



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

216993

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³

G 01 N 31/00

(22) Přihlášeno 26 03 80
(21) (PV 2107-80)

(40) Zveřejněno 26 02 82

(45) Vydáno 15 02 85

(75)

Autor vynálezu

MADER PAVEL RNDr. CSc., PRAHA, CHLADOVÁ JARMILA ing., LITOMYŠL

(54) Způsob kvantitativního stanovení beta-karotenu, sumy xantofylů a feofytinu a

Vynález se týká způsobu kvantitativního stanovení beta-karotenu, sumy xantofylů a feofytinu a. Jeho podstata spočívá v tom, že se rostlinná barviva extrahují z analyzovaného rostlinného materiálu acetonem, načež extrakcí uvolněná barviva se převedou z acetonu do hexanu, heptanu nebo petroléteru a beta-karoten, suma xantofylů a feofytin a se vzájemně chromatograficky oddělí na sloupci polyamidu a jejich množství se stanoví spektrofotometricky. K analýze lze použít čerstvého, sušeného i fermentovaného rostlinného materiálu, krmiv a krmných směsí používaných v zemědělství. Lze rovněž použít rostlinných surovin a produktů potravinářského a farmaceutického průmyslu (čerstvé a konzervované ovoce, zelenina, ovocné šťávy, čerstvé a sušené léčivé rostliny, léčivé čaje). Obsah beta-karotenu spoluurčuje nutriční hodnotu analyzovaného materiálu. Obsah sumy xantofylů rozhoduje o výsledné pigmentaci živočišných produktů (máslo, žloutky vajec, kůže brojlerů). Obsah feofytinu a poskytuje informaci o kvalitě skladování či technologického zpracování (sušení, fermentace, konzervování) rostlinných surovin.

Vynález se týká metodiky pro kvantitativní stanovení obsahu beta-karotenu, sumy xantofylů a feofytinu a v různých typech rostlinného materiálu.

Kvantitativní stanovení karotenů a xantofylů v materiálech rostlinného a živočišného původu vyžaduje obecně následující dílčí kroky:

příprava průměrného vzorku,
extrakce pigmentů z průměrného vzorku do polárního rozpouštědla,
saponifikace přítomných esterů,
převedení pigmentů z polárního do nepolárního rozpouštědla,
chromatografická separace pigmentů a
kvantitativní stanovení jednotlivých pigmentů nebo jejich skupin.

V konkrétních případech některé z těchto dílčích kroků odpadají. Např. při analýzách vzorků rostlinného původu často odpadá saponifikace přítomných esterů. Při použití takové techniky chromatografické separace, při které lze na chromatografický nosič nanést pigmenty v polárním rozpouštědle, odpadá nutnost převedení pigmentů z polárního do nepolárního rozpouštědla.

Přípravu průměrného vzorku je nutno provést vždy; používají se různé postupy v závislosti na povaze analyzovaného materiálu. K extrakci pigmentů se používá polárních organických rozpouštědel (aceton, metanol, etanol), a to buď samotných, nebo ve směsi s vodou či dalšími organickými rozpouštědly. Saponifikace lipidů (tj. esterů) se provádí pomocí alkoholického roztoku hydroxidu draselného, a to buď dlouhodobě (do 24 hod) při teplotě místnosti, nebo krátkodobě (desítky minut) při zvýšené teplotě. K převedení pigmentů z polárního do nepolárního rozpouštědla se běžně používá dělička, ve které se protřepává směs obsahující polární extrakt, nepolární rozpouštědlo a vodu event. vodný roztok NaCl. Chromatografická separace pigmentů z polárního či nepolárního extraktu se provádí na různých nosičích, často na celulóze (papír, tenká vrstva, sloupec), rovněž často na kysličníku hlinitém nebo silikagelu, a to jak ve formě sloupce, tak tenké vrstvy. Kvantitativní stanovení pigmentů nebo jejich směsí se běžně provádí spektrofotometricky vzhledem k tomu, že se jedná o barevné látky.

Extrakční, separační a determinační postupy pro stanovení beta-karotenu, a xantofylů, doporučené ve světové literatuře, jsou přehledně shrnuty a diskutovány v práci DAVIES, 1976. V ČSSR existuje pro stanovení beta-karotenu státní norma ČSN 46 7007 a ČSN 56 0053. Pro zemědělské oblastní laboratoře vydal v r. 1975 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (dále ÚKZÚZ) v Praze jednotnou metodiku, která vychází z ČSN 46 7007. Pro stanovení xantofylů a feofytinu a v rostlinném materiálu úřední předpis v ČSSR neexistuje. Postup v současné době předepsaný státní normou a jednotnými předpisy ÚKZÚZ používá pro extrakci pigmentů z rostlinného materiálu alkoholický roztok hydroxidu draselného, pro chromatografickou separaci kysličník hlinitý a pro kvantitativní stanovení spektrofotometrického vyhodnocení při 450 nm. Všechny tyto tři základní fáze metodiky však vyžadují velký počet doplňkových operací. Tak např. po extrakci pigmentů z rostlinného materiálu alkoholickým roztokem KOH se na rostlinný materiál působí 25% vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové a dále se znovu několikrát extrahuje organickým rozpouštědlem, konkrétně acetonem, až do úplného odbarvení výluhu. Chromatografickou separaci předchází mnohonásobné přetřepávání částí pigmentů z původního etanolicko-acetonového extraktu do benzínu v děličce, a to nejprve s vodou, pak s etanolickým roztokem hydroxidu draselného, a nakonec opět s vodou.

Rovněž u adsorbentu - kysličníku hlinitého - je nutno před naplněním chromatografické kolony upravit jeho aktivitu na 2. stupeň podle Brockmanna, a to dvouhodinovým žháním při 650 až 700 °C; po vychladnutí se přidají 2 % vody, dokonale se protřepe a ponechá stát do druhého dne, kdy ho lze teprve použít jako nosiče k separaci. Před nanesením benzinového extraktu pigmentů na kolonu je ještě třeba sloupec kysličníku hlinitého převrstvit 1 až 1,5 cm vysokou vrstvou bezvodého síranu sodného. Vlastní eluce beta-karotenu se provádí

směsí benzínu a dietyléteru 3:1. Předpis neuvádí, že dietyléter by měl být před použitím zbaven peroxidů, které v něm vznikají po delší době stání a které silně degradují karotenoidy včetně beta-karotenu tvorbou epoxidů (DAVIES 1976). Spektrofotometrické vyhodnocení eluátu vyžaduje kalibrační křivku, kterou je nutno sestavit předem proměřením sady standardních roztoků buď čistého beta-karotenu, nebo dvojchromanu draselného.

Podstata vynálezu spočívá v tom, že se rostlinná barviva extrahují acetonem, načež extrakcí uvolněná barviva se převedou z acetonu do hexanu, heptanu nebo petroléteru a beta-karoten, suma xantofylů a feofytin a se vzájemně chromatograficky oddělí na sloupci polyamidu a jejich množství se stanoví spektrofotometricky.

V porovnání s dosavadním postupem, který je v ČSSR v současné době předepsán státní normou a jednotnými předpisy ÚKZÚZ, modifikuje navrhovaný postup dílčí kroky převedení pigmentů z polárního do nepolárního rozpouštědla, dále chromatografické separace pigmentů, a konečně kvantitativního stanovení jednotlivých pigmentů a jejich skupin.

Při převedení pigmentů z polárního do nepolárního rozpouštědla je dosavadní způsob, spočívající v opatrném kroužení směsi acetonového extraktu pigmentů s nepolárním rozpouštědlem a vodou v dělicí nálevce, nahrazen postupem, při kterém se tato směs intenzivně promíchá v kádince na elektromagnetické míchačce a vodně acetonová zóna se odsaje. Voda je přitom nahrazena nasyceným vodným roztokem chloridu sodného. Při chromatografické separaci pigmentů je chromatografický materiál (kysličník hlinitý) nahrazen polyamidem. Separace se provádí za atmosférického tlaku. Při kvantitativním stanovení jednotlivých pigmentů nebo jejich skupin je dosavadní postup, který spočívá v sestrojení kalibrační křivky a v případě použití čistého beta-karotenu jako standardu rovněž ve spektrofotometrickém ověření jeho účinnosti, nahrazen postupem, při kterém je obsah beta-karotenu vypočten přímo z naměřené hodnoty absorbance. Navrhovaný postup umožňuje navíc kvantitativně stanovit i celkový obsah xantofylů a v případě, že je přítomen, i feofytinu a.

K přesné odvážené množství analyzovaného materiálu (asi 0,5 g u vitaminózních mouček, asi 1 g u úsůšků, asi 2 g u čerstvého rostlinného materiálu a krmných směsí, asi 5 g u senáže a siláže) se v třetí misce přidá malé množství uhličitanu hořečnatého a mořského písku a přelije se asi 10 ml acetonu. U suchých vzorků je extrakce usnadněna předchozí několika-hodinovou macerací odváženého vzorku s vodou nebo se směsí voda + aceton (1:1) při teplotě místnosti. Po důkladném rozetření se acetonový extrakt vpraví na skleněnou fritu S3 a pod vakuem prosaje do odsávací baňky. K pevnému zbytku ve třetí misce se přidá dalších asi 10 ml acetonu a postup se ještě jednou nebo víckrát opakuje až do úplného odbarvení pevného zbytku. Po posledním roztírání se na fritu vpraví i pevný zbytek, třetí miska se vypláchne malým množstvím acetonu, který se rovněž vpraví na fritu, a extrakt se prosaje do baňky.

K acetonovému extraktu se v kádince přidá třetina objemu hexanu a dvojnásobný objem nasyceného vodného roztoku chloridu sodného NaCl. Vzniklá těžká emulze se několik minut (5 min) intenzivně míchá na elektromagnetické míchačce. Po vypnutí míchačky se ze stříčky nebo injekční stříkačky pomalu přidává za současného přerušovaného mírného promíchávání směsi destilovaná voda tak dlouho, až se vypadlý chlorid sodný NaCl téměř rozpustí. Pomocí injekční stříkačky se spodní vodně-acetonová zóna odsaje, k hexan-acetonové zóně se znovu přidá nasycený roztok NaCl a celý postup se opakuje. Hexanový extrakt se pak zbaví posledních stop acetonu promytím samotnou destilovanou vodou. Po odsátí vody se hexanový extrakt přelije do kalibrované zkumavky a odečte se jeho objem a v ml.

Chromatografická kyveta o vnitřních rozměrech 10 x 100 mm, dole zúžená na rozměr 4 x 40 mm, se utěsní kouskem vaty, zvlhčeným hexanem, a naplní se řídkou kaší polyamidu v hexanu. Sloupec polyamidu po jeho úplné sedimentaci má mít výšku 30 až 40 mm. Ihned po vsáknutí hexanu se na sloupec nanese alikvot hexanového extraktu pigmentů o objemu b ml. Po jeho vsáknutí do kolony se kolona promývá hexanem až do úplného vymytí karotenů, které se jímají do kalibrované zkumavky. Výsledný objem hexanového eluátu karotenů je y ml. Na

spektrofotometru se pak proměří absorbance tohoto eluátu v 1 cm silné kyvetě při vlnové délce 451 nm. Obsah beta-karotenu v analyzovaném materiálu se vypočte ze vzorce

$$K = \frac{3,86 \cdot a \cdot y \cdot A_{451}^{1 \text{ cm}}}{N \cdot b},$$

kde K je obsah beta-karotenu v $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, N je navážka analyzovaného materiálu v g, a $A_{451}^{1 \text{ cm}}$ je absorbance hexanového eluátu karotenů v 1 cm silné kyvetě při 451 nm.

Konstanta 3,86 zahrnuje hodnotu specifického absorbančního koeficientu beta-karotenu v hexanu, $A_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ mg\%}} = 2,59$ při 451 nm a převodní koeficient pro navážku analyzovaného materiálu.

Princip stanovení sumy xantofylů spočívá v tom, že se po vymytí karotenů z kolony vymyjí z kolony i xantofyly směsí hexanu s benzenem. Kolona se po vymytí karotenů převrství 0,5 až 1 ml směsí 5% benzenu v hexanu. Tento postup se několikrát opakuje, avšak obsah benzenu v promývací směsi se postupně zvyšuje (10%, 20%, 30%) až na konečnou hodnotu 50%, kterou se kolona promývá až do úplného vymytí xantofylů. Hexan-benzenový eluát xantofylů se jímá do kalibrované zkumavky a stanoví se jeho objem z v. ml. Na spektrofotometru se proměří absorbance tohoto eluátu při vlnové délce 447 nm. Obsah sumy xantofylů v analyzovaném materiálu se vypočte ze vzorce

$$X = \frac{4,06 \cdot a \cdot z \cdot A_{447}^{1 \text{ cm}}}{N \cdot b},$$

kde X je obsah sumy xantofylů v $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, N je navážka analyzovaného materiálu v g a $A_{447}^{1 \text{ cm}}$ je absorbance hexan-benzenového eluátu xantofylů v 1 cm silné kyvetě při 447 nm. Konstanta 4,06 v sobě zahrnuje hodnotu "specifického absorbančního koeficientu" pro směs xantofylů v eluční směsi hexan + benzen (4:1), $A_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ mg\%}} = 2,46$ při 447 nm a převodní koeficient pro navážku analyzovaného materiálu.

Princip stanovení feofytinu a spočívá v tom, že kolona se po nanesení hexanového extraktu pigmentů promývá směsí hexanu s benzenem do okamžiku, kdy z kolony začnou vytékat xantofyly. Kolona se po vsáknutí hexanového extraktu pigmentů převrství 0,5 až 1 ml směsí 5% benzenu v hexanu. Tento postup se několikrát opakuje, avšak obsah benzenu v promývací směsi se postupně zvyšuje (10%, 20%) až na konečnou hodnotu 30%, kterou se kolona promývá až do počátku eluce xantofylů. Hexan-benzenový eluát feofytinu a, který obsahuje rovněž beta-karoten a část xantofylů, se jímá do kalibrované zkumavky a stanoví se jeho objem f v ml. Na spektrofotometru se proměří absorbance tohoto eluátu při vlnové délce 667 nm. Obsah feofytinu a v analyzovaném materiálu se vypočte ze vzorce

$$F_a = \frac{17,86 \cdot a \cdot f \cdot A_{667}^{1 \text{ cm}}}{N \cdot b},$$

kde F_a je obsah feofytinu a v $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, N je navážka analyzovaného materiálu v g a $A_{667}^{1 \text{ cm}}$ je absorbance hexan-benzenového eluátu feofytinu a, obsahujícího rovněž beta-karoten a část xantofylů, v 1 cm silné kyvetě při 667 nm. Konstanta 17,86 v sobě zahrnuje hodnotu specifického absorbančního koeficientu feofytinu a, $A_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ mg\%}} = 0,56$ při 667 nm a převodní koeficient pro navážku analyzovaného materiálu.

Hexan je možno při stanovení obsahu beta-karotenu, sumy xantofylů i feofytinu a nahradit heptanem nebo petroleterem.

Výhody navrhovaného způsobu spočívají v tom, že intenzivním promícháním směsi acetonového extraktu pigmentů s nepolárním rozpouštědlem a nasyceným roztokem chloridu sodného NaCl se docílí mnohem účinnějšího a rychlejšího převedení acetonu do vodní fáze, bez nebezpečí tvorby emulze. Odstranění vodně-acetonové fáze odsátím podstatně snižuje ztráty pigmentů. Celý postup se provádí v otevřené nádobě a tím odpadá nutnost častého odvětrávání, což usnadňuje převedení pigmentů z polárního do nepolárního rozpouštědla. Přítomnost chloridu sodného ve vodě značně zkvalitňuje separaci obou oddělených zón; množství chloridu sodného, které vypadne z roztoku po promíchání směsi přitom indikuje množství acetonu dosud přítomného v nepolárním rozpouštědle. Tento vypadlý chlorid sodný je možno znovu rozpustit opatrným přidáváním destilované vody k vodně acetonové zóně. Tím se dále posune termodynamická rovnováha rozdělení acetonu mezi obě vzájemně nemísitelná rozpouštědla - vodu a nepolární rozpouštědlo - v příznivém směru.

Náhradou kysličníku hlinitého polyamidem se docílí kvalitnějšího oddělení karotenů od ostatních pigmentů vzhledem k tomu, že při promývání kolony nepolárním rozpouštědlem jsou karoteny jedinými fotosyntetickými pigmenty, které se pohybují, kdežto všechny ostatní fotosyntetické pigmenty zůstávají na vstupu kolony. Polyamid má navíc mnohem nižší aktivitu než kysličník hlinitý a při jeho použití je tedy mnohem menší nebezpečí přesmyků a jiných degradačních procesů karotenoidů v průběhu vlastní chromatografické separace. K úplnému vymytí karotenů z polyamidové kolony dojde již za 2 až 3 minuty, tedy mnohem dříve, než na kysličníku hlinitém. Objem činidla, potřebného k vymytí karotenů z polyamidové kolony, je mnohem nižší, než v případě kolony z kysličníku hlinitého.

Náhradou kysličníku hlinitého polyamidem se docílí též možnosti snadno stanovit celkový obsah xantofylů v analyzovaném materiálu, vzhledem k tomu, že na polyamidu migrují xantofyly v jediné společné zóně. Je rovněž možné snadno stanovit obsah feofytinu a u vzorků, které tento degradační produkt chlorofylu a obsahují.

Náhradou kysličníku hlinitého polyamidem se docílí možnosti pracovat při atmosférickém tlaku, což snižuje nároky na aparaturu a zvyšuje bezpečnost práce.

Ve svém souhrnu navrhovaný postup předčí dosavadní postup také v tom, že celková spotřeba chemikálií je mnohem menší, aktivitu polyamidu není nutno nijak upravovat a odpadá i nutnost provedení některých dílčích operací (ověření kvality benzenu na přítomnost dehtovitých látek; přečištění chloroformu k odstranění chlorovodíku; destilace dietyléteru se sodíkem k odstranění peroxidů; práce se silnými louhy a kyselinami).

Na připojeném výkresu je znázorněn příklad provedení sloupcové chromatografie hexanového extraktu pigmentů z úsušku vojtěšky, provedené navrhovaným postupem. Křivka 1 na výkresu představuje průběh eluce beta-karotenu, který vytekl z kolony při jejím promývání hexanem. Křivka 2 na výkresu představuje průběh eluce feofytinu a, který vytéká z kolony při jejím promývání hexanem a později směsí hexanu s benzenem (5 až 30 % benzenem). Křivka 3 na výkresu představuje průběh eluce xantofylů, které vytékají z kolony při jejím promývání směsí hexanu s benzenem (30 až 50 % benzenem). Křivka 4 na výkresu představuje průběh eluce chlorofylů a a b, které vytékají z kolony při jejím promývání acetonem. Hodnoty na ose x značí celkový objem elučního činidla, resp. činidel v ml, hodnoty na ose y absorpční příslušných eluatů v 1 cm silné kyvetě. V případě beta-karotenu a xantofylů byla tato absorpce měřena při vlnové délce 451, resp. 447 nm, u feofytinu a a chlorofylů a a b při vlnové délce jejich červeného absorpčního maxima (663 až 667 nm).

Stanovení obsahu beta-karotenu, sumy xantofylů a feofytinu a je možno využít ke kvalitativní i kvantitativní charakteristice materiálů rostlinného původu. Obsah beta-karotenu a sumy xantofylů ve tkáni zelených rostlin doplňuje informace o složení a funkční aktivitě fotosyntetického aparátu, na níž závisí tvorba biomasy. Množství těchto pigmentů je rovněž ukazatelem dynamiky ontogenetického vývoje analyzovaného orgánu nebo rostliny. Obsah beta-karotenu ve tkáni zelených rostlin je navíc vhodným indikátorem stavu dusíkaté výživy

těchto rostlin. Obsah beta-karotenu v čerstvé a konzervované píce je vzhledem k provitaminové aktivitě beta-karotenu (vitamin A) jedním z důležitých ukazatelů celkové nutriční hodnoty píce. Obsah beta-karotenu a sumy xantofylů v krmivech rozhoduje o výsledné pigmentaci mnoha živočišných produktů (máslo, vaječné žloutky, kůže brojlerů apod.). Obsah feofytinu a v materiálech rostlinného původu je ukazatelem kvality jeho technologického zpracování a skladování. Vedle nutriční hodnoty je obsah beta-karotenu, sumy xantofylů a nepřímo i feofytinu a v zemědělských produktech významný i pro jejich tržní hodnotu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob kvantitativního stanovení beta-karotenu, sumy xantofylů a feofytinu a, vyznačený tím, že se rostlinná barviva extrahují acetonem, načež se extrakcí uvolněná barviva převedou z acetonu do hexanu, heptanu nebo petroléteru a beta-karoten, suma xantofylů a feofytin a se vzájemně chromatograficky oddělí na sloupci polyamidu a jejich množství se stanoví spektrofotometricky.

1 list výkresů

216993

