripomočki	24
3.2 Metode dela	25
3.2.1 Ekstrakcija	25
3.2.2 Filtriranje	25
3.2.3 UV-VIS spektrofotometer	26
3.2.4 Druge metode dela	27
3.2 Opis postopka	27
4. Rezultati	30

4.1 Barva vzorcev po ekstrakciji	30
4.1.1 Peteršilj	30
4.1.2 Motovilec	31
4.1.3 Špinača	32
4.2 Obarvanost jajčne lupine v različnih vzorcih	33
4.2.1 Peteršilj	33
4.2.2 Motovilec	34
4.2.3 Špinača	35
4.3 Vsebnost klorofila v ekstraktih	36
5. Razprava	40
6. Zaključek	41
7. Viri in literatura	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Rastline kot pomemben del prehrane	9
Slika 2: Rastlinska celica s celičnimi organeli	10
Slika 3: Zgradba lista	11
Slika 4: Prečni prerez stebela pri enokaličnicah in dvokaličnicah	12
Slika 5: Osnovna zgradba korenin (vir: OŠ Polzela)	12
Slika 6: Peteršilj (vir: Farmedica)	13
Slika 7: Motovilec (vir: Zeleni svet)	14
Slika 8: Špinača (vir: Bodi eko)	15
Slika 9: Klorofil a in klorofil b (vir: Both, 2000)	16
Slika 10: Klorofil, viden skozi mikroskop (vir: Makanan Sunnan in Herba)	17
Slika 11: Molekula klorofila in molekula hemoglobina (vir: Vivartos)	17
Slika 12: Rdeča pesa v prahu (vir: Natural Loti)	19
Slika 13: Primer označevanja jajc (vir: Prehrana.si)	19
Slika 14: Reproductivni organi kokoši (vir: Alderton)	21
Slika 15: Struktura jajčne lupine (Solomon)	22
Slika 16: Barvanje jajc z naravnimi barvili (vir: Naša super hrana)	23
Slika 17: Filtriranje (vir lasten)	25
Slika 18: Filtriranje peteršilja v acetonu (vir lasten)	25
Slika 19: Spektrofotometer (vir lasten)	26
Slika 20: Tehtanje sode bikarbone (vir lasten)	27
Slika 21: Rezanje peteršilja (vir lasten)	27
Slika 22: Obdelava motovilca v terilnici (vir lasten)	28
Slika 23: Kuhanje vzorcev (vir lasten)	28
Slika 24: Kuhanje jajc, pena, ki pri tem nastaja (vir lasten)	28
Slika 25: Razbarvana jajca (vir lasten)	29
Slika 26: Tehtanje snovi za pripravo slepega vzorca za umeritveno krivuljo	29
Slika 27: Spektrofotometrična določitev klorofila v vzorcih (vir lasten)	30
Slika 28: Ekstrakti peteršilja v vodi, bazični in kisli raztopini (vir lasten)	30
Slika 29: Ekstrakti peteršilja v etanolu, acetonu in diklorometanu (vir lasten)	31
Slika 30: Ekstrakti motovilca v vodi, bazični in kisli raztopini (vir lasten)	31
Slika 31: Ekstrakti motovilca v acetonu, etanolu in diklorometu (vir lasten)	31
Slika 32: Ekstrakti špinače v vodi, bazični in kisli raztopini (vir lasten)	32

Slika 33: Ekstrakti špinače v etanolu, acetonu in diklorometanu (vir lasten).....	32
Slika 34: Jajce, barvano z barvilom peteršilja,	33
Slika 35: Jajce, barvano z barvilom peteršilja,	33
Slika 36: Jajce, barvano z barvilom peteršilja,	33
Slika 37: Jajce, barvano z barvilom motovilca,	34
Slika 38: Jajce, barvano z barvilom motovilca, ekstrahiranim	34
Slika 39: Jajce, barvano z barvilom motovilca,	34
Slika 40: Jajce, barvano z barvilom špinače,	35
Slika 41: Jajce, barvano z barvilom špinače,	35
Slika 42: Jajce, barvano z barvilom špinače,	35

KAZALO TABEL

Tabela 1: Vloga različnih delov jajcevoda kokoši (vir: Holcman in sod, 2004)	20
Tabela 2: Koncentracija klorofila a v ekstraktih špinače, peteršilja in motovilca v mg/g.....	36
Tabela 3: Koncentracija klorofila b v ekstraktih špinače, peteršilja in motovilca v mg/g	36
Tabela 4: Koncentracija celokupnega klorofila v ekstraktih špinače, peteršilja in motovilca v mg/g	37

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Koncentracija celokupnega klorofila v vodnem ekstraktu	37
Graf 2: Koncentracija celokupnega klorofila v ekstraktih bazičnih raztopin	38
Graf 3: Koncentracija celokupnega klorofila v ekstraktih kislih raztopin	38
Graf 4: Koncentracija celokupnega klorofila v etanolnih ekstraktih	38
Graf 5: Koncentracija celokupnega klorofila v ekstraktih z acetonom.....	39
Graf 6: Koncentracija celokupnega klorofila v ekstraktih v diklorometanu	39

Povzetek

V današnjem času stremimo k vse večji uporabi naravnih rešitev vsakdanjih problemov. Naravna barvila, ki jih uporabljamo, so lahko rastlinskega izvora, zelo znano barvilo je klorofil v kloroplastih zelenolistnih rastlin.

Raziskovalna naloga obravnava pridobivanje klorofila v ekstraktih različnih topil, ocenjuje obarvanost topil in obarvanje jajčne lupine v ekstraktih ter spektrofotometrično določitev klorofila v vzorcih. Rastline, ki smo jih v raziskovalni nalogi uporabili, so bile peteršilj, motovilec in špinaca. Z različnimi topili smo pridobili ekstrakte barvil rastlin, z njimi poskušali obarvati jajčno lupino in določili vsebnost klorofila v ekstraktih. Izkazalo se je, da vodni ekstrakti vsebujejo zelo majhno količino klorofila v primerjavi z drugimi topili. Obarvanost jajčne lupine pa se je razlikovala glede na vrsto uporabljene zelenjave in topila, v katerem je bil ekstrahiran klorofil.

Ključne besede: klorofil, peteršilj, motovilec, špinaca, vodni ekstrakti, etanol, aceton, diklorometan, jajčna lupina

Summary

Nowadays, we strive for an increasing use of natural solutions to everyday problems. The natural dyes we use can be of vegetable origin, a very well-known dye is chlorophyll in the chloroplasts of green-leaved plants.

The research task deals with the extraction of chlorophyll in extracts of various solvents, evaluates the coloration of solvents and eggshell coloration in the extracts, and the spectrophotometric determination of chlorophyll in the samples. The plants we used in the research project were parsley, chives and spinach. Extracts of plant dyes were obtained using different solvents, we tried to color the eggshell with them and determined the chlorophyll content in the extracts. Aqueous extracts were found to contain a very small amount of chlorophyll compared to other solvents. The coloring of the eggshell, however, differed depending on the type of vegetable used and the solvent in which the chlorophyll was extracted.

Key words: chlorophyll, parsley, parsley, spinach, water extracts, ethanol, acetone, dichloromethane, eggshell

1. UVOD

Rastline (Plantae) so eno izmed izmed kraljestev domene evkariontov. Za odgovor na vprašanje, zakaj rastline niso črne, moramo poseči globoko v način razmišljanja v biologiji. Zgradba sestavnih delov vsakega organizma je tesno povezana z nalogami, ki jih ti deli opravljajo (funkcijo). Naloge, ki jih opravljajo deli organizma ali organizem kot celota, so povezane s prilagoditvijo, adaptacijo organizma na okolje. Vsi organizmi in njihovi sestavni deli so se razvili z evolucijo, torej z naravnim izborom. Takšen način razmišljanja nas popelje več milijard let nazaj v evolucijsko zgodovino, ko enocelični organizmi, ki so živeli v pramorju, še niso opravljali fotosinteze - bili so heterotrofi. Prvi organizmi, pri katerih se je razvila fotosinteza, so domnevno uporabljali vijolično fotosintezno barvilo bakteriorodopsin, ki ga še danes najdemo pri nekaterih skupinah bakterij. Bakterije, ki za fotosintezo uporabljajo klorofil, so se domnevno razvile šele v času, ko so že prevladoval bakterije z bakteriorodopsinom. Novo fotosintezno barvilo klorofil je tako vsrkavalo tiste valovne dolžine, ki so sploh še bile na voljo - modre in rdeče. Iz njihovih potomcev so se razvili kloroplasti v algah in višjih rastlinah. Vsi zeleni listi višjih rastlin v kloroplastih vsebujejo karotenoide, vendar je klorofil precej prevladujoč, zato so kloroplasti (in listi) zelene barve.

1.1 Namen

V raziskovalni nalogi se bomo osredotočili na ekstrakcijo klorofila iz peteršilja, motovilca in špinače v vodnih ekstraktih, v kislih in bazičnih vodnih raztopinah, v acetonu, etanolu in diklorometanu. Ekstrakte smo uporabili za barvanje jajčne lupine kokošjih jajc, ki smo jim pred tem odstranili lastno barvilo.

Zanimalo nas je, ali so rastline primerne za pridobivanje barvil, s katerimi bi lahko obarvali jajčno lupino.

1.2 Hipoteze

Pred začetkom raziskovalnega dela smo zastavili tri hipoteze.

Hipoteza 1: Ekstrakcija klorofila bo najintenzivnejša v etanolu.

Hipoteza 2: V organskih topilih se bo jajčna lupina najintenzivneje obarvala.

Hipoteza 3: Ekstrakti špinače bodo vsebovali največjo koncentracijo klorofila.

2. TEORETIČNI DEL

2.1 Pomen rastlin v naravi

Rastline so eno izmed kraljestev živih bitij. Skupina vključuje splošno razširjene in znane življenjske oblike, kot so drevesa, cvetnice, trave, praprotnice in mahovi, izključuje pa rdeče in rjave alge, živali, glive, arheje ter bakterije. Za rastline je značilno, da razen izjem pridobivajo energijo za rast in delovanje organizma iz sončne svetlobe s pomočjo procesa fotosinteze, ki poteka v kloroplastih, poleg tega imajo njihove celice celične stene, zgrajene iz celuloze. Z rastlinami se znanstveno ukvarja botanika, ki je panoga biologije. V preteklosti so med rastline uvrščali tudi alge, glive in druge ne sorodne avtotrofne organizme, to tradicijo botanika do neke mere ohranja še danes. Skupnosti vseh rastlin na določenem območju v določenem času pravimo flora.

Rastline so osnova življenja na zemlji. Omogočajo življenje vseh drugih bitij, saj so vse druge oblike življenja posredno ali neposredno vezane na rastlinsko hrano. Brez rastlin ne bi bilo življenja na zemlji. Rastline same pa lahko zrastejo zato, ker s fotosintezo pridelujejo lastno hrano iz snovi, ki jih dobijo v zemlji in zraku.

2.1.1 Pomen rastlin za okolje

- 1.) Rastline sproščajo kisik, iz njega pa nastaja ozonska plast, ki nas ščiti pred ultravijolično svetlobo.
- 2.) Odstranjujejo ogljikov dioksid iz ozračja in ga vežejo v organske spojine, s tem prispevajo k uravnavanju učinka tople grede na našem planetu in vzdrževanju temperature, ki je primerna za naše življenje.
- 3.) Rastline preprečujejo odnašanje prsti (erozijo) in zadržujejo zemeljske plazove, drevesa pa omilijo moč viharjev.
- 4.) Prispevajo tudi k nastajanju prsti z mehansko in kemijsko razgradnjo kamnin ter odmrli deli rastlin.
- 5.) Rastline soustvarjajo številne ekosisteme in biome ter nudijo živalim, glivam in mikroorganizmom pomemben življenjski prostor.

2.1.2 Pomen rastlin za človeka

- 1.) Rastline so za nas življenjsko pomembne. Sproščajo kisik, ki ga potrebujemo za dihanje.
- 2.) Predstavljajo pomemben del naše prehrane. Jemo žita, zelenjavo, sadje, različne oreške, rastlinska olja in izdelke iz njih. Tudi sladkor in čokolada sta rastlinskega izvora, rastline pa uporabljamo tudi kot začimbe. Iz rastlin si pripravljamo pijače.
- 3.) Iz rastlin, predvsem iz bombaža in lana, pridobivamo rastlinska vlakna. Ta so osnova za izdelavo blaga za obleko in obutev. Iz celuloznih vlaken pridobivajo umetno svilo, viskozo in druga umetna tekstilna vlakna.
- 4.) Rastlinskega izvora je tudi les, ki ga uporabljamo kot gradbeni material za različne objekte, pohištva, orodja in še za mnogo izdelkov. Les je osnovna surovina za pridobivanje papirja.
- 5.) Kuriva in goriva so rastlinskega izvora. Les uporabljamo za drva in pridobivanje oglja. Premog je nastal iz fosilnih rastlin, nafta in zemeljski plin pa iz odmrlih organizmov.
- 6.) Rastline uporabljamo v kozmetiki kot razne rastlinske izvlečke in olja. Tudi farmacija se poslužuje rastlin za izdelavo različnih zdravil.
- 7.) Rastlinsko biomaso predelujemo v gnojilo – kompost. Iz rastlinskih izvlečkov delajo škropiva. iz rastlinskih mlečkov pridobivajo naravno gumo. Iz rastlinskih olj pridobivajo strojna maziva.



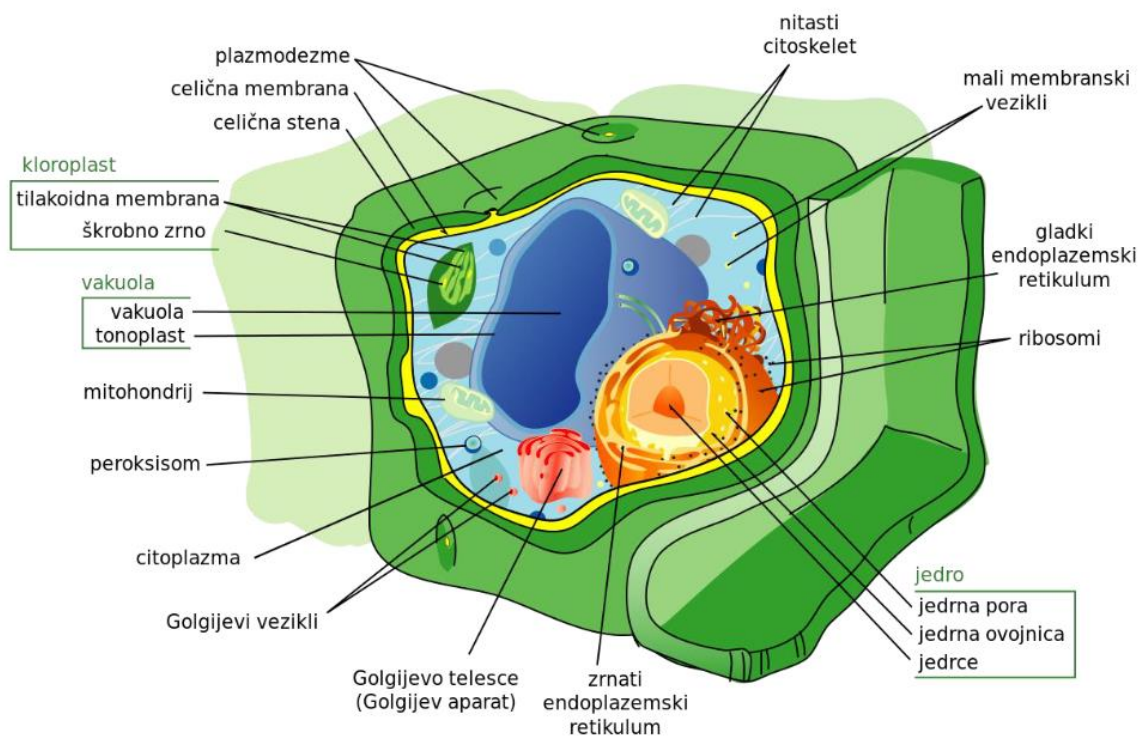
Slika 1: Rastline kot pomemben del prehrane

2.2 Rastlinska celica

Celica je temeljna gradbena in fiziološka enota vseh živih bitij. Samo cela celica lahko preživi in opravlja vse življenjske procese, zato je fiziološko nedeljiva celota.

Nekaj pomembnejših celičnih organelov v rastlinski celici: celična stena, citoplazma,

mitohondrij, centrosomi, plastidi, kloroplasti, vakuola, jedro (katerega najpomembnejši sestavni del je kromatin).



Slika 2: Rastlinska celica s celičnimi organeli

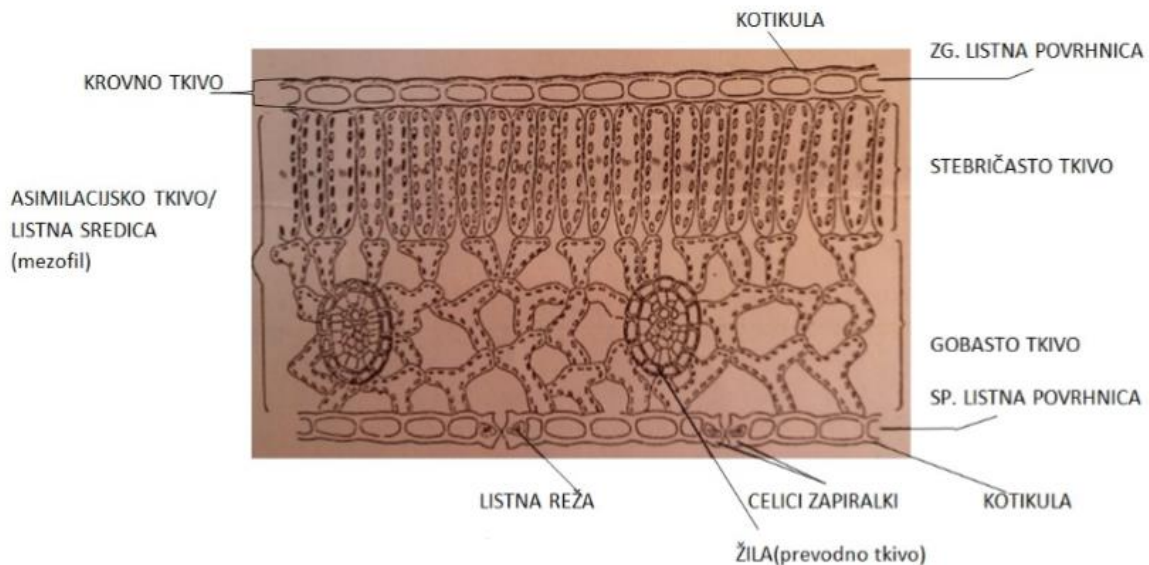
2.3 Zgradba in deli rastlin

Zunanja in notranja zgradba rastlinskih organov sta prilagojeni nalogam, ki jih organi opravljajo.

2.3.1 List

- ♣ Primarna naloga: fotosinteza, prilagojen za učinkovito izkoriščanje svetlobe.
- ♣ Za fotosintetsko funkcijo je ključno asimilacijsko tkivo (palisadno/stebričasto in gobasto tkivo) celice palisadnega tkiva so pokončno valjaste in strnjene.
- ♣ Gobasto tkivo je zračno z večjimi medceličnimi prostori, povezani so z listnimi režami preko listnih rež poteka izmenjava plinov med listom in ozračjem.
- ♣ Režo oblikujeta celici zapiralki.
- ♣ Reže so mesta, kjer rastlina aktivno uravnava komunikacijo z ozračjem, drugje pa povrhnica omejuje prepustnost.

- ♣ Povrhnjica in prevodna tkiva se združujejo v žile.
- ♣ Zunanje stene so prekrivane s kutikulo.
- ♣ Žile v listu dvokaličnice so razporejene mrežasto.
- ♣ Žile v listu enokaličnice so razporejene vzporedno.



Slika 3: Zgradba lista

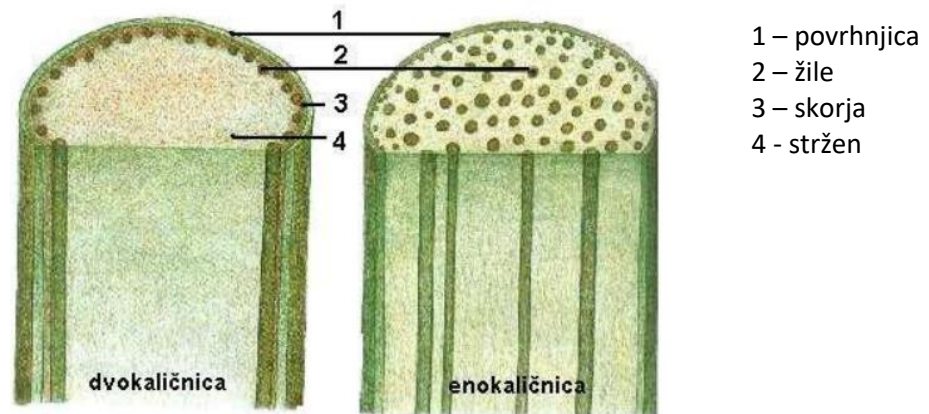
2.3.2 Steblo

- Ψ Primarna naloga;
 - nosi liste,
 - nosi razmnoževalne in razširjevalne rastlinske organe,
 - do njih prevaja potrebne snovi.
- Ψ Osnovno tkivo je v središču stebela - osrednji stržen:
 - skladišči snovi,
 - v mladih delih rastline določa, kako bodo razporejene žile.
- Ψ Tkivo med posameznimi žilami so strženovi trakovi (ki se povezujejo z osrednjim strženom).
- Ψ V bližini prevajalnih tkiv opazimo mehanska tkiva, oblikujejo jih celice z močno celično steno.
- Ψ Mehanska tkiva so posebej obsežna, če se steblo debeli s sekundarno rastjo (tu se mehanska stabilnost tkiv poveča z nalaganjem lignina (olesenitev) ali suberina (oplutitev) v sekundarno celično steno).

Ψ Pri neolesenelih dvokaličnicah je tkivo med žiljem in povrhnjico primarna skorja.

Ψ Steblo pri enokaličnicah ima naključno razporeditev žilnih snopičev

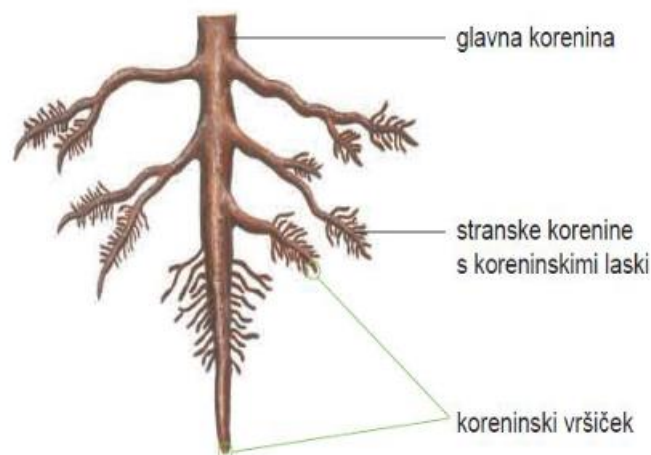
Ψ Steblo pri dvokaličnicah ima krožno razporeditev žilnih snopičev.



Slika 4: Prečni prerez stebela pri enokaličnicah in dvokaličnicah

2.3.3 Korenina

- Naloga; sprejemanje vode in mineralnih hranil iz tal.
To delo opravljajo predvsem končni, mlajši deli korenin.
- V območju za rastnim vršičkom se nekatere celice koreninske povrhnjice lahko preoblikujejo v koreninske laske, ki izboljšajo sprejem hranil.
- Stik med tlemi in korenino ni zaželen pri starejših in debelejših koreninah, njihova naloga je predvsem transport mineralnih in mehanska opora.



Slika 5: Osnovna zgradba korenin (vir: OŠ Polzela)

2.4 Peteršilj (*Petroselinum crispum*)

Navadni peteršilj ali peteršilj, kot mu po domače pravimo, je svetlozelena, dvoletna zel, ki se vsakodnevno uporablja kuhinji. Uporabimo lahko list, ki ima blažjo aromo, pa tudi steblo ali korenino.

Skozi zgodovino so peteršilj uporabljali v zdravilne (ljudsko zdravilstvo), kulinarčne in druge namene. Že vse od časov starih Rimljanov velja za živilo, ki koristi zdravju. Njegovi pradomovini sta Sredozemlje in južna Evropa. Danes ga veliko pridelajo tudi v Rusiji, Indiji, Severni Ameriki in drugod po svetu.

Peteršiljeva korenina je vretenasta, 20 centimetrov dolga in dva centimetra debela. Iz nje poganjajo vlaknaste koreninice. Steblo je v zgornji polovici razvejeno, vejice pa preraščajo osrednji kobul. Temnozeleni, svetleči in včasih močno nakodrani listi imajo dolge peclje. Obtalni in stebelni so (razen najvišjih) po obrisu trikotni in dvakrat peresasto deljeni, najvišji pa urezani v tri krpice ali vsaj globoko in neenakomerno nazobčani. Na vrhu stebela so listi dlanasto razdeljeni v tri celorože ali trokrpe, podolgasto suličaste lističe. Kobul sestavlja od 10 do 20 pecljev, ovojek pa le dva listka. Drobni zelenkasto rumeni cvetovi so v kobulastih socvetjih.



Slika 6: Peteršilj (vir: *Farmedica*)

2.5 Motovilec (*Valerianella locusta*)

Motovilec uvrščamo v družino špajkovk (*Valerianaceae*). Je solatnica, ki jo uporabljamo predvsem jeseni in pozimi ter zgodaj spomladi, saj je idealen zimski nadomestek za solato. Oblikuje rozeto in pri tržni pridelavi porežemo cele rozete, medtem ko pri pridelavi na vrtovih lahko porežemo posamezne liste in se bo rastlina spet obrasla. Optimalno število je 10 do 12 listov v rozeti. Pri višjih temperaturah in dolgem dnevu rastline poženejo v cvet (Osvald in Kogoj-Osvald, 2003).

Motovilec je enoletna rastlina z razmeroma kratko rastno dobo. Na skrajšanem stebelu oblikuje liste, pri katerih pecelj večinoma ni izražen. Listi so ovalne do izdolžene oblike in rahlo kosmati. Listni rob je gladek. Rastline so rumeno do temno zelene barve (odvisno od

sorte). V dolgem dnevu in pri višji temperaturi se oblikuje razvejano cvetno steblo z drobnimi plavkastimi cvetovi. Prevladuje samooplodnja.

Vsebuje precej vitamina C, karotena, zato je priporočljivo jesti motovilec zgodaj spomladi za čistilno dieto. Motovilec pomirja živce, krče v mišicah, deluje kot pomirjevalo. V koreninah je valerianska kislina. V suhi rastlini je 19 % beljakovin in 30 do 34 % olj (Černe in Vrhovnik, 1992).

Ker motovilec vsebuje veliko mineralov, ugodno deluje na čiščenje krvi in kože, pospešuje izločanje vode in strupenih snovi iz telesa, olajša iztrebljanje. Pripomore, da se izognemo spomladanski utrujenosti, ker vsebuje razmeroma veliko železa. Priporočajo ga tudi ledvičnim in srčnim bolnikom, pri artritisu, sladkorni bolezni (Černe, 2000).

Zlasti zgodaj spomladi je cenjena motovilčeva solata, lahko tudi skupaj z radičem, regratom in jajci.

Motovilec mešamo tudi med druge vrtnine in pripravimo zelenjavni sok, ki ga pijemo večkrat na teden, zlasti če smo predebeli (Černe in Vrhovnik, 1992).



Slika 7: Motovilec (vir Zeleni svet)

2.6 Špinača (*Spinacia oleracea*)

Špinača je zelnata rastlina iz družine ščirov (*Amaranthaceae*), ki tvori nizki grmiček in listno rozeto. Njeni temno zeleni listi so lahko gladki ali nazobčani, kar je odvisno od vrste semen. Barva je prav tako odvisna od vrste špinače in časa setve. Listi lahko zrastejo do velikosti 20 cm, ločimo pa užitne in neužitne liste.

Špinači ustreza zmerno podnebje in je primerna za vzgojo na našem področju, je pa potrebno zadostiti določenim pogojem, da dobimo užitne in kvalitetne liste. Špinača je tudi pomemben vir železa in je bogata z minerali, vendar jo je potrebno pravilno pripraviti in zaužiti, saj ima lahko kopičenje nitratnih soli nezaželene učinke v organizmu

Špinača izvira iz antične Perzije, od koder so jo zanesli v Indijo in na Kitajsko. V Evropi se je pojavila v 9. stol na Siciliji.

Za uspešno rast potrebuje ilovnata vrtna tla. Ne prenaša preveč peščenih in preveč glinenih tal. Ne uspeva na kislih tleh. Potrebuje veliko dušika. Bolje uspeva na hladnejših rastiščih, sicer prehitro naredi semena. Najbolj uspeva tam, kjer je povprečna temperatura med 16 in 18 stopinjami Celzija. Mlade rastline in sejanci prenesejo zimske temperature do -9 stopinj Celzija. Potrebuje veliko vlage v času rasti. Uspeva v plosenci in na soncu, vendar jo običajno gojimo v plosenci, da naredi več listov.

Razmnožujemo s semeni. Ne sejemo, kadar so temperature nad 29 stopinj Celzija, saj semena pri tako visokih temperaturah ne kalijo. Seme kali okoli 14 dni.

Špinačo sejemo na zelenjavne grede samostojno ali pa v mešane kulture. Nabiramo liste, ko so rastline visoke vsaj 5 cm. To je običajno 5 do 10 tednov po sejanju. Nabiramo posamezne liste ali pa celoten glavni poganjek.

Liste uporabimo sveže, lahko pa jih zamrznemo. Iz listov se pridobiva rumeno barvilo.



Slika 8: Špinača (vir: Bodi eko)

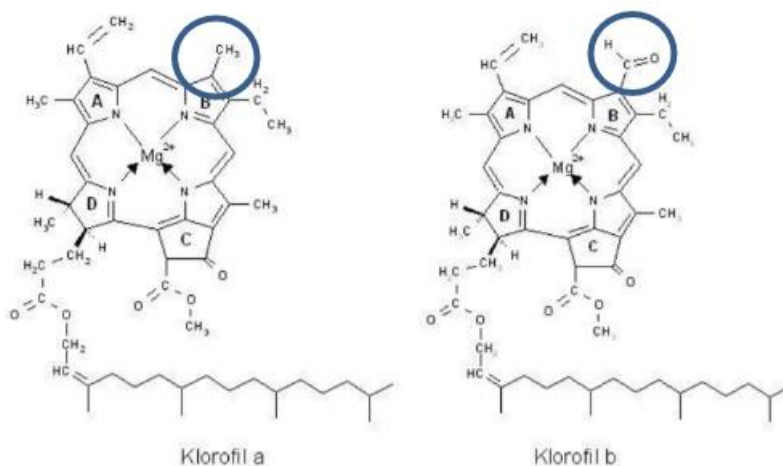
2.7 Barvila v rastlinah

Rastlinski pigment oziroma barvilo je vsak barvni material, ki ga najdemo v rastlinski celici. Tako kot pigmenti dajejo barvo naši koži, lasem in očem jo dajejo tudi rastlinam. Zaradi barvil so stvari videti določene barve, saj absorbirajo in odbijajo različne valovne dolžine svetlobe. V rastlinah najdemo predvsem naslednje tri vrste barvil: klorofile, karotenoide in flavonoide.

2.3.1 Klorofil

Klorofil (iz grščine chloros - zelen, phyllos - list) je zeleno barvilo v rastlinah, algah in modrozelenih cepljivkah, ki je zelo pomembno v procesu fotosinteze. Kemijsko je heterociklična aromatska spojina z ionom magnezija v sredini obroča in več stranskimi verigami. Glede na

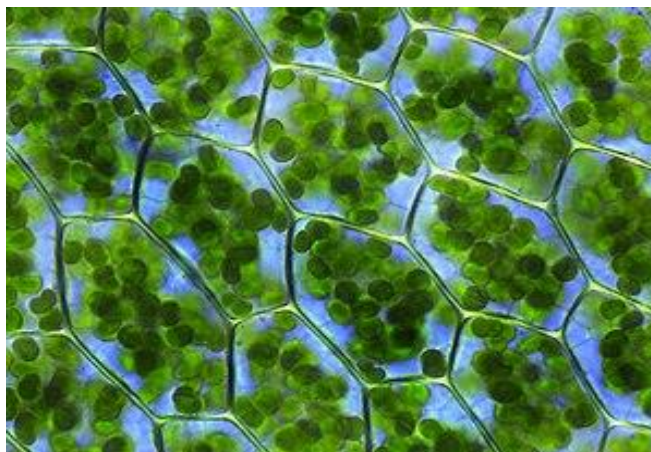
zgradbo stranskih verig ločimo več tipov klorofilov. So del beljakovinskih kompleksov v notranjih membranah kloroplastov, ki jim pravimo fotosistemi. Klorofil absorbira modri in rdeči del spektra in odbija zelenega, kar daje rastlinam značilno zeleno barvo. Ko vanj zadene foton ustrezne valovne dolžine, se magnezijev ion v molekuli klorofila vzbudi in odda elektron naslednji molekuli v fotosintetski kaskadi, kjer se elektron vključi v elektronsko transportno verigo. Tako se energija fotona na koncu porabi za gradnjo energetske bogatih organskih snovi, predvsem ATP.



Slika 9: Klorofil a in klorofil b (vir: Both, 2000)

Poznamo več tipov klorofilov. Vsi so opredeljeni kot derivati matičnega klorina s prisotnostjo petega obroča, ki vsebuje keton, poleg štirih pirolu podobnih obročev. Večino klorofilov uvrščamo med klorine, ki so reducirani sorodniki porfirinov (najdemo jih v hemoglobinu). Imajo skupno biosintetsko pot s porfirini, vključno s prekursorjem uroporfirinogen III. Za razliko od hemoglobinov, ki vsebujejo železo vezano na center N4, večina klorofilov veže magnezij. Aksialni ligandi, pritrjeni na središče Mg^{2+} , so zaradi jasnosti pogosto izpuščeni. Klorovemu obroču so pripete različne stranske verige, običajno vključno z dolgo fitilno verigo ($C_{20}H_{39}O$). Najbolj razširjena oblika v kopenskih rastlinah je klorofil a. Edina razlika med klorofilom a in klorofilom b je, da ima prvi metilno skupino, medtem ko ima drugi formilno skupino. Ta razlika povzroči precejšnjo razliko v absorpcijskem spektru, kar rastlinam omogoča, da absorbirajo večji del vidne svetlobe.

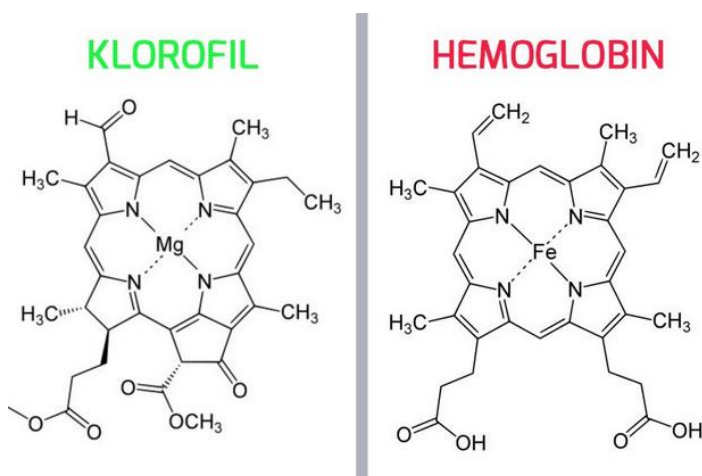
Pod ene izmed najbolj pogosto zaužita živila z obilico klorofila prištevamo špinačo, brokoli, zelje, šparglje, grah ...



Slika 10: Klorofil, viden skozi mikroskop (vir: Makanan Sunnan in Herba)

2.3.1.1 Pomen klorofila za živa bitja

Molekula klorofila je po zgradbi skoraj identična molekuli hemoglobina, le da ima klorofil v centru magnezijev atom, hemoglobin pa železo. Podobno porfirinsko strukturo imajo v naravi še mioglobin (mišice), citokromi (membrane), bakterijo-klorini in izobakterijo-klorini (fotosintetske bakterije) – zelo pomembne, a skorajda nepoznane snovi živih organizmov. In prav iz narave prihaja pomoč, ki nam je vsem dostopna. Klorofil tako zelo pozitivno deluje v našem telesu, da ga v resnici lahko imenujemo zelena molekula zdravja.



Slika 11: Molekula klorofila in molekula hemoglobina (vir: Vivartos)

V zadnjem času je vse več raziskav namenjenih antikancerogenim učinkom klorofila, tudi preventivi in zdravljenju z njim (onemogoča vezavo aflatoksina B1 na DNA): **jetra, koža, debelo črevo. V osnovi ima moč regenerirati naše telo, podpre ga pri čiščenju, celjenju ran, v borbi proti infektom, izboljša prebavo, imunost in prekrvitev, pomaga pri obnavljanju in regeneraciji krvnih celic.**

2.3.2 Karotenoidi

Vse zelene rastline vsebujejo kot pomožna fotosintezna barvila tudi karotenoide. Pri fotosintezi karotenoidi absorbirajo svetlobo v modro zelenem delu in tako razširijo uporabni del svetlobnega spektra. Pretvorijo jo v energijo, ki jo prenesejo na klorofil. Zato delujejo kot pomožna fotosintezna barvila, ki obenem klorofile varujejo pred uničenjem s premočno svetlobo. Če klorofili absorbirajo več svetlobne energije, kot jo potrebujejo za fotosintezo, nastajajo zelo reaktivne oblike kisika, ki bi lahko poškodovale tkiva. Z absorpcijo presežne energije karotenoidi to preprečijo. Pod najbolj pogosto zaužita živila z obilico karotenoida prištevamo paradižnik, mango, korenček, pomarančo ...

2.3.3 Flavonoidi

Flavonoidi so sekundarni rastlinski metaboliti. Flavonoidi so sintetizirani po fenilpropanoidni metabolni poti, v kateri je uporabljena aminokislina fenilalanin za sintezo kumarne kisline. Drugi del molekule pa nastane preko aktivirane malonilne kisline. Tako dobimo osnovno strukturo flavonoidov – skupino spojin imenovanih halkoni. Flavonoidi so zelo razširjeni v rastlinah in imajo več funkcij. So rastlinski pigmenti - dajejo rumeno, rdečo in modro barvo cvetovom, plodovom in redkeje tudi listom. Poleg tega ščitijo rastline pred mikrobi in insekti. Zaradi velike razširjenosti, raznolikosti in majhne toksičnosti (glede na ostale rastlinske snovi) flavonoidov, zaužijemo z normalnim prehranjevanjem signifikantne količine le-teh. Flavonoidom pravimo tudi »naravni prikrojevalci bioloških odgovorov«, saj je dokazano, da imajo sposobnost prilagoditi reakcije organizmov na alergene, viruse in karcinogene. Imajo antialergijsko, antiinflamatorno, antimikrobno in antikancerogeno delovanje. Zaradi potencialnih zdravilnih učinkov, predvsem v preventivi rakavih obolenj in srčno-žilnih bolezni, so postali flavonoidi zanimivi za potrošnike in živilsko industrijo. V skupino najbolj pogosto zaužitih živila z obilico flavonoidov prištevamo peteršilj, zeleno, rdečo papriko, meto ...

2.4 Barvanje z naravnimi barvili

Snov za barvanje živil je vsaka barva, s katero želimo doseči, da bi nekemu živilu oziroma jedi spremenilo osnovno oziroma temeljno barvo. Naravna barvila, ki jih lahko vsak iz rokava strese bi lahko npr. bila: špinača za zeleno barvo, rdeča pesa za rdečo, korenje ali kurkuma ali buča za rumeno barvo, itd.



Slika 12: Rdeča pesa v prahu (vir: Natural Loti)

2.4.1 Jajca

Jajca so ljudje uživali že pred več tisoč leti, ko so nabirali jajca iz gnezd divjih ptic. Ko so okoli 600 let pr. n. št. perutnino prvič udomačili, je oskrba z jajci postala enostavnejša. Jajca so tako postala pomembna sestavina pri pripravi najrazličnejših jedi, tako v domači kuhinji kot tudi v industriji, saj jih odlikujejo številne zaželene tehnološke lastnosti. Danes so na tržišču na voljo jajca, ki pripadajo različnim vrstam ptic, in sicer prepeličja, nojeva, račja, puranja, gosja in najbolj pogosto uporabljena, kokošja jajca. Več kot polovica prebivalcev v Sloveniji jajca običajno uživa enkrat tedensko ali redkeje, petina jih uživa večkrat na teden, desetina prebivalstva pa jajc ne uživa. Jajce je sestavljeno iz treh glavnih delov: lupine, jajčnega beljaka in rumenjaka. Lupina in njene membrane niso užitne, vendar imajo pomembno vlogo pri kakovosti jajc, saj služijo kot fizična ovira pred mikrobiološko kontaminacijo, tudi pred npr. salmonelo. Lupina je anorganskega izvora, saj 95 % le-te predstavljajo minerali, večinoma kalcijev karbonat.



Slika 13: Primer označevanja jajc (vir: Prehrana.si)

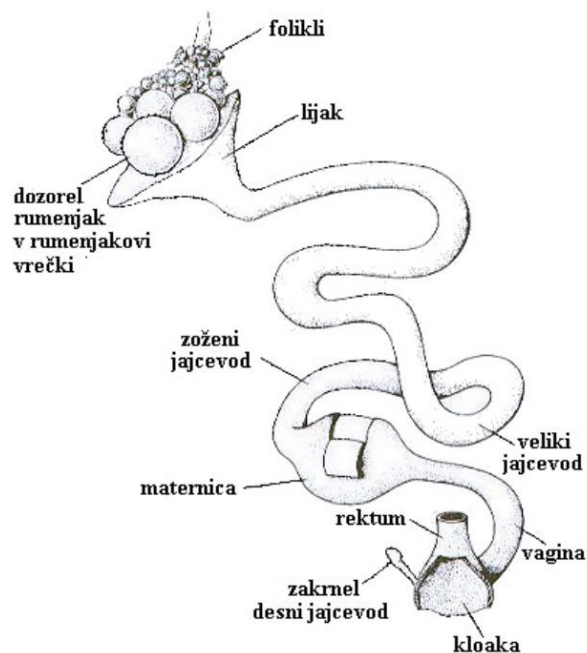
2.4.1.1 Nastanek in zgradba jajčne lupine

Jajce nastaja v jajčniku in jajcevodu. Jajcevod je pri kokoših dolg približno 80 cm in sestavljen iz petih delov, ki se med seboj razlikujejo po zgradbi, dolžini in pomenu (Preglednica 1). Tvorba jajca, od sprostitve dozorelega folikla iz jajčnika v jajcevod, do znesenega jajca traja približno 24 ur (Holcman in sod., 2004).

del jajcevoda	čas zadrževanja	funkcija
lijak (<i>infundibulum</i>)	15 minut	Sprejme rumenjaki iz jajčnika in ga obda s tanko plastjo beljaka. Če so prisotne semenčice pride do oploditve jajčne celice (valilno jajce).
veliki jajcevod (<i>magnum</i>)	3 ure	Obda več plasti beljaka.
zoženi jajcevod (<i>isthmus</i>)	1 ura	Doda dve mebrani, nekaj vode.
maternica (<i>uterus</i>)	19-20 ur	Tvorba jajčne lupine, zadnje ure obarva lupino, tvorba povrhnjice čez lupino.
nožnica (<i>vagina</i>)	manj kot minuto	Prehod jajca ob znesenju.

Tabela 1: Vloga različnih delov jajcevoda kokoši (vir: Holcman in sod, 2004)

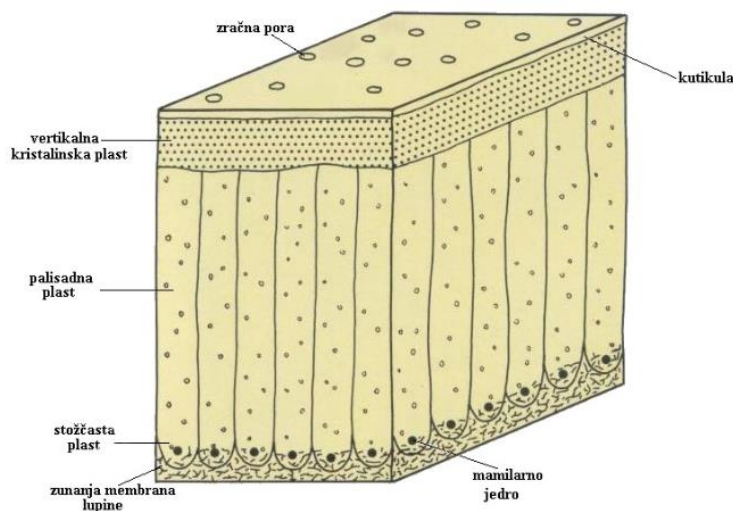
Jajčna lupina se začne tvoriti v zoženem jajcevodu, v glavnem pa se tvori v maternici od 5. - 22. ure po ovulaciji in spada med najhitrejše mineralizacijske procese (Nys, 2001). Intenzivno nalaganje Ca v jajčno lupino je med 12. in 18. uro ciklusa. Kalcifikacija-nalaganje Ca, poteka medtem, ko jajce počasi potuje med isthmusom in uterusom in sovpada z nastajanjem mamilarne plasti, ta pa je z bazalno kapico vezana na zunanjo membrano lupine. Jajce se zadrži v uterusu okrog 20 ur (Slika 14) (Cestnik, 1993).



Slika 14: Reprodaktivni organi kokoši (vir: Alderton)

V uterusu ima jajce že izoblikovano stožčasto plast (mamilarno plast) z mamilarnim jedrom. Sinteza jajčne lupine poteka z zgoščevanjem kalcijevega karbonata (CaCO_3) na membrani in nalaganjem plasti. Naložene plasti predstavljajo palisadno plast, ki daje lupini trdnost in debelino (Slika 15). Debelina jajčne lupine pri kokoših znaša okrog 0,33 mm, povprečna trdnost je 30 N (newton) (Nys, 2001). Jajčno lupino v 90 - 95 % sestavlja kalcit, ki je najbolj stabilna polimorfna oblika CaCO_3 , nekaj odstotkov pa predstavlja še beljakovinski del v stožčasti in palisadni plasti. Jajčna lupina je čvrsta apnenčasta zunanja ovojnica, ki preprečuje učinke fizikalnih in kemičnih dejavnikov okolja na jajce ter ščiti zarodek med embrionalnim razvojem. Največji delež predstavlja CaCO_3 (93 %), ostanek pa magnezijev karbonat (1,6 %), kalcijev in magnezijev fosfat (0,5 - 1,4 %) ter organska masa keratinske sestave (3 - 6 %). V sledovih se v njej nahajajo tudi kalij, cink, mangan, jodidi in kloridi (Cestnik, 1993).

Jajčna lupina predstavlja embalažo, najvidnejšo lastnost znesenega jajca, ki je pomembna tako za rejca kot za marketing in porabnika. Izraz kakovost lupine se pogosto uporablja kot sinonim za trdnost lupine, kar pomeni sposobnost jajčne lupine prenašati zunanje sile, ne da bi se natrla ali zlomila (Holcman, 1997b).



Slika 15: Struktura jajčne lupine (Solomon)

Naravna barva lupine je v veliki meri odvisna od genotipa. Jajca so lahko zelenkasta ali celo modra, kar je odvisno od pigmenta, ki izvira iz posebnih žlez v kokoši. Ime glavnega rjavega pigmenta lupine je protoporfirin IX.

Nasičenost jajca s pigmentom je odvisna od pasme. Na primer bela leghorna nese bela jajca, plimouthska jagnjetina pa rjava. Nekatero pasme so izvorno obarvane in nesejo modra, zelenkasta in rožnata jajca. Med njimi sta na primer araukana in ameraukana. To ni nič nenavadnega.

Po podatkih študije Univerze v Pensilvaniji vsebujejo jajca različnih barv enako količino hranilnih snovi. Eno veliko jajce vsebuje povprečno 72 kalorij, 6,29 g beljakovin, 4,97 g maščob, 212 mg holesterola in 125,5 mg holina, ne glede na barvo lupine. Vsebujejo tudi precej vitaminov A, D, E, B-6, B-12, folne kisline, tiamina, riboflavina, kalcija, kalija, fosforja, magnezija, železa in cinka. Poleg tega se okus ali kakovost ne razlikujeta.

V primerjavi med belimi in rjavimi jajci torej ni razlike. Edina resnična razlika med njima je v ceni, saj imajo rjave jajčne lupine v preteklosti višjo vrednost. Dejansko barva jajca ne vpliva na hranilno vrednost, kakovost, okus, značilnosti jedi, pripravljenih iz jajca, niti na debelino lupine.

2.4.2 Barvanje jajc

Že v antičnih časih so verjeli, da so jajca simbol plodnosti in novega življenja, zato so jih zelo radi podarjali. Tradicija barvanja jajc tako sega že v zgodovino, ko so za njihovo okrasitev uporabljali naravna barvila. Barva pirhov je odvisna od izbranih živil, zagotovo pa boste večjo pestrost v velikonočni zbirki dosegli s kombiniranjem dveh ali več odtenkov. Vijolično barvo pirhov boste

dobili s kuhanjem v soku rdeče pese ali rdečega grozdja. Različne odtenke modre barve najlepše ustvarijo borovnice, rdeče zelje ali cvetovi vijolic, pa tudi hibiskusov čaj in rdeče vino. Rjavo ali zlato rjavo barvo bodo na jajčni lupini pustili čebulni olupki, kava, črni čaj, orehove lupine. Oranžno barvo boste dobili s kurkumo, korenjem, čilijem v prahu ali mleto papriko. Tudi rožnato barvo ustvari sok rdeče pese, pa tudi sok različnega jagodičevja. V zelene odtenke pa jajčno lupino odene klorofil, ki ga dobimo v zeleni zelenjavi.



Slika 16: Barvanje jajc z naravnimi barvili (vir: Naša super hrana)

3. EKSPERIMENTALNI DEL

Eksperimentalni del je obsegal tri sklope:

1. V prvem sklopu smo pripravili ekstrakte peteršilja, mtovilca in špinače v šestih vrstah topil.
2. Drugi del je obsegal barvanje jajc v dobljenih ekstraktih.
3. Tretji del pa je obsegal spektrofotometrično določitev klorofila v ekstraktih.

3.1 Materiali in pripomočki

- čaša
- laboratorijska žlička
- terilnica in pestilo
- tehtnica
- nož
- termometer
- grelnik
- alu folija
- deionizirana voda
- alkoholni kis
- soda bikarbona
- aceton
- etanol
- diklorometan
- kremenčev pesek
- urno steklo
- alkoholni flomastri
- listi motovilca
- listi peteršilja
- listi špinače
- jajca
- spektrofotometer
- kivete

3.2 Metode dela

3.2.1 Ekstrakcija

Je laboratorijska tehnika, velikokrat uporabljena tudi v vsakdanjem življenju. V kemijskem smislu pomeni prenos molekul snovi, ki jo želimo ekstrahirati, iz tekoče ali trdne faze v drugo tekočo fazo. V organskem laboratoriju je najpogostejša ekstrakcija organskih spojin iz ene tekoče faze v drugo. Ti dve tekoči fazi sta ponavadi vodna raztopina in organsko topilo, ki se z vodo ne meša, tehnika pa se imenuje ekstrakcija tekoče-tekoče. Ekstrakcija, ki jo izvedemo s pomočjo razredčene vodne raztopine kisline ali baze, je še posebej uporabna pri ločevanju kislinskih ali bazičnih komponent iz zmesi. Večino ekstraktov izvajamo v liju ločniku.

V naši raziskovalni nalogi smo ekstrahirali klorofil iz motovilca, peteršilja in špinače z različnimi topili. Topila, ki smo jih uporabili so voda, kislina, bazična raztopina, aceton, etanol in diklorometan.

3.2.2 Filtriranje

Filtracijo izvedemo tako, da tekočino spustimo skozi porozno pregrado, kot je filter papir ali sanitarno steklo, pri čemer trdna snov ostane na tej pregradi. Pogosto je gravitacija dovolj, da 44 tekočina preide skozi porozno pregrado, čemur pravimo gravitacijska filtracija. Kadar pa to ni dovolj, se lahko poslužimo uporabe filtracije pod znižanim pritiskom oz. nučanja.

Posamezne ekstrakte barvil smo pridobili s filtriranjem rastlinskega preostanka od tekočega dela.



Slika 17: Filtriranje (vir lasten)



Slika 18: Filtriranje peteršilja v acetonu (vir lasten)

3.2.3 UV-VIS spektrofotometer

Spektrofotometer primerja delež svetlobe, ki preide skozi referenčno raztopino in skozi merjen vzorec. Svetloba potuje skozi vzorec. Del svetlobe se pri tem absorbira, prepuščena svetloba pa pride do detektorja.

Spektrofotometer je sestavljen iz izvora svetlobe, monokromatorja, kivete in detektorja. Za izvor svetlobe uporabljamo devterijevo ali volframovo žarnico. S prvo merimo v območju med 195 nm do 375 nm, z drugo pa v območju med 350 nm in 1000 nm. Monokromator je po navadi sestavljen iz optične rešetke ali optične prizme. V nekaterih primerih pa tudi iz optičnega filtra. Z izbiro kota padanja svetlobe na optično rešetko ali optično prizmo, lahko izberemo valovno dolžino svetlobe, ki jo bo monokromator prepustil. Kivete so dolge okoli 1 cm. So iz kvarčnega ali navadnega stekla. Tista stran, kjer gre skozi žarek svetlobe mora biti gladka in čista, saj to vpliva na točnost merjenja. Detektor pa meri intenziteto prepuščene svetlobe skozi vzorec. Na koncu pa imamo še zaslon, ki nam prikaže izmerjeno absorbanco.

Spektrofotometrijska merjenja absorpcije se izvajajo pri valovni dolžini, ki odgovarja nekemu absorpcijskem maksimumu. V tej točki je sprememba absorbance na enoto koncentracije največja. Absorpcijska krivulja je v maksimumu skoraj vedno ravna, kar omogoča dobro linearnost in manjšo možno napako, če se ne doseže točna valovna dolžina na instrumentu.

Na absorbanco raztopine vplivajo narava topila, pH, temperatura, koncentracija elektrolita, čas trajanja reakcije ter prisotnost snovi, ki interferirajo.

V kiveto smo natočili vse vzorce in nato izmerili, kolikšno količino žarkov je ekstrakt absorbiral/prepustil. Merili smo pri dveh valovnih dolžinah: 645 nm in 663 nm.



Slika 19: Spektrofotometer (vir lasten)

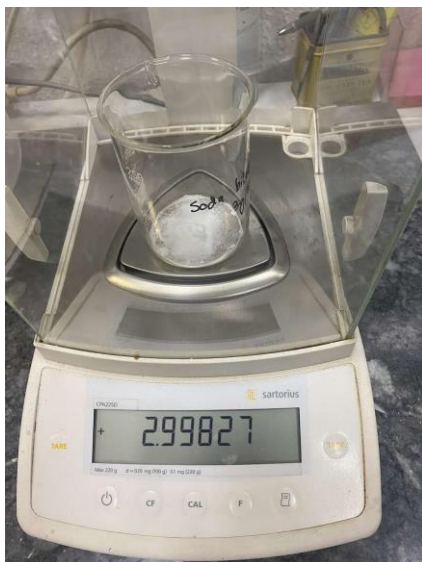
3.2.4 Druge metode dela

Razbarvanje jajc, barvanje jajc, spreminjanje pH vrednosti, tehtanje, namakanje.

3.2 Opis postopka

Najprej smo določili količino kisa/sode bikarbone, ki jo moramo dodati 100 ml vode da se njena pH vrednost zniža/zviša za določeno vrednost. Ugotovili smo, da če vodi dodamo 28 kapljic alkoholnega kisa, pH vrednost pade na 4, in da če dodamo 3 g sode bikarbone, se pH zviša na 9. Te vodne raztopine smo nato uporabili pri eksperimentu. Nato smo zatehtali 5 g posamezne rastline, jih narezali, v terilnici do dobra razdrobili in jih nato dodali vodi/vodnim raztopinam/acetonu/etanolu/diklorometanu. Tako smo želeli ugotoviti, v katerem topilu se klorofil najboljše ekstrahira.

Čaše, v katerih je bilo topilo voda/kisla raztopina/bazična raztopina smo postavili na kuhalnik in jih greli na 80 stopinj celzija 30 minut. Čaše z etanolom, acetonom in diklorometanom pa zaradi njihovih lastnosti nismo postavili na kuhalnik, temveč smo liste v njih namakali ločeno. Vse skupaj smo pustili stati en dan in naslednjega dne zmes filtrirali.



Slika 20: Tehtanje sode bikarbone (vir lasten)



Slika 21: Rezanje peteršilja (vir lasten)



Slika 22: Obdelava motovilca v terilnici (vir lasten)



Slika 23: Kuhanje vzorcev (vir lasten)

Jajca smo zaradi njihove osnovne barve najprej razbarvali. Vodo in alkoholni kis smo zmešali v razmerju 1:1. Jajca smo položili v zmes in segrevali do vrenja. Kuhali smo jih 8 minut. Pri tem smo sproti odstranjevali peno, ki je nastajala pri kuhanju.



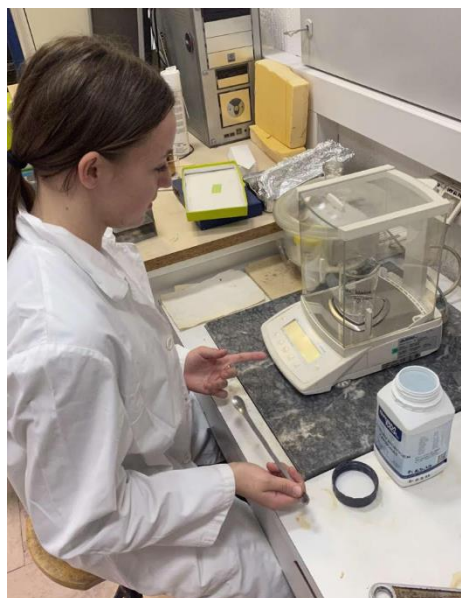
Slika 24: Kuhanje jajc, pena, ki pri tem nastaja (vir lasten)



Slika 25: Razbarvana jajca (vir lasten)

Po razbarvanju so imela zelo krhko lupino, zato smo z njimi ravnali zelo previdno. Nato smo jih pobarvali. Vodnih, kisljih in etanolnih ekstraktov nismo uporabili, saj ekstrakcija ni bila dovolj uspešna. Jajca smo pustili stati v vseh ekstraktih razen vodnih približno en dan.

Vzorcem smo nato izmerili absorbanco klorofila s spektrofotometrom. V kiveto smo nalili vzorec in mu izmerili absorbanco pri valovnih dolžinah 645 nm in 663 nm.



Slika 26: Tehtanje snovi za pripravo slepega vzorca za umeritveno krivuljo



Slika 27: Spektrofotometrična določitev klorofila v vzorcih (vir lasten)

4. Rezultati

4.1 Barva vzorcev po ekstrakciji

4.1.1 Peteršilj



Slika 28: Ekstrakti peteršilja v vodi, bazični in kisli raztopini (vir lasten)



Slika 29: Ekstrakti peteršilja v etanolu, acetonu in diklorometanu (vir lasten)

4.1.2 Motovilec



Slika 30: Ekstrakti motovilca v vodi, bazični in kisli raztopini (vir lasten)



Slika 31: Ekstrakti motovilca v acetonu, etanolu in diklorometu (vir lasten)

4.1.3 Špinača



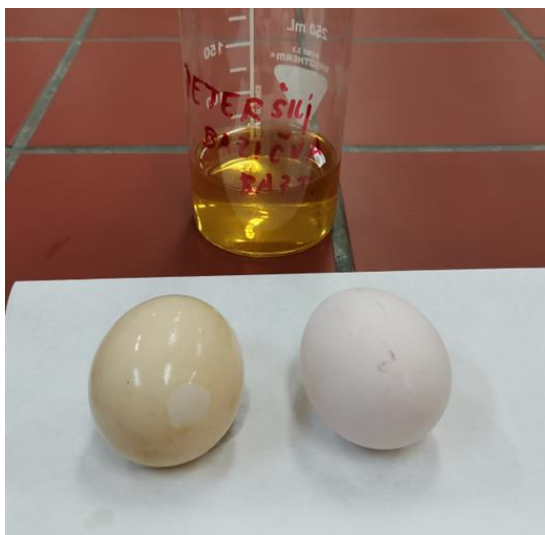
Slika 32: Ekstrakti špinače v vodi, bazični in kisli raztopini (vir lasten)



Slika 33: Ekstrakti špinače v etanolu, acetonu in diklorometanu (vir lasten)

4.2 Obarvanost jajčne lupine v različnih vzorcih

4.2.1 Peteršilj



Slika 34: Jajce, barvano z barvilom peteršilja, ekstrahiranim v bazični raztopini (vir lasten)



Slika 35: Jajce, barvano z barvilom peteršilja, ekstrahiranim v acetonu (vir lasten)



Slika 36: Jajce, barvano z barvilom peteršilja, ekstrahiranim v diklorometanu (vir lasten)

4.2.2 Motovilec



Slika 37: Jajce, barvano z barvilom motovilca, ekstrahiranim v bazični raztopini (vir lasten)



Slika 38: Jajce, barvano z barvilom motovilca, ekstrahiranim v acetonu (vir lasten)



Slika 39: Jajce, barvano z barvilom motovilca, ekstrahiranim v diklorometanu (vir lasten)

4.2.3 Špinača



Slika 40: Jajce, barvano z barvilom špinače, ekstrahiranim v bazični raztopini (vir lasten)



Slika 41: Jajce, barvano z barvilom špinače, ekstrahiranim v acetonu (vir lasten)



Slika 42: Jajce, barvano z barvilom špinače, ekstrahiranim v diklorometanu (vir lasten)

4.3 Vsebnost klorofila v ekstraktih

Koncentracijo klorofila smo izračunali po enačbi:

$$1) \text{ Chlotophyll a (mg/g)} = 12.7 (A_{663}) - 2.69 (A_{645}) \times V/1000 \times W$$

$$2) \text{ Chlorophyll b (mg/g)} = 22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663}) \times V/1000 \times W$$

$$3) \text{ Total chlorophyll (mg/g)} = 20.2 (A_{645}) - 8.02 (A_{663}) \times V/1000 \times W$$

kjer je:

A_{663} – absorbanca pri valovni dolžini 663 nm;

A_{654} – absorbanca pri valovni dolžini 654 nm;

V – količina topila [mL];

W – masa suhe snovi [g].

Primer izračuna vsebnosti klorofila v špinačnem ekstraktu vode:

$$12,7 \times 0,01575 - 2,69 \times 0,0159 \times 100/1000 \times 5 = 0,1786395 \text{ mg/g}$$

zelenje/topilo	voda	kisla raztopina	bazična raztopina	aceton	etanol	diklorometan
špinača	0,1786395	0,11445275	0,60524475	35,3016425	1,18096625	9,81130925
peteršilj	3,54586525	0,0111895	0,609391	61,13332	0,49027075	40,4483125
motovilec	0,3487925	0,96101475	7,79304725	30,9898725	0,3637	2,16861225

Tabela 2: Koncentracija klorofila a v ekstraktih špinače, peteršilja in motovilca v mg/g

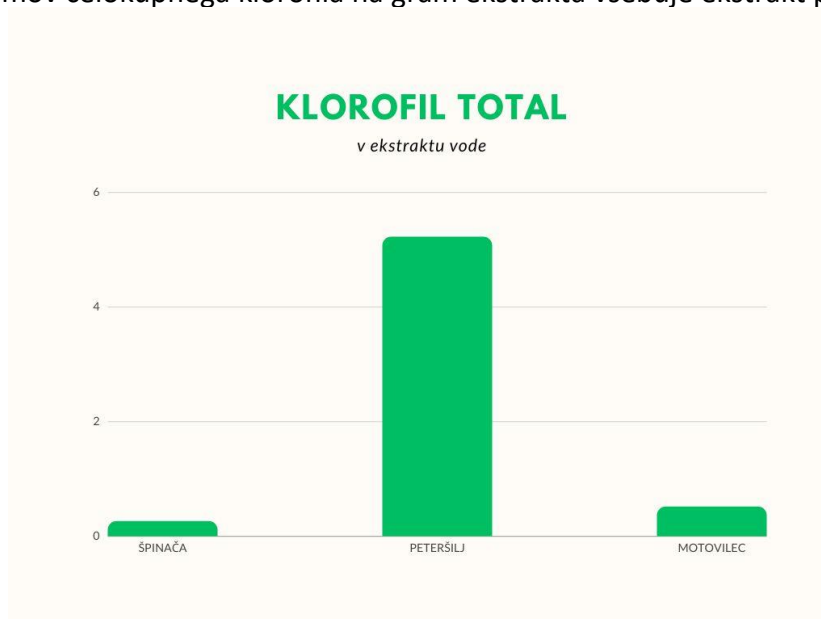
zelenje/topilo	voda	kisla raztopina	bazična raztopina	aceton	etanol	diklorometan
špinača	0,327255	0,297175	1,031285	24,15533	1,453003	8,053874
peteršilj	6,607824	0,108934	1,024858	34,58408	0,555866	26,46896
motovilec	0,649278	2,256908	13,060379	16,93091	0,363379	0,935775

Tabela 3: Koncentracija klorofila b v ekstraktih špinače, peteršilja in motovilca v mg/g

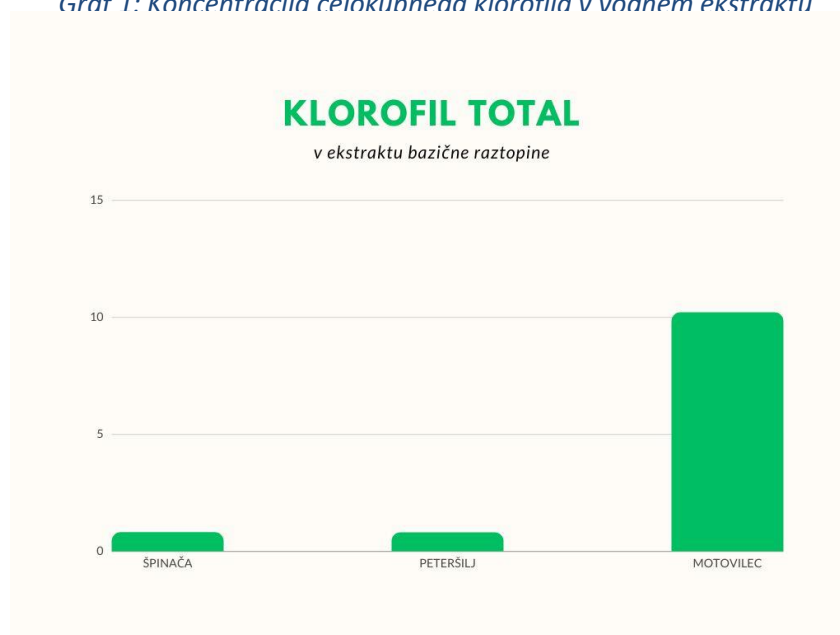
zelenje/topilo	voda	kisla raztopina	bazična raztopin	aceton	etanol	diklorometan
špinača	0,2580225	0,241705	0,80656	15,61947	1,085542	5,5112835
peteršilj	5,2193785	0,093366	0,800307	20,72252	0,4088915	16,842065
motovilec	0,512792	1,8214195	10,194576	9,98044	0,2608935	0,48102

Tabela 4: Koncentracija celokupnega klorofila v ekstraktih špinače, peteršilja in motovilca v mg/g

Največ miligramov klorofila a na gram ekstrakta vsebuje ekstrakt peteršilja v diklorometanu. Največ miligramov klorofila b na gram ekstrakta vsebuje ekstrakt peteršilja v acetonu. Največ mi ligramov celokupnega klorofila na gram ekstrakta vsebuje ekstrakt peteršilja v acetonu.

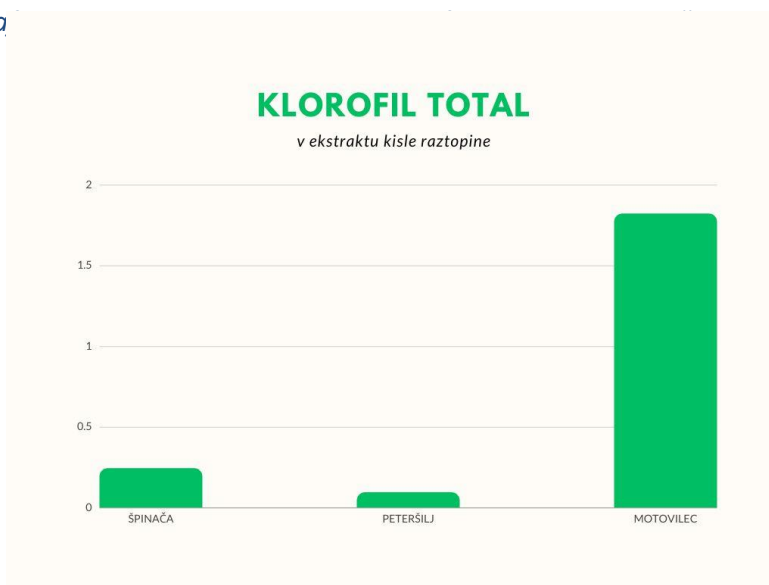


Graf 1: Koncentracija celokupnega klorofila v vodnem ekstraktu

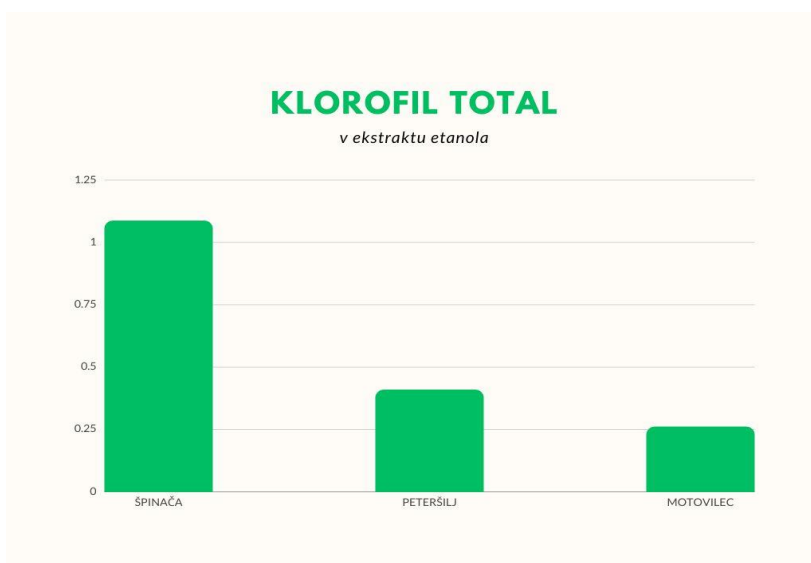


Gra

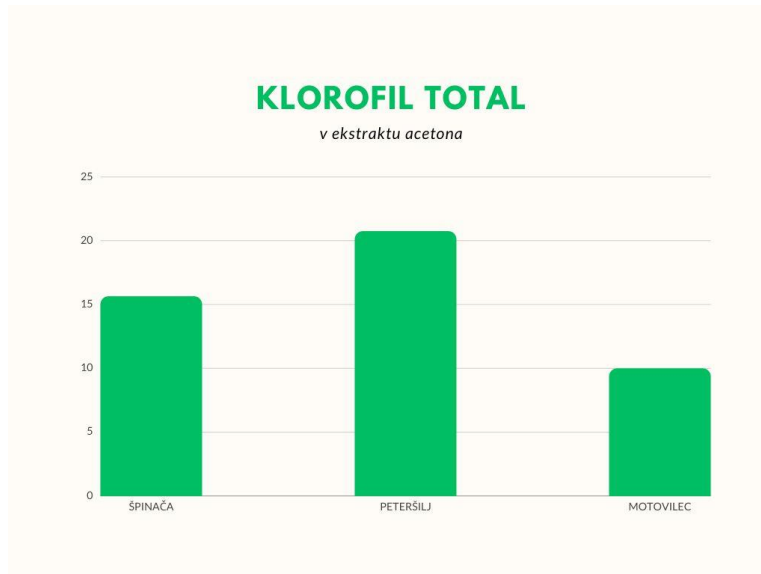
opin



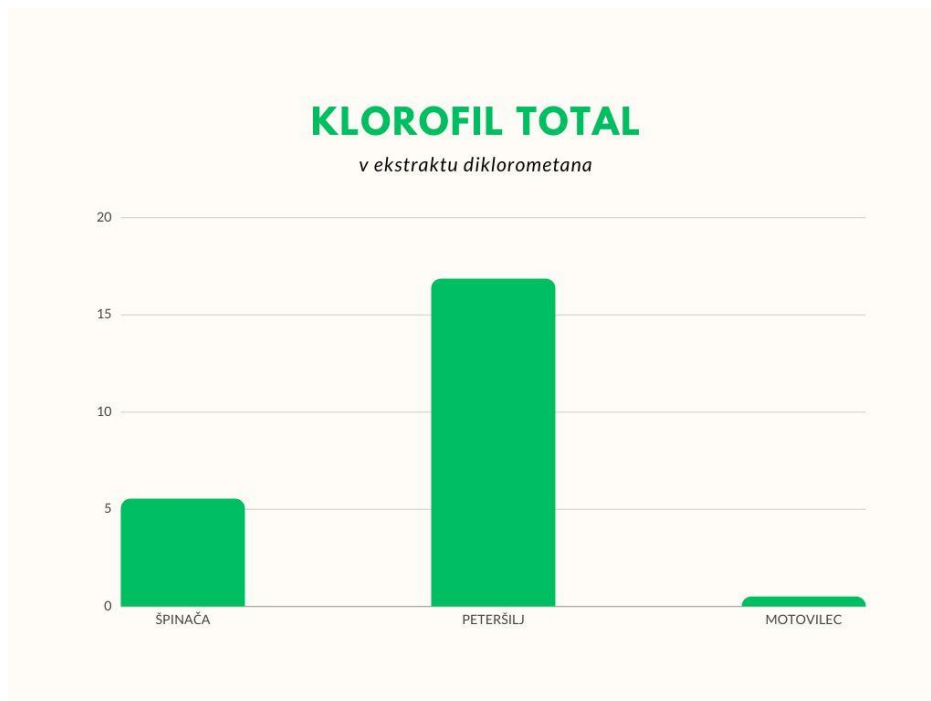
Graf 3: Koncentracija celokupnega klorofila v ekstraktih kislih raztopin



Graf 4: Koncentracija celokupnega klorofila v etanolnih ekstraktih



Graf 5: Koncentracija celokupnega klorofila v ekstraktih z acetonom



Graf 6: Koncentracija celokupnega klorofila v ekstraktih v diklorometanu

5. Razprava

Glavni cilj naše raziskovalne naloge je bil ugotoviti katero topilo je najprimernejše za ekstrakcijo klorofila iz zelenih listov izbranih rastlin, hkrati pa smo poskusili ugotoviti kako bi se obarvala jajčna lupina v ekstraktih teh rastlin.

Hipoteza 1: Ekstrakcija klorofila bo najintenzivnejša v etanolu.

Etanol je organsko topilo, ki hitro hlapi. Spada v skupino alkoholov. Ekstrakti vseh uporabljenih rastlin so se v etanolu obarvali svetlo zeleno, vendar po izmerjeni absorbanci vzorcev etanol ni najprimernejše topilo za ekstrakcijo klorofila. Prvo hipotezo ovržemo.

Hipoteza 2: V organskih topilih se bo jajčna lupina najintenzivneje obarvala.

Ekstrakti rastlin v organskih topilih so dali intenzivnejšo barvo, v primerjavi z vodnimi ekstrakti. Izjema je ekstrakt motovilca v bazični raztopini, ki je jajčno lupino obarval najintenzivneje, skoraj rjavo. Ostali ekstrakti so lupino obarvali blede rjavo ali rumeno. Ovržemo tudi drugo hipotezo.

Hipoteza 3: Ekstrakti špinače bodo vsebovali največjo koncentracijo klorofila.

Špinača je vrsta zelenjave, znana po veliki vsebnosti tega barvila. Največjo koncentracijo klorofila je vseboval ekstrakt špinače v acetonu, vendar še vedno manj kot ekstrakt peteršilja v acetonu, kar ovrže tudi našo tretjo hipotezo.

6. Zaključek

V raziskovalni nalogi smo preučevali vsebnost klorofila v ekstraktih peteršilja, motovilca in špinače v različnih topilih. Izbrali smo šest vrst topil, med njimi tri organska topila, ostalo pa so bili vodni ekstrakti (z različnimi pH). Dobljenim ekstraktom smo izmerili vsebnost klorofila in v najintenzivnejših poskušali obarvati jajčno lupino. V splošnem lahko rečemo, da se klorofil najbolje ekstrahira v organskih topilih in sicer v acetonu in diklorometanu. Jajčna lupina se je najbolj obarvala v bazični raztopini motovilca.

Pričakovali smo, da bodo vsi ekstrakti v odtenkih zelene barve, vendar se je izkazalo, da temu ni tako. Veliko jih je bilo rumene barve, vodni ekstrakti pa v glavnem zelo blede rumeni.

7. Viri in literatura

- Cestnik V.,1993. Fiziologija domačih živali. Ljubljana, Veterinarska fakulteta, 1993: 157 str
- <https://sl.wikipedia.org/wiki/Rastline>
- <https://letstalkscience.ca/educational-resources/backgrounders/plant-pigments>
- <https://sl.wikipedia.org/wiki/Klorofil>
- <https://eucbeniki.sio.si/kemija3/1283/index3.html>
- <https://sl.wikipedia.org/wiki/Flavonoidi>
- <https://integrisok.com/resources/on-your-health/2021/august/chlorophyll>
- <https://www.healthline.com/health/carotenoids>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5465813/>
- https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorophyll#Chemical_structure
- <https://www.makabo.si/splosno/naravna-barvila-za-zivila/>
- <https://natureta.si/barvanje-pirhov-z-naravnimi-barvili/>
- <https://prehrana.si/clanek/263-jajca>
- http://seminarvaja6.blogspot.com/2013/11/pomen-rastlin-v-naravi-in-za-cloveka_4.html
- <https://leverageedu.com/blog/plants/>
- https://zbirke.zotks.si/2022/resources/OS_kemij_1023.pdf
- <https://sl.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrija>
- <https://en.wikipedia.org/wiki/Plant>
- <https://www.farmedica.si/rastlina/47/Petersilij>
- https://dijaski.net/gradivo/bio_sno_rastline_04
- <http://botanika.kladnik.xyz/zeleni-skrat/student/BSc-Bio/gradivo/proteus-zelene-rastline.pdf>
- <https://repositorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=128695>
- <https://www.vrtnarava.si/rastline/opisi/zelenjava/spinaca>
- <https://www.vrtnarica.si/spinaca/>
- http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_flere_robert.pdf
- <https://ifood-sl.womanexpertus.com/chem-otlichajutsja-belye-jaic>