

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **238039**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **418707**

(22) Data zgłoszenia: **15.09.2016**

(51) Int.Cl.

G01N 33/02 (2006.01)

G01N 21/79 (2006.01)

G01N 21/77 (2006.01)

(54)

Sposób oznaczania zawartości karagenu kappa lub jota w mieszaninie

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

26.03.2018 BUP 07/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

28.06.2021 WUP 13/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersYTET
TECHNOLOGICZNO-PRZYRODNICZY
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH
W BYDGOSZCZY, Bydgoszcz, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**DOROTA ZIÓŁKOWSKA, Bydgoszcz, PL
AGNIESZKA KANIEWSKA, Włocławek, PL
ALEKSANDR SHYICHUK, Bydgoszcz, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Jankowski

PL 238039 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób ilościowego oznaczenia zawartości karagenu kappa lub jota w mieszaninie karagenów, przydatny do analizy surowców w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym.

Karagen to ogólna nazwa grupy związków o charakterze naturalnych polisacharydów i strukturze liniowej. Występuje w odmianach kappa (κ), jota (ι), lambda (λ), mi (μ) oraz ni (ν), różniących się stosunkiem ilościowym grup siarczanowych i cząsteczek galaktozy. Największe zastosowanie praktyczne znajdują trzy pierwsze spośród wymienionych typów. Odmiany kappa- i jota- posiadają właściwości żelujące (κ -karagen tworzy żele silne, stałe, a ι -karagen daje żele miękkie), natomiast λ -karagen nie ulega żelowaniu, lecz ma zdolność zagęszczania roztworów poprzez zwiększanie ich lepkości. Z tego względu karageny są używane w przemyśle jako stabilizatory, zagęstniki i środki żelujące. Karageny stosuje się w przemysłach: spożywczym jako dodatek (E407 oraz E466) [1] do wędlin, konserw mięsnych, sosów, produktów o obniżonej zawartości tłuszczu, deserów mlecznych, niektórych napojów, dżemów, galaretek, kosmetycznym jako dodatek do past do zębów, szamponów, kremów, farmaceutycznym [2] do produkcji opatrunków, tabletek, preparatów farmaceutycznych o przedłużonym uwalnianiu.

Źródłem karagenów są wodorosty. Niektóre z nich produkują karagen określonego typu, np. ι -karagen jest pozyskiwany z *Eucheuma cottoni* lub *Eucheuma spinosum*, κ -karagen otrzymuje się z różnych gatunków należących do rodzajów *Gigartina* i *Chondrus*, a λ -karagen ze sporofitycznych grup wodorostów. Z kolei wodorosty gametofityczne wytwarzają hybrydowy typ jota- i kappa- o różnych proporcjach składników. Karageny stosowane w przemyśle najczęściej mają postać półrafinowaną lub rafinowaną. Analizę karagenów można przeprowadzić różnymi technikami [3, 4]. Metoda FTIR umożliwia rozróżnienie wszystkich typów karagenu przy użyciu minimalnej ilości próbki. Oznaczenie jest względnie proste, ale wymaga umiejętnej interpretacji wyników, m.in. w celu eliminacji wpływu matrycy. Metodę $^1\text{H-NMR}$ oraz $^{13}\text{C-NMR}$ stosuje się do oznaczania stosunku karagenów kappa i jota w mieszaninie karagenów [5, 6]. Technika ta nie pozwala na oznaczenie karagenu lambda.

Przykład 1 [5]

Mieszaninę karagenów analizowano metodą $^{13}\text{C-NMR}$ w temperaturze ok. 80°C . Otrzymane widmo było sumą widm karagenów kappa i jota, natomiast nie posiadało sygnałów pochodzących od karagenu lambda. Metoda umożliwia zatem określenie w mieszaninie stosunku ilościowego karagenów kappa i jota, lecz nie daje możliwości identyfikacji karagenu lambda. Analizę uzupełniono o badanie metodą spektroskopii IR. W uzyskanym widmie pasmo przy 1250 cm^{-1} odpowiadające sumie grup siarczanowych było znacznie bardziej intensywne dla karagenu lambda niż dla kappa i jota. Dodatkowo pasma przy 845 , 830 , 820 i 805 cm^{-1} umożliwiły rozróżnienie poszczególnych grup siarczanowych. Jako sygnał analityczny przyjęto stosunek absorpcji przy $845/1250\text{ cm}^{-1}$, który jest wrażliwy na dodatek karagenu lambda do mieszaniny karagenów kappa i jota.

Ważnymi narzędziami stosowanymi do charakterystyki surowców są też metody chromatograficzne (HPLC i HPAEC), umożliwiające półilościową oraz ilościową analizę karagenów po depolimeryzacji. Inną ważną techniką jest dwuwymiarowa elektroforeza, która pozwala na oznaczanie półilościowe bez depolimeryzacji. Z kolei u podstaw metod spektrofotometrycznych leży dysocjacja makrocząsteczek, skutkiem czego jest pojawienie się w roztworze polianionów posiadających zdolność tworzenia trwałych par jonowych z barwnikami kationowymi. [7–10]. Wszystkie typy karagenu rozpuszczają się w wodzie i ulegają reakcji kompleksowania, stąd klasyczne metody spektrofotometryczne umożliwiają jedynie oznaczenia ilościowe sumy karagenów. Zaletą tych metod są natomiast małe wymagania sprzętowe. Najbardziej znana wśród metod spektrofotometrycznych jest ta z użyciem Błękitu Metylenowego [8], popularna ze względu na swoją czułość i łatwość wykonania. Do analizy polimerów anionowych można wykorzystać technikę miareczkowania spektrofotometrycznego, stosując jako titrant barwnik kationowy [9].

Przykład 2 [8]

Do ilościowego oznaczania hydrokoloidów, w tym karagenów, alginianu oraz karboksymetylocelulozy w roztworach wodnych zastosowano Błękit Metylenowy. Podstawą metody jest przesunięcie maksimum widma absorpcji barwnika z 610 i 664 nm do 559 nm na skutek tworzenia się rozpuszczalnych kompleksów barwnik – polianion, przy czym absorpcja kompleksu przy 559 nm jest proporcjonalna do stężenia hydrokoloidu. Zaletą procedury jest rozpuszczalność kompleksów, wynikająca z zastosowania małych stężeń barwnika i polianionu.

Przykład 3 [7]

Do spektrofotometrycznego oznaczania stężeń polimerów anionowych w roztworach wodnych zastosowano wodny roztwór barwnika – Błękitu Metylenowego. Porcję analitu o znanej objętości miareczkuje się roztworem barwnika, rejestrując w sposób ciągły absorbancję mieszaniny roztworów przy długości fali z zakresu od 660 do 670 nm. Miareczkowanie prowadzi się do momentu osiągnięcia zadanej wartości absorbancji. Stężenie polimeru (C) odczytuje się z krzywej kalibracyjnej w postaci $C=f(V_{BM})$ (gdzie V_{BM} – objętość barwnika w punkcie równoważnikowym), wykreślonej dla tej samej zadanej wartości absorbancji.

Istotą rozwiązania według wynalazku jest oznaczenie ilości karagenu kappa lub jota w mieszaninie karagenów typu kappa i jota na podstawie wyników spektrofotometrycznego miareczkowania wodnego roztworu mieszaniny Błękitem Toluidynowym (BT). Podstawę oznaczenia stanowi miareczkowanie wzorcowych próbek mieszaniny karagenów typu kappa i jota o różnych proporcjach składników i określonym całkowitym stężeniu mianowanym roztworem BT korzystnie 1 mM, z jednoczesnym pomiarem absorbancji układu przy długości fali 640 nm. Punktem końcowym miareczkowania jest objętość barwnika, przy której osiągnięto absorbancję równą 0,5. Na podstawie uzyskanych wyników otrzymuje się zależność zawartości jednego ze składników w mieszaninie karagenów od objętości BT w punkcie końcowym (fig. 1 i 2). Zawartość wybranego składnika w próbce badanej, będącej mieszaniną karagenów kappa i jota, oznacza się na podstawie miareczkowania wodnego roztworu badanej próbki o określonym stężeniu (optymalnie 20–30 mg/L) roztworem BT do osiągnięcia absorbancji równej 0,5. Objętość BT w punkcie końcowym pozwala odczytać z rys. 1 lub 2 zawartość wybranego składnika w mieszaninie karagenów.

Korzystne skutki wynalazku to prostota wykonania analizy, nieskomplikowana aparatura, możliwość automatyzacji.

Objaśnienie figur rysunku fig. 1. przedstawia krzywe wzorcowe do oznaczania zawartości karagenu kappa w mieszaninie karagenów kappa i jota, wyznaczone na podstawie wzorcowych mieszanin o całkowitym stężeniu 20 oraz 30 mg/L, fig. 2. przedstawia krzywe wzorcowe do oznaczania zawartości karagenu jota w mieszaninie karagenów kappa i jota, wyznaczone na podstawie wzorcowych mieszanin o całkowitym stężeniu 20 oraz 30 mg/L.

Przykład realizacji wynalazku

Krzywe wzorcowe wykonano używając oczyszczonych karagenów / κ -karagen, CAS 11114-20-8, ι -karagen, CAS 9062-07-1/, z których przygotowano dwie serie roztworów wodnych o całkowitym stężeniu składników 20 oraz 30 mg/L. Każda seria obejmowała po kilka roztworów różniących się stężeniem masowym karagenów kappa i jota.

Jako próbki badane wykorzystano mieszaniny karagenów handlowych kappa i jota w proporcjach 1:1 i 3:1, z których przygotowano roztwory wodne o całkowitym stężeniu 20 lub 30 mg/L.

Roztwór barwnika o stężeniu 1 mM otrzymano przez rozpuszczenie naważki Błękitu Toluidynowego O, C.I. 52040 (Panreac Quimica Sau) w wodzie destylowanej.

Wykonanie krzywych wzorcowych:

Do kuwety pomiarowej o pojemności 30 cm³ wprowadzano 20 cm³ wzorcowego roztworu mieszaniny karagenów. Kuwetę umieszczano w przystawce Ti spektrofotometru Spekol. Za pomocą titratora Radelkis OP-930/1 do kuwety dozowano barwnik BT porcjami o objętości 8 μ L z interwałem 30 s. Odczytu absorbancji dokonywano przy długości fali 640 nm. Z uzyskanych krzywych miareczkowania odczytano objętości titranta odpowiadające absorbancji 0,5 (V, ml) i na tej podstawie wyznaczono krzywe wzorcowe, które można opisać równaniami:

dla stęż. mieszaniny 20 mg/L :	zaw. ι -karagenu = $399,41 \cdot V - 94,427$ [%]
	zaw. κ -karagenu = $-399,41 \cdot V + 194,43$ [%]
dla stęż. mieszaniny 30 mg/L :	zaw. ι -karagenu = $469,33 \cdot V - 140,73$ [%]
	zaw. κ -karagenu = $-469,33 \cdot V + 240,73$ [%]

Wykonanie oznaczenia:

Próbki badane zmiareczkowano analogicznie jak roztwory wzorcowe. Z krzywych miareczkowania odczytano objętości titranta odpowiadające absorbancji 0,5, a następnie na podstawie krzywych wzorcowych wyznaczono składy mieszanin (Tabela 1).

Tabela 1

Mieszanina karagenów		Wyniki analizy		
stężenie, mg/L	zawartość κ -karagenu, %	V, ml	zawartość κ -karagenu, %	błąd oznaczenia, %
20	50	0,408	49,24	1,51
20	75	0,368	68,02	9,31
30	50	0,368	47,45	5,11
30	75	0,328	63,42	15,44

- [1] Z. Sikorski (red.), Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności, WNT, Warszawa 1996, s. 161.
- [2] S. Kohlmünzer, Farmakognozja: podręcznik dla studentów farmacji, wyd. V unowocześnione, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2003, s. 669.
- [3] M. A. Roberts, B. Quemener, Measurement of carrageenans in food: challenges, progress, and trends in analysis, Trends in Food Science & Technology 1999, 10, 169–181.
- [4] L. Pereira, A. T. Critchley, A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, A comparative analysis of phycocolloids produced by underutilized versus industrially utilized carrageenophytes (Gigartinales, Rhodophyta), J. Appl. Phycol. 2009, 21, 599–605.
- [5] T. Turquois, S. Acquistapace, F. Arce Vera, D. H. Welti, Composition of carrageenan blends inferred from ^{13}C -NMR and infrared spectroscopic analysis, Carbohydrate Polymer 1996, 31, 269–278.
- [6] F. van de Velde, S.H. Knutsen, A.I. Usov, H.S. Rollemay, A.S. Cerezo, ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry, Trends in Food Science & Technology 2002, 13, 73–92.
- [7] D. Ziółkowska, A. Shyichuk, D. Żygowska, Sposób ilościowego oznaczania polimerów anionowych w roztworach wodnych, zgł. pat. P.408914.
- [8] H.S. Soedjak, Colorimetric Determination of Carrageenans and Other Anionic Hydrocolloids with Methylene Blue, Anal. Chem. 1994, 66, 4514–4518.
- [9] D. Ziółkowska, A. Shyichuk, D. Żygowska, Sposób ilościowego oznaczania polimerów anionowych w roztworach wodnych, zgł. pat. P.410721.
- [10] D. Ziółkowska, A. Shyichuk, Sposób ilościowego oznaczania polimerów anionowych w roztworach wodnych o podwyższonej wartości siły jonowej, zgł. pat. P.412374.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oznaczania zawartości karagenu kappa lub jota w mieszaninie karagenów kappa i jota, **znamienny tym**, że wodny roztwór mieszaniny karagenów o stężeniu z zakresu 20–30 mg/L miareczkuje się wodnym roztworem barwnika – Błękitu Toluidynowego o stężeniu 1 mM, z ciągłą rejestracją absorbancji mieszaniny przy długości fali 640 nm i na podstawie objętości barwnika w punkcie końcowym (V) odczytuje się zawartość jednego ze składników z krzywej wzorcowej.
2. Sposób wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że punktem końcowym miareczkowania jest moment osiągnięcia absorbancji roztworu równej 0,5.
3. Sposób wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że krzywą wzorcową w postaci: zaw. składnika mieszaniny = $f(V)$ wyznacza się dla wzorcowych mieszanin karagenów o różnych proporcjach masowych składników i o tym samym całkowitym stężeniu, co próbka badana, na podstawie ich miareczkowania w warunkach analogicznych jak dla próbki badanej.

Rysunki

Fig. 1

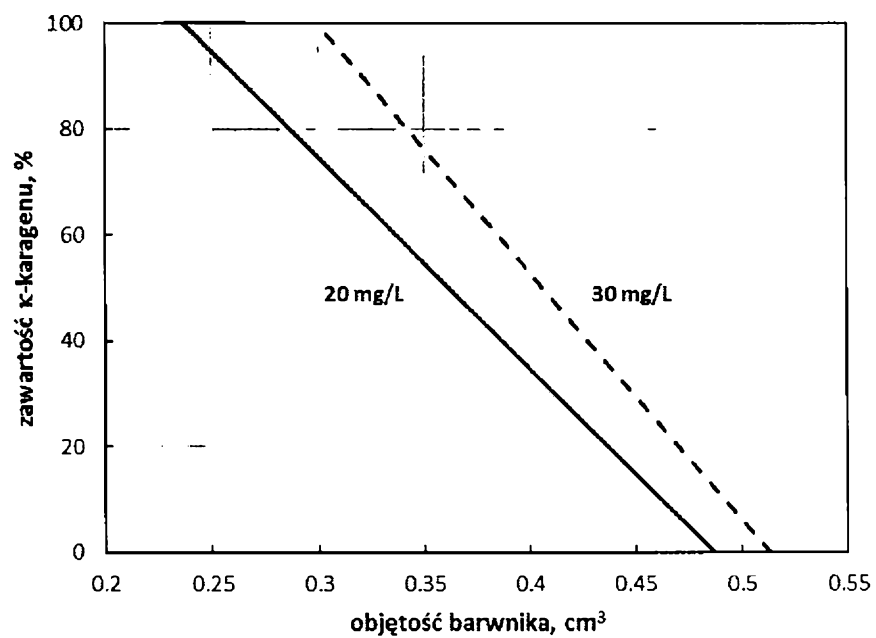


Fig. 2

