

# Príspevok ku kvantitatívnemu určovaniu farbív v koreninovej paprike

A. HASPELOVÁ-HORVATOVIČOVÁ, B. HORIČKOVÁ

Ústav experimentálnej biológie a ekológie SAV, Bratislava

Pri určovaní kvality koreninovej papriky je jedným z najdôležitejších kritérií obsah farbív. Ako je známe, koreninová paprika obsahuje okrem izomérov  $\beta$ -karoténu kryptoxantín, kryptokapsín, luteín, violaxantín, anteraxantín a predovšetkým  $\beta$ -karotén, ktorý je dôležitý ako provitamín A. Celková farbiaca schopnosť je daná najmä červeným farbivom kapsantínom, ktorý prevláda v oplodí papriky. Ďalším červeným farbivom je kapsorubín, ktorý sa v paprike nachádza v porovnaní s kapsantínom v rádove menších množstvách [8].

Chceme tu predložiť jednak metodiku na chromatografické delenie hlavných pigmentov obsiahnutých v červenej paprike pomocou chromatografie na tenkých vrstvách, jednak na jej základe vypracovanú metódu na rýchle a jednoduché určenie červených a žltých pigmentov papriky spektrofotometrickým meraním celkového extraktu.

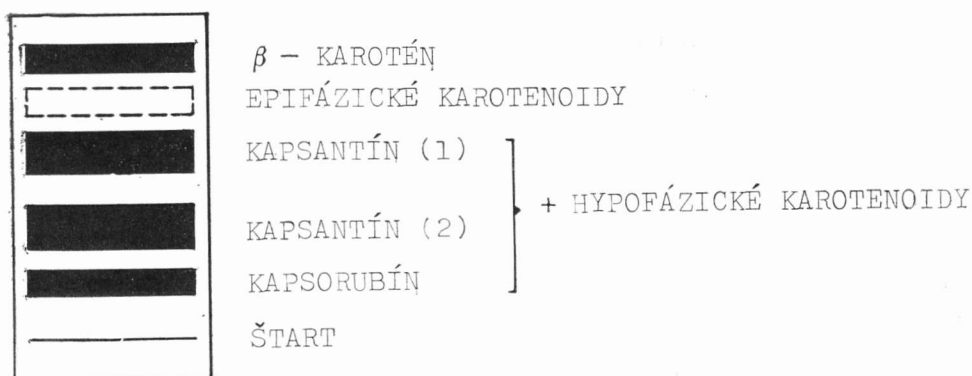
## *Extrakcia pigmentov*

Návažok 0,5 g sušenej papriky sa extrahuje do zmesi 50 ml acetón-hexán v pomere 2 : 1. Pri čerstvej, najmä dužinatej paprike, treba materiál vysušiť do konštantnej váhy, aby voda obsiahnutá v plodoch nevyvolávala pri extrakcii delenie dvoch fáz acetón-hexán. Rozotieranie materiálu s rozpúšťadlom a jeho extrakciu treba viackrát opakovať, prípadne materiál preliať extrakčným činidlom a nechať stáť niekoľko hodín v zábrusovej nádobe. Pri extrakcii sa použil sinter č. 3.

## *Chromatografické delenie na tenkých vrstvách*

Na sklené platne sa naniesie tenká vrstva, pozostávajúca z 29,5 g  $\text{CaCO}_3$ , 6 g  $\text{MgO}$  a 5 g  $\text{Ca(OH)}_2$  suspendovaných v 60 ml 1 % roztoku KOH. Toto množstvo stačí na zhotovenie 8 platní rozmerov  $10 \times 20$  cm. Platne sa sušia 1 hodinu pri  $110^\circ\text{C}$ . Nanášku paprikového extraktu treba určiť experimentálne podľa koncentrácie extraktu (v našom prípade 0,2—0,4 ml extraktu). Chromatografuje sa vzostupne v sústave benzín-chloroform-acetón (75 : 25 : 21) [6]. Na chromatograme sa oddelí predovšetkým  $\beta$ -karotén ako epifázický karote-

noid, ďalej slabé pásy ostatných epifázických karotenoidov, ktoré sa vyhodnocujú spolu. V rámci hypofázických pigmentov sa oddelia dva izoméry kapsantínu a kapsorubín. Hypofázické žlté karotenoidy sa od uvedených červených farbív neoddedia. Na štarte zostávajú zmydelnené, prípadne degradačné produkty chlorofylov a iné hydrofilné farbivá. Schéma chromatogramu je na obr. 1. Oddelené pásy jednotlivých pigmentov sa z platne zoškrabujú [5] a eluujú do týchto činidiel:



Obr. 1. Chromatogram pigmentov papriky na tenkej vrstve.

$\beta$ -karotén do hexánu, ostatné epifázické karotenoidy do chloroformu, kapsantín (spolu dva izoméry) do 96 % etanolu, kapsorubín do 96 % etanolu.

Ako sme už uviedli, obsahuje červená paprika okrem kapsantínu a kapsorubínu ešte ďalšie hypofázické karotenoidy (najmä violaxantín, luteín, zeaxantín, anteraxantín a xantofilepoxid), ktoré sa pri našej chromatografickej metóde neoddedia. Podľa Cholnokyho údajov [7] sa obsah týchto hypofázických karotenoidov v oplodí zrelej červenej papriky pohybuje v rozmedzí 35—50 % celkového množstva žltých pigmentov. Na ich oddelenie by bol potrebný ďalší chromatografický krok, čím by sa metóda stala zbytočne zdĺhavou a spojenou so stratami. Na praktické účely potravinárskeho priemyslu preto navrhujeme korigovať o túto hodnotu predovšetkým obsah žltých pigmentov.

Na kvantitatívny výpočet pigmentov po chromatografickom delení sme používali extinkčné koeficienty, uvedené v tab. 1. Množstvá jednotlivých pigmentov, prepočítané vzhľadom na pôvodný návažok, sme vypočítali podľa nasledujúceho vzorca:

$$\text{g pigmentu/g sušenej papriky} = \frac{\text{Abs} \cdot Z}{100 \cdot Y \cdot E_{1\text{ cm}}^{1\%} \cdot Kyv}$$

$\text{Abs}$  = spektrofotometrické absorbancie pigmentového roztoku,

$Z$  = množstvo použitého elučného činidla v ml,

$Kyv$  = hrúbka použitej kyvety,

$Y$  = množstvo papriky v g, prepočítané na ml pôvodného extraktu, naneseného na 1 platňu,

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  = percentuálny absorpčný koeficient počítaného pigmentu.

Tab. 1. Percentuálne absorpčné koeficienty paprikových farbív v rozličných rozpúšťadlách

Pigment	Rozpúšťadlo	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	Literatúra*
$\beta$ -karotén	hexán	2450	Smakula, 1934
Epifázické karotenoidy	chloroform	2200	Gillam, 1935
Kapsorubín	etanol	2024	**
Kapsantín	etanol	1760	Polgar a Zechmeister, 1944

\* pozri [3, 4, 10], 1%

\*\* pre hodnotu  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  pre kapsorubín bola za základ zvolená hodnota  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  v etanole pre kapsantín a zvýšená o 15 % podľa Benedekových údajov [1].

Množstvo žltých farbív sa korigovalo o množstvo neoddelených hypofázických pigmentov, ktoré sa bralo ako konštantná hodnota (25 % celkového obsahu hypofázických karotenoidov, prípadne pri vzorkách žltého až okrového zafarbenia až 35 %).

#### *Metóda spektrofotometrického určenia žltých a červených pigmentov z celkového extraktu*

Na praktické účely potravinárskeho priemyslu sme vyvinuli metódu na kvantitatívne zistenie celkového množstva žltých a červených pigmentov na základe spektrálnej krivky celkového extraktu.

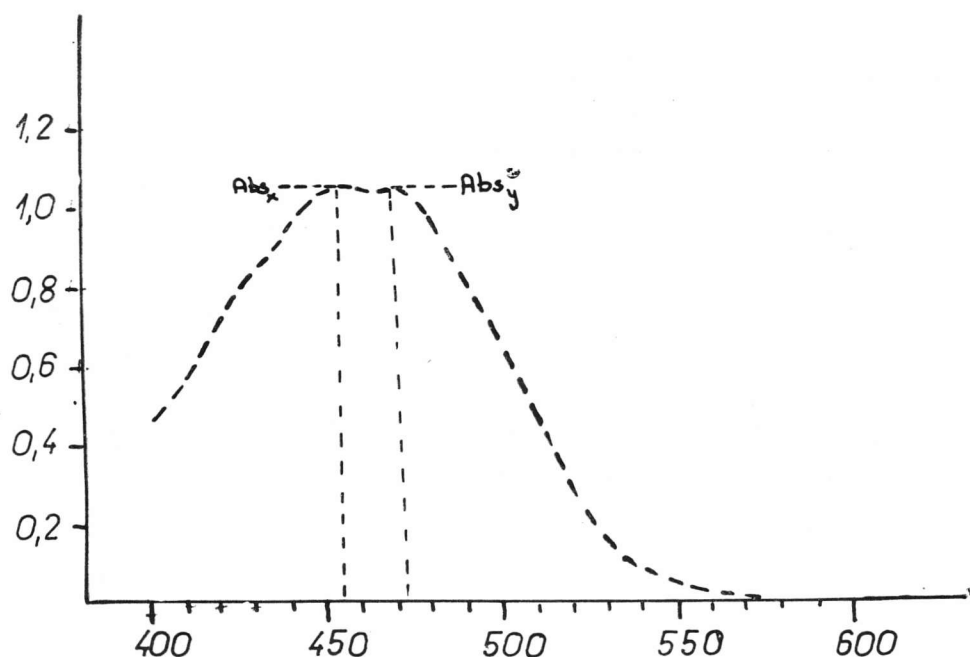
1. Spektrálne vlastnosti extraktu z papriky. V spomínanom rozpúšťadle acetón-hexán 2 : 1 majú extrahované pigmenty spektrálnu krivku s dvoma jasnými maximami (obr. 2). Maximum pri kratších vlnových dĺžkach (asi pri 450 nm) treba pripísať žltým pigmentom, maximum pri vlnovej dĺžke asi 469 nm červeným. Z literatúry uvádzame absorpčné maximá žltých aj červených pigmentov papriky. I keď pre naše extrakčné činidlo nie sú ich hodnoty uvedené v tab. 2, jednako z nej vidieť, že žlté pigmenty majú absorpčné maximum vo všetkých rozpúšťadlách pri kratších vlnových dĺžkach ako červené pigmenty.

2. Kvantitatívny výpočet. Ak porovnáваме spektrálnu krivku čistého kapsorubínu a  $\beta$ -karoténu (ako najviac zastúpeného červeného, resp. žltého pigmentu), vidíme, že pri maximálnej absorbancii  $\beta$ -karoténu má kapsantín absorbanciu ešte 82,5 % maxima absorbancie  $\beta$ -karoténu. Naproti tomu má  $\beta$ -karotén pri absorpčnom maxime kapsantínu ešte 81,33 % absorbancie kapsantínu. Na základe tejto úvahy sme zostavili vzorec na empirický výpočet žltých, resp. červených pigmentov papriky

$$X = (1,2 \cdot Abs_x - 0,825 \cdot Abs_y) \cdot \text{riedenie},$$

$$Y = (2,26 \cdot Abs_y - 2,1 \cdot Abs_x) \cdot \text{riedenie},$$

kde  $X$  je množstvo červených pigmentov v mg/g sušenej papriky,  
 $Y$  je množstvo žltých pigmentov v mg/g sušenej papriky,  
 $Abs_x$  je absorbanca červených pigmentov pri vlnovej dĺžke asi 450 nm,  
 $Abs_y$  je absorbanca žltých pigmentov (pri vlnovej dĺžke asi 469 nm).



Obr. 2. Dvojvrcholová spektrálna krivka celkového extraktu papriky. *Abs<sub>x</sub>* — absorpčné maximum červených farbív, *Abs<sub>y</sub>* — absorpčné maximum žltých farbív.

Faktory, ktorými sa násobia absorbancie, berú do úvahy uvedenú skutočnosť, ako aj konštantné a absorpčné koeficienty pre žlté a červené pigmenty. Tieto koeficienty sa zistili empiricky na základe kvantitatívnych hodnôt pre žlté a červené pigmenty získaných chromatografiou.

Tab. 2. Absorpčné maximá žltých a červených farbív v niektorých rozpúšťadlách [9]

Žlté farbivá	Absorpčné max. nm	Rozpúšťadlo
Violaxantín	442	etanol
	451	chloroform
	443	benzín
Anteraxantín	445	etanol
	457	benzén
$\beta$ -karotén	450	hexán
	452	benzín
Kryptoxantín	452	etanol
	452	benzín
	451	hexán
Červené farbivá		
Kapsantín	486	benzén
Kapsorubín	475	benzín
	486	benzén
	474	benzín

Uvedené vzorce sa vzťahujú na návažok 0,5 g sušenej červenej papriky, extrahovanej do 50 ml extrakčného činidla. Na prípadný iný návažok treba brať vo výpočtových vzorcoch ohľad. Na meranie absorbancie sa použila 1 cm kveta.

Pri určení vzorca na výpočet sumy červených, resp. žltých pigmentov papriky na základe sumárnej spektrálnej krivky, resp. na základe spektrofotometrického zistenia po chromatografickom delení, brali sme do úvahy aj to, že červené pigmenty obsahujú po chromatografickom delení ešte isté množstvo hypofázických žltých pigmentov; pri dlhšie skladovanej paprike (60 dní) je to 25—30 % [1, 11] a podľa [12] 25—40 %. Do úvahy sa bralo aj to, že množstvo pigmentov určené spektrofotometricky z celkového extraktu býva podľa rozličných autorov aj podľa našich skúseností vždy o 20—25 % väčšie ako množstvo zistené po chromatografickom delení. Je to zapríčinené predovšetkým hydrofilnými farbivami, resp. zmydlenými splodinami chlorofylu, ktoré pri chromatografii zostávajú na štarte, ale v celkovom extrakte môžu zvyšovať jeho absorbanciu. Okrem toho je aj tenkovrstvová chromatografia vždy zaťažovaná stratami (degradácia pri styku so svetlom a vzduchom, straty pri zoškrabávaní vrstvy a pri elúcii).

Vplyv týchto skutočností sa pri červených pigmentoch navzájom ruší, pri žltých naproti tomu sú tieto rozdiely, ktoré treba ku konečnej hodnote pripočítat, asi 50 %. V tab. 3 vidieť výsledky určení jednotlivých vzoriek papriky po chromatografickom delení v porovnaní s hodnotami zistenými na základe spektrálnej krivky celkového extraktu, vypočítanými podľa uvedených vzorcov a korigovanými.

Vidíme, že hodnoty získané po chromatografickom delení na tenkých vrstvách sa dobre zhodujú s hodnotami zistenými na základe spektrálnych kriviek a vypočítanými podľa našej metódy, pokiaľ ide o papriku dobrej kvality s vysokým obsahom červených pigmentov (vzorky 2—5). Pri vzorkách 1 a 6 s vyšším obsahom žltých farbív, ako ho predpokladá Cholnoky [8], treba pokladať množstvo žltých farbív zistené zo spektrálnej krivky za hodnovernejšie ako množstvo zistené chromatograficky s uvedenou konštantnou korektúrou.

Tab. 3 — Obsah červených a žltých pigmentov papriky zistený po chromatografii a na základe spektrálnej krivky

Červené pigmenty						
Č. vzorky	Absorpcia	Riedenie	Chromatografia mg pig./g pap.	Spekt. krivka mg pig./g pap.	$\delta_x$	%
1	0,4486	.5	0,6382	0,6183	0,0199	0,3
2	0,7120	.6	1,6651	1,5327	0,1324	8,0
3	0,4800	.6	0,9641	1,0305	0,0664	6,9
4	1,1070	.6	2,3164	2,4660	0,1496	6,3
5	1,0290	.6	2,2187	2,2262	0,0431	1,9
6	1,0090	.10	3,9714	3,6520	0,3190	8,0

Žlté pigmenty							
Č. vzor- ky	Absorpcia	Riedenie	Chromato- grafia mg pig./g pap.	Korektúra 50 %	Spektrálna krivka mg pig./g pap.	$\delta_x$	%
1	0,5026	.5	0,3855	0,5782	0,9690	0,3808	39,3
2	0,7260	.6	0,5882	0,8823	0,8730	0,0093	1,06
3	0,4900	.6	0,4197	0,6295	0,5964	0,0331	5,54
4	1,1120	.6	0,8071	1,2106	1,2390	0,0284	2,29
5	1,0470	.6	0,7394	1,1091	1,2310	0,1209	9,82
6	1,0250	.10	1,05430	1,5814	1,9760	0,3945	19,96

### Diskusia

Okrem klasickej práce Cholnokého a spolupracovníkov [7], ktorí zdĺhavou metódou stĺpcovej chromatografie oddeľovali a určovali aj farbivá obsiahnuté v paprike iba v malých množstvách, publikoval metódu na zistenie paprikových pigmentov predovšetkým Benedek [1], najmä na použitie v potravinárskej praxi. Jeho metóda je založená na extrakcii materiálu do benzénu a na fotometrickom zistení koncentrácie extraktu v podobe kapsantínu. Predpokladá sa pritom stály obsah žltých pigmentov, a to 32—50 %. Na túto metodiku sa odvoláva Benedek aj v svojej ďalšej práci [2], pričom však uvádza, že benzenový extrakt sa meral spektrofotometricky pri 492 nm. Aj tu sa celkový obsah pigmentov zisťoval v podobe kapsantínu. Naproti tomu Vinklerová [12] v rámci analýz dozrievajúcej papriky používa tiež Benedekovu metódu, okrem nej však spomína aj vlastnú metódu chromatografického oddeľovania kapsorubínu a kapsantínu na tenkých vrstvách zo silikagélu po extrakcii do éteru a po nasledujúcej saponifikácii 5 % etanolovým KOH. Ako rozdeľovaciu zmes používala petroleter-benzén-acetón-kyselinu octovú ľadovú v pomere 40 : 10 : 2 : 2,5. Oddelenie kapsantínu, kapsorubínu,  $\beta$ -karoténu, zeaxantínu, luteínu a kryptoxantínu dosiahli dvojstupňovou chromatografiou.

Technické normy, a to československá ČSN 58 0511 zo dňa 6. 11. 1963, ako aj maďarská MS 71 1851-62 uvádzajú ako záväzné empirické hodnoty percentuálneho obsahu papriky, získané na základe kalibračnej krivky po meraní na Pulfrichovom fotometri.

Naše metodiky, ktoré tu uvádzame, najmä metóda zistenia žltých a červených pigmentov zo spektrálnej krivky extraktu celkových pigmentov, majú sa používať ako rýchle analýzy v rámci technickej praxe.

Metodika delenia pigmentov papriky na tenkých vrstvách uhličitanu vápenatého, uvádzaná v prvej časti práce, oddeľuje epifázické karotenoidy, predovšetkým  $\beta$ -karotén a niektoré iné, v menších množstvách sa vyskytujúce epifázické karotenoidy, ďalej kapsantín (oddeľia sa dva izoméry) a kapsorubín. Hypofázické karotenoidy (predovšetkým zeaxantín a violaxantín) sa od červených pigmentov pri tejto metóde neoddeľia. Aby sa vyhlo ďalšiemu chromatografickému kroku na ich oddelenie, spojenému vždy so stratami, obsah týchto karotenoidov sa koriguje empirickými, resp. v literatúre uvádzanými hodnotami [1, 11].

V druhej časti práce sa pomocou výsledkov analýz 6 vzoriek mletej papriky po chromatografickom delení navrhuje vzorec umožňujúci kvantitatívny výpočet červených a žltých pigmentov na základe maximálnych absorbancií dvojrýchlovej krivky celkového extraktu. Celý výpočet sa zakladá na empirickej báze. Výpočet na základe presne určených absorpčných koeficientov sa nedal urobiť už aj preto, že pri žltých pigmentoch nejde o čisté pigmenty, ale o zmes, a zmesou je aj samo extrakčné činidlo, v ktorom sa farbivá merajú (acetón-hexán 2:1). Treba však konštatovať, že hodnoty pre červené a žlté pigmenty získané predloženou metodikou sú dobre reprodukovateľné a že po patričných, v práci uvedených korektúrach sa dobre zhodujú s výsledkami získanými po chromatografickom delení. Väčšie odchýlky vznikajú pri paprike obsahujúcej relatívne väčšie množstvo žltých pigmentov. V tomto prípade treba pokladať výsledky získané na základe celkovej spektrálnej krivky za presnejšie, lebo umožňujú skutočne určiť vyššie množstvo žltých pigmentov. Takýto materiál je charakterizovaný vyššími vrcholmi pri kratších vlnových dĺžkach, prípadne deformáciou celej absorpčnej krivky.

Za poskytnutie vzoriek ďakujeme Ing. Šepitkovi, CSc., z Výskumného ústavu potravinárskeho, ktorý dal podnet k tejto práci.

### Literatúra

1. BENEDEK, L.: Untersuchungsverfahren zur Bestimmung des Farbstoffgehaltes in Paprikamahlgut. *Z. Lebensmitt. Untersuch.*, 107, 1958, 228—232.
2. BENEDEK, L.: Carotenoid synthesis in seasoning paprika. *Acta Alimentaria*, 1(2), 1972, 187—202.
3. GOODWIN, T. W.: Chemistry and biochemistry of plant pigments. London — New York 1965.
4. HAGER, A. — MEYER-BERTENRATH, T.: Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünn-schichtchromatographischer Methoden. *Planta (Berlin)*, 69, 1966, 198—217.
5. HASPELOVÁ-HORVATOVIČOVÁ, A. — FRIČ, F.: Dünnschichtchromatographie von Blattpigmenten auf Kieselgel und eine Verbesserung der quantitativen Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen. *Biológia (Bratisl.)*, 19, 1964, 820—826.
6. HASPELOVÁ-HORVATOVIČOVÁ, A.: Dünnschichtchromatographie zur Isolierung des Luteinisomers Zeaxanthin. *Biológia (Bratisl.)*, 25 (7), 1970, 439—444.
7. CHOLNOKY, L.: Vizsgálatok karotinoid festékekről I. A vörös paradicsompaprika festékei. *Magy. Tud. Akad. kém. Tud. Osztál. Közl.*, 57, 1955, 415.
8. CHOLNOKY, L. — GYÖRGYFY, K. — NAGY, E. — PÁNCZÉL, N.: Vizsgálatok a karotinoid festékekről III. *Magy. Tud. Akad. kém. Tud. Osztál. Közl.*, 10, 1958, 23—29.
9. KARRER, P., JUCKER, E.: Carotenoids. New York — Amsterdam—London—Brussel 1950.
10. PEACH, K. — TRACEY, M. V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. 3. Band. Berlin—Göttingen—Heidelberg 1955.
11. VINKLER, M.: Festéktartalom, illetve az alkotó komponensek alakulásának vizsgálata a csöves fűszerpaprikában a tárolás folyamán. *Konzerv-és Paprikaipar*, 45, 1961, 99—105.
12. VINKLER, M. — KISZEL — RICHTER, M.: A thin layer chromatographic method to determine the pigment content (components) in the pericarp of paprika. *Acta Alimentaria*, 1(1), 1971, 41—58.

## Súhrn

V prvej časti práce sa opisuje metóda na kvantitatívne zistenie pigmentov koreninovej papriky po chromatografickom delení na tenkých vrstvách. Oddelí sa  $\beta$ -karotén, zmes ďalších epifázických karotenoidov, v hypofáze dva izoméry kapsantínu a kapsorubín. Žlté hypofázické karotenoidy, ako zeaxantín, violaxantín, luteín atď., sa pri uvedenej metóde neoddelia od červených. Ich množstvo sa určuje ako konštantné v rozsahu 25 červených farbív.

V druhej časti práce sa opisuje metóda na kvantitatívne zistenie obsahu žltých a červených pigmentov na základe dvojvrcholovej spektrálnej krivky celkového extraktu. Rýchlosť metódy, ako aj jednoduchosť kvantitatívneho výpočtu predurčujú metódu na rutinné analýzy v rámci potravinárskeho priemyslu.

## Summary

In the first part of the article a method is presented for the quantitative determination of red paprika pigments after separation by thin-layer chromatography. There are separated  $\beta$ -carotene and a mixture of further epiphasic carotenoids (especially cryptoxanthin) from the hypophasic carotenoids two isomers of capsanthin and capsorubin. The yellow hypophasic carotenoids, especially lutein, zeaxanthin and violaxanthin are not separated from the red ones, their amount is supposed to be constant with 25 % of the red pigments.

In the second part a method is described for the quantitative determination of the yellow and red pigment respectively from the spectral curve of the total pigment extract, which shows two distinct peaks. Simple analytical work with a simple mathematic formula for the quantitative accounting make the method suitable for routine analyses within the food industry.

## Содержание

В первой части работы описывается метод количественного определения пигментов пряного перца после хроматографии на тонких слоях. Определяется  $\beta$ -каротин, смесь дальних эпифазических каротиноидов, в гипофазе два изомера капсантина и капсорубин. Желтые гипофазические каротиноиды как зеаксантин, виолаксантин, лютеин при этом методе неотделяются от красных. Их количество определяется как константное в объеме 25 % красных пигментов.

Вторая часть работы описывает метод для количественного определения содержания желтых и красных пигментов на основании двухвершинной спектральной кривой общего экстракта. Быстрота метода и простое количественное вычисление предполагают этот метод удобным для пищевой промышленности.