

УДК 54.056:54.03:577.127.3

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ ИЗ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ (*URTICA DIOICA* L.) И СПИРУЛИНЫ (*SPIRULINA PLATENSIS*)

© Д.Р. Каримов^{1,2}, В.В. Макаров³, С.О. Кручин³, Д.Б. Березин^{3*}, Н.Л. Смирнова¹, М.Б. Березин¹, Е.И. Желтова², А.И. Стрельников², А.В. Кустов^{1,2}

¹Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, ул. Академическая, 1, Иваново (Россия)

²Ивановская государственная медицинская академия Минздрава России, Шереметевский пр-т, 8, Иваново (Россия)

³Ивановский государственный химико-технологический университет, НИИ макрогетероциклических соединений, Шереметевский пр-т, 7, Иваново (Россия), e-mail: berezin@isuct.ru

В работе рассмотрены и сопоставлены различные факторы, влияющие на эффективность экстрактивного выделения хлорофиллов из двух растительных источников – цветкового растения крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.), содержащего смесь хлорофиллов *a* и *b*, и сине-зеленой водоросли спирулины (*Spirulina platensis*), содержащей хлорофилл *a*. Предпочтительным растворителем для экстракции хлорофилла из спирулины является этанол, а из крапивы – ацетон. Обработка сырья ультразвуком, перемешивание, предварительная криообработка биомассы повышают выход хлорофиллов, а сочетание таких факторов приводит к существенному увеличению выхода продуктов. Криообработка сырья оказывает положительное влияние на выход пигментов только при экстракции ацетоном.

Ключевые слова: хлорофиллы, экстракция, крапива двудомная (*Urtica dioica* L.), сине-зеленая водоросль спирулина (*Spirulina platensis*), ультразвуковая обработка, криообработка сырья жидким азотом.

Работа поддержана грантом РФФИ (проект №13-03-00557а).

Введение

Хлорофиллы являются одними из наиболее распространенных природных пигментов, ежегодное производство которого в растительной биомассе составляет 10^{12} – 10^{14} тонн в год [1–4]. На основе хлорофиллового сырья возможно создание производства важных лекарственных препаратов, пищевых красителей, катализаторов, фотопреобразователей энергии [5–7]. В связи с общим развитием биотехнологии, и в частности возрастанием интереса к применению малотоксичных пигментов природного происхождения, разработка эффективных методов выделения хлорофиллов, их химическая

модификация, а также поиск новых областей использования являются весьма перспективными [3–9].

В основе молекулы хлорофилла лежит магниевый комплекс хлорина (β -дигидропорфирина, например, соед. **I–II**), содержащий дополнительное изоциклическое циклопентанонное кольцо V и остаток пропионовой кислоты в кольце IV, этерифицированный фитолом ($C_{20}H_{39}OH$), а также метильные и винильные группы в замещаемых положениях макроцикла. Наиболее распространенные в растительном мире хлорофиллы *a* (соед. **I**) и *b* (соед. **II**) различаются лишь заместителем R в положении 7 (рис. 1).

Каримов Дмитрий Рустамович – кандидат химических наук, научный сотрудник

Макаров Владимир Владимирович – студент

Кручин Сергей Олегович – студент

Березин Дмитрий Борисович – доктор химических наук, профессор кафедры органической химии, e-mail: berezin@isuct.ru

Смирнова Наталья Леонидовна – кандидат химических наук, научный сотрудник

Березин Михаил Борисович – доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник

Желтова Е.И. – студентка

Стрельников Александр Игоревич – доктор медицинских наук, профессор, проректор

Кустов Андрей Владимирович – доктор химических наук, старший научный сотрудник

* Автор, с которым следует вести переписку.

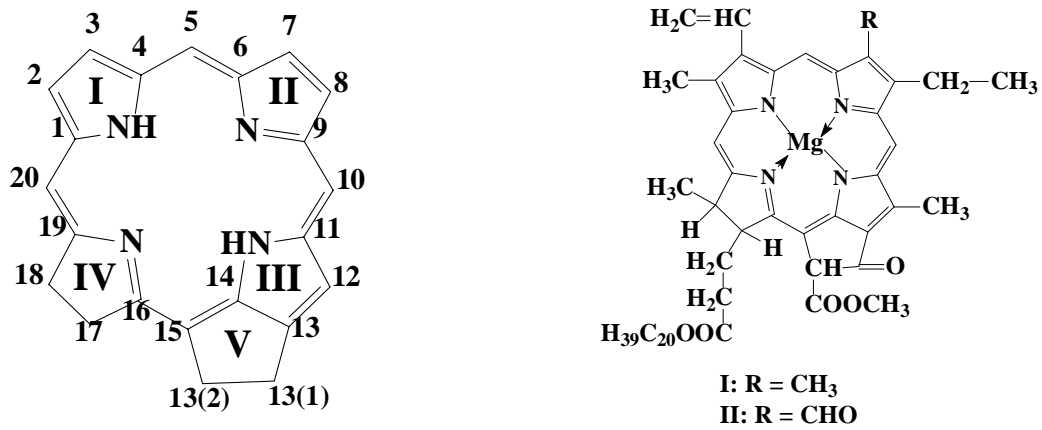


Рис. 1. Нумерация фрагментов макроцикла хлорофиллов

Наиболее распространенным способом выделения хлорофиллов из природных источников является экстракция [5, 10–15]. При этом выбор растворителя и дополнительных условий, таких как время обработки, температурный режим на предварительном этапе и во время экстракции, добавление электролита, воздействие ультразвука, могут играть важную роль в оптимизации выхода целевого продукта.

Имеется большое число работ по выделению хлорофиллов из крапивы двудомной (*Urtica dioica*) [5, 12]. Однако крапива, подобно другим высшим растениям, содержит смесь хлорофиллов *a* и *b*, разделение которой на компоненты весьма трудоемко. Сине-зеленые водоросли, в частности спирулина (*Spirulina platensis*), содержат только хлорофилл *a* и являются перспективными источниками его получения. Обычно содержание хлорофиллов в экстракте в расчете на сухой вес высшего растения или водоросли составляет от 0,5 до 1,5% [5, 10].

Для экстракции зеленых пигментов из свежего растительного сырья используются различные индивидуальные, смешивающиеся с водой растворители – спирты, ацетон, *N,N*-диметилформамид, а также смешанные – этилацетат-гексан, этанол-петролейный эфир и другие среды [5, 10, 11]. Одним из самых распространенных экстрагентов является абсолютизированный или водный ацетон (Me_2CO) [5, 12, 13]. Ацетоновый раствор с концентрацией воды больше 10% неполно экстрагирует малополярный хлорофилл *a* из высших растений. Однако добавление небольших количеств воды к растворителям (Me_2CO , EtOH) улучшает их экстрагирующую способность, поскольку вода нарушает электролитный баланс в хлоропластах, вызывая разрушение хлорофилловых агрегатов [16, 17], а также уменьшает растворимость липидных соединений, таких как каротиноиды [18].

Ацетон применяют и для получения хлорофиллового экстракта из *Spirulina* [10, 19]. В ацетоне хлорофиллы устойчивы, однако он является менее эффективным экстрагентом свежего растительного сырья по сравнению с низшими спиртами, где, тем не менее, возможна их алломеризация, в частности окисление C–H связи в 13(2)-положении до C–OH [10]. Алломеризация может происходить при длительной экстракции, а также при хроматографировании.

Важное значение для эффективной экстракции имеет выбор соотношения объема растворителя и растительного сырья: для свежей биомассы – это 20÷1 – 30÷1, в случае высушенного сырья соблюдают отношение 5÷1 [10].

Для удаления хлорофиллов из растительной ткани целесообразно провести предварительное измельчение биомассы [10]. Следом за измельчением в избытке растворителя смесь фильтруют или центрифугируют для отделения твердого вещества от экстракта, при неполном извлечении экстракцию повторяют [13].

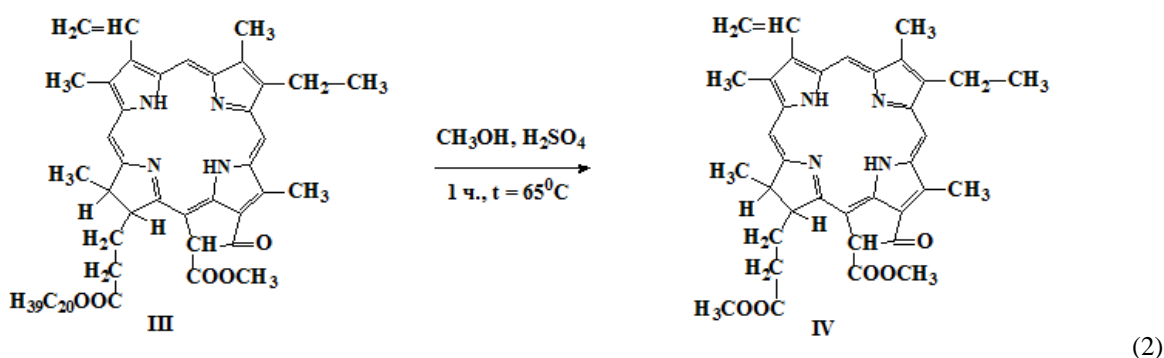
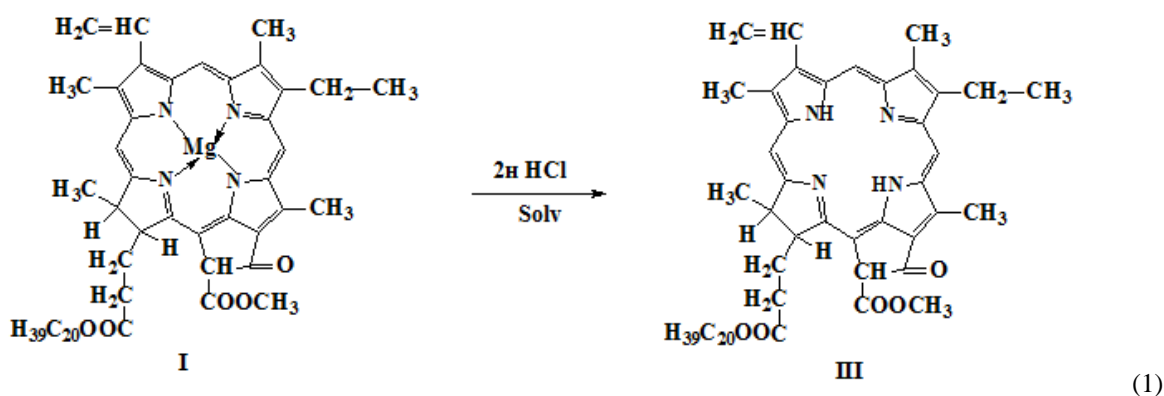
С целью повышения эффективности экстракции иногда проводят предварительную обработку растительного сырья небольшим количеством спирта или ацетона для удаления избытка воды и/или гликопротеидов, окружающих клеточную стенку [20]. При экстракции пигментов из растений с кислой цитоплазмой, например из крапивы, для предотвращения образования феофитинов добавляют бикарбонат или карбонат натрия, *N,N*-диметиланилин или гидроксид аммония [10, 12]. В работе [21] *Spirulina* перед экстракцией ацетоном отмывалась от водорастворимых веществ фосфатным буфером с pH = 6. Такая процедура облегчает в дальнейшем проницаемость клеточных стенок для растворителя. Кроме того, проницаемость оболочек клеток можно повысить, используя замораживание-размораживание растительного сырья [19, 22] или обработку ультразвуком [10].

Некоторые растительные материалы перед измельчением рекомендуют кратковременно нагревать в кипящей воде (1–2 мин) с последующим резким охлаждением ледяной водой, чтобы улучшить экстрагируемость и уменьшить ферментативное окисление и гидролиз. В то же время известно, что нагревание вызывает изомеризацию хлорофиллов и их частичное разложение [10]. Способность пигментов экстрагироваться зависит от проницаемости клеточной стенки и изменяется в зависимости от содержания воды. Более полно экстракция из высушенных листьев происходит с применением предварительной гидратации [10]. Кроме того, экстракция хлорофилла увеличивается по мере увеличения полярности растворителя.

В настоящей работе изучено влияние различных факторов – природы растворителя, температуры, ультразвуковой обработки, перемешивания, а также их сочетания – на степень извлечения хлорофиллов из растительного сырья.

Экспериментальная часть

В работе использовались образцы хлорофиллов, полученные из двух растительных источников: крапивы двудомной (*Urtica dioica L.*) и сине-зеленой водоросли спирулины (*Spirulina platensis*). В случае крапивы смесь хлорофиллов *a* и *b* выделялась из высушенных в темноте и измельченных листьев растения, собранных в мае, до начала цветения. Место сбора образцов – Иваново, в городской черте. Спирулина использовалась в виде высушенной массы, поставляемой в одном случае из Китая, в другом – из Германии. В качестве растворителей для экстракции использовались 96%-й этанол и ацетон марки «Ч». Основная методика экстракции заключалась в следующем:



50 г сухого измельченного растительного сырья заливали 250 мл 96%-го раствора этилового спирта [5, 11] или ацетона [12, 13] и экстрагировали в течение часа при температуре 50 °С и постоянном перемешивании на ротационном испарителе или с помощью механической мешалки без доступа света (см. таблицу). Затем полученный экстракт фильтровали на воронке Бюхнера, фильтрат подкисляли 36%-й HCl до получения 2n раствора. Далее спиртовой экстракт оставляли на 12 ч в морозильной камере. Полученный спиртовой раствор с осадком феофитина *a* (соед. III) (1) фильтровали на фильтре Шотта, остаток сушили под вакуумом и взвешивали. При использовании ацетона в качестве экстрагента подкисленный HCl ацетоновый экстракт хлорофилловых пигментов упаривали на ротационном испарителе до вязкой зеленой массы, отмывали водой от ацетона и кислоты, экстрагировали в дихлорметан, раствор концентрировали и про-

водили колоночную хроматографию на оксиде алюминия V степени активности по Брокману с использованием дихлорметана в качестве элюента. Затем феофитин *a* (соед. III) или смесь пигментов (*a + b*) перерабатывались на метилфеофорбид *a* (соед. IV, (2)) (или смесь *a + b* производных) путем кипячения с 5%-ным (об.) раствором серной кислоты в метаноле в течение 1ч (2) с последующим осаждением продукта в ходе разбавления реакционной массы водой 1 : 1 и ее охлаждения в течение 12 ч в морозильной камере. Более высокая степень кристалличности метилфеофорбидов по сравнению с феофитинами благоприятствует определению выхода модифицированного продукта экстракции с более высокой точностью (табл.). Выход феофитина *a* (или смеси *a + b*) определялся только в некоторых случаях (табл.). Чистоту соединений оценивали с помощью ТСХ, электронной спектроскопии (ЭСП) и спектроскопии протонного магнитного резонанса (¹H ЯМР).

В серии последующих экспериментов модифицировали условия экстракции следующим образом (табл.):

1. Влажную зеленую массу подвергали замораживанию в морозильной камере холодильника в течение 12 ч, а затем экстрагировали 250 мл растворителя (этанол или ацетон) при перемешивании на ротационном испарителе и температуре 50 °С.

2. Сухую массу помещали в тонкостенную пластиковую емкость, заливали 250 мл растворителя и подвергали действию ультразвука (рабочая частота 40 кГц; мощность – 70, 120 Вт) при температуре 50 °С без перемешивания.

3. Сухую массу помещали в тонкостенную пластиковую емкость, заливали 250 мл растворителя и подвергали действию ультразвука (рабочая частота 40 кГц; мощность – 70 Вт) при температуре 50 °С и постоянном перемешивании механической мешалкой.

4. Сухую массу помещали в тонкостенную пластиковую емкость, заливали 250 мл растворителя, обрабатывали жидким азотом и подвергали действию ультразвука (рабочая частота 40 кГц; мощность – 70 Вт) при температуре 50 °С и постоянном перемешивании механической мешалкой.

Количественные результаты приведены в таблице и на рисунке 2.

Обсуждение результатов

Усовершенствование методики экстракции хлорофилловых производных, проводимой нами при перемешивании реакционной массы и нагревании ее до 50 °С в течение часа, предполагает повышение ее эффективности за счет ультразвукового воздействия с частотой 70–120 Вт, предварительного охлаждения реакционной массы жидким азотом, а также высаливания конечного продукта из раствора, варьирования типа растительного сырья и экстрагента.

Выход хлорофилла *a* из сине-зеленой водоросли *Spirulina*, целевым образом химически модифицированного в ходе выделения до феофитина *a*^{**} (1), а затем – до диметилового сложного эфира феофорбида *a*^{**} (2), зависит от марки продукта. Так, максимальный достигаемый выход метилфеофорбида *a* из исходного сухого растительного сырья изменяется при экстракции этанолом от 0,84% до 1,28%, т.е. возрастает на 0,44% при замене *Spirulina* производства Китая на продукт, приобретенный в Германии (табл.).

Преимуществом спирта как экстрагента по сравнению с ацетоном является возможность высаливания из него хлорофилловых производных путем подкисления реакционной массы и выдерживания ее при пониженной температуре в течение 0,5–3 суток (см. экспериментальную часть). Для того чтобы хлорофилловые продукты осаждались и выделялись из реакционной массы с высоким выходом, содержание воды в исходном спирте не должно быть слишком высоким. Так, при содержании воды в системе 30 и более процентов хлорофилловые производные в осадок не выпадают, поскольку их концентрация в растворе в результате слабой степени экстракции сильно снижается. 50 г водоросли *Spirulina* при набухании поглощает до 130 мл воды. По этой причине пришлось исключить из методики фактор предварительного запаривания сухой биомассы в воде при 50 °С. Из ацетоновых растворов хлорофиллы обычно не выпадают, кроме как при действии на эти растворы фосфатного буфера [21], поэтому для выделения из реакционной массы чистых индивидуальных пигментов в этом случае обычно необходима стадия хроматографической очистки, снижающая выход целевого продукта и приводящая к существенному удорожанию стадии экстракции. Применение метода высаливания хлорофиллов из раствора NaCl, CH₃COONa, [N(R)₄]Br (R = C₆H₁₃–, C₈H₁₇–) не способствовало осаждению по причине недостаточной растворимости рассматриваемых солей в ацетоне.

^{**} Или смеси продуктов (*a + b*) при использовании крапивы в качестве растительного сырья.

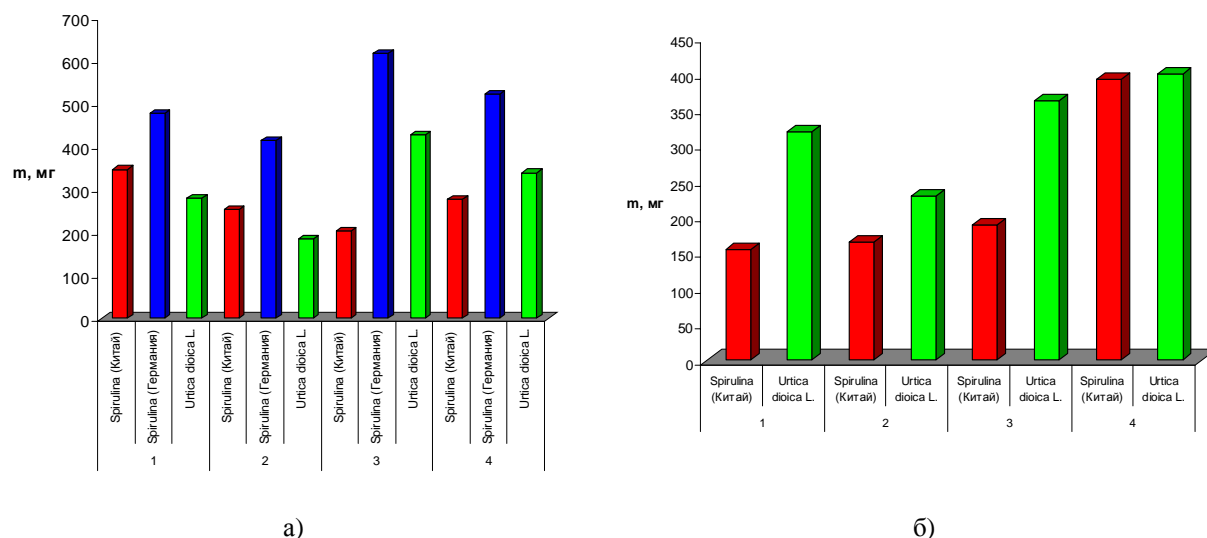


Рис. 2. Выход экстракции хлорофилловых пигментов из растительного сырья в пересчете на метилфеофорбиды (соед. IV): а) в этаноле; б) в ацетоне под действием внешних факторов:

1 – перемешивание; 2 – ультразвук (УЗ); 3 – перемешивание + УЗ; 4 – перемешивание + УЗ + криообработка

Результаты экстракции и выходы модифицированных производных хлорофилла *a* (или их смесей *a+b*) из экстрактов растительного сырья при 50 °С

№	Растительное сырье (50 г)	Растворитель (250 мл)	Время обработки, ч	Ультразвук (70 Вт)	Криообработка жидким азотом	Перемешивание		Выход феофитина (соед. III) ^{***} , мг	Выход метилфеофорбида (соед. IV), мг
						ротационный испаритель	механическая мешалка		
1	Spirulina (Китай)	EtOH	1	-	-	+	-	-	347 (0,69%)
2	Spirulina (Китай)	EtOH	1	+	-	-	-	283 (0,57%)	260 (0,52%)
3	Spirulina (Китай)	EtOH	1	+(120 Вт)	-	-	-	350 (0,70%)	245 (0,49%)
4	Spirulina (Китай)	EtOH	1	+	-	-	+	526 (1,05%)	422 (0,84%)
5	Spirulina (Китай)	EtOH	2	+	-	-	+	276 (0,55%)	226 (0,45%)
6	Spirulina (Китай)	EtOH	1	+	+	-	+	-	277 (0,55%)
7	Spirulina (Китай)	Me ₂ CO	1	-	-	+	-	-	155 (0,31%)
8	Spirulina (Китай)	Me ₂ CO	1	+	-	-	-	-	165 (0,33%)
9	Spirulina (Китай)	Me ₂ CO	1	+	-	-	+	-	189 (0,38%)
10	Spirulina (Китай)	Me ₂ CO	1	+	+	-	+	-	393 (0,79%)
11	Spirulina (Германия)	EtOH	1	+	-	-	-	-	415 (0,83%)
12	Spirulina (Германия)	EtOH	1	-	-	-	+	-	477 (0,95%)
13	Spirulina (Германия)	EtOH	1	+	-	-	+	-	617 (1,23%)
14	Spirulina (Германия)	EtOH	1	+	+	-	+	-	522 (1,04%)
15	<i>Urtica dioica</i> L. (свежее сырье)	EtOH	1	-	-	+	-	425 (0,85%)	272 (0,54%)
16	<i>Urtica dioica</i> L. (через 2 недели)	EtOH	1	-	-	+	-	415 (0,83%)	282 (0,56%)
17	<i>Urtica dioica</i> L.	EtOH	1	+	-	-	-	273 (0,55%)	185 (0,37%)
18	<i>Urtica dioica</i> L.	EtOH	1	-	-	-	+	453 (0,91%)	286 (0,57%)
19	<i>Urtica dioica</i> L.	EtOH	1	+	-	-	+	-	427 (0,85%)
20	<i>Urtica dioica</i> L.	EtOH	1	+	+	-	+	-	339 (0,68%)
21	<i>Urtica dioica</i> L.	Me ₂ CO	1	-	-	-	+	-	319 (0,64%)
22	<i>Urtica dioica</i> L.	Me ₂ CO	1	+	-	-	-	-	229 (0,46%)
23	<i>Urtica dioica</i> L.	Me ₂ CO	1	+	-	-	+	-	363 (0,73%)
24	<i>Urtica dioica</i> L.	Me ₂ CO	1	+	+	-	+	-	401 (0,80%)

*** Или смеси продуктов (*a+b*) из *U. dioica*.

Из 2 н этанольного раствора соляной кислоты феофитины полностью выпадают в осадок при использовании экстракта крапивы через 12 ч; в случае экстракции из спирулины дополнительное количество продукта (около 10%) выпадает еще через 2,5 суток.

В ходе проведенных исследований установлено, что совместное действие нескольких факторов на выход экстракции всегда эффективнее действия каждого из них в отдельности (табл.). По эффективности при нагревании реакционной массы при 50 °С в течение 1 ч в зависимости от природы растворителя и сырья они располагаются следующим образом: ультразвук (выход η_0) < перемешивание реакционной массы на ротационном испарителе или на мешалке ($\eta_0 + 40\text{--}60\%$) < ультразвук + перемешивание ($\eta_0 + 50\text{--}62\%$) (табл., рис. 2).

Предварительная механическая обработка растительного сырья на примере крапивы, т.е. измельчение его при помощи шаровой мельницы непосредственно перед экстракцией и экстракция через 2 недели после измельчения дали одинаковые результаты (выход смеси метилфеофорбидов $a + b$ 0,52–0,54%) (табл.). Увеличение времени экстракции хлорофилла из *Spirulina* ацетоном приводит к снижению соед. IV практически вдвое, тогда как в случае ацетона такое время процесса признавалось оптимальным [13].

Нами показано, что предварительная обработка растительной массы жидким азотом увеличивает выход экстракции феофорбидов из ацетона (более чем вдвое в случае спирулины и на 10% в случае крапивы) и не благоприятствует экстракции хлорофиллов спиртом – наблюдается снижение выхода на 35–65 и 9% соответственно (табл., рис. 2), что в настоящее время не находит объяснения.

При замене спирулины на крапиву выход пигментов в сравнимых условиях понижается в среде спирта приблизительно на 20–65%, а в ацетоне – повышается вдвое.

Выводы

1. Спирулина более удобна для получения индивидуальных производных хлорофиллового ряда, поскольку содержит только хлорофилл a -ряда в отличие от крапивы и других высших растений, содержащих обычно смесь хлорофиллов a и b . Содержание хлорофилла в спирулине существенно зависит от марки и страны-производителя.

2. Предпочтительным растворителем для экстракции хлорофилла из спирулины является этанол, а из крапивы – ацетон. Показано, что преимущества экстракции пигментов этанолом связаны с простотой реализации процесса, меньшими потерями продукта при очистке, а также с высокой экологичностью, что позволяет использовать полученный растительный жмых как пищевую биологически активную добавку в животноводстве.

3. Доказано, что применение дополнительных физических факторов – обработка сырья ультразвуком, перемешивание, предварительное замораживание биомассы жидким азотом с последующим размораживанием – повышает выход хлорофиллов, а сочетание нескольких таких факторов приводит к существенному увеличению выхода продуктов. Криообработка сырья оказывает положительное влияние на выход пигментов только при экстракции ацетоном. Наибольший выход пигмента в пересчете на метилфеофорбид IV имел место в случае экстракции из *Spirulina* этанолом при совместном действии перемешивания и ультразвука.

Список литературы

1. Годнев Т.Н. Хлорофилл. Его строение и образование в растении. Минск, 1963. 319 с.
2. Рабинович Е. Фотосинтез. М., 1951. 648 с.
3. Березин Б.Д., Березин М.Б., Румянцева С.В. Синтез и применение экологически чистых металлосодержащих красителей на основе производных хлорофилла // Координационная химия. 2006. Т. 32. № 3. С. 235–239.
4. Березин Б.Д., Румянцева С.В., Морыганов А.П., Березин М.Б. Химические превращения хлорофилла и его использование для создания экологически чистых красителей нового поколения. // Успехи химии. 2004. Т. 73. № 2. С. 197–207.
5. Койфман О.И., Аскараров К.А., Березин Б.Д., Ениколопян Н.С. Порфирины. Структура. Свойства. Синтез. М., 1985. С. 175–204.
6. Павлов В.Ю., Пономарев Г.В. Пути модификации периферических заместителей хлорофиллов a и b и их производных // Химия гетероциклических соединений. 2004. № 4. С. 483–519.
7. Миронов А.Ф. Современное состояние химии фотосенсибилизаторов на основе природных порфиринов, хлорофинов и бактериохлорофинов // Успехи химии порфиринов. 2004. Т. 4. С. 271–288.

8. Березин Б.Д. Координационные свойства и функции важнейших биопорфиринов // Известия вузов. Химия и химическая технология. 1984. Т. 27. В. 3. С. 259–271.
9. Cannon J., Cannon M. Dye plants and dyeing. London, 1994. 128 p.
10. Svec W.A. The isolation, preparation, characterization and estimation of the chlorophylls and bacteriochlorophylls // In book: The porphyrins. New-York: Acad. Press, 1978. Vol. 5. Pp. 342–400.
11. Белых Д.В. Новые подходы в синтезе полифункциональных хлоринов на основе хлорофилла *a*: дисс. ... д-ра хим. наук. Иваново, 2012. 320 с.
12. Березин М.Б. Сольватация хлорофилла и родственных соединений: дисс. ... д-ра хим. наук. Иваново, 1993. 340 с.
13. Salgado A. Chlorin photosensitisers for tumor phototherapy. London, 1993. 168 p.
14. Ашмаров В.В., Баум Р.Ф., Мещерякова А.Л., Пономарев Г.В., Сухин Г.М. Промышленное производство Spirulina – реальный источник крупномасштабного получения фотосенсибилизаторов на основе хлорофилла *a* // Тезисы VII Междунар. конф. по химии порф. и их аналогов. СПб., 1995. С. 151–152.
15. Рашидова С.Т. Переработка хлорофилла из выделений тутового шелкопряда на металлопорфирины и исследование их физико-химических свойств: дисс. ... канд. хим. наук. Иваново, 1983. 135 с.
16. Porra R.J. The assay of chlorophylls *a* and *b* converted to their respective magnesium-rhodochlorin derivatives by extraction from recalcitrant algal cells with aqueous alkaline methanol: prevention of allomerisation with reductants // Biochim. Biophys. Acta. 1990. Vol. 1015. N3. Pp. 493–502.
17. Humphrey A.M. Chlorophyll // Food Chem. 1980. Vol. 5. Pp. 57–67.
18. Bruinsma J. The quantitative analysis of chlorophylls *a* and *b* in plant extracts // Photochem. Photobiol. 1963. Vol. 2. Pp. 241–244.
19. Osuka A., Wada U., Shinoda S. Covalently linked pyropheophorbide dimers as model of the special pair in the photosynthetic reaction center // Tetrahedron. 1996. Vol. 52. N12. Pp. 4311–4326.
20. Holden M. Analytical methods – chlorophylls // Chemistry and biochemistry of plant pigments. Ed by Goodwin T.W. New-York, 1976. Vol. 2. 2nd ed. Pp. 1–27.
21. Borovcov V.V., Gribcov A.A., Kozyrev A.N., Brandis A.S., Ishida A., Sacata Y. Synthesis and properties of pheophorbide-quinone compounds // Bull. Chem. Soc. Japan. 1992. Vol. 65. Pp. 1533–1537.
22. Ma L., Dolphin D. Nucleophilic reaction of 1,8-diazabicyclo-[5,4,0]-undec-7-en and 1,5-diazabicyclo-[4,3,0]-non-5-en] with methylpheophorbide *a*. Unexpected products // Tetrahedron. 1996. Vol. 52. N3. Pp. 849–860.

Поступило в редакцию 3 декабря 2013 г.

Karimov D.R.^{1,2}, Makarov V.V.³, Kruchin S.O.³, Berezin D.B.^{3*}, Smirnova N.L.¹, Berezin M.B.¹, Zheltova E.I.², Strel'nikov A.I.², Kustov A.V.^{1,2} OPTIMIZATION OF EXTRACTION CONDITIONS OF CHLOROPHYLLS A AND B FROM *URTICA DIOICA* L. AND *SPIRULINA PLATENSIS*

¹Institute of Solution Chemistry behalf G.A. Krestov Russian Academy of Sciences, st. Academic, 1, Ivanovo (Russia)

²Ivanovo State Medical Academy of the Ministry of Health of Russia, Sheremetevsky Ave., 8, Ivanovo (Russia)

³Ivanovo State University of Chemistry and Technology, Research Institute macroheterocyclic compounds, Sheremetevsky Ave., 7, Ivanovo (Russia), e-mail: berezin@isuct.ru

Various factors as the nature of the solvent, temperature, presence or absence of stirring and sonication, affecting the efficiency of extractive separation of the two chlorophylls from two plant sources – a flowering plant of nettle (*Urtica dioica* L.), containing a mixture of chlorophyll a and b, and the blue-green alga spirulina (*Spirulina platensis*), containing only chlorophyll a, are compared in a paper. The aim of the work was to optimize the conditions for the allocation of chlorophyll from plant material.

Keywords: chlorophyll, extraction, nettle (*Urtica dioica* L.), blue-green algae Spirulina (*Spirulina platensis*), sonication, cryotreatment raw liquid nitrogen.

References

- Godnev T.N. *Hlorofill. Ego stroenie i obrazovanie v rastenii*. [Chlorophyll. Its structure and formation in the plant]. Minsk, 1963, 319 p. (in Russ.)
- Rabinovich E. *Fotosintez*. [Photosynthesis]. Moscow, 1951, 648 p. (in Russ.)
- Berezin B.D., Berezin M.B., Rumjanceva S.V. *Koordinacionnaja himija*, 2006, vol. 32, no. 3, pp. 235–239. (in Russ.)
- Berezin B.D., Rumjanceva S.V., Moryganov A.P., Berezin M.B. *Uspehi himii*, 2004, vol. 73, no. 2, pp. 197–207. (in Russ.)
- Kojfman O.I., Askarov K.A., Berezin B.D., Enikolopjan N.S. *Porfiriny. Struktura. Svoystva. Sintez*. [Porphyrins. Structure. Properties. Synthesis.]. Moscow, 1985, pp. 175–204. (in Russ.)
- Pavlov V.Ju., Ponomarev G.V. *Himija geterociklicheskih soedinenij*, 2004, no. 4, pp. 483–519. (in Russ.)
- Mironov A.F. *Uspehi himii porfirinov*. [Russian Chemical porphyrins]. 2004, vol. 4, pp. 271–288. (in Russ.)
- Berezin B.D. *Izvestija vuzov. Himija i himich. tehnol.*, 1984, vol. 27, issue 3, pp. 259–271. (in Russ.)
- Cannon J., Cannon M. *Dye plants and dyeing*. London: Herbert press, 1994. 128 p.
- Svec W.A. *The porphyrins*. New-York: Acad. Press, 1978, vol. 5, pp. 342–400.
- Belyh D.V. *Novye podhody v sinteze polifunkcional'nyh hlorinov na osnove hlorofilla a*. [New approaches in the synthesis of multifunctional chlorins based on chlorophyll a]. Doctor chemistry thesis. Ivanovo, 2012, 320 p. (in Russ.)
- Berezin M.B. *Sol'vatsija hlorofilla i rodstvennyh soedinenij*. [Solvation of chlorophyll and related compounds]. Doctor chemistry thesis. Ivanovo, 1993, 340 p. (in Russ.)
- Salgado A. *Chlorin photosensitisers for tumor phototherapy*. London: QMWC, 1993, 168 p.
- Ashmarov V.V., Baum R.F., Meshherjakova A.L., Ponomarev G.V., Suhin G.M. *Tezisy VII Mezhdunarodnoj konferencii po himii porfirinov i ih analogov*. [Abstracts of the VII International Conference on Chemistry of Porphyrins and their analogues]. St. Petersburg, 1995, pp. 151–152. (in Russ.)
- Rashidova S.T. *Pererabotka hlorofilla iz vydelenij tutovogo shelkoprvjada na metallopofiriny i issledovanie ih fiziko-himicheskikh svoystv*. [Processing of chlorophyll from silkworm excreta on metalloporphyrins and the study of their physical and chemical properties]. Candidate of chemical sciences thesis. Ivanovo, 1983, 135 p. (in Russ.)
- Porra R.J. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1990, vol. 1015, no. 3, pp. 493–502.
- Humphrey A.M. *Food Chem.*, 1980, vol. 5, pp. 57–67.
- Bruinsma J. *Photochem. Photobiol.*, 1963, vol. 2, pp. 241–244.
- Osuka A., Wada U., Shinoda S. *Tetrahedron*, 1996, vol. 52, no. 12, pp. 4311–4326.
- Holden M. *In: Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Ed by Goodwin T.W., New-York: Acad. Press., 1976, vol. 2, 2nd ed., pp. 1–27.
- Borovcov V.V., Gribcov A.A., Kozyrev A.N., Brandis A.S., Ishida A., Sacata Y. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1992, vol. 65, pp. 1533–1537.
- Ma L., Dolphin D. *Tetrahedron*, 1996, vol. 52, no. 3, pp. 849–860.

Received December 3, 2013

* Corresponding author.