

Metódy stanovenia steroidných glykoalkaloidov rajčín

JELA VALACHOVÁ - MILAN DRDÁK

Súhrn. Prehľadový článok podáva základné informácie o možnostiach stanovenia steroidných glykoalkaloidov (SGA) v rastlinnom materiáli s dôrazom na rajčiny. Článok sa orientuje na možnosti stanovenia celkového množstva SGA klasickými postupmi na základe zrážacích a kolorimetrických metód, z chromatografických metód sa podrobnejšie uvádza metóda TLC, GLC a HPLC. Uvádzajú sa taktiež použité metódy ELISA a RIA. Poukazuje sa na doterajšie ťažkosti stanovenia SGA.

Steroidné glykoalkaloidy (SGA) sú dlhodobo predmetom diskusií a to najmä pre ich účinky na ľudský organizmus, vyvíjajúci sa plod počas gravidity a pod. Na druhej strane prítomnosť SGA v rastlinách je prirodzená a na prežitie rastliny nevyhnutná [1]. Ich funkciou je ochrana rastliny pred mikroorganizmami. Po ich objavení a zistení v dôležitých potravinách, ako sú zemiaky, rajčiny a baklažány, sa im začala venovať stála pozornosť. Zistilo sa, že ich koncentrácia sa počas vývinu rastliny mení. Napríklad, po oplodnení sa obsah SGA v plodovom uzle niekoľkonásobne zvýši. Pre potravinárske využitie je najdôležitejšia zmena SGA v konzumnej časti rastliny. Napr. dozreté plody rajčín sú jedinou nadzemnou časťou, kde sa SGA vôbec nevyskytujú, alebo len v nepatrných koncentráciách [2]. Základne poznatky o SGA sme publikovali v predošlej práci [3]. Tento prehľadový článok je orientovaný na metódy stanovenia SGA práve z potreby sledovania týchto látok v potravinových surovinách a výrobkoch.

Ing. Jela Valachová, Doc. Ing. Milan Drdák, DrSc., Katedra sacharidov a konzervácie potravín, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Metódy na stanovenie SGA vychádzajú z charakteru ich molekulovej štruktúry. Molekuly SGA sú priestorovo objemné, s veľkou molekulovou hmotnosťou. Skladajú sa z hydrofóbnej časti - aglykónu, ktorým je alkaloid steroidnej povahy (SA), spojenej glykozidickou väzbou s hydrofilnou sacharidovou zložkou.

Dnešné analýzy kladú dôraz na stanovenie jednotlivých SGA. Na tento účel sa využívajú najnovšie analytické techniky, ako je plynová a kvapalinová chromatografia, RIA a ELISA metódy.

Stanovenie celkového množstva SGA

Vo všeobecnosti sa používajú dve metódy na stanovenie celkového množstva SGA. Metóda zavedená Sanfordom a Sindonom je kombináciou najlepších klasických postupov [4]. Po extrakcii v Soxhletovom prístroji sa vyvolá farebná reakcia s chloridom antimonitým a koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Jej základným nedostatkom je, že sa detegujú len Δ^5 -nenasýtené glykoalkaloidy. Nedajú sa stanoviť nasýtené SGA, zastupené napríklad demissidínom a tomatidínom a glykoalkaloidy s leptínovou skupinou, ktorá sa nedá vyzrážať amoniakom.

Fitzpatrickova a Osmanova metóda používaná na analýzu SGA obsahuje extrakciu s metanolom a chloroformom a následným prídavkom vodného roztoku síranu sodného [5]. Odpovedajúci podiel hydrofilnej fázy obsahujúcej glykoalkaloidy sa odparí dosucha a opätovne rozpustí v $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseline sírovej na hydrolýzu. Po pridaní NaOH sa aglykón extrahuje benzénom. Benzén sa odparí a zvyšok sa rozpustí v bezvodom metanole na kvantifikáciu. Metanolvý roztok aglykónu sa titruje 10 % fenolom v metanole. Ako indikátor sa používa bromfenolová modrá. Táto metóda je ekonomická, jednoduchá a bola široko používaná v rôznych prácach. Metóda má však nízku výťažnosť, spôsobenú najmä 25 %-nými stratami pri extrakcii. Fitzpatrickova a Osmanova metóda by sa dala zdokonaľiť spoľahlivou hydrolytickou technikou. Používanú kyslú hydrolýzu môže nahradiť dvojfázový systém. Pozostáva z anorganickej kyslej fázy, v ktorej sa vzorka hydrolyzuje a z organickej kvapalnej fázy. Nepolárna organická kvapalina slúži ako ochranná fáza pre nestabilné nepolárne aglykóny. Tento postup umožňuje kvantitatívne získanie SGA [5]. Kritizovaná fázová separácia a hydrolýza sa dá eliminovať aj vyzrážaním glykoalkaloidov amoniakom s ich náležitým prečistením [6]. Na tomto základe metódu modifikoval Bushway

[7] a Speroni a Pell [8]. Spektrofotometrické stanovenie tomatidínu sa opiera o kvantitatívnu extrakciu dichlormetánom, následnú hydrolýzu a určenie modrého sfarbenia roztokov vyvolaného sodnou soľou bromtymolu pri vlnovej dĺžke 620 nm. Metóda umožňuje stanovenie v koncentračnom rozmedzí 4,1 až 33,3 µg tomatidínu v 1 ml [9].

Chromatografické metódy

Tenkovrstvová chromatografia. TLC metódy sú vhodné na identifikáciu jednotlivých glykoalkaloidov aj ich aglykónov. Ako tenká vrstva sa používa silikagél. Z množstva vyskúšaných systémov rozpúšťadiel používaných na vyvíjanie chromatogramu sa najviac osvedčili zmesi chloroform-metanol (etanol) - 1 % roztok amoniaku a etylacetát-pyridín-voda pre glykoalkaloidy leptínového typu [10]. Najmä demissidín a solanidín sa dajú takto výborne oddeliť. Po vyvíjaní chromatogramu sa na vyvolanie farebnej reakcie používa chlorid antimonytý a joditý, Dragendorfovo činidlo, alebo modifikované Klarkovo činidlo (H_3PO_4 a paraformaldehyd) [11].

Kvantifikácia TLC metód je všeobecne zložitá. Intenzita sfarbenia škvŕn sa meria denzitometrom, fotometrom a fluorescenčným detektorom [12].

Plynová chromatografia. Podstatnými črtami stanovenia SGA metódou GLC je prvostupňová hydrolýza a následné metódy rozdelenia aglykónov a ich stanovenie. V tejto oblasti nastal výrazný posun. V roku 1984 bol napr. solanidín v kravskom mlieku po jeho uvoľnení stanovený na sklenenej kolóne naplnenej 3 % OV 17 na Chromosorbe WHP za využitia dusíko-fosforového detektora [34]. Výhodami plynovej chromatografie je vysoká citlivosť detekcie. Všeobecne sa môže použiť plameňovoionizačný detektor (FID), alebo selektívny detektor pre dusík a fosfor (NPD) [13]. Najnovšia kapilárna GC (HRGC) oveľa účinnejšie separuje zmes glykoalkaloidov v relatívne krátkom čase [14]. Pri použití GC metód sa musia celé molekuly SGA derivatizovať. Využíva sa permetylová reakcia s metyljodidom v roztoku dimetylsulfoxidu [15]. Metylové deriváty solanidínu a demissidínu, tomatidenolu a tomatidínu sa za týchto podmienok nedajú separovať. Dajú sa stanoviť ako metylestery. Zmesi, ktoré by mohli obsahovať tieto zložky sa hydrolyzujú za takých podmienok, aby Δ^5 -nenасыtená zložka (solanidín a tomatidenol) sa kvantitatívne premenili na dién (solantrén alebo tomatidín), zatiaľ čo насыtené zložky zostali nezmenené. Priama GC sa použila

na meranie proporcie každej zložky, od diékových produktov sa dali odseparovať ich korešpondujúce nasýtené analógy. Výhody kapilárnej GC metódy a vnútorného štandardu umožnili stanoviť nederivatizované aglykóny solanidínu, leptinidínu, tomatidínu a acetylleptidínu [16].

Špeciálne, len na stanovenie α -solanínu a α -chaconínu plynovou chromatografiou sa využíva schopnosť tvoriť komplex so stigmasterolom v metanole. Komplex sa oddelí, znova rozloží a stanoví sa voľný stigmasterol [17].

Kvapalinová chromatografia. Jedná sa o analýzu termolabilných, silne polárnych, neprchavých látok s nízkou teplotou varu, preto je výhodnejšie použiť HPLC metódy. Hlavnou prekážkou úspešnej aplikácie tejto techniky pre analýzu glykoalkaloidov je nájdenie vhodnej detekcie a kvantifikácie, pretože neabsorbujú v UV oblasti pri 200 nm. Len tomatín a 5-tomatidenol sa separovali bežnou HPLC s UV detekciou [18]. Pre ostatné glykoalkaloidy je vhodnejší refraktometrický detektor (RID) [19,20,21]. Tento detektor bol úspešne použitý na rozdelenie hydrolyzovanej zmesi glykoalkaloidov v rozličných hybridoch *Solanum* [22].

α -Solanín a α -chaconín sa dajú separovať a identifikovať kolónou pre analýzu sacharidov a mobilnou fázou tetrahydrofurán-voda-acetonitril (53:17:30). Ak sa použijú reverzné fázy na C18 kolóne s mobilnou fázou acetonitrilvoda-etanolamín (45:55:0,1), čas analýzy sa skráti [23,24]. Na analýzu solanidínu a všetkých jeho známych glykozidov sa dajú použiť rôzne náplňové kolóny a mobilné fázy. Najnovšie sa používajú extrakčné kolóny so zakotvenou tuhrou fázou na výkonné prečistenie vzoriek (Sep-Pak kolóny) [25]. Separáciu a kvantifikáciu HPLC metódou opísal pre solanidín Nes [26], pre solasonín a solamargín Cham a Wilson [27], pre solasodín a niektoré jeho mono-, di- a triglykozidy Crabbe a Fryer [28].

Okrem analýzy glykoalkaloidov sa dajú stanoviť aj ich aglykóny, alebo sacharidové zložky. HPLC metódy sa na analýzu veľmi polárnych a nepolárnych aglykónov pre zdĺhavosť stanovenia nepoužívajú. Vo všeobecnosti, UV a RI detektor používaný v HPLC nie je citlivý na nasýtené SA, ako je demissidín, tomatidín a solanodulcidín [29]. Vhodný je FID a NPD detektor používaný pre GC [30,31]. V poslednom období boli publikované výsledky, ktoré na rozdelenie SGA použili tzv. kyslé kolóny (zakotvený aktívny silanol na rôznych nosičoch) [32].

Biochemické metódy

Tak ako aj v iných oblastiach analýzy prírodných látok čoraz viac nachádzajú uplatnenie aj pri analýze SGA biochemické metódy. Za ich hlavnú výhodu sa označuje ich väčšia rýchlosť, a čo je dôležité, prakticky odpadá často komplikovaná príprava vzoriek na vlastné stanovenie. Na stanovenie celkového množstva glykoalkaloidov v hľuzách zemiakov bola použitá imunometóda ELISA [33]. RIA metóda bola využitá na stanovenie solanidínu v krvnej plazme [34].

Analýza SGA je dnes komplexná. Zaslúžila sa o to aplikácia inštrumentálnych metód. Treba však zdôrazniť, že neexistuje najvýhodnejšia metóda na stanovenie steroidných glykoalkaloidov. Každá metóda má ešte zostávajúce problémy, ktoré však majú vyhliadky na riešenie. Ešte stále sa nevyvinula štandardná metóda, ktorou by sa dali univerzálne stanoviť všetky zložky v zmesi glykoalkaloidov [35]. Zdá sa, že každá skupina pracovníkov preferovala vývin a testovanie svojich vlastných metód. Akékoľvek zdokonalenie vedie k účinnejšej analýze, treba však upozorniť na nahromadenie problémov, ktoré sa pri tom vyskytujú.

Literatúra

1. RIPPERGER, H. - SCHREIBER, K., Solanum steroid alkaloids, In: The Alkaloids. R.G.A. RODRIGO (ed.), New York, Academic Press 1981, s.81-192.
2. ALI, A. - SCHLOSSER, E., *Angew. Botanik*, 51, 1977, s.143.
3. DRDÁK, M. - VALACHOVÁ, J., *Bulletin PV*, 32(12), 1993, č.2, s.23-31.
4. SANFORD, L.L. - SINDEN, S.L., *J. Am. Potato*, 51, 1974, s.318.
5. FITZPATRICK, T.J. - OSMAN, S.F., *J. Chromatogr.*, 479, 1989, s.189.
6. COXON, D.T. - PRICE, K.R. - JONES, P.G., *J. Sci. Food Agric.*, 30, 1979, s.1043.
7. BUSHWAY, R.J., WILSON, A.M., BUSHWAY, A.A., *J. Am. Potato*, 57, 1980, s.561.
8. SPERONI, J.J. - PELL, E.J., *J. Am. Potato*, 57, 1980, s.537.
9. BAJAJ, K.L., - KANR, P.P. - SHARMA, O.N., *Analysis*, 16, 1988, s.194.
10. SINDEN, S.L. - SANFORD, L.L. - OSMAN, S.F., *J. Am. Potato*, 57, 1980, s.331.
11. COXON, D.T. - JONES, P.G., *J. Sci. Food Agric.*, 32, 1981, s.366.
12. JELLEMA, R. - ELEMA, E.T. - MALINGRE, Th. M., *J. Chromatogr.*, 210, 1981, s.121.
13. GELDER, W.M.van - JONKER, H.H. - HUIZING, H.J. - SCHEFER, J.J., *C. J. Chromatogr.*, 442, 1988, s.133.
14. GELDER, W.M.van, *J. Chromatogr.*, 331, 1985, s.285.
15. OSMAN, S.F. - ZACHARIUS, R.M. - KALAN, E.B. - FITZPATRICK, T.J. - KRULICK, S.J., *Food Protection*, 42, 1979, s.502.
16. LAWSON, D.R. - ERB, W.A. - MILLER, A.R., *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1992, s.2186.
17. RODDICK, J.G., *Phytochem.*, 19, 1980, s.2455.
18. BUSHWAY, R.J. - BARDEN, E.S. - WILSON, A.M. - BUSHWAY, A.A., *J. Food Sci.*, 45, 1980, s.1088.

19. BUSHWAY, R.J., *J. Chromatogr.*, 247, 1982, s.180.
20. BUSHWAY, R.J., *J. Liq. Chromatogr.*, 5, 1982, s.1313.
21. MORRIS, S.C. - PETERMANN, J.B., *Food Chem.*, 18, 1985, s.271.
22. OSMAN, S.F. - SINDEN, S.L., *J.Chromatogr.*, 479, 1989, s.189.
23. CARMAN, A.S. - Jr. KUAN, S.S. - WARE, G.M. - FRANCIS, O.J., Jr.- KIRSHENHEUTER G.P., *J. Agric. Food Chem.*, 34, 1986, s.279.
24. BUSHWAY, R.J. - BUREAU, J.L. - KING, J.J., *Agric. Food Chem.*, 34, 1986, s.277.
25. GELDER, W.M.van - De PONTI, O.M.B., *Euphytica*, 36, 1987, s.555.
26. NES, W.D. - HEFTMANN, E. - HUNTER, I.R. - WALDEN, M.K., *J. Liq. Chromatogr.*, 3, 1980, s.1687.
27. CHAM, B.E. - WILSON, L., *Planta Med.*, 4, 1987, s.59.
28. CRABBE, P.G. - FRYER, C., *J. Chromatogr.*, 187, 1980, s.87.
29. MORGAN, M.R.A. - McNERNEY, R. - MATTHEW, J.A. - COXON, D.T. - CHAN, W.S., *J. Sci. Food Agric.*, 34, 1983, s.593.
30. KING, R.R., *J. Assoc. of Anal. Chem.*, 63, 1980, s.1226.
31. BUSHWAY, R.J. - McGANN, D.F. - BUSHWAY, A.A., *J. Agric. Food Chem.*, 32, 1984, s.548.
32. FRIEDMAN, M. - LEVIN, C.E., *J.Agric. Food Chem.*, 40, 1992, s.2157.
33. HELLENAS, K.E., *J. Sci. Food Agric.*, 37, 1986, s.776.
34. COXON, D.T., *Am. Potato J.*, 61, 1984, s.115.
35. MORGAN, M.R.A. - COXON, D.T. - BRANHAM, S. - CHAN, H.W.S. - GELDER, W.M.van ALLISON, M.J., *J. Sci. Food Agric.*, 36, 1985, s.282.

Do redakcie došlo 3.3.1993.

Determination methods of tomato steroid glycoalkaloides

Summary

The survey gives the basic information on possibilities of steroid glycoalkaloides (SGA) determination in plant material with the emphasis to tomatoes. The paper is aimed at possibilities of SGA total amount determination by classic processes based on coagulation and calorimetric methods, from chromatographic methods TLC, GLC and HPLC methods are mentioned in more detail. The ELISA and RIA methods are also mentioned.