

# SPEKTROFOTOMETRICKÉ ŠTÚDIUM IZOMERIZÁCIE *TRANS*- $\beta$ -KAROTÉNU POČAS STANOVENIA VPLYV TEPLoty

VLADIMÍR ŠPRINGER

Katedra analytickej chémie Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského  
v Bratislave

## Úvod

Ako vyplýva z výsledkov prác mnohých autorov [1—6], stanovenie  $\beta$ -karoténu naráža na viaceré ťažkosti spôsobené malou stabilitou *trans*- $\beta$ -karoténu, izoméru, ktorý sa v analyzovanom rastlinnom aj biologickom materiáli nachádza v prevažnej miere, pričom predstavuje i najvyššiu biologickú aktivitu ako provitamín A [7]. Pôsobením svetla, tepla, jódu, kyslíka a vplyvom rozličných iných faktorov môže *trans*- $\beta$ -karotén izomerizovať na *cis*-izoméry (*neo*- $\beta$ -karotény) [4, 5, 6, 8, 9, 10]. *Cis*-izoméry vykazujú pri fotometrickom stanovení absorpčné maximá posunuté smerom ku kratším vlnovým dĺžkam. Tento posun, ako aj nižšie extinkčné koeficienty všetkých maxim vzhľadom na *trans*- $\beta$ -karotén zapríčiňujú skreslenie konečných výsledkov.

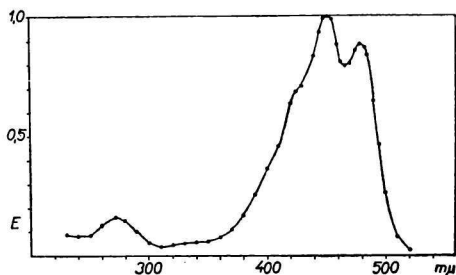
Metódu stanovenia  $\beta$ -karoténu v rastlinnom i biologickom materiáli uvádzajú u nás JAM—13 [11]. Táto metóda však v jednotlivých fázach práce nespĺňa vždy podmienky kvantitatívnej reprodukovateľnej analýzy [4, 12]. Našou úlohou bolo sledovať zmeny *trans*- $\beta$ -karoténu, ktoré môžu podľa metódy JAM—13 [11] nastať vplyvom vyššej teploty pri zahusťovaní extraktu v organickom rozpúšťadle, resp. pri oddestilovaní elučného roztoku po chromatografickom oddelovaní  $\beta$ -karoténu na kysličníku hlinitom. Toto oddelovanie je nevyhnutné najmä v prípade stanovenia, ktoré uvádza I. Klimeš [12].

## Experimentálna časť

Pre sledovanie účinku zvýšenej teploty na  $\beta$ -karotén sme si pripravili modelový roztok *trans*- $\beta$ -karoténu. Použili sme syntetický *trans*- $\beta$ -karotén, pripravený vo Výskumnom ústave pre farmáciu a biochémiu v Prahe, ktorý sme v dôsledku nejednotnosti zistenej počas chromatografie prečistili chromatograficky na kysličníku hlinitom [5]. Ako rozpúšťadlo sme použili spektrálne čistý hexán Merck, v ktorom podľa našich skúseností, ako aj podľa prác iných autorov je *trans*- $\beta$ -karotén najstabilnejší [5, 6]. Pripravený štandardný roztok obsahoval v 1 ml 3,39  $\mu$ g *trans*- $\beta$ -karoténu. Jeho absorpčné spektrum (graf 1), zistené v 10 mm kremennej kyvete na spektrofotometri SF-4 (na ktorom sa urobili všetky merania), zodpovedá údajom L. Zechmeistera a A. Polgára [13].

Vplyv teploty na štandardný roztok *trans*- $\beta$ -karoténu sme sledovali tak, že sme roztok refluxovali v 100 ml varnej banke z hnedého skla (na zamedzenie súčasného vplyvu svetla [5, 14]) na vriacom vodnom kúpeli. V pravidelných časových intervaloch sme po vytemperovaní roztoku na 20 °C odobrali 4 ml vzorky a na spektrofotometri premerali

jeho absorpčné spektrum. Zvyšok sme nakoniec chromatografovali na stĺpci kysličníka hlinitého (aktivita III podľa Brockmana) tak, že sme ako elučné činidlo použili petroléter [11]. Eluát sme odparili na vodnom kúpeli vyhriatom na 70—80 °C za zníženého tlaku



Graf 1. Absorpčná krivka *trans*- $\beta$ -karoténu v hexáne.

pomocou vodnej výevy, pričom posledné 3—4 ml hexánu sme odparili za použitia kysličníka uhličitého.

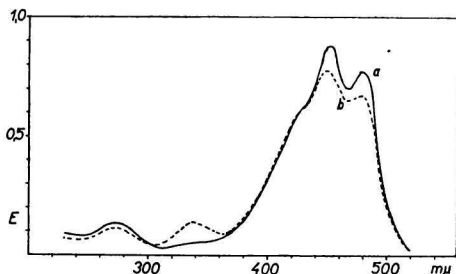
Celý postup sledovania vplyvu teploty sme opakovali s tým rozdielom, že sme pokus vykonali v anaeróbnom prostredí (atmosféra kysličníka uhličitého), čím sme sa snažili odstrániť vplyv kyslíka zo vzduchu na sledovaný *trans*- $\beta$ -karotén.

$\beta$ -Karotén býva pri neopatrnom oddestilovaní rozpúšťadla lokálne prehriaty na teplotu vyššiu, ako je bod varu rozpúšťadla, čo môže mať veľmi nepriaznivý vplyv na stabilitu analyzovaného  $\beta$ -karoténu. Túto skutočnosť sme sa pokúsili overiť tak, že sme na vriacom vodnom kúpeli oddestilovali 5 ml štandardného roztoku *trans*- $\beta$ -karoténu. Po odparení poslednej kvapky rozpúšťadla sme banku nechali na vodnom kúpeli 1 minútu, ďalšie potom vždy dvojnásobnú dobu. Vzorky sme rozpustili v hexáne a premerali extinkciu pri vlnových dĺžkach, ktoré zodpovedajú maximám absorpcie vo viditeľnej časti spektra *trans*- $\beta$ -karoténu (452 m $\mu$  a 478 m $\mu$ ). Vzorku, ktorá bola na vodnom kúpeli najdlhšie (16 minút), rozpustili sme v hexáne, premerali celé absorpčné spektrum a na stĺpci kysličníka hlinitého (aktivita III) oddelili petroléterom intenzívny žltý pás  $\beta$ -karoténu [11]. Tento sme po oddestilovaní rozpúšťadla rozpustili postupom, ktorý sme už uviedli, a znova sme premerali celé absorpčné spektrum.

### Výsledky a diskusia

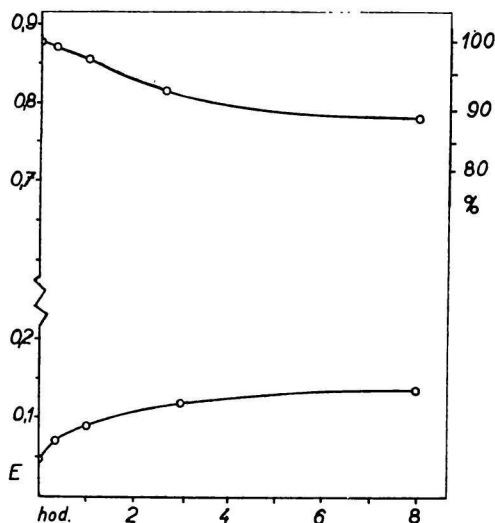
Pri sledovaní vplyvu dĺžky refluxovania hexánového roztoku *trans*- $\beta$ -karoténu na jeho stabilitu sme prišli k poznatku, že pri spektrofotometrickom hodnotení už po 20 minútach javil priebeh krivky malý pokles vo všetkých troch maximách [15] a vykazoval pomalé vytváranie nového maxima pri 340 m $\mu$ . Pozorovali sme aj pomalý posun maximálnym smerom ku kratším vlnovým dĺžkam, takže po ôsmich hodinách mal roztok maximá pri 270—274 m $\mu$ , *cis*-maximum pri 339—440 m $\mu$ , hlavné maximum pri 449 m $\mu$  a ďalšie pri 476 m $\mu$ . Krivka *a* na grafe 2 udáva priebeh absorpčnej krivky štandardného roztoku *trans*- $\beta$ -karoténu a krivka *b* priebeh po osemhodinovom varení pod spätným chladičom na vriacom vodnom kúpeli. Uvádžame len tieto dve

extrémne hodnoty, pretože nakreslením všetkých absorpčných kriviek by sa stal graf neprehľadný. Vzťah medzi poklesom absorpčného maxima pri 452



Graf 2. Absorpčná krivka štandardného roztoku *trans*- $\beta$ -karoténu v hexáne (a) a toho istého roztoku po osemhodinovom refluxe (b).

$m\mu$  a tvorbou *cis*-maxima (340  $m\mu$ ) je vyjadrený na grafe 3, z ktorého možno zistiť, že pokles hlavného maxima bol 11,4 %.



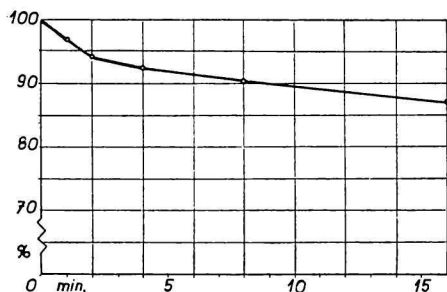
Graf 3. Vzťah medzi poklesom absorpčného maxima *trans*- $\beta$ -karoténu pri 449—452  $m\mu$  a tvorbou *cis*-maxima (339—340  $m\mu$ ).

Pri chromatografii na kyslíčniku hlinitom [11] sa 8 hodín refluxovaný roztok choval ako jednotná látka (vzniknuté *neo*- $\beta$ -karotény sa neoddelili). Po opätovnom premeraní svetelnej absorpcie roztoku mala krivka ten istý priebeh, len bola o 8,4 % nižšia, čo podľa našich predchádzajúcich výsledkov [5], ako aj podľa práce I. Klimeša [12] súvisí so stratami vzniknutými adsorpciou na kyslíčnik hlinitý. Porovnaním krivky  $\beta$ -karoténu v hexáne

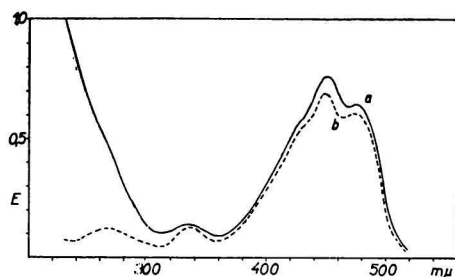
refluxovanom osem hodín s absorpčnou krivkou hexánového roztoku *trans*- $\beta$ -karoténu, na ktorý sa pôsobilo jódom [13], možno povedať, že priebeh oboch kriviek je zhodný. Rozdiel je len v stupni izomerizácie, pretože extinkcie pri všetkých maximách javili pokles asi 30 %. Na základe údajov uvedených autorov možno tvrdiť, že po izomerizácii pôsobením varu hexánového roztoku vzniká prevažne *neo*- $\beta$ -karotén U a v menšej miere *neo*- $\beta$ -karotén B.

Po zopakovaní celého procesu v anaeróbnom prostredí (atmosféra kyslíčnika uhličitého) nepozorovali sme nijaké zmeny v charaktere priebehu absorpčných kriviek zistených pri refluxovaní štandardného roztoku za prístupu vzduchu. To nás vedie k domnienke, že na izomerizáciu *trans*- $\beta$ -karoténu v hexánovom roztoku pôsobením varu nemá podstatný vplyv prítomnosť vzduchu.

Ako možno zistiť z výsledkov našich ďalších pokusov, veľmi nepriaznivý vplyv na *trans*- $\beta$ -karotén má zvýšená teplota po oddestilovaní rozpúšťadla. Pri teplote varu vodného kúpeľa v priebehu 16 minút znížila sa priepustnosť v absorpčnom maxime pri 452 m $\mu$  až o 13 % (graf 4). Ako je však zrejmé



Graf 4. Závislosť obsahu *trans*- $\beta$ -karoténu od doby zahrievania po oddestilovaní rozpúšťadla.



Graf 5. Absorpčné krivky *trans*- $\beta$ -karoténu maximálne rozloženého vplyvom teploty po oddestilovaní rozpúšťadla (a) a toho istého roztoku chromatograficky rozdeleného (b).

z priebehu krivky, už aj doba 1 min. zpríčiňuje podstatné zníženie maxima. Pri sledovaní priebehu absorpčnej krivky maximálne zahrievaného *trans*- $\beta$ -karoténu bez rozpúšťadla (graf 5, krivka a) pozorovali sme zvýšenú absorpciu svetla v ultrafialovej časti spektra do 300 m $\mu$ . Táto absorpcia prekrýva maximum *trans*- $\beta$ -karoténu v ultrafialovej časti spektra. Ako sa ukázalo po chromatografii tohto roztoku, ide o rozkladné produkty  $\beta$ -karoténu, ktoré možno pri chromatografickom oddeľovaní na kyslíčniku hlinitom od  $\beta$ -karoténu oddeľiť. Krivka b na grafe 5 udáva priebeh krivky toho istého roztoku po chromatografii. Z priebehu krivky vidieť, že znovu nastal posun jednotlivých maxim smerom ku kratším vlnovým dĺžkam a vzniklo nové maximum pri 332–335 m $\mu$ , ktoré je charakteristické pre *cis*-izoméry [4, 6, 9, 15]. Uvedené výsledky svedčia o veľmi nepriaznivom vplyve vyššej teploty po oddestilovaní roz-

púšťadla na *trans*- $\beta$ -karotén, čo má za následok nielen intenzívnu izomerizáciu, ale aj rozklad.

Na základe zistených výsledkov môžeme odporúčať pri stanovení  $\beta$ -karoténu brať do úvahy spôsob oddestilovania roztoku, ktorý sme opísali v experimentálnej časti za použitia 70—80 °C teplého vodného kúpeľa a odparenia poslednej časti rozpúšťadla pomocou kyslíčnika uhlíčitého. Takýmto spôsobom sme sa ani v jednom prípade nestretli s izomerizáciou, ani s rozkladom *trans*- $\beta$ -karoténu. Získané hodnoty sú ľahko reprodukovateľné pri nízkom rozptyle výsledkov, čo vyplýva zo štatistického vyhodnotenia pomocou smerodajnej odchýlky [16]. Variačný koeficient z 10 paralelných stanovení bol 0,34 % pri 99,7 % späť získaného *trans*- $\beta$ -karoténu.

*Ďakujem inž. M. Gažovi, kand. chem. vied, z Biochemického oddelenia Výskumného ústavu pre chov hydiny ČSAPV za cenné rady.*

### Súhrn

Sledovali sa zmeny *trans*- $\beta$ -karoténu v hexánovom roztoku, zapríčinené varom. Je známe, že dochádza k izomerizácii za vzniku *cis*-izomérov, čo sa pri spektrofotometrickom stanovení prejavuje nižšími extinkčnými hodnotami. Pri oddestilovaní rozpúšťadla na vriacom vodnom kúpeli dochádza k rýchlej izomerizácii *trans*- $\beta$ -karoténu a čiastočne k jeho rozkladu. Zistilo sa, že podstatný úbytok *trans*- $\beta$ -karoténu nenastáva, ak sa destilácia uskutočňuje pri teplote vodného kúpeľa 70—80 °C za zníženého tlaku a ak sa posledné 3—4 ml rozpúšťadla odstránia prúdom kyslíčnika uhlíčitého.

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИЗОМЕРИЗАЦИИ ТРАНС- $\beta$ -КАРОТЕНА В ТЕЧЕНИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ

ВЛАДИМИР ШПРИНГЕР

Кафедра аналитической химии Фармацевтического факультета  
Университета имени Коменского в Братиславе

### Выводы

Мы исследовали изменения транс- $\beta$ -каротена в гексановом растворе, вызванные кипячением. Известно, что при этом наступает изомеризация, при чем получают *cis*-изомеры, что проявляется при спектрофотометрическом определении низшими экстинкционными значениями. При отдистиллировании растворителя на кипящей водной бане наступает быстрая изомеризация транс- $\beta$ -каротена и настает его частичное разложение. Мы обнаружили, что к значительному убытку транс- $\beta$ -каротена не доходит, если дистилляция проводится при температуре водной бани 70—80° при пониженном давлении и когда последние 3—4 мл. растворителя удаляются струей углекислого газа.

Поступило в редакцию 24. 11. 1959 г.

# SPEKTROPHOTOMETRISCHES STUDIUM DER ISOMERISATION VON *TRANS*- $\beta$ -CAROTIN WÄHREND DER BESTIMMUNG EINFLUSS DER TEMPERATUR

VLADIMÍR ŠPRINGER

Lehrstuhl für analytische Chemie der Pharmazeutischen Fakultät  
an der Komenský-Universität in Bratislava

## Zusammenfassung

Der Autor beobachtete die Veränderungen von *trans*- $\beta$ -Carotin in einer Hexanlösung, verursacht durch das Sieden. Es ist bekannt, dass es zu einer Isomerisation unter Entstehung der *cis*-Isomeren kommt, was bei der spektrophotometrischen Bestimmung durch niedrigere Extinktionswerte zum Ausdruck kommt. Beim Abdestillieren des Lösungsmittels auf einem siedenden Wasserbade kommt es zu einer raschen Isomerisation des *trans*- $\beta$ -Carotins und teilweise zu dessen Zersetzung. Der Autor stellte fest, dass eine wesentliche Abnahme des *trans*- $\beta$ -Carotins dann nicht eintritt, wenn die Destillation bei einer Temperatur des Wasserbads von 70—80 °C unter vermindertem Druck vorgenommen wird und die letzten 3—4 ml des Lösungsmittels durch einen Kohlendi-oxystrom entfernt werden.

In die Redaktion eingelangt den 24. 11. 1959

## LITERATÚRA

1. Wagner K., Vermeulen M., Vorratspflege Lebensmittelforsch. 4, 2 (1941). —
2. Booth V. H., *Carotene. Its Determination in Biological Materials*, Cambridge 1957, 16—23. —
3. Devjatnin V. A., *Metody opredelenija vitaminov*, Moskva 1954, 16—24. —
4. Karrer P., Jucker J., *Carotinoide*, Basel 1948, 44—49. —
5. Špringer V., *Farmácia* 4, 106 (1960). —
6. Tiews J., *Vitamine u. Hormone* 8, 185 (1958). —
7. György P., *Vitamin Methods I*, New York 1950, 150—155. —
8. Harry I., Deuel Jr., *The Lipids*, New York 1951, 510—666. —
9. Zechmeister L., Polgár A., *J. Am. Chem. Soc.* 64, 1856 (1942). —
10. Goodwin T., *Sravnitel'naja biochimija karotinoidov*, Moskva 1954, 16—20.
11. Jednotné analytické metódy, č. 13: *Stanovení karotenu (provitaminu A) a axerof-tolu (vitaminu A) v potravinovém materiálu*, Praha 1957. —
12. Klimeš I., *Živočišna výroba* 3, 9 (1958). —
13. Zechmeister L., Polgár A., *J. Am. Chem. Soc.* 65, 1522 (1943). —
14. Špringer V., *Farmácia* 2, 44 (1958). —
15. Knobloch E., *Fysikálně chemické metody stanovení vitaminů*, Praha 1956, 110—132. —
16. Líkař O., *Statistické metody v laboratorní práci*, Praha 1957, 74—80.

Do redakcie došlo 24. 11. 1959

*Adresa autora:*

*Prom. farm. Vladimír Špringer, Bratislava, Americké nám. 14a, Katedra analytickej chémie Farmaceutickej fakulty UK.*