

## SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ $\beta$ -KAROTENU

**Úkol:** Spektrofotometricky stanovit obsah  $\beta$ -karotenu v mrkvi

### **Teoretický úvod:**

Karotenoidy jsou významnými a nejrozšířenějšími lipofilními barvivy mnoha různých druhů ovoce a zeleniny. Většina karotenoidních látek se řadí mezi terpenoidy. Za svoji barevnost vděčí řetězci konjugovaných dvojných vazeb. Karotenoidy reagují s volnými radikály, a proto působí jako antioxidanty. Hlavním zástupcem této skupiny látek je  $\beta$ -karoten.  $\beta$ -karoten je nejvýznamnějším provitaminem A. Je převládajícím pigmentem v mrkvi, meruňkách, mangu, ale také v listové zelenině, kde je jeho přítomnost maskována chlorofylovými barvivy. Široce využívanou technikou pro stanovení obsahu  $\beta$ -karotenu v potravinách je UV-VIS spektrofotometrie.

Kvantitativní analýza je založena na platnosti Lambert-Beerova zákona, podle něhož je hodnota absorbance  $A$  při vlnové délce přímo úměrná molární koncentraci  $c$  [mol/l]:

$$A = \varepsilon * c * d \quad \begin{array}{l} \varepsilon = \text{molární absorpční koeficient} [l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \\ d = \text{tloušťka absorbující vrstvy} [cm] \end{array}$$

Při kvantitativní analýze se obvykle měří při vlnové délce absorpčního maxima, kde je měřená absorbance nejvyšší. Vyhodnocování výsledků se provádí metodou kalibrační křivky, proměřením absorbancí srovnávacích roztoků o známé koncentraci nebo metodou standardních přidavků. Z Lambert-Beerova zákona vyplývá, že kalibrační závislost bude mít lineární průběh, avšak platnost zákona je omezena řadou odchylek způsobených např. změnou chemické rovnováhy v roztoku v důsledku měnící se koncentrace nebo nedostatečnou monochromatickostí záření.

### **Princip:**

$\beta$ -karoten se po uvolnění ethanolickým hydroxidem a po extrakci do organické fáze stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Obsah  $\beta$ -karotenu v mrkvi se určí metodou kalibrační křivky proměřením absorbancí standardních roztoků dichromanu draselného.

### **Přístrojové vybavení a chemikálie:**

- UV-VIS spektrofotometr Shimadzu

- dichroman draselný p.a., ethanolický roztok NaOH, kyselina chlorovodíková (1:1), n-heptan p.a., bezvodý síran sodný p.a.

*Příprava ethanolického roztoku hydroxidu draselného:* 10 g NaOH se rozpustí v 20 ml vody, doplní na 100 ml 96% ethanolem a promíchá. Roztok se připravuje vždy čerstvý.

*Příprava standardního roztoku dichromanu draselného:* 1,25 g dichromanu draselného, předem vysušeného při 105 °C (2 hodiny) se rozpustí v odměrné baňce na 1000 ml vodou. Přidá se asi 5 ml koncentrované kyseliny sírové, doplní vodou po značku a promíchá. 1 ml tohoto roztoku odpovídá 0,0080 mg β-karotenu.

### **Postup stanovení:**

#### *a) Příprava kalibračních roztoků*

Do 10 odměrných baněk o objemu 10 ml se diferencovaně odpipetuje 0,2; 0,4; 0,6; ...; 2 ml standardního roztoku dichromanu draselného, doplní vodou po rysku a promíchá. Při navážce 1 g vzorku odpovídají tyto roztoky koncentracím uvedeným v tabulce.

Dichroman draselný [ml]	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2
Koncentrace β-karotenu [mg/1kg]	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80

#### *b) Zpracování vzorku*

1,00 g nastrouhané mrkve se vsype do kádinky a přidá se 20 ml ethanolického roztoku NaOH. Po promíchání tyčinkou se kádinka se směsí nechá 10 minut stát. Poté se přidá 20 ml HCl (1:1) a opět se promíchá. Obsah kádinky se kvantitativně převede na filtr a promývá acetonem, tak dlouho, až je nerozpustná část zcela bezbarvá. Filtrát se kvantitativně převede do dělicí nálevky (500 ml), přidá se 40 ml heptanu a doplní do  $\frac{3}{4}$  objemu vodou. Kroužením (netřepat) se obsah promíchá. Po několikaminutovém stání se vodná fáze až na malý zbytek vypustí. Do dělicí nálevky se přilije 20 ml ethanolického roztoku NaOH (rozhraní obou vrstev se vyčeří) a dělicí nálevka se doplní opět na  $\frac{3}{4}$  objemu vodou. Kroužením se obsah promíchá a po usazení se vodná fáze opět odpustí. Celý

postup se opakuje ještě 2-3x až je vodně ethanolická fáze bezbarvá. Heptanový extrakt, přesušený bezvodým síranem sodným, se převede do 50 ml odměrné baňky a doplní heptanem po rysku.

*c) Spektrofotometrické měření*

Kalibrační řada standardních roztoků dichromanu draselného se proměří na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm proti destilované vodě. Při stejné vlnové délce se rovněž proměří vzorek proti čistému heptanu. Obsah  $\beta$ -karotenu v mg/1kg mrkve se přímo odečte z kalibrační křivky.

**Použitá literatura:**

Javorský P. a kol., Chemické rozbory v zemědělských laboratořích, Ministersvo zemědělství a výživy ČR.

A. K. Biswas, J. Sahoo, M. K. Chatli, *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1809-1813, 2011.

J. Velišek, J. Hajšlová, *Chemie potravin II*, 3. Vydání, OSSIS, Tábor 2009, p. 512.