

ARKADIUSZ SZTERK, EWA SOSIŃSKA, MIECZYŚLAW W. OBIEDZIŃSKI,
PIOTR P. LEWICKI

METODA OTRZYMYWANIA PREPARATU NATURALNEGO α - I β -KAROTENU Z MARCHWI

Streszczenie

Celem pracy było otrzymanie preparatu naturalnego α - i β -karotenu z marchwi. Wyciśnięty sok poddawano koagulacji stężonym kwasem solnym, w temperaturze ok. 95 °C. Sedymentację prowadzono w temperaturze bliskiej 0 °C, a koagulat odwirowywano. Następnie ekstrahowano z niego α - i β -karoten mieszaniną ekstrakcyjną eter naftowy: aceton (1:1 v/v). Otrzymany ekstrakt poddawano filtracji próżniowej i odwadnianiu chemicznemu. Mieszaninę ekstrakcyjną odparowywano pod próżnią, następnie przeprowadzano krystalizację karotenu w temp. -20 °C. Kryształy α - i β -karotenu oddzielano na sączku bibułowym, przemywając heksanem i suszono próżniowo.

Z 50 kg marchwi uzyskiwano przeciętnie co najmniej 2 g preparatu α - i β -karotenu w postaci krystalicznej. Analiza chromatograficzna HPLC wykazała, że uzyskany preparat charakteryzuje się dużą czystością oraz stosunkiem α - karotenu do β -karotenu 1:1,7. Dodatkowo potwierdzono identyfikację α - i β -karotenu na podstawie widma UV/VIS (detektor diodowy) oraz widma masowego, uzyskanego techniką chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, z jonizacją przez elektrorozpylanie (LC-ESI/MS).

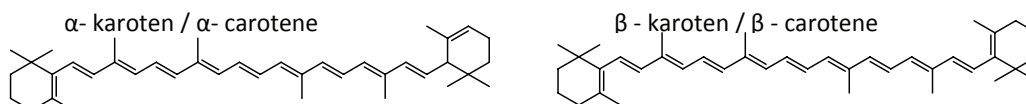
Słowa kluczowe: α -karoten, β -karoten, naturalny preparat, HPLC, HPLC-DAD, LC-ESI/MS

Wprowadzenie

Naturalne dodatki do żywności, a w szczególności barwniki, w porównaniu ze swoimi syntetycznymi odpowiednikami zyskują coraz większe grono zwolenników wśród producentów żywności i konsumentów. Uważa się, że są one bezpieczne zdrowotnie i wartościowe pod względem technologicznym. Karotenoidy (prowitamina A) są powszechnie znane jako przeciwutleniacze. Szczególnie β -karoten, jako dodatek do

Mgr inż. A. Szterk, prof. dr hab. P.P. Lewicki, Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, mgr inż. E. Sosińska, prof. dr hab. M.W. Obiedziński, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

żywności, zyskuje na znaczeniu, zarówno dzięki swoim właściwościom barwiącym, jak i korzystnemu wpływowi na zdrowie człowieka (rys. 1). Jest on powszechnie występującym karotenoidem w przyrodzie, stąd można go uzyskać np. w wyniku ekstrakcji z marchwi lub oleju palmowego. Barwnik ten może być stosowany np. do barwienia bezalkoholowych i nieklarowanych napojów, często o smaku owoców południowych, ponieważ można uzyskać barwę od jasnożółtej do żółto-pomarańczowej [4, 5].



Rys. 1. Struktura α - i β -karotenu.

Fig. 1. Structure of α - and β -carotene.

Celem pracy było otrzymanie preparatu naturalnego α - i β -karotenu z marchwi, a następnie określenie stosunku α - do β -karotenu i potwierdzenie ich identyfikacji.

Material i metody badań

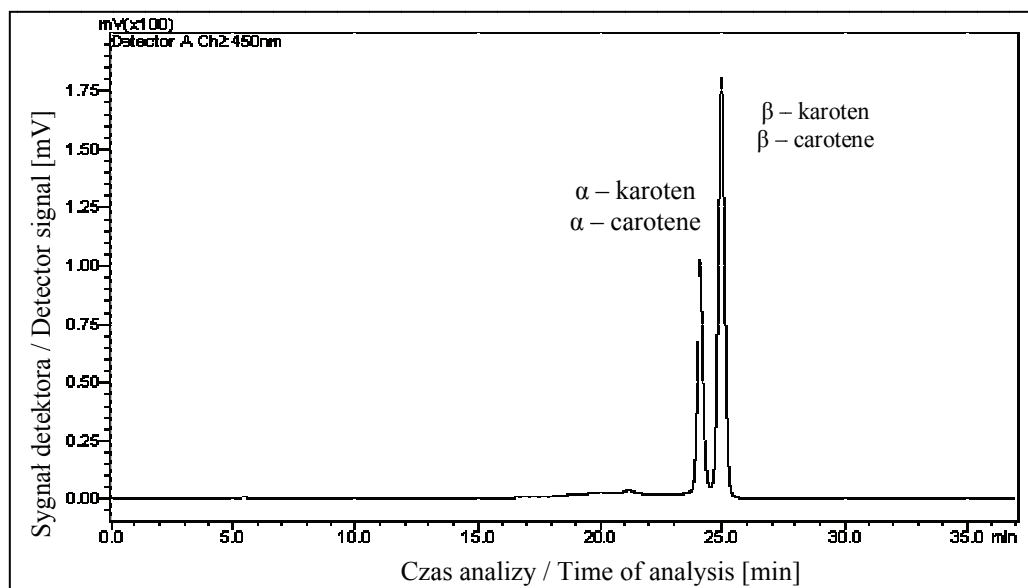
Preparat α - i β -karotenu otrzymywano z marchwi odmiany Kazan, pochodzącej z pól doświadczalnych SGGW. Sok wyciskano z marchwi przy użyciu ślimakowej sokowirówki, wyłoki mieszano z wodą 2:1 i ponownie wyciskano sok. Proces ten powtarzano dwukrotnie, w celu jak największego wyekstrahowania barwnika. Sok poddawano koagulacji stężonym kwasem solnym w temp. ok. 95 °C. Sedymentację prowadzono w temp. bliskiej 0 °C, a koagulat odwirowywano. Następnie ekstrahowano z niego α - i β -karoten mieszaniną ekstrakcyjną eter naftowy: aceton (1:1 v/v). Otrzymany ekstrakt poddawano filtracji próżniowej i odwadnianiu chemicznemu (bezwodnym siarczanem sodu). Mieszaninę ekstrakcyjną odparowywano pod próżnią, następnie przeprowadzano krystalizację karotenu w temp. -20 °C. Kryształy α - i β -karotenu oddzielano na sączku bibułowym przemywając 3-krotnie heksanem i suszono próżniowo.

Analizę jakościową i ilościową otrzymanego preparatu prowadzono za pomocą chromatografu cieczowego firmy Shimadzu z detekcją spektrofotometryczną ($\lambda = 450$ nm). Rozdział mieszaniny prowadzono w układzie faz odwróconych z elucją izokratyczną, stosując acetonitryl (supergradient do HPLC) jako fazę ruchomą. Preparat rozpuszczano w fazie, a próbki filtrowano. Warunki analizy: kolumna Applied Biosystems Spheri-5 RP C-18 10 mm x 1,0 mm, 5 μ m; przepływ fazy 0,12 ml/min, temp. 22 °C. Ponadto prowadzono analizę z użyciem chromatografu cieczowego z detektorem diodowym (PDA) firmy Shimadzu, otrzymując widma UV/VIS α - i β -karotenu.

Dodatkowo wykonywano potwierdzenie identyfikacji α - i β -karotenu na podstawie widma masowego, uzyskanego techniką chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, z jonizacją przez elektrorozpylanie (LC-ESI/MS). Do badań wykorzystano LCMS-2010V firmy Shimadzu. Warunki analizy rozdzielania chromatograficznego były identyczne jak powyżej. Parametry MS z ESI(+): analiza w trybie pozytywnym (tylko jony o ładunku dodatnim podlegały analizie), napięcie detektora 1,3 kV, zakres przemieszczania 200-800 m/z, napięcie interfejsu 5 kV, temp. bloku grzejnego w interfejsie 250 °C, napięcie CDL (curved desolvation line) 200 V, temp. CDL 300 °C, kwadrupolowy filtr mas, napięcie na Q-array: DC 50 V i RF 150 V, przepływ azotu rozpylającego 1 l/min, ciśnienie podawania gazu osuszającego 0,1 MPa.

Wyniki i dyskusja

Stosując opisaną wyżej procedurę otrzymywania preparatu naturalnego α - i β -karotenu, uzyskano purpurowy krystalizat, który przechowywano w temp. -20 °C w szczelnie zamkniętych buteleczkach z ciemnego szkła. Obliczono, że wydajność uzyskiwania preparatu to, co najmniej 2 g α - i β -karotenu w postaci krystalicznej z 50 kg marchwi. Analiza chromatograficzna wykazała, że uzyskany preparat charakteryzował się dużą czystością oraz stosunkiem α - karotenu do β -karotenu 1:1,7 (przeliczano na podstawie stosunku pól powierzchni pod pikami [j.u.]) (rys. 2). W marchwi dominują dwa karotenoidy: α - i β -karoten, proporcje między zawartością formy α i β

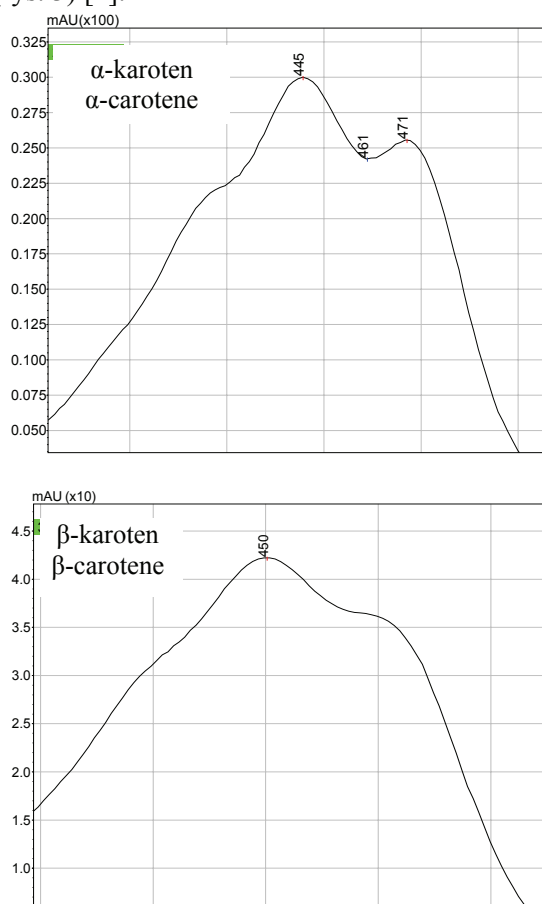


Rys. 2. Rozdział chromatograficzny α - i β -karotenu, detekcja przy $\lambda = 450$ nm.

Fig. 2. Chromatographic separation of α - and β -carotene, detection at $\lambda = 450$ nm.

zależą od odmiany oraz wielu czynników środowiskowych, jednak zawsze dominuje forma β [3, 5]. Zgodnie z danymi literaturowymi stosunek zawartości α - i β -karotenu w świeżej marchwi wynosi zwykle ok. 1:2 [4]. Należy zaznaczyć, że α -karoten charakteryzuje się większą stabilnością niż β -karoten, stąd w uzyskanym preparacie stosunek ten mógł ulec zmianie na korzyść formy α ze względu na proces otrzymywania [3].

Uzyskano charakterystyczne widma α - i β -karotenu w zakresie światła widzialnego, przy czym forma α wykazywała maksimum absorpcji przy 445 nm, natomiast forma β przy 450 nm (rys. 3) [2].

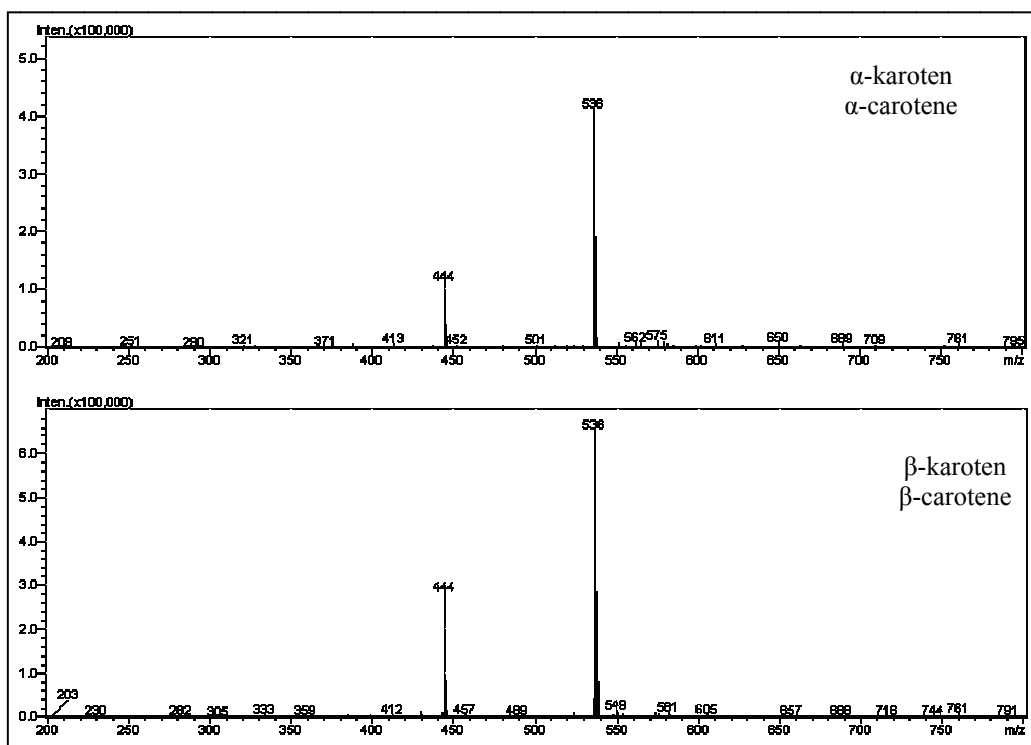


Rys. 3. Widmo α - i β -karotenu w zakresie światła widzialnego.

Fig. 3. α - and β -carotene spectra in VIS range.

Przeprowadzona analiza z wykorzystaniem chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrią mas z jonizacją przez elektrorozpylanie (LC-ESI(+)/MS) pozwoliła uzyskać widma α - i β -karotenu, które różniły się jedynie stosunkiem dwóch dominują-

cych jonów. Najbardziej intensywny był molekularny jon kationorodnikowy $[M]^{++}$ (536 m/z), a następnie $[M-C_6H_6CH_2]^+$ (444 m/z) (rys. 4). Ten ostatni jest typowym jonem fragmentarycznym powstającym z jonu molekularnego $[M]^{++}$, przez odłączenie toluenu [1]. Li i wsp. [1], stosując jonizację przez elektrorozpylanie z kwadrupolowym tandemowym spektrometrem mas (ESI(+)/ MS-MS) z multiple reaction monitoring (MRM), w przypadku β -karotenu otrzymali prekursorowy jon molekularny $[M]^{++}$ (536 m/z) i jego jon fragmentaryczny $[M-C_6H_6CH_2]^+$ (444 m/z).



Rys. 4. Widma masowe α - i β -karotenu, uzyskane techniką LC-ESI(+)/MS.

Fig. 4. Mass spectra of α - and β -carotene obtained using a LC-ESI(+)/MS technique.

Wioski

1. Z 50 kg marchwi uzyskiwano przeciętnie co najmniej 2 g preparatu α - i β -karotenu w postaci krystalicznej.
2. Na podstawie różnych wartości czasu retencji, a przed wszystkim uzyskanych widm w zakresie światła widzialnego oraz widm masowych zidentyfikowano α - i β -karoten w otrzymanym preparacie.
3. Analiza chromatograficzna wykazała, że uzyskany preparat charakteryzuje się dużą czystością i stosunkiem α -karotenu do β -karotenu 1:1,7.

4. Uzyskano charakterystyczne widma α - i β -karotenu w zakresie światła widzialnego, forma α wykazywała maksimum absorpcji przy 445 nm, natomiast forma β przy 450 nm.
5. Przeprowadzona analiza z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z jonizacją przez elektrorozpylanie, pozwoliła uzyskać widma α - i β -karotenu, w których dominowały jony o stosunku m/z 536 oraz 444.

Praca była prezentowana podczas VI Konferencji Naukowej nt. „Nowoczesne metody analityczne w zapewnieniu jakości i bezpieczeństwa żywności”, Warszawa, 6 - 7 grudnia 2007 r.

Literatura

- [1] Li H., Tyndale S.T., Heath D.D., Letcher R.J.: Determination of carotenoids and all-*trans*-retinol in fish eggs by liquid chromatography-electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *J. Chrom. B*, 2005, **816**, 49-56.
- [2] Scott K.J.: Detection and measurement of carotenoids by UV/VIS spectrophotometry. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001, **F2.2**.
- [3] Sweeney J. P., Marsch A. C.: Effect of processing on provitamin A in vegetables. *J. Am. Diet. Assoc.*, 1971, **59**, 234-238.
- [4] Szterk A., Lewicki P.P.: Karotenoidy i ich funkcje biologiczne. *Przem. Spoż.* 2007, **61** (7), 32-34.
- [5] Rodriguez-Amaya D.B.: Some physicochemical properties of carotenoids. *A guide to carotenoid analysis in food* ILSI Press USA, 14-22.

METHOD FOR OBTAINING NATURAL α - AND β -CAROTENE PREPARATION FROM CARROT

Summary

The objective of the study was to obtain a natural α - and β -carotene preparation from carrot. The squeezed juice was coagulated with a concentrated hydrochloric acid at about 95 °C. The sedimentation was carried out at a temperature close to 0 °C, and the coagulum was centrifuged. Next, α - and β -carotene were extracted from this centrifuged coagulum using an extraction mixture: petroleum ether & acetone (1:1 v/v). The extract produced was vacuum-filtered and chemically dehydrated. The extraction mixture was evaporated under vacuum, and the crystallization of carotene was carried out at -20°C. The crystals of α - and β -carotene were isolated on a filter paper by washing them with hexane; then, they were dried under vacuum.

From the amount of 50 kg of carrot, more than 2 g of the crystal-formed α - and β -carotene preparation were obtained on average. The HPLC chromatographic analysis proved that the preparation produced was characterized by high purity and by α - to β -carotene ratio being 1:1.7. Additionally, the identification of α - and β -carotene was confirmed on the basis of UV/VIS spectra (diode array detector) and mass spectrum obtained using a liquid chromatography coupled with mass spectrometry, and with the ionization using electrospray (LC-ESI/MS).

Key words: α -carotene, β -carotene, natural preparation, HPLC, HPLC-DAD, LC-ESI/MS ☒