Úloha č. 11 - Stanovení obsahu β-karotenu v džusu extrakční spektrofotometrií

Princip:

β-karoten je přírodní barvivo chemicky patřící do skupiny tetraterpenoidů a je provitaminem vitaminu A. Karoteny jsou nepolární organická barviva, rozpustná v tucích a nepolárních rozpouštědlech. K jejich oddělení od matrice lze využít extrakci do hexanu a intenzitu zbarvení extraktu lze přímo měřit spektrofotometricky proti hexanu. Ze známé hodnoty absorpčního koeficientu se vypočte obsah karotenu v testovaném materiálu:

$$c_{KAROTEN} = (3{,}86 * A_{450} * V_{ex} * R) / V_{vz}$$

kde

$c_{KAROTEN}$	je hmotnostní koncentrace β-karotenu v $mg.l^{-1}$
3,86	je absorpční koeficient β-karotenu v hexanu při vlnové délce 450 nm
A_{450}	je absorbance hexanového extraktu při 450 nm, měřená proti hexanu v 1 cm kyvetě
V_{ex}	je objem hexanového extraktu po extrakci vzorku, v ml
R	je faktor ředění hexanového extraktu, pokud je příliš vysoká hodnota absorbance
V_{vz}	je objem vzorku džusu, který byl extrahován hexanem, v ml

Pracovní postup

Do dělící nálevky odpipetujeme 10 ml vzorku džusu, přidáme 30 ml vody, 1 ml 2M HCl a 10 ml hexanu z dávkovače. Nálevku zazátkujeme, otočíme vzhůru stopkou a uvolníme přetlak otevřením kohoutu. Po uzavření kohoutu mírně zatřepeme a opět uvolníme přetlak. Ještě jednou zopakujeme uvolnění přetlaku a poté s uzavřeným kohoutem nálevkou intenzivně třepeme asi 20 sekund. Otočíme vzhůru zátkou, celou nálevkou zakroužíme a postavíme do stojanu.

Po oddělení vrstev odzátkujeme nálevku a spodní (vodnou) vrstvu odpustíme do kádinky (objemu 150 ml), k hexanové vrstvě přilijeme 10 ml vody a protřepeme. Po oddělení vrstev spodní vodnou vrstvu spojíme s předchozí a hexanovou vrstvu odpustíme do zabroušené baničky objemu 100 ml.

Vodnou vrstvu vrátíme zpět do dělící nálevky a celý postup s 10 ml hexanu opakujeme, včetně vyprání hexanové vrstvy vodou. Vodná vrstva opět přijde spojit s předchozí vodnou vrstvou, hexanová po vyprání přijde spojit s hexanovou vrstvou z předchozí extrakce. Poté extrakci zopakujeme ještě dvakrát, opět s 10 ml hexanu.

Po čtvrté extrakci necháme hexanovou vrstvu v nálevce, přidáme k ní předchozí hexanové extrakty a 40 – 50 ml vody. Protřepeme a po oddělení fází vodnou vrstvu odpustíme do odpadu. Hexanovou vrstvu vypustíme do zabroušené baničky, přidáme 1 lžičku bezvodého síranu sodného na vysušení hexanové vrstvy a intenzivně třepeme asi 20 sekund. Poté extrakt přefiltrujeme přes suchý filtrační papír do 50 ml odměrné baňky. Síran sodný v baničce přelijeme 10 ml hexanu, zatřepeme (vypereme zbytky extraktu ze soli) a opět přefiltrujeme do odměrné baňky. Filtr ještě promyjeme malým množstvím čistého hexanu (pozor na přelití objemu odměrné baňky!). Poté odměrnou baňku doplníme hexanem po rysku a obsah zamícháme.

Extrakt nalijeme do suché kyvety spektrofotometru, druhou naplníme čistým hexanem. Proměříme na spektrofotometru absorpční spektrum v rozsahu 380 – 540 nm a dále absorbance roztoku při 450 nm a 477 nm.

Ze zjištěných hodnot sestrojíme absorpční křivku (graf) a přiložíme k protokolu. Z hodnot absorbancí při 450 nm a 477 nm provedeme zkoušku totožnosti – poměr těchto hodnot pro čistý β-karoten je v rozmezí 1,16 – 1,18. Je-li naměřený poměr jiný, vyextrahovaly se současně s β-karotenem také jiná nepolární barviva (xanthophyly). Z absorbance při 450 nm vypočtěte hmotnostní koncentraci β-karotenu ve zkoumaném vzorku džusu a porovnejte s případně deklarovanou hodnotou.

Veškeré zbytky hexanu (i extrakt po změření) slijte do láhve k tomu určené! Laboratorní sklo, které přichází do styku s čistou hexanovou fází (odměrná baňka, nálevka, kyvety) musí být suché! Případné kapky vody odstraňte opláchnutím nádobí alkoholem.