

Strona czasopisma: <http://analit.agh.edu.pl/>

Spektrofotometryczne oznaczanie zawartości β -karotenu w produktach spożywczych

Spectrophotometric determination of β -carotene content in food products

Wiktoria Taźbirek, Natalia Wróbel

AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

ABSTRAKT: W niniejszej pracy dokonano oznaczenia zawartości β -karotenu, związku z grupy karotenoidów będącego substancją barwną absorbującą światło o długości fali 450 nm w produktach spożywczych. Do badania wykorzystano spektrofotometrię UV – VIS, a analizowane produkty stanowiły: marchewka, batat, papryka, dynia oraz produkt dla dzieci „Pierwsza marchewka” marki HIPPI. Na podstawie charakteru substancji badanej jako rozpuszczalnik do ekstrakcji wybrano aceton. W artykule przedstawiono przebieg procesu analitycznego od przygotowania roztworów wzorcowych, krzywej kalibracji i próbek poprzez oznaczanie ich oraz analizę uzyskanych wyników i odniesienie ich do źródeł literaturowych. Zawartość β -karotenu w badanych produktach wykazała znaczną różnorodność: w marchewce stwierdzono od 62.22 mg/100 g, w batacie około 11.10 mg/100 g, w papryce 64.60 mg/100 g, natomiast w dyni wynosiła ona 2.18 mg/100 g. W przypadku produktu dla dzieci „Pierwsza marchewka” marki HIPPI stężenie β -karotenu wyniosło 96.67 mg/100 g, co czyni go wartościowym źródłem tego związku w diecie najmłodszych.

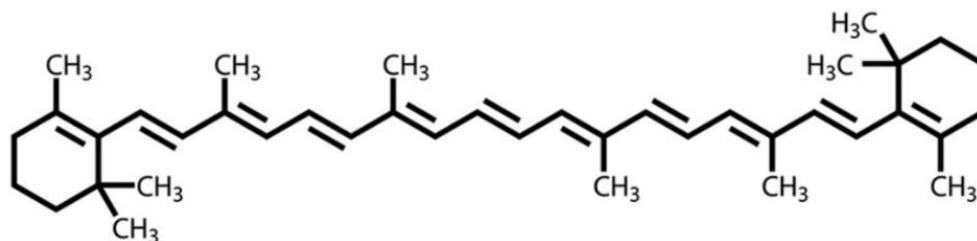
ABSTRACT: In this study, β -carotene, a compound from the carotenoid group that serves as a pigment absorbing light at a wavelength of 450 nm, was determined. UV–VIS spectrophotometry was employed for the analysis, and the selected food products examined included carrot, sweet potato, bell pepper, pumpkin, and the infant food product "First Carrot" by the HIPPI brand. Given the properties of the analysed substance, acetone was chosen as the solvent for extraction. The article presents the process starting from the preparation of standard solutions, calibration curves, and samples, through their analysis and determination, followed by an examination of the obtained results and their comparison with relevant literature sources. The content of β -carotene in the studied products showed significant variability: in carrots, it was found to be 62.22 mg/100 g, in sweet potatoes approximately 11.10 mg/100 g, in bell peppers 64.60 mg/100 g, while in pumpkin it measured 2.18 mg/100 g. For the children's product "First Carrot" by HIPPI, the concentration of β -carotene reached 96.67 mg/100 g, making it a valuable source of this compound in the diet of the youngest children.

Słowa kluczowe: β -karoten, spektrofotometria UV – VIS, aceton, ekstrakcja

1. Wstęp

β -karoten należy do grupy karotenoidów, czyli związków organicznych, które jako barwniki nadają charakterystyczne ubarwienie. Karotenoidy to naturalnie pigmenty występujące w roślinach, grzybach, algach czy bakteriach. W przyrodzie odnaleźć można ponad 650 różnych rodzajów karotenoidów, w tym do 100 obecnych w diecie człowieka. Ludzie nie syntetyzują jednak karotenoidów - konieczne jest dostarczanie ich w żywności lub poprzez suplementację [1].

β -karoten jest związkiem rozpuszczalnym w tłuszczach, który zawiera 40 atomów węgla, sprzężone wiązania podwójne i dwa pierścienie β -jonowe (**Rysunek 1**) [2].



Rysunek 1. Wzór strukturalny β -karotenu. Źródło [3].

β -karoten to substancja barwna, która absorbuje światło o długości fali 450 nm. Występuje w postaci czerwonego, czerwono-brunatnego, a nawet fioletowego krystalicznego proszku. W większości produktów spożywczych występuje naturalnie w formie trans, jednak forma cis jest również obecna w żywności. Trans- β -karoten w łatwy sposób ulega termicznemu i chemicznemu utlenianiu oraz izomeryzacji, jest też wrażliwy na światło i wysoką temperaturę w procesie przechowywania i przetwarzania. W organizmie człowieka β -karoten łatwo utlenia się do dwóch cząsteczek retinalu, a następnie zostaje zredukowany do retinolu, czyli biologicznie aktywnej formy witaminy A. Pozostała ilość nieprzekształconego β -karotenu i estrów retinalu jest wydzielana do limfy, i następnie transportowana do wątroby [4].

Jest jednym z najszerzej badanych z karotenoidów w ludzkiej diecie, krwi czy tkankach, ponieważ posiada najwyższą aktywność prowitaminy A. Ze względu na wysoką bioaktywność jest również szeroko stosowany w medycynie. Jego niedobór może powodować problemy ze wzrokiem takie jak kseroftalmia czyli zespół suchego oka, czy kurzą ślepotę. Do innych objawów należą pogorszenie się stanu skóry, paznokci i włosów. β -karoten jako prowitamina A angażuje się w proces rozwoju embrionalnego oraz przyczynia się do prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego. Ma również właściwości przeciwutleniające [5].

Nie tylko bioaktywność β -karoten sprawia, że jest on cennym dodatkiem do żywności, jego znaczenie przemysłowe wynika również z faktu, iż posiada on właściwości barwiące – jest stosowany jako czerwono-pomarańczowy pigment wykorzystywany np. w napojach o smaku tropikalnych owoców. Najlepszym źródłem omawianej substancji jest marchewka (8-10 mg/100 g), szpinak (5 mg/100g), rukiew wodna (6 mg/100 g), jarmuż (5 mg/100 g) oraz natka pietruszki (5.5 mg/100 g). Ponadto można ją też znaleźć w dyni, batatach (6.5 mg/100 g), papryce (3.5 mg/100 g), pomidorach czy owocach takich jak malina, borówka i arbuz [6].

Karotenoidy, takie jak β -karoten, można analizować za pomocą różnych metod, głównie spektroskopowych (np. Spektroskopia Ramana i UV-Vis) oraz chromatograficznych, w tym TLC, HPLC i chromatografii gazowej. W pierwszej z wymienionych metod, analizie podlega sposób w jaki substancje oddziałują z promieniowaniem elektromagnetycznym. Badanie polega na analizie absorpcji, emisji, rozpraszania lub odbicia światła (lub innego rodzaju promieniowania) przez substancję. Technika ta dostarcza informacji o składzie chemicznym i właściwościach badanej próbki oraz umożliwia zarówno identyfikację związków chemicznych, jak i ilościowe oznaczenie ich zawartości. Metody spektroskopowe wyróżniają poszczególne rodzaje spektroskopii w zależności od sposobu działania. Główne rodzaje spektroskopii wykorzystywane do analizy β -karotenu to: spektroskopia absorpcyjna UV-Vis polegająca na pomiarze ilości światła pochłoniętego przez substancję w zakresie ultrafioletu i widzialnym oraz spektroskopia Ramana, która wykorzystuje rozpraszanie światła w celu badania drgań molekularnych struktury chemicznej. Szczególną zaletą drugiego rodzaju jest możliwość pomiaru próbek w różnych stanach skupienia, w przeciwieństwie do spektroskopii absorpcyjnej UV-Vis, gdzie analizie możemy poddać wyłącznie próbki ciekłe [7]. Chromatografia to z kolei metoda służąca do rozdzielania i analizy składników mieszanin chemicznych, polegająca na różnicach w ich zdolności przemieszczania się między dwoma fazami:

stacjonarną i ruchomą. Każdy składnik mieszaniny oddziałuje z fazą stacjonarną w inny sposób, co skutkuje różnicami w szybkości ich migracji, umożliwia to ich rozdzielenie, identyfikację i oznaczenie ilościowe. Do analizy β -karotenu wykorzystywane są trzy rodzaje chromatografii: TLC (chromatografia cienkowarstwowa, gdzie mieszaninę nanosi się na cienką warstwę adsorbentu na płytce a następnie faza ruchoma migruje wzdłuż płytki, rozdzielając składniki), HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa, technika, w której ciecz pod wysokim ciśnieniem przepływa przez kolumnę wypełnioną fazą stacjonarną) oraz chromatografia gazowa, gdzie gaz stanowi fazę ruchomą [8].

Zdecydowaną przewagą metod spektroskopowych nad metodami chromatograficznymi w oznaczaniu zawartości β -karotenu jest niski koszt analiz oraz odczynników, szybkość przeprowadzenia pomiaru i prostota procesu [9]. Mnogość zalet spektrofotometrii oraz jej zdecydowana przewaga nad metodami chromatograficznymi przeważały nad wyborem tej właśnie metody do przeprowadzenia oznaczenia zawartości β -karotenu w wybranych produktach spożywczych.

W pracy przedstawiono proces przygotowania próbek, ekstrakcji substancji badanej oraz wyznaczenie zakresu liniowości dla dobranej uprzednio metody kalibracji – krzywej wzorcowej. Wytypowano długość fali, przy której oznaczenia będą najdokładniejsze oraz dokonano przy niej oznaczenia β -karotenu w przygotowanych próbkach – marchewce, papryce, batacie, dyni oraz produkcie dla dzieci „Pierwsza marchewka” marki HIPP.

2. Część doświadczalna

2.1. Odczynniki i sprzęt

2.1.1. Odczynniki

β -karoten firmy Sigma-Aldrich, wzór sumaryczny: $C_{40}H_{56}$, masa molowa: 536.87 g/mol, czystość na poziomie 93%, syntetyczny czerwony proszek, stabilny chemicznie w temperaturze pokojowej [10]. Aceton do HPLC firmy Avantor Performance Materials Poland S. A. Wzór sumaryczny: C_3H_6O , masa molowa: 58.09 g/mol, bezbarwna, wysoce łatwopalna ciecz, może powodować podrażnienia oczu oraz uczucie senności lub zawroty głowy [11].

2.1.2. Sprzęt laboratoryjny

Celem rozdrobnienia i homogenizacji warzyw użyto blendera kuchennego marki Braun, model Multi Quick 9 MQ9147X o maksymalnej mocy 1200 W i mechaniczno-płynnej regulacji obrotów. Proces naważania przeprowadzono na wadze analitycznej RADWAG AS 110/X z dokładnością pomiarową do 0.001 g.

Roztwór wzorcowy β -karotenu o stężeniu 0.2 g/l przygotowano poprzez rozpuszczenie odpowiedniej naważki w kolbce o pojemności 50 cm³ oraz dopełnienie kolbki do kreski za pomocą acetonu. Roztwory kalibracyjne przygotowano w dniu pomiaru poprzez odpowiednie rozcieńczenie roztworu wzorcowego w kolbkach o pojemności 10 ml.

Celem intensyfikacji procesu ekstrakcji β -karotenu wykorzystano wytrząsarkę laboratoryjną typu 358S firmy Elpan. Z kolei oddzielenie roztworu z nad osadu wykorzystano wirówkę laboratoryjną MPW-260 firmy MPW MED. INSTRUMENTS.

Do spektrofotometrycznego oznaczenia beta-karotenu w przygotowanych próbkach wykorzystano spektrofotometr jednowiązkowy Lambda XLS firmy PerkinElmer. W celu uzyskania najdokładniejszych wyników, oznaczeń dokonano w kuwetach kwarcowych o szerokości 10 mm.

Szkło laboratoryjne przed pomiarami oczyszczono z użyciem detergentu oraz bieżącej wody. Następnie dwukrotnie przepłukano wodą destylowaną w celu usunięcia resztek detergentu. Ze

względu na wrażliwość β -karotenu na promieniowanie słoneczne, zastosowano szkło bursztynowe, które pozwoli ograniczyć ekspozycję próbek na ten czynnik.

2.2. Przygotowanie próbek do analizy

Produkty o wysokiej zawartości beta-karotenu to głównie warzywa i owoce koloru żółtego lub pomarańczowego. Szczególnie duże ilości znajdują się w marchwi, batatach, dyni oraz papryce, co pozwoliło wytypować te warzywa jako przedmiot analizy. Wybór uzasadnia również prostota ekstrakcji β -karotenu z ich matrycy, którą można przeprowadzić z wykorzystaniem różnych rozpuszczalników organicznych.



Rysunek 2. Produkty wybrane do analizy. Źródło własne.

Przedmiotem badania były warzywa: marchewka, papryka, batat, dynia oraz produkt marki Hipp przeznaczony dla dzieci „Pierwsza marchewka”. Przed przystąpieniem do analizy surowe warzywa – marchewkę, batat, paprykę i dynię umyto pod strumieniem bieżącej wody wodociągowej, a następnie obrano ze skórki. Następnie podzielono je na mniejsze kawałki za pomocą noża, po czym rozdrobniono wykorzystując do tego blender kuchenny do momentu uzyskania w miarę możliwej gładkiej postaci. Naważki każdego badanego warzywa, odpowiadające masie 1 g, odważono precyzyjnie za pomocą wagi analitycznej, przeniesiono ilościowo do probówek polipropylenowych o pojemności 7 ml. Celem określenia powtarzalności oznaczenia dla każdej analizowanej próbki przygotowano trzy powtórzenia.

2.2.1. Ekstrakcja

Kolejnym krokiem przygotowania próbek do analizy jest ekstrakcja. Jest to proces, który polega na wyodrębnieniu zadanego składnika lub składników z ciała stałego lub cieczy wykorzystując metodę dyfuzji, do cieczy która lepiej rozpuszcza te związki. Ze względu na mnogość i różnorodność produktów spożywczych zawierających β -karoten nie została określona standardowa procedura jego ekstrakcji. Większość tych metod skupia się jednak na ekstrakcji ciecz-ciecz lub ciecz-ciało stałe. Rodzaj ekstrakcji dobierany jest z uwzględnieniem badanego materiału. Ze względu na charakter ekstrahowanych substancji oraz zawartość wody w produktach spożywczych są to rozpuszczalniki w większości organiczne [12].

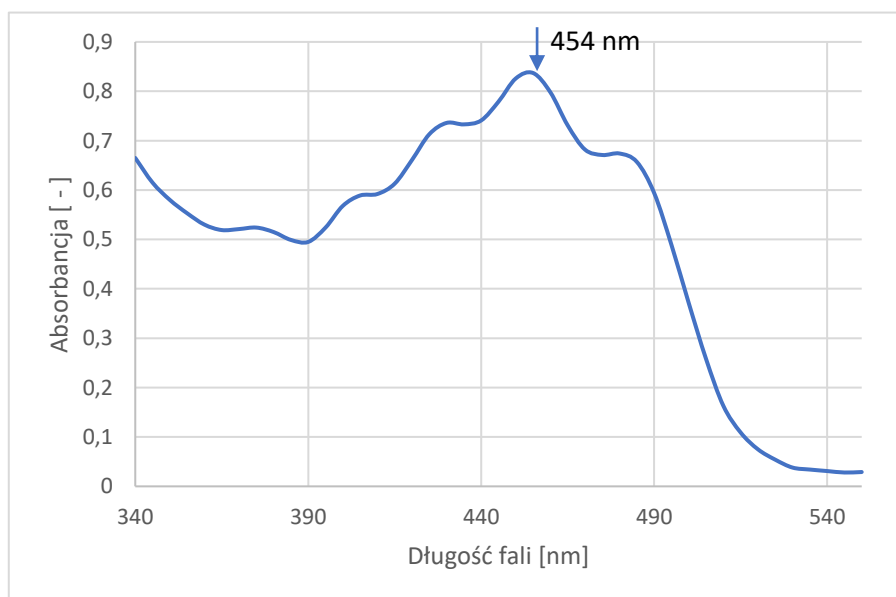
Ekstrakcję β -karotenu z analizowanych produktów spożywczych przeprowadzono poprzez wprowadzenie do każdej naważki po 5 cm³ acetonu, a następnie poddano procesowi wytrząsania

przez 30 min. Po tym czasie próbki odwirowano z prędkością 13.5 tys. rpm przez 15 minut. Po zakończeniu wirowania ostrożnie zebrano ciecz nad osadu za pomocą pipety automatycznej i przeniesiono ją do próbek ze szkła bursztynowego. Następnie procedurę ekstrakcyjną powtórzono, celem maksymalnego zwiększenia wydajności ekstrakcji β -karotenu. Otrzymane w dwóch etapach ekstrakty połączono. Dodatkowo dla próbek papryki, marchewki oraz przecieru dokonano ich 40-krotnego rozcieńczenia.

2.3. Wyznaczenie analitycznej długości fali $\lambda_{\max}$

Absorpcja światła przez substancje jest zmienna w zależności od długości fali, wykazuje jedno lub kilka charakterystycznych maksimów w określonych punktach na spektrum. Krzywa, która przedstawia jak zmienia się absorpcja w zależności od długości fali nazywana jest krzywą absorpcji. Z kolei $\lambda_{\max}$ to długość fali, przy której próbka absorbuje najwięcej światła.

$\lambda_{\max}$ wyznaczono doświadczalnie poprzez analizę roztworu kalibracyjnego o stężeniu 10 mg/l, a następnie na podstawie uzyskanych wyników i krzywej absorpcji wytypowano długość fali, przy której absorbancja osiąga maksymalną wartość (**Rysunek 3**). Pomiary wykonywane przy $\lambda_{\max}$ cechują się największą dokładnością i czułością.



Rysunek 3. Krzywa absorpcji roztworu β -karotenu w acetonie o stężeniu 10 mg/l, z wyznaczonym $\lambda_{\max}$. Źródło własne.

2.4. Metodyka pomiaru

W celu wyznaczenia zależności kalibracyjnej dla β -karoten należy przygotować serię roztworów wzorcowych poprzez pobranie za pomocą pipety automatycznej odpowiedniej ilości roztworu wzorcowego o stężeniu 200 mg/l i połączenie z rozpuszczalnikiem w postaci acetonu.

Na potrzeby projektu wybrano metodę kalibracji opartą na serii roztworów wzorcowych, dla których zmierzono absorbancję. Każdy roztwór β -karotenu w acetonie został poddany trzykrotnemu pomiarowi przy długości fali równej 454 nm, a uzyskane średnie wartości absorbancji zestawiono w tabeli.

Tabela 1. Wartości absorbancji dla roztworów wzorcowych β -karotenu.

Stężenie wzorca [mg/l]	Absorbancja [-]	Absorbancja średnia [-] $\pm$ SD
0.1	0.010	0.008 $\pm$ 0.002
	0.008	
	0.007	
0.5	0.048	0.048 $\pm$ 0.001
	0.047	
	0.048	
1.0	0.094	0.093 $\pm$ 0.002
	0.091	
	0.094	
1.5	0.134	0.131 $\pm$ 0.003
	0.129	
	0.131	
2.0	0.173	0.173 $\pm$ 0.001
	0.173	
	0.174	
2.5	0.211	0.208 $\pm$ 0.003
	0.208	
	0.206	
5.0	0.423	0.420 $\pm$ 0.002
	0.419	
	0.419	
7.0	0.599	0.601 $\pm$ 0.002
	0.603	
	0.600	
9.0	0.768	0.767 $\pm$ 0.001
	0.767	
	0.767	
10.0	0.844	0.843 $\pm$ 0.003
	0.84	
	0.846	

W programie Excel sporządzono wykres krzywej kalibracyjnej, która przedstawia zależność między absorbancją, a stężeniem (**Rysunek 4**). Przy użyciu metody najmniejszych kwadratów opracowano funkcję kalibracyjną w postaci:

$$y = bx + a \quad (1)$$

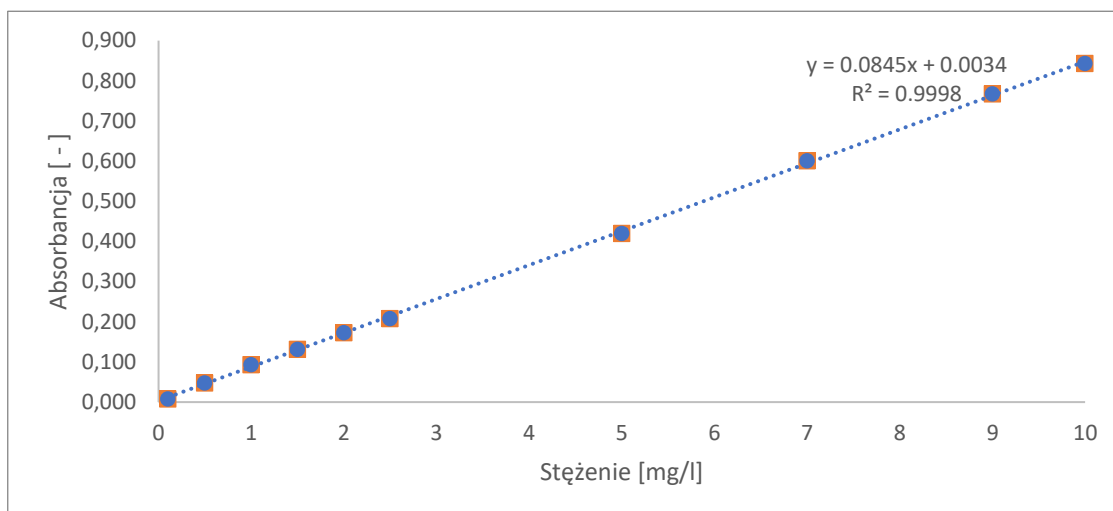
gdzie:

y – absorbancja [-],

x – stężenie [mg/l],

b – nachylenie [mg/l],

a – wyraz wolny [-].



Rysunek 4. Wykres krzywej kalibracyjnej wzorca β -karotenu dla $\lambda = 454$ nm.

Jak wynika z otrzymanych danych metoda jest liniowa w całym zakresie badanych stężeń (od 0 do 10 mg/l).

3. Wyniki i dyskusja

W celu ustalenia zawartości β -karotenu w badanych produktach przeprowadzono serię pomiarów spektrofotometrycznych roztworów przy wybranej uprzednio długości fali $\lambda_{\max}$. Dla każdego z produktów wykonano trzy pomiary wartości absorbancji. Następnie korzystając z wyznaczonej wcześniej funkcji kalibracyjnej dokonano jej przekształcenia do postaci funkcji analitycznej, z której możliwe jest obliczenie stężenia analitu w badanej próbce. Postać ogólna funkcji analitycznej:

$$x = \frac{y-a}{b} \quad (2)$$

Na podstawie uzyskanych pomiarów absorbancji dla badanych substancji oraz wyznaczonej funkcji analitycznej wyznaczono średnie stężenie β -karotenu w roztworach. Następnie uwzględniając objętość rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji, masę naważki oraz zastosowane rozcieńczenie przeliczono zawartość β -karotenu na 100 g produktu badanego (**Tabela 2**).

Tabela 2. Stężenie β -karotenu w analizowanych próbkach żywności.

Substancja badana	Stężenie średnie [mg/l] $\pm$ odchylenie	Zawartość [mg/100g]
Dynia	2.18 $\pm$ 0.02	2.18
Batat	11.10 $\pm$ 0.03	11.10
Papryka	1.62 $\pm$ 0.02	64.60
„Pierwsza marchewka” Hipp	2.42 $\pm$ 0.05	96.67
Marchewka	1.56 $\pm$ 0.03	62.22

Dokonując analizy uzyskanych wyników można zauważyć, iż największą ilość β -karotenu udało się oznaczyć w słoiczku „Pierwsza marchewka” marki Hipp (96.67 mg/100 g produktu). Podobne, stosunkowo wysokie wyniki uzyskano dla marchewki oraz papryki (kolejno 62.22 mg i 64.60 mg /100 g produktu). Z kolei najmniej poszukiwanej substancji znajdowało się w dyni (2.18 mg/100 g produktu).

Znaczna rozbieżność pomiędzy danymi literaturowymi przedstawionymi w rozdziale 1, a wynikami uzyskanymi podczas przeprowadzonego doświadczenia może sugerować, że metoda ta nie jest specyficzna. Podczas ekstrakcji mogło dojść do wyekstrahowania innego składnika, który powoduje absorpcję promieniowania w podobnym zakresie co β -karoten co prowadzi do zwiększenia wartości odczytanej absorpcji zgodnie z prawem addytywności. Rozbieżności między wynikami mogą również wynikać z różnorodnych czynników wpływających na jego poziom w produktach. Zawartość β -karotenu zależy m.in. od pochodzenia surowców, ich gatunku czy odmiany, warunków, w jakich dojrzewały, takich jak nasłonecznienie, temperatura czy dostęp do składników odżywczych w glebie, co może prowadzić do naturalnych różnic w wynikach analiz. Do dokładnego porównania konieczne więc byłoby poznanie źródła upraw produktów wykorzystanych zarówno do badań w przedstawionej literaturze jak i tych wykorzystanych do badania w przedstawionym artykule.

4. Podsumowanie

Celem niniejszej pracy było oznaczenie β -karotenu w produktach spożywczych z zastosowaniem spektrofotometrii UV-Vis. W ramach realizacji tego celu, kluczowym krokiem było zaplanowanie poszczególnych etapów procesu analitycznego. Z uwagi na charakterystykę badanej substancji, dokonano selekcji odpowiednich materiałów do analizy. Dodatkowo, dobrano niezbędne odczynniki chemiczne oraz szkło laboratoryjne, co umożliwiło przeprowadzenie doświadczenia.

Literatura

- [1] (Eggersdorfer, M., & Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. Archives of Biochemistry and Biophysics, 652, 18–26. doi:10.1016/j.abb.2018.06.001)
- [2] (Z. E. Sikorski et al., *Chemia żywności*, 5th ed., vol. 1. Warszawa: Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, 2007.)
- [3] (J. Higdon, V. J. Drake, and B. Delage, “Carotenoids w: Oregon State University Micronutrient Information Center,” Linus Pauling Institute, 2004. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/carotenoids#food-sources> (accessed Nov. 12, 2024).
- [4] (K. Gul, A. Tak, A. K. Singh, P. Singh, B. Yousuf, and A. A. Wani, “Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -carotene - A review,” Cogent Food Agric, vol. 1, no. 1, 2015, doi: 10.1080/23311932.2015.1018696.)
- [5] (H. M. M. Ramalho, J. Santos, S. Casal, M. R. Alves, i M. B. P. P. Oliveira, „Fat-soluble vitamin (A, D, E, and β -carotene) contents from a Portuguese autochthonous cow breed-Minhota”, J Dairy Sci, t. 95, nr 10, s. 5476–5484, paź. 2012, doi: 10.3168/jds.2010-3975.)
- [6] Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J. (2018). β -Carotene—properties and production methods. Food Quality and Safety, 2(2), 69–74. doi:10.1093/fqsafe/fyy004
- [7] W. W. Kubiak et al., *Instrumentalne metody analizy chemicznej*. Kraków: Wydawnictwo Naukowe AKAPIT, 2005.
- [8] S. Kumar Bhardwaj, „A Review: HPLC Method Development and Validation”, 2015. [Online]. Dostępne na: <http://www.urpjournals.com>
- [9] M. R. Shishehbore, A. Sheibani, i A. Haghdost, „Kinetic spectrophotometric method as a new strategy for the determination of vitamin B 9 in pharmaceutical and biological samples”, Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, t. 81, nr 1, s. 304–307, paź. 2011, doi: 10.1016/j.saa.2011.06.015.
- [10] Sigma-Aldrich, “Karta charakterystyki beta-karotenu firmy Sigma-Aldrich.” <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/sigma/c9750> (accessed Nov. 25, 2024).
- [11] Avantor Performance Materials Poland S. A., “Karta charakterystyki acetonu firmy Avantor Performance Materials Poland S. A.” https://www.poch.com.pl/1/wysw/msds_clp.php?A=591007d9fa83b7800001 (accessed Nov. 25, 2024).
- [12] (K.T. Amorim-Carrilho, A. Cepeda, C. Fente, P. Regal, Review of methods for analysis of carotenoids, TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 56, 2014, Pages 49-73)