

## Dozarea carotenilor in plante

**Principiul metodei.** Materialul vegetal se tritureaza cu un amestec de sulfat de sodiu anhidru si oxid de calciu, care retin substantele colorate in afara de caroteni. Pentru a preveni descompunerea carotenilor in mediu acid se adauga la amestec carbonat de sodiu anhidru. Carotenii din amestecul triturat se extrag cu acetona și eter de petrol sau benzină. În extractul obținut se determină colorimetric, direct sau după o prealabilă purificare cromatografică pe coloană cu oxid de aluminiu conținutul de caroteni în materialul analizat.

### Reactivi

1. acetona
2. hexan p.a.
3. sulfat de sodiu anhidru
4. oxid de calciu
5. carbonat de calciu anhidru
6. eter de petrol sau benzină
7. fosfat dicalcic
8. soluție etalon de azobenzen. Se dizolvă 14.5 mg de azobenzen (recristalizat din alcool etilic) în 100 ml etanol 96%. Intensitatea culorii acestei soluții corespunde cu cea a unei soluții conținând 0.00235 mg caroten într-un ml.
9. Soluție etalon de dicromat de potasiu. Se dizolvă 72 mg dicromat de potasiu în 100 ml apă distilată. Extincția acestei soluții corespunde unui conținut de 0.00416 mg caroten într-un ml soluție.

### Mod de lucru

#### Extracția produselor vegetale uscate.

Într-un flacon conic cu dop rodat se introduce o cantitate exact cântărită de material vegetal mărunțit cât mai fin posibil. La un conținut în caroten mai mare de 10 mg% se va lua 1 g material, la 5 mg% se vor lua 2 g sau 4 g la un conținut mai mic de 5 mg%. Se adaugă 30 ml amestec de acetona cu hexan (3:7) și se lasă la temperatura camerei, timp de 15 – 24 de ore, la întuneric.

Extractul se filtrează prin decantare într-un balon cotat de 100 ml conținând 9 ml acetona, se spală reziduul de câteva ori cu volume mici de hexan și se completează la semn cu același solvent.

#### Extracția materialului vegetal proaspăt

O probă de 0.1 – 10 g (în funcție de conținutul presupus de caroteni) din materialul vegetal proaspăt, în prealabil mărunțit, se triturează într-un mojar cu o cantitate dublă de nisip de cuarț sau sticlă pisată, până la completa dispariție a elementelor structurale vegetale și obținerea unui amestec omogen. Deoarece carotenii sunt instabili la pH acid, în timpul mojarării se adaugă un vârf de spatulă de carbonat de sodiu anhidru pentru neutralizarea acizilor. De asemenea se adaugă o cantitate de sulfat de sodiu anhidru aproximativ egală cu aceea a probei cântărite cu scopul de a fixa apa din materialul vegetal și o cantitate echivalentă de oxid de calciu, pentru reținerea clorofilei și xantofilei. Amestecul se mojarăază până se transformă într-o pulbere fină de culoare galben-verzuie.

În mojar se pipetează 5-20ml de acetona și se continuă mojararea încă câteva minute. Apoi conținutul mojarului se trece cantitativ într-un pahar Berzelius de 50ml sau într-o eprubetă, spalînd mojarul de mai multe ori cu cantități mici de acetona. După ce materialul se lasă timp de 15-20 minute în contact cu acetona, se varsa amestecul acetonc, prin decantare, într-o pîlnie de separare. Se repetă extracția materialului din pahar sau eprubetă, cu cantități mici de acetona de 4-10 ori, pînă cînd acetona folosită în acest scop rămîne incoloră.

Extractul acetonc din pîlnia de separare se amesteca cu 10-20ml de benzină sau eter de petrol. Acetona din amestec se îndepărtează prin spălare cu apă distilată. În acest scop se introduc în pîlnia de separare 10-20ml apă distilată și se agită ușor.

Se așteaptă câteva minute pînă are loc separarea distinctă a două straturi de lichide. Stratul inferior aposo-acetonc se elimină din pîlnie cu atenție. Se repetă spălarea extractului din pîlnie cu apă încă de 2-3 ori. Ca rezultat carotenii trec complet în stratul de benzină sau de eter de petrol.

Soluția benzinică sau eterică se usucă de urmele de apă prin amestecare cu 1-5g sulfat de sodiu anhidru, urmată de filtrare. La filtratul obținut se adaugă 0,5-1g fosfat dicalcic pentru izolarea clorofilei și xantofilei. Soluția de caroteni se filtrează și se completează la volum cunoscut cu benzină sau eterul de petrol.

**Dozarea colorimetrică directă a crotenilor în soluția benzinică (eterică).** Măsurarea intensității culorii soluției benzinice de caroteni, obținută în modul descris sus, se poate efectua la spectrofotometru, folosind lungimea de undă de 450 nm (filtru albastru), iar pentru compensație benzină sau eterul de petrol.

**Dozarea carotenilor după separarea prin cromatografia de adsorbție pe oxid de aluminiu.**

**Separarea carotenilor** de pigmenții însoțitori se realizează cu ajutorul cromatografiei și adsorbție pe oxid de aluminiu, cu folosirea în calitate de fază lichidă a eterului de petrol. La partea inferioară a unei coloane cromatografice, cu lungimea de 12-16cm și diametrul de 1-1,5cm se fixează un tampon de vată de sticlă sau medicinală de 0,5-1cm grosime. În coloană se introduc porțiuni mici de oxid de aluminiu cu umiditate de 4%, tasînd ușor cu o baghetă de sticlă adsorbantul. Înălțimea stratului de adsorbant trebuie să atingă 7-10cm. Deasupra adsorbantului se așază un strat de vată și unul de sulfat de sodiu anhidru, cu grosimea de 0,5cm. Soluția de caroteni în eter de petrol se filtrează prin coloană cromatografică cu o viteză de 60 picături pe minut. În timpul cromatografierii este necesar ca deasupra umpluturii coloanei să fie tot timpul un strat de solvent, întrucît carotenii se oxidează la contactul cu aerul. După adsorbția soluției de caroteni pe oxidul de aluminiu, adsorbantul se spală cu eter de petrol până ce zonele galbene de caroteni se eluează complet din coloană. Spălarea coloanei se consideră terminată, când eluatul devine transparent. Soluția de caroteni se adună într-un balon cotat de 25-50 ml și se completează cu eter de petrol la semn. Cantitatea de caroteni în eluatele obținute se determină prin colorimetrare la 450nm, față de eterul de petrol.

Calculul rezultatelor. Pentru calcularea conținutului de caroteni în probe se măsoară în aceleași condiții extincția soluției etalon de azobenzen sau dicromat de potasiu.

Cantitatea carotenilor în materialul vegetal cercetat se calculează după formula următoare:

$$\text{mg caroteni}\% = E_1 \cdot a \cdot v \cdot 100 / E_2 \cdot p$$

unde:

- E1 = extincția probei de cercetat;
- E2 = extincția soluției etalon;
- a = mg de caroteni într-un ml soluție etalon (0,00235 mg în cazul soluției de azobenzen și 0,00416 mg dacă s-a lucrat cu soluția de dicromat de potasiu);
- v = volumul soluției de caroteni, ml;
- p = greutatea materialului luat pentru analiză, g.