RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **238038**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **418706**

(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 rozróżniania karagenów typu kappa, iota i lambda**

(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 238038 B1

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób rozróżniania karagenów typu kappa, iota i lambda, przydatny 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 pływu matrycy. Metodę $^{1}$H-NMR oraz $^{13}$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 $^{13}$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 absorbancji przy 845/1250 $cm^{-1}$, 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]. Z uwagi na to, że wszystkie typy karagenu rozpuszczają się w wodzie i ulegają reakcji kompleksowania, 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 mn do 559 nm na skutek tworzenia się rozpuszczal-

nych kompleksów barwnik-polianion, przy czym absorbancja 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 typu karagenu na podstawie wyników spektrofotometrycznego miareczkowania wodnego roztworu karagenu Błękitem Toluidynowym (BT). W przypadku karagenów różnych typów, tj. różniących się ilością i rozmieszczeniem grup siarczanowych, kompleksowanie polimeru z barwnikiem zachodzi w odmienny sposób, co determinuje postać krzywej wzorcowej.

Podstawę oznaczenia stanowi miareczkowanie próbek wzorcowych karagenów typu kappa, jota oraz lambda o różnych stężeniach mianowanym roztworem BT (optymalnie c=1 mM), z jednoczesnym pomiarem absorbancji układu przy długości fali z zakresu 640±20 nm. Punktem końcowym miareczkowania jest objętość barwnika, przy której osiągnięto zadaną wartość absorbancji (A). Następnie, na podstawie krzywych miareczkowania (fig. 1), wykreśla się zależność stężenia roztworu karagenu od objętości BT w punkcie końcowym (fig. 2). Typ karagenu odczytuje się z rys. 2, na podstawie miareczkowania wodnego roztworu badanej próbki karagenu o określonym stężeniu (optymalnie 10–40 mg/L) roztworem BT do osiągnięcia zadanej wartości absorbancji. W celu identyfikacji karagenu jota zadana wartość absorbancji powinna być większa od jedności (optymalnie 1,5–2). Aby rozróżnić karageny typu kappa i lambda zadana wartość absorbancji nie powinna przekraczać 1 (optymalnie 0,5–0,7). Stężenie miareczkowanej próbki oraz objętość BT w punkcie końcowym pozwalają rozpoznać typ karagenu.

Korzystnymi skutkami rozwiązania według wynalazku, jest prostota i szybkość wykonania, oraz brak potrzeby stosowania skomplikowanej aparatury analitycznej.

Fig. 1 przedstawia przykładowe krzywe miareczkowania wodnych roztworów ι-karagenu o różnych stężeniach roztworem Błękitu Toluidynowego.

Fig. 2 przedstawia krzywe do rozróżniania typu karagenu, wyznaczone na podstawie wyników miareczkowania (rys. 1) dla określonej wartości absorbancji oraz sposób wyznaczania typu karagenu.

Fig. 3 przedstawia wyniki oznaczenia typu karagenu. Linie oznaczają krzywe wzorcowe dla poszczególnych typów karagenu, a punkty ilustrują wyniki oznaczenia (○ – κ-karagen, ● – ι-karagen, ● – λ-karagen).

Wynalazek przedstawiono bliżej w przykładzie realizacji.

Krzywe wzorcowe wykonano używając oczyszczonych karagenów, z których przygotowano po kilka roztworów wodnych o stężeniach z zakresu 6–40 mg/L. Jako próbki badane wykorzystano karageny (κ-karagen, CAS 11114-20-8, ι-karagen, CAS 9062-07-1, λ-karagen, CAS 9064-57-7), z których przygotowano roztwory wodne o stężeniach 12, 20 i 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 $cm^3$ wprowadzano 20 $cm^3$ wzorcowego roztworu karagenu. Kuwetę umieszczono w przystawce Ti spektrofotometru Spekol. Za pomocą titratora Radelkis OP-930/1 do kuwety dozowano barwnik BT porcjami o objętości 8 μL z interwałem 30 s. Odczytu absorbancji dokonywano przy długości fali 640 nm. Z uzyskanych krzywych miareczkowania odczytano objętości titranta odpowiadające absorbancji 0,5 oraz 1,5 i na tej podstawie wykreślono krzywe wzorcowe pokazane na fig. 3.

*Wykonanie oznaczenia:* Z badanych próbek karagenu przygotowano roztwory o stężeniach 12, 20 i 30 mg/L. Próbki zmiareczkowano analogicznie jak roztwory wzorcowe. Z krzywych miareczkowania odczytano objętości titranta odpowiadające absorbancji 0,5 oraz 1,5 i na tej podstawie oznaczono typ karagenu w badanych próbkach. Wyniki ilustruje fig. 3.

[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 13C-NMR and infrared spectroscopic analysis, Carhohydrare Polymer 1996, 31, 269–278.
[6] F. van de Velde, S.H. Knutsen, A.I. Usov, H.S. Rollemay, A.S. Cerezo, 1H and 13C 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 rozróżniania karagenów, **znamienny tym**, że wodny roztwór karagenu o stężeniu ($C_{kar}$) z zakresu 10–40 mg/L miareczkuje się wodnym roztworem barwnika – Błękitu Toluidynowego o stężeniu 1 mM z ciągłą rejestracją absorbancji mieszaniny przy długości fali z zakresu od 640±20 nm i na podstawie objętości barwnika w punkcie końcowym ($V_{PK}$) odczytuje się typ karagenu z krzywej wzorcowej.
2. Sposób wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że punktem końcowym miareczkowania jest moment osiągnięcia zadanej wartości absorbancji roztworu.
3. Sposób wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że krzywe wzorcowe w postaci $C_{kar}=f(V_{PK})$ wyznacza się oddzielnie dla różnych typów karagenu i dla tej samej wartości absorbancji, jaką przyjęto za punkt końcowy miareczkowania roztworów badanych.
4. Sposób wg zastrz. 2, **znamienny tym**, że przy odróżnianiu karagenu typu jota od kappa i lambda zadana wartość absorbancji jest >1, korzystnie 1,5–2.
5. Sposób wg zastrz. 2, **znamienny tym**, że przy rozróżnianiu karagenów typu kappa i lambda zadana wartość absorbancji jest ≤1, korzystnie 0,5–0,7.

# Rysunki

Fig.1

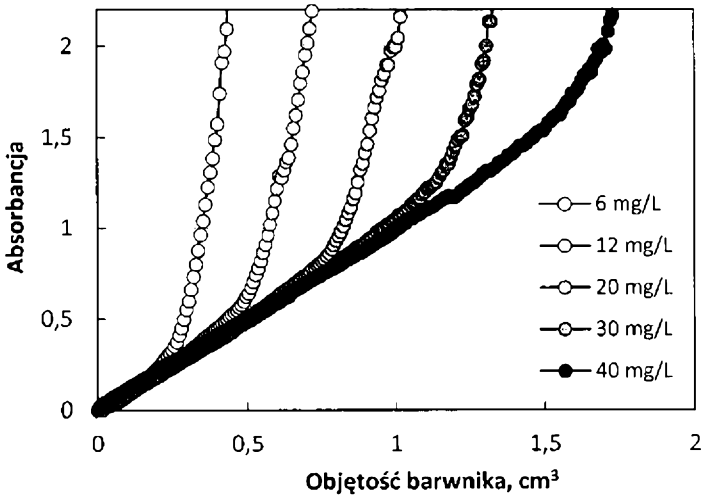
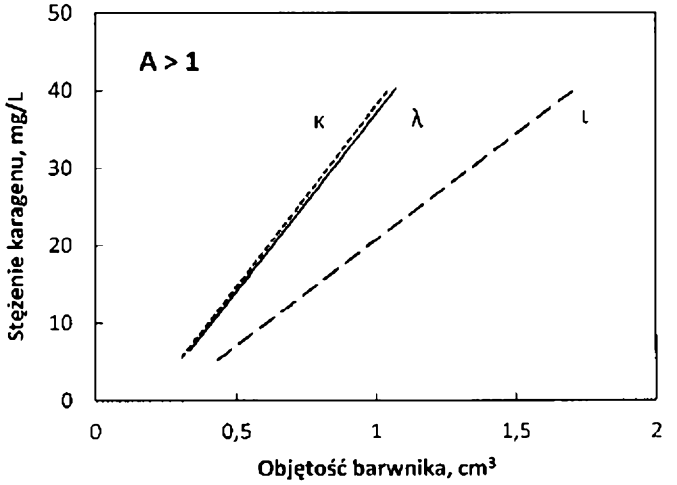



Fig. 2



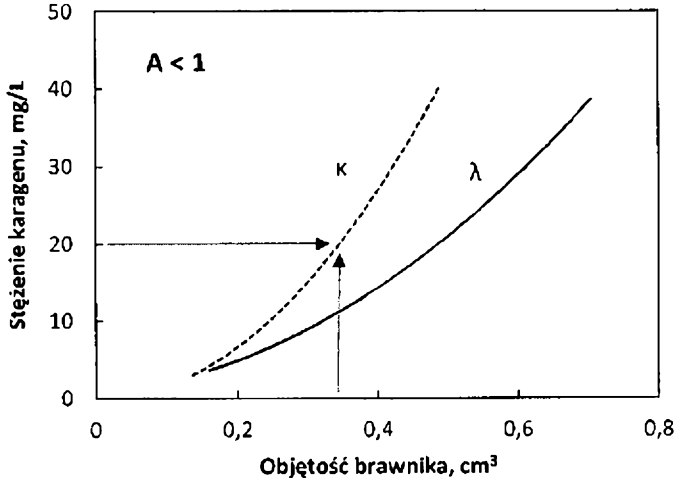
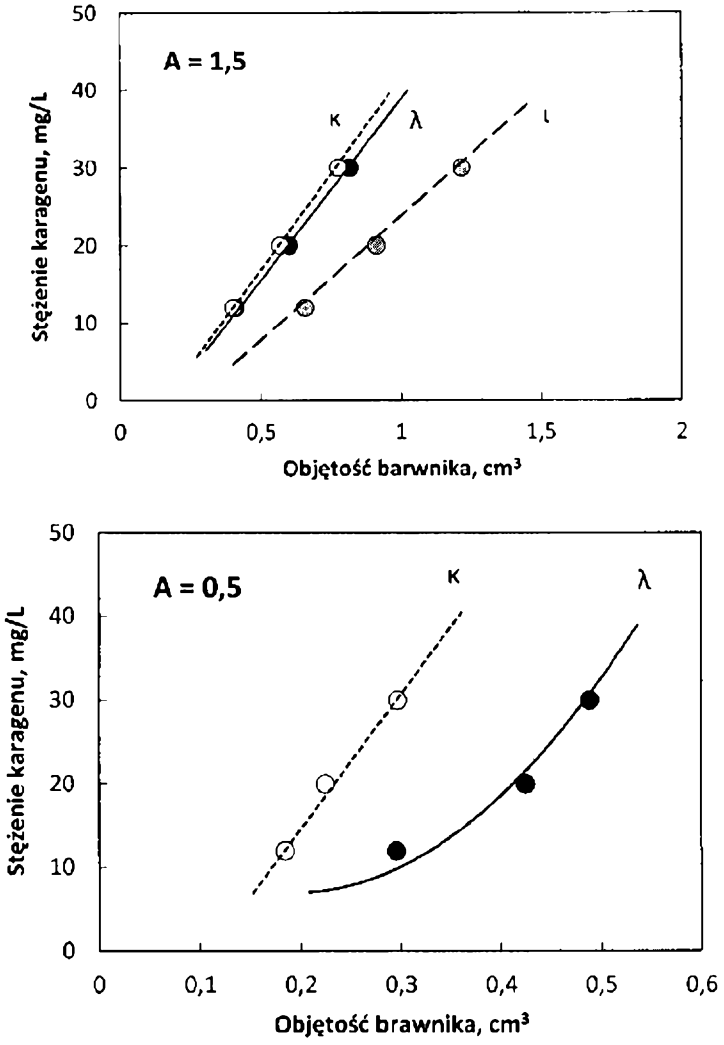



Fig. 3


A = 1,5
κ
λ
ι
Stężenie karagenu, mg/L
Objętość barwnika, cm³
0
10
20
30
40
50
0,5
1
1,5
2
A = 0,5
κ
λ
Stężenie karagenu, mg/L
Objętość brawnika, cm³
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6