

**CAROTENOIDE.**  
**DOZAREA CAROTENULUI DIN MORCOV**  
**- laborator -**

Carotenoidele sunt substanțe de natură terpenoidică, cu un număr de 40 de atomi de carbon în moleculă, de culoare galbenă, portocalie sau roșie, ce prezintă proprietăți puternic lipofile. Acestea se găsesc în multe specii, pornind de la pigmentii colorați din bacterii și până la majoritatea plantelor superioare.

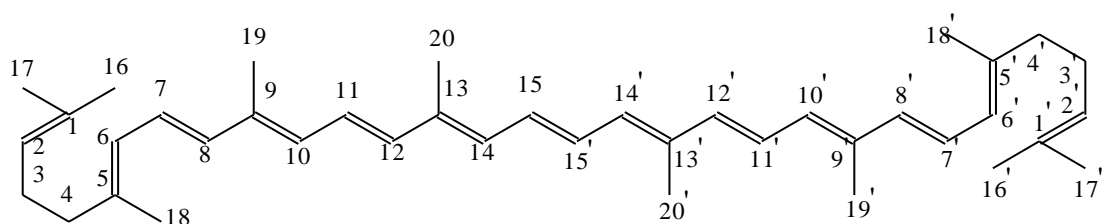
Structura carotenoidelor se particularizează prin faptul că acestea prezintă în moleculă 40 de atomi de carbon și un număr considerabil de duble legături conjugate. Există mai multe tipuri de clasificări, cele mai simple fiind cele care grupează acești compuși în incolori și colorați, respectiv în caroteni (pentru hidrocarburile carotenoidice) și xantofile (pentru compușii oxigenați).

Un sistem mai natural, de considerare structurală dar și de clasificare este cel prin care se face distincția între carotenoidele aciclice, monociclice și biciclice, indiferent dacă este vorba de hidrocarburi sau compuși oxigenați deoarece, linia de biosinteză fiind aceeași, oxigenarea reprezintă o etapă colaterală pentru oricare dintre structurile hidrocarburi de bază.

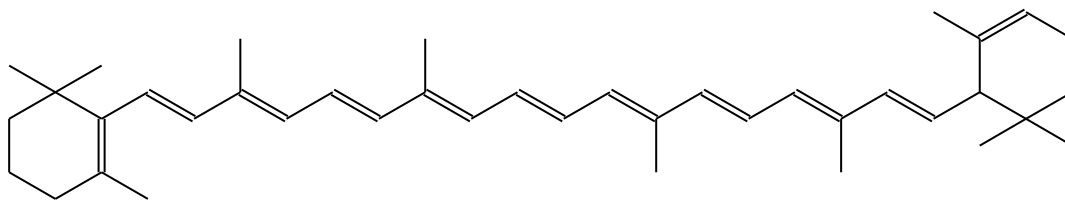
- în funcție de *structura chimică*:
  - hidrocarburi carotenoidice sau carotine;
  - derivați oxigenați ai hidrocarburilor sau xantofile;
  - esteri, eteri, glicozide ale xantofilelor și epoxizi ai hidrocarburilor;
  - ceto- și aldocarotenoide;
  - acizi carotenoidici;
  - carotenoide cu cicluri aromatice;
  - carotenoide acetilenice;
  - carotenoide alenice;
  - carotenoide cu pentaciclu.
- în funcție de *numărul de atomi de carbon* în moleculă:
  - cu 40 – 50 atomi de carbon: homocarotenoide sau carotenoide superioare;
  - cu 40 atomi de carbon: carotenoide;
  - cu 20 – 40 atomi de carbon: apocarotenoide sau carotenoide degradate;
  - cu 30 atomi de carbon: diapocarotenoide.
- în funcție de *natura sistemului polienic*:
  - cu sistem polienic normal;
  - cu sistem polienic de formă retro.

Ca structură aciclică tipică se prezintă structura licopenului (licopină), din fructele de tomate, hidrocarbură tetraterpenoidică cu 13 duble legături. Numerotarea este realizată după un sistem simetric care presupune formula ca o bis-diterpenă.

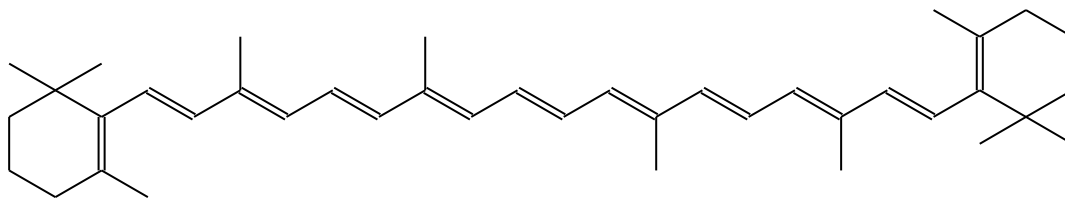
Prin închiderea capătului catenei polienice, datorită structurii pseudociclice și ca urmare a unui proces de ciclizare, se formează structura  $\beta$ -iononică, tipică pentru grupa carotenoidelor.



*licopen*



*α-caroten*



*β-caroten*

Pentru denumirea carotenoidelor (care sunt în jur de 500) se folosește de obicei nomenclatura nesistematică, ce utilizează de cele mai multe ori sursa de obținere (caroten provine de la carrot – morcov), dar s-a dezvoltat și o nomenclatură sistematică ce ia în considerare tipul de grupă terminală de la capătul lanțului polienic (există șapte astfel de grupări terminale). De exemplu,  $\alpha$ -carotenul este, conform acestei nomenclaturi,  $\beta,\epsilon$ -caroten.

Carotenoidelor pot fi separate prin extracție cu solvenți organici nepolari (benzen, eter de petrol, eter etilic) și distilare cu obținerea carotenoidelor brute, ce mai conțin și alte lipide. Purificarea se face prin hidroliza bazică a lipidelor și esterilor carotenoidelor și cristalizarea carotenilor din eter de petrol – metanol. O purificare mai avansată se face prin fracționare pe coloană cromatografică.

În stare pură carotenoidelor sunt substanțe solide cu punct de topire apropiat de 200°C ( $\beta$ -carotenul are intervalul de topire 181 – 184°C). Culoarea lor variază în soluție, în funcție de concentrație, de la galben la roșu. Carotenoidelor hidrocarbonate pure sunt de culoare roșie, iar xantofilele prezintă diverse nuanțe de galben. În general, carotenoidelor sunt puternic lipofile, foarte labile, ușor oxidabile, îndeosebi în prezența aerului, căldurii și luminii.

Pentru identificarea carotenoidelor se folosesc diverse reacții de culoare (colorație albastră cu triclorura de stibiu în soluție cloroformică), cromatografia în strat subțire sau pe hârtie impregnată cu oxid de aluminiu, spectroscopiile UV, IR,  $^1\text{H-RMN}$  și MS.

Pentru dozare nu există o metodă generală, existând o metodă volumetrică pentru determinarea  $\beta$ -carotenului din produse vegetale. O separare eficientă a  $\beta$ -carotenului se obține la trecerea soluției extractive pe o coloană de oxid de aluminiu și eluarea zonei corespunzătoare carotenului, apoi fotometrare. Metodele utilizate astăzi sunt cele spectrofotometrice, unde se pune însă problema unor etaloane cu grad de puritate înalt.

### **Scopul lucrării**

În lucrare se va urmări identificarea și dozarea carotenului din morcovi și aprofundarea studierii coloranților naturali prin metode spectrofotometrice.

### **Mod de lucru:**

Pentru separarea și dozarea carotenului se va utiliza metoda spectrofotometrică, ce presupune extracția pigmentilor liposolubili, cromatografierea acestora pentru îndepărtarea clorofililor și hidroxicarotenilor, apoi determinarea spectrofotometrică a carotenilor exprimați ca  $\beta$ -caroten.

#### **A. Reactanți**

(a) *Acetonă* – uscată, liberă de alcool. Pentru uscare se tratează cu  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidru și se distilă de pe Zn granular de circa 10 mesh;

(b) *Hexan comercial* – cu interval de fierbere 60 – 70°C; se distilă de pe KOH;

(c) *Adsorbant* – Magnezie activată;

(d) *Pământ de diatomee*

#### **B. Extracția**

Se taie mărunț materialul vegetal cu ajutorul unui cuțit sau se macină cu ajutorul unui robot de bucătărie. Dacă analiza nu se realizează imediat, se introduce proba în apă fiartă timp de 5 – 10 minute și se stochează la rece. Se introduc 2 – 5 g probă cântărită exact într-un extractor cu agitare intensă, se adaugă 40 ml acetonă, 60 ml hexan și 0.1 g  $\text{MgCO}_3$  și se agită 5 minute. Se filtrează la vid sau se lasă să stea până se separă straturile și se decantează supernatantul într-un separator. Se spală reziduu de două ori cu câte 25 ml acetonă, apoi cu 25 ml hexan și se combină extractele. Se spală acetona din extract cu câte 100 ml apă în cinci porțiuni, se transferă stratul superior într-un balon cotat de 100 ml ce conține 9 ml acetonă și se diluează la volum cu hexan. Se poate utiliza pentru extracție și alcool în locul acetonei. Se vor folosi 80 ml alcool și 60 ml hexan la extracția prin agitare, restul volumelor fiind identice cu cele ale acetonei.

#### **C. Separarea pigmentilor**

Se introduce un amestec de magnezie activată – pământ de diatomee (1:1) într-un tub cromatografic de 175 x 22 mm subțiat la partea inferioară la 10 mm. Pentru prepararea coloanei se pune puțină vată de sticlă sau de bumbac în interiorul tubului și se adaugă adsorbant pe o înălțime de 15 cm, apoi se conectează coloana la un sistem de vidare cu trompă de apă. Pentru presarea ușoară a adsorbantului se utilizează un instrument cu capăt plat (coloana împachetată trebuie să aibă aproximativ 10 cm înălțime). Se adaugă apoi un strat de 1 cm de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidru peste adsorbant.

Cu sistemul de vacuumare conectat se introduce extractul în coloană. Se utilizează 50 ml amestec acetonă – hexan (1:9) pentru dezvoltarea cromatogramei și se spală carotenul vizibil prin adsorbant. Pe parcursul întregii operații se menține partea superioară a coloanei acoperită cu un strat de solvent.

Se colectează eluatul (carotenii trec rapid prin coloană; benzile de xantofile, produși de oxidare ai carotenilor și clorofile trebuie să rămână în coloană la finalizarea operației). Se transferă eluatul, care va avea un volum mai mic datorită pierderii unei părți din solvent prin

vacuumare, într-un balon cotate de 100 ml, se diluează la volum cu acetonă – hexan (1:9) și se determină conținutul de caroten prin fotometrare.

#### **D. Determinare**

Se măsoară  $A$  rapid pentru minimizarea pierderilor prin izomerizare și oxidare (la început se calibrează spectrofotometrul prin citirea unei soluții standard la intervale de 1 nm între 431 și 441 nm; maximul trebuie să fie la 436 nm).

Se determină  $A$  pentru fracțiunea carotenică la 436 nm, corectându-se volumele de soluție pentru a obține  $A$  între 0.25 și 0.75.

#### **E. Calcul**

Se va utiliza ecuația următoare pentru a obține concentrația de caroten, în care  $b$  – lungimea cuvei în cm;  $d$  – factorul de diluție (g probă x ml extract din coloană) / (50 ml fază superioară x ml diluție finală);  $f$  – factorul de deviație al instrumentului (0.460 /  $A_{436}$ ).

$$\text{Concentrația fracției de caroten (mg/g)} = 1/453.59 \times (A_{436} \times 454 \times f) / (196 \times b \times d)$$