

Disciplina de biochimie-chimie sanitară (cond.: prof. dr. V. Bota, doctor în chimie)
a I.M.F. din Tirgu-Mureș

SEPARAREA ȘI DETERMINAREA CAROTENILOR TOTALI DIN CONCENTRATE DE LEGUME ȘI CITRICE ȘI DIN BĂUTURI NEALCOOLICE

V. Bota, I. Máthé, Iulia Kovács, Alexandrina Oșan

Concentratele de morcovi și citrice sînt folosite în industria alimentară pînă la obținerea unor băuturi nealcoolice care constituie surse de caroteni, provitamine A, și de săruri, mai ales potasiu. Pentru a evalua aportul în provitamine A al acestor băuturi și deci al valorii lor alimentare este necesară cunoașterea cît mai exactă a conținutului în caroteni al materiilor prime folosite la obținerea lor și al băuturilor înseși.

La solicitarea unor întreprinderi producătoare de băuturi nealcoolice ne-am propus cercetarea metodelor de separare și determinare a carotenilor din concentrate de morcovi și citrice precum și din unele băuturi obținute din acestea.

Pentru determinarea conținutului total de caroteni s-au încercat unele metode semnalate în literatura de specialitate (2—9) și aplicarea lor la sucurile și concentratele de morcovi sau citrice.

Material și metodă

Dintre metodele de extracție a carotenilor totali s-au experimentat acelea care permiteau separarea carotenilor de xantofile și în special a beta-carotenului.

Materialele asupra cărora s-au experimentat metodele de extracție și de dozare au fost: sucuri concentrate de morcovi și concentrate citrice (de portocale și de mandarine), siropul concentrat de morcovi și citrice cu lecitină (Bem-Bem).

I. Metode de extracție

Dintre metodele de extracție și determinare aplicabile materialelor cercetate au fost studiate:

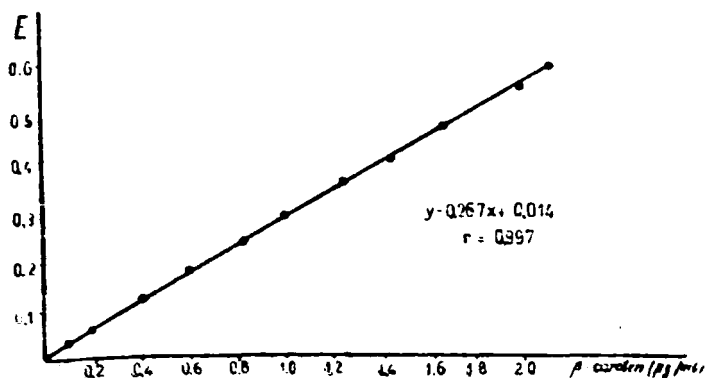
1. Extracția cu eter de petrol și acetona.
2. Extracția cu eter de petrol și alcool.
3. Extracția și determinarea carotenilor din sirop concentrat de morcovi și citrice cu conținut de lecitină.
4. Extracția și determinarea carotenilor prin metoda Racevski.

5. Extracția cu eter de petrol și acetonă urmată de separare pe coloană cu MgO +celuloză.

1. Extracția cu eter de petrol și acetonă și determinarea carotinoidelor din sucuri concentrate de morcovi și citrice: 0,5 ml suc concentrat (1—10 ml în cazul sucurilor diluate) a fost tratat cu 50 ml acetonă într-o pilnie de separare. După agitare timp de 3—5 minute soluția a fost filtrată la trompă. Reziduuul de pe hirtia de filtru s-a spălat cu porțiuni mici de acetonă pînă la completa decolorare. Soluțiile de spălare colectate au fost adăugate la soluția primă de extracție. Soluția acetonică a fost introdusă într-o pilnie de separare și tratată cu 50 ml eter de petrol. După agitare s-au adăugat 25 ml apă pentru separarea stratului eteric, care conținea carotenii, de stratul acetonic apos cu xantofile. După separarea stratului eteric superior, soluția apoasă a fost re-extrasă de 2—3 ori cu cîte 25 ml eter de petrol pînă ce aceasta nu a mai fost colorată. Soluțiile eterice reunite, au fost spălate cu 100 ml apă distilată, stratul eteric a fost anhidrificat cu sulfat de sodiu și concentrat prin distilare pe baia de apă pînă la aproximativ 10 ml. Soluția eterică a fost transvazată cantitativ într-un balon cotat de 50 ml și completată cu eter de petrol pînă la semn. Toate operațiile de extracție au fost executate în pilnii acoperite cu hirtie neagră pentru a le proteja de accesul luminii. Extincția soluției eterice a fost citită imediat la un spectrofotometru VSU-2P în cuva de 1 cm grosime la $\lambda = 440$ nm față de eter de petrol ca martor.

Concentrația soluției s-a apreciat din curba de etalonare trasată pe baza extincțiilor date de o soluție apoasă conținînd 360 mg $K_2Cr_2O_7$ p.á./1000 ml, 1 ml din această soluție corespunde la 2,08 μg beta caroten. Din această soluție, prin diluare s-a realizat o serie de etalonare conținînd diferite concentrații de bicromat de potasiu (50; 100; 160; 200; 260; 300; 360; mg/l) (fig. nr. 1).

Rezultatele experimentale sînt cuprinse în tabelul nr. 1.



2. Extracția cu eter de petrol și alcool și determinarea carotenilor din sucuri concentrate de morcovi și citrice: 0,5 ml suc concentrat (1—10 ml în cazul sucurilor diluate) s-a extras cu alcool de 95% la fierbere timp de 30 de minute. Soluția galbenă a fost diluată cu apă până la un conținut în alcool de 85%. După răcire s-a agitat într-o pilnie de separare cu 25 ml eter de petrol. Stratul eteric conținea carotenii iar stratul alcoolic apos inferior xantofilele. Extracția a fost apoi repetată cu cite 25 ml eter până ce stratul eteric a devenit incolor. Extractele eterice reunite într-o pilnie de separare au fost spălate cu o soluție apoasă de alcool 85% pentru îndepărtarea urmelor de xantofile. Soluția eterică a fost anhidrificată cu sulfat de sodiu și apoi s-a procedat ca și în cazul arătat la extracția cu acetonă. Rezultatele experimentale sînt cuprinse în tabelul nr. 1.

3. Extracția și determinarea carotenilor din sirop concentrat de morcovi și citrice cu conținut de lecitina (sirop Bem-Bem).

Din aceste siropuri carotenii au fost extrași cu acetonă și eter. Deoarece lecitina formează o emulsie care face dificilă separarea stratului eteric s-a cercetat posibilitatea extragerii fără saponificare cu KOH alcoolic și după saponificare.

a) extracția fără saponificare: 5 ml sirop s-a tratat cu 50 ml acetonă și după agitare într-o pilnie de separare s-au introdus 50 ml eter de petrol. S-a agitat 5 minute și s-au adăugat 50 ml apă apoi s-a separat stratul eteric. Extracția s-a repetat de 3 ori cu cite 25 ml eter. Extractele eterice au fost spălate de cite două ori cu 100 ml apă și apoi prelucrate ca și în cazul sucurilor concentrate de citrice și morcovi.

b) extracția după saponificare cu KOH alcoolic 12%: 5 ml sirop s-a introdus într-un balon prevăzut cu refrigerent ascendent. S-au adăugat 50 ml KOH alcoolic 12% și s-a încălzit pe baia de apă la fierbere timp de o oră. După răcire s-a transvazat într-o pilnie de separare și s-au extras carotenii cu 25 ml eter de petrol. Soluția apoasă a fost reextrasă cu eter de petrol în cantități de cite 25 ml până ce stratul eteric separat ajunge incolor. Soluțiile eterice reunite au fost spălate cu 400 ml apă de trei ori. Neutralitatea soluției apoase a fost controlată cu hirtie de turnesol. Soluția eterică de caroteni a fost deshidratată cu Na_2SO_4 , concentrată prin distilare și prelucrată ca în cazul sucurilor concentrate de morcovi sau citrice.

4. Extracția și determinarea carotenilor prin metoda Racevski.

S-a procedat la o extragere cu acetonă și eter de petrol după metoda Racevski (7).

Rezultatele experimentale sînt cuprinse în tabelul nr. 2.

5. Extracția cu eter de petrol și acetonă urmată de separarea carotenilor pe coloană cu MgO + celuloză.

În urma studierii diferiților adsorbanți indicați în literatura de specialitate s-a ajuns la concluzia că dintre cei accesibili care permit o separare bună a carotenilor este amestecul de MgO și celuloză 1 : 1. După activarea amestecului la 140° C timp de 30 minute s-a introdus într-o coloană de 25 cm și \varnothing interior de 14 mm realizîndu-se un strat de 12 cm. La suprafața acestui strat s-a pus sulfat de sodiu anhidru în grosime de 1 cm. Coloana a fost spălată cu un amestec de eter de petrol și acetonă 5% până ce soluția de spălare a prezentat extincția 0.

Soluția de caroteni obținută prin extracția cu eter de petrol și acetonă a fost concentrată la un volum de aproximativ 1 ml și aplicată pe coloană. Balonul de distilare a fost spălat de 3 ori cu cite 0,5 ml eter de petrol iar soluțiile obținute au fost aplicate pe coloană. Coloana a fost supusă unei sugeri la trompa de apă pînă la adsorbția totală a carotenilor. Eluarea coloanei s-a făcut cu 50 ml eter conținînd 5% acetonă. Viteza de scurgere a fost de 1 ml/minut. Colectarea fracțiunilor s-a făcut pînă ce eluatul a fost incolor. Fracțiunile separate s-au adus la 50 ml cu eter de petrol. S-a citit extincția la 440 nm în cuva de 1 cm grosime iar concentrația a fost exprimată pe baza curbei de etalonare. Rezultatele experimentale sînt trecute în tabelul nr. 1.

II. *Determinarea spectrelor de adsorbție ale carotenilor din soluțiile obținute din suc concentrat de morcovi și sirop concentrat de morcovi și citrice.*

Pentru identificarea componenților carotenici din sucurile concentrate de morcovi și componente ale siropului de morcovi și citrice s-au înregistrat spectrele de adsorbție ale soluțiilor eterice obținute prin extracție înainte și după adsorbție și eluție pe coloana de MgO + celuloză. Absorbțiile maxime obținute au fost comparate cu valorile găsite în literatura de specialitate pentru alfa-, beta- și alfa-beta și gama-caroteni.

Rezultate și discuții

În tabelul nr. 1., sînt arătate valorile experimentale și rezultatele calculului statistic la determinarea spectrofotometrică a carotenilor din: concentrate de citrice, sucuri de morcovi, sucuri de morcovi + citrice și lecitină, după extracție cu acetonă și eter, alcool și eter, înainte și după saponificare. De asemenea sînt prezentate rezultatele determinării carotenilor totali; după extracție cu acetonă și eter după sperare pe coloană de MgO + celuloză.

Tabelul nr. 1

Produsul	Metoda de extracție	Valoarea medie mg ⁰ / ₀	Eroarea medie	Deviația standard
Concentrat de citrice	Acetonă și eter de petrol	7,70	0,28	0,139
	Alcool și eter de petrol	7,93	0,14	0,183
Suc de morcovi	Acetonă și eter de petrol	3,15	0,12	0,156
	Alcool și eter de petrol	3,01	0,12	0,015
Sirop conc. de morcovi și citrice cu lecitină	Acetonă și eter	0,71	0,03	0,046
	Acetonă și eter după saponificare	0,64	0,06	0,023
Suc de morcovi	Acetonă și eter de petrol	1,91	0,04	0,054
	Acetonă și eter de petrol separare pe MgO + celuloză	1,85	0,11	0,275

În tabelul nr. 2 sînt trecute rezultatele experimentale ale determinării spectrofotometrice a carotenilor totali comparativ cu metoda Racevski.

Tabelul nr. 3 cuprinde adsorbțiile maxime ale alfa, beta și gama carotenilor găsite în literatura de specialitate, iar tabelul nr. 4 prezintă maximele determinate în suc de morcovi și în siropul de morcovi cu citrice și lecitină după extragere eu eter de petrol.

Tabelul nr. 2

Produsul	Metoda de extracție	Valoarea medie mg ⁰ / _g	Diferența mg ⁰ / _g
Conc. de citrice I	Metoda Racevski	5,46	2,21
	M. spectrofotometrică	3,25	
Conc. de citrice II	Metoda Racevski	7,26	3,54
	M. spectrofotometrică	3,72	
Conc. de citrice III	Metoda Racevski	6,23	0,79
	M. spectrofotometrică	5,44	
Sirop concentrat de morcovi și citrice cu lecitină	Metoda Racevski	1,09	0,44
	M. spectrofotometrică	0,64	

Tabelul nr. 3

Carotenu	M ₁	M ₂	M ₃
alfa-carotenu	422	444	473
beta-carotenu	427	451	478
gama-carotenu	437	462	494

Tabelul nr. 4

Produsul cercetat	M ₁	M ₂	M ₃
Suc de morcovi	425—430	445	475
Suc de morcovi după trecere prin coloană	—	445—453	470
Sirop de morcovi cu citrice și lecitină	425—430	447	465—475
După saponificare	425—430	447	475
Sirop de morcovi și citrice cu lecitină după saponificare și trecere prin coloană	—	447—455	470

Din tabelul nr. 1 rezultă că determinarea spectrofotometrică a carotenilor totali după extracție cu acetonă și eter sau alcool și eter din concentrate de citrice și sucuri de morcovi este afectată de o eroare mică, până la 0,2 mg⁰/₀. Diferențele între valorile găsite sint mici, în jur de 0,1—0,2 mg⁰/₀. Deoarece metoda cu acetonă și eter de petrol este mai simplă, nu necesită o extracție la cald, optăm pentru folosirea acesteia.

În cazul determinării carotenilor din suc de morcovi după trecerea extractului eteric peste coloana cu MgO și celuloză se observă separarea a două zone: o zonă superioară foarte îngustă și o zonă inferioară lată. Dozarea spectrofotometrică a soluției după eluare cu eter de petrol și acetonă (5⁰/₀) dă o valoare mai mică pentru carotenii totali exprimați în beta caroten decît la dozarea directă din extractul eteric.

Determinarea spectrofotometrică a carotenilor totali din siropul de morcovi și citrice conținînd și lecitină dă valori puțin mai mici cu 0,07 mg⁰/₀ în cazul saponificării prealabile a produsului cu KOH alcoolic.

Metoda Racevski de determinare a carotenilor totali dă valori mult mai mari (cu peste 40 mg⁰/₀) comparativ cu metoda spectrofotometrică (tabelul nr. 2). Metoda Racevski dă numai valori orientative.

Cercetînd spectrele de absorbție ale extractelor obținute din sucuri de morcovi se observă existența celor 3 maxime indicate în literatura de specialitate pentru alfa și beta caroteni. În cazul extractului separat după trecerea pe coloană cu MgO și celuloză maximul corespunzător alfa carotenului la 422 dispăre. La siropul de morcovi și citrice conținînd și lecitină s-au pus în evidență maximele de absorbție corespunzătoare alfa și beta carotenilor. Saponificarea nu modifică practic poziția maximului de absorbție. După trecerea peste coloana de MgO + celuloză, maximele de la 420, 427 observate la alfa și beta caroteni se deplasează spre valori de undă mai mici sub 420 nm. Maximul de absorbție de la 494 corespunzător gama carotenului nu a fost observat, ceea ce indică absența acestuia în materialele cercetate.

Bibliografie

1. *** European J. Biochem. (1972), 25, 397; 2. *Fragner J.*: Vitamine chemie und Biochemie, Ed. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, Band. I. 1964, Band. II. 1965; 3. *Paech K., Tracey M.V.*: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Springer Verlag, Berlin-Göttingen, 1955, 303; 4. *Joslyn M.A.*: Methods in food analysis. Academic Press, New York — London. 1970, 781; 5. *Leconte R., Seilleur R.*: Nutrition Abstr. Rev. (1954). 24, 780; 6. *Strohecker R., Henning H.M.*: Vitamin Bestimmungen. Verlag Chemie G.M.B.H., Weinheim, 1963, 62; 7. *Dumitru I.F.*: Lucrări practice de biochimie. Ed. Did. și Ped., București, 1967, 256; 8. *Welcher F.J.*: Standard methods of chemical analysis. Part. B. Van Nostrand Company Inc., Princeton — New Jersey, 1963, 2344; 9. *Rendina G.*: Experimental method in modern biochemistry. W.B. Saunders Company, Philadelphia — London Toronto, 1971, 169.

V. Bota, I. Máthé, Iulia Kovács, Alexandrina Oşan

**SEPARATION AND DETERMINATION OF TOTAL CAROTENES
IN VEGETABLE AND CITRUS CONCENTRATIONS AND IN
NON-ALCOHOLIC DRINKS**

The authors have investigated the method of separation and determination of carotenes in carrot and citrus concentrates and in some drinks made of them. The studies led to the conclusion that the method of carotene extraction with acetone and petroleum ether from citrus concentrations and carrot juice followed by spectrophotometric determination was the best.

In the carrot and citrus juice extracts they identified alpha-, beta- and gamma-carotenes according to the maximums of absorption.
