

WPLYW ROZDROBNIENIA PRÓBKI NA WYDAJNOŚĆ EKSTRAKCJI β – KAROTENU Z KORZENIA MARCHWI

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

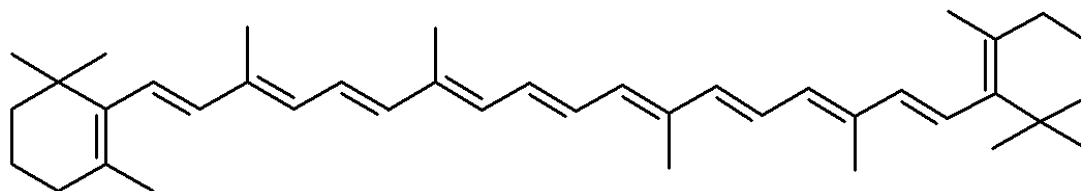
Przygotowała mgr Monika Osmolak i dr Kamila Borowczyk

I. Wprowadzenie

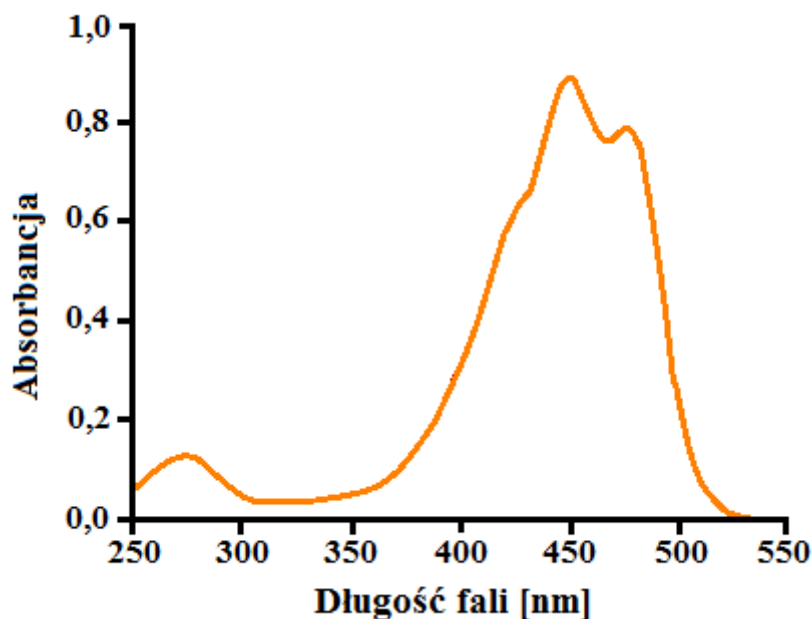
I.1. Karotenoidy

Karotenoidy są barwnikami, pochodnymi izoprenu należącymi do grupy terpenoidów. Dzieli się na pomarańczowe karoteny, zbudowane wyłącznie z atomów węgla i wodoru oraz żółte i pomarańczowe ksantofile, zawierające dodatkowo atomy tlenu. Karotenoidy mają charakterystyczną budowę. W większości tych związków występują dwa pierścienie cykloheksylowe połączone długim łańcuchem węglowym, w którym występują na przemian wiązania pojedyncze i podwójne. Takie ułożenie wiązań tworzy układ sprzężony, który umożliwia absorpcję światła. Karotenoidy występują zarówno w świecie roślin, jaki i zwierząt pełniąc zróżnicowane funkcje. Niektóre z tych związków odgrywają ważną rolę w procesie fotosyntezy, inne zaś nadają barwę owocom i kwiatom.

Najbardziej rozpowszechnionym w przyrodzie karotenoidem jest β – karoten (Rys. 1), charakteryzujący się największą aktywnością spośród prowitamin A. W stanie wolnym występuje w postaci krystalicznego proszku o ciemnoczerwonym zabarwieniu. Rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak: chloroform, dichlorometan, heksan, a także w disiarczku węgla. Słabo rozpuszcza się w wodzie. Absorbuje promieniowanie o długości fali $\lambda = 449$ i 475 nm (w metanolu). Widmo absorpcji β – karotenu przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 1. Struktura chemiczna β – karotenu.



Rys. 2. Widmo absorpcji β – karotenu.

β – karoten wykazuje aktywność przeciwutleniającą, która wynika z obecnością wiązań podwójnych w jego strukturze chemicznej. Korzystnie wpływa na funkcjonowanie systemu immunologicznego oraz zapewnia prawidłowe funkcjonowanie narządu wzroku. Ponadto przyczynia się do redukcji liczby komórek nowotworowych w organizmie i odgrywa istotną rolę w profilaktyce przeciwmiażdżycowej, wpływając na obniżenie stężenia cholesterolu. Dzienna dawka β – karotenu w diecie człowieka wynosi od 1,3 do 2,9 mg. Najbardziej zasobnymi w β – karoten produktami pokarmowymi są marchew, słodkie ziemniaki, czerwona papryka, dynia, brzoskwinie, szpinak i arbuz.

I.2. Ekstrakcja

Ekstrakcja jest powszechnie stosowaną techniką rozdzielania i oczyszczania składników mieszanin. Polega na rozpuszczeniu poszczególnych substancji lub grup związków chemicznych w odpowiednim rozpuszczalniku i oddzieleniu ich w postaci roztworu od pozostałych składników próbki. W trakcie procesu ekstrakcji ma miejsce transport składników

z próbki, nazywanej matrycą pierwotną do matrycy odbierającej tzw. wtórnej, która zazwyczaj ma jednoznacznie określony i prosty skład chemiczny. We współczesnych technikach ekstrakcji, jako matrycę odbierającą stosuje się nie tylko ciekłe rozpuszczalniki, ale także gazy, ciała stałe lub płyny w stanie nadkrytycznym.

Wykorzystanie ekstrakcji w procedurze analitycznej pozwala na:

- izolację poszczególnych składników lub całej grupy związków z pierwotnej próbki do matrycy o prostszym składzie, tym samym zmniejszenie interferencji innych składników na skutek przeniesienia do matrycy wtórnej tylko wybranych związków chemicznych,
- zatężenie próbki, czyli uzyskanie odpowiedniego stężenia analitu, umożliwiające zastosowanie wybranej techniki i przyrządu pomiarowego w celu analizy ilościowej.

Należy jednak pamiętać, że ekstrakcja, jak każdy etap w procedurze analitycznej wiąże się z możliwością utraty części analitów.

Wybór techniki ekstrakcji zależy przede wszystkim od stanu skupienia matrycy, właściwości i stężenia analitu oraz właściwości i stężenia substancji przeszkadzających. Technikę ekstrakcji należy dostosować do celu, czasu analizy, sposobu przygotowania próbki oraz czułości i selektywności metody końcowego oznaczania, jeśli takie jest stosowane.

Najstarszym rodzajem ekstrakcji stosowanym w analityce, a zarazem najpopularniejszą techniką izolacji analitów z próbek ciekłych jest ekstrakcja typu ciecz – ciecz (liquid – liquid extraction, LLE). Polega ona na przeniesieniu substancji rozpuszczonej w jednej fazie ciekłej do drugiej fazy ciekłej, niemieszającej się z pierwszą. Warunkiem prawidłowego przebiegu tego procesu jest występowanie dwóch faz ciekłych, które po zakończeniu procesu można łatwo rozdzielić mechanicznie. Najprostszym sposobem ekstrakcji ciecz – ciecz jest ekstrakcja w rozdzielniku. Próbkę ciekłą umieszcza się w rozdzielniku, dodaje rozpuszczalnik ekstrahujący i wytrząsa ręcznie lub mechanicznie. Następnie pozostawia do rozdzielenia warstw. Ekstrakcję powtarza się wielokrotnie, a połączone ekstrakty przemywa czystą cieczą, w której była rozpuszczona próbka.

Kolejnym typem ekstrakcji jest ekstrakcja w układzie ciało stałe – ciecz (ang. solid liquid extraction, SLE), która polega ona na wyodrębnieniu z ciała stałego składnika rozpuszczającego się w odpowiednim rozpuszczalniku. Ekstrakcję za pomocą cieczy stosuje się do wydzielania substancji z materiału roślinnego, z materiału pochodzenia zwierzęcego oraz z gleby i osadów. Ponadto ekstrakcja w układzie ciało stałe – ciecz jest często stosowana do desorpcji analitu z sorbentu stałego. Stosowane obecnie techniki ekstrakcji próbek stałych cieczą można podzielić na:

- techniki klasyczne, takie jak: ekstrakcja przez wytrząsanie oraz ekstrakcja przez homogenizację próbki z rozpuszczalnikiem,
- techniki klasyczne wspomagane np. ultradźwiękami czy promieniowaniem mikrofalowym,
- współczesne techniki ekstrakcji, z zastosowaniem niekonwencjonalnych rozpuszczalników oraz warunków procesu, np. ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym.

Klasyczne techniki ekstrakcji skutecznie wypierane są przez modyfikowane sposoby izolacji substancji. Stosowanie fizycznych metod wspomagających proces ekstrakcji, takich jak: zwiększanie ciśnienia ekstrahenta, stosowanie promieniowania mikrofalowego lub fal ultradźwiękowych, zdecydowanie zwiększa wydajność ekstrakcji oraz pozwala na ograniczenie zużycia lotnych i szkodliwych rozpuszczalników.

Najprostszą techniką klasyczną jest ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie, która przy tym jest czasochłonna i wymagająca dużej ilości ekstrahenta. Próbkę po rozdrobnieniu umieszcza się w naczyniu, zalewa rozpuszczalnikiem i wytrząsa. Najczęściej próbkę ekstrahuje się wielokrotnie, dodając za każdym razem świeżą porcję rozpuszczalnika. Uzyskane porcje ekstraktu łączy się, następnie sączy lub wiruje dla oddzielenia cząstek stałych próbki.

W przypadku próbek biologicznych często stosuje się homogenizację próbki z odpowiednim rozpuszczalnikiem. Próbkę zalewa się odpowiednim rozpuszczalnikiem i rozdrabnia z wykorzystaniem homogenizatora. Proces ekstrakcji zachodzi jednocześnie z rozdrabnianiem próbki. Uzyskany homogenat następnie poddaje się sączeniu lub częściej wirowaniu w celu oddzielenia nierozpuszczalnych pozostałości. Uzyskany osad można poddać powtórnej ekstrakcji. Powtarzanie tego procesu kilkoma porcjami świeżego rozpuszczalnika pozwala uzyskać większą wydajność ekstrakcji.

Oceny ilościowej procesu ekstrakcji można dokonać na podstawie **wydajności ekstrakcji (%E)**, która jest stosunkiem ilości substancji wyekstrahowanej, znajdującej się w eluencie do jej ilości w próbce wyjściowej. Na efektywność ekstrakcji wpływ mają takie czynniki jak: rodzaj substancji i stosowanego rozpuszczalnika, temperatura, intensywność wytrząsania oraz rozdrobnienie materiału.

II. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest określenie wpływu rozdrobnienia próbki na efektywność ekstrakcji β – karotenu z korzenia marchwi.

III. Odczynniki i aparatura

III.1. Odczynniki

- β – karoten
- metanol

III.2. Aparatura

- homogenizator IKA Labortechnik T25
- waga analityczna RADWAG WPE 60
- spektrofotometr UV-VIS
- kuweta kwarcowa 1 cm
- nóż,
- tarka
- szkiełko zegarkowe do krojenia
- łopatką ze stali nierdzewnej
- zlewki
- probówki zakręcane typu „falcon” o pojemności 15 mL
- kolbki szklane o pojemności 10 mL
- statyw na probówki
- pipety automatyczne 100 –1000 uL
- końcówki do pipet

IV. Wymagane środki ostrożności

- W trakcie wykonywania ćwiczenia student zobowiązany jest do noszenia odzieży ochronnej oraz okularów laboratoryjnych.
- Praca z rozpuszczalnikami organicznymi powinna odbywać się pod wyciągiem.
- Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- Szczegółowe opisy zagrożeń oraz sposoby postępowania w przypadkach niebezpiecznych sytuacji zawarte są w kartach charakterystyk, obecnych w pracowni laboratoryjnej.

V. Wykonanie ćwiczenia

V.1. Przygotowanie krzywej kalibracyjnej

Przygotować serię roztworów standardowych β – karotenu w metanolu o stężeniach 0; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 i 4,0 $\mu\text{g/mL}$. Następnie zmierzyć absorbancję przygotowanych roztworów przy długości fali 449 nm.

V.2. Przygotowanie próbek do ekstrakcji

Ekstrakcja przez wytrząsanie:

Pierwszą część oczyszczonego i umytego korzenia marchewki pokroić nożem na kawałki wielkości kostki o wymiarach 0,5 cm \times 0,5 cm \times 0,5 cm. Następnie do dwóch falkonów o pojemności 15 mL odważyć po 1 g pokrojonej marchewki. Przygotowane naważki ekstrahować 10-krotnym nadmiarem metanolu przez 5 min. Po zakończeniu procesu ekstrakcji przygotować 10-krotnie rozcieńczone próbki w kolbach o objętościach 10 mL. Zmierzyć absorbancję tak przygotowanych roztworów przy długości fali 499 nm względem metanolu.

Drugą część oczyszczonego i umytego korzenia marchewki zetrzeć na tarce na „dużych okach”. Następnie do dwóch falkonów o pojemności 15 mL odważyć po 1 g startej marchewki. Przygotowane naważki ekstrahować 10-krotnym nadmiarem metanolu przez 5 min. Po zakończeniu procesu ekstrakcji przygotować 10-krotnie rozcieńczone próbki w kolbach o objętościach 10 mL. Zmierzyć absorbancję przygotowanych roztworów.

Homogenizacja:

Odważyć po 2 g marchewki. Naważki umieścić w zlewkach. Dodać taką objętość metanolu, aby otrzymać 10-krotnie rozcieńczony homogenat. Otrzymany homogenat odwirować przy 15 000 g przez 10 min. Z otrzymanego ekstraktu przygotować 10-krotnie rozcieńczone próbki w kolbach o objętościach 10 mL. Zmierzyć absorbancję przygotowanych roztworów.

VI. Wykonanie sprawozdania i opracowanie wyników

1. Przygotować wstęp teoretyczny.
2. Wykreślić krzywą zależności absorbancji od stężenia β – karotenu w próbce i wyznaczyć równanie uzyskanej krzywej.
3. Wykorzystując równanie prostej kalibracyjnej, określić zawartości β – karotenu w przygotowanych ekstraktach.
4. Dla uzyskanych wartości absorbancji 10-krotnie rozcieńczonych ekstraktów wyliczyć wartość odchylenia standardowego i względnego odchylenia standardowego.
5. Wyjaśnić w jaki sposób rozdrobnienie próbki na wydajność procesu ekstrakcji oraz jakie są tego przyczyny.

VII. Literatura

1. J. Namieśnik, Z. Jamrógiewicz, M. Pilaszczyk, J. Torres, *Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy*, WNT, Warszawa 2000, ISBN 83-204-2482-8.
2. J.R. Dean, *Extraction Techniques in Analytical Sciences*, John Wiley & Sons, Newcastle 2009, ISBN 978-0-470-77285-0.
3. P. Stepnowski, E. Synak, B. Szafranek, Z. Kaczyński, *Techniki separacyjne*, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010, ISBN 978-83-7326-712-1.
4. M. Trêš, E. Francheschi, G. Borges, C. Dariva, F. Corazza, J. V. Oliveira; M. L. Corazza, *Effect of temperature on the solubility of b-carotene in organic solvents under ambient pressure*, *Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.27 no.4 Campinas Oct./Dec. 2007*