	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50211.1 – Stanovení obsahu lykopenu spektrofotometricky	Vydání	1
		Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU LYKOPENU SPEKTROFOTOMETRICKY

1 Účel a rozsah

Postup je určen pro stanovení obsahu lykopenu ve vzorcích rostlinného materiálu (rajčat).

2 Princip

Lykopen se ze vzorku extrahuje směsným roztokem organických rozpouštědel a následně se stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 503 nm.

3 Chemikálie


Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- 2 Dichlormethan.
- 3 Hexan.
- 4 Aceton.
- 5 Ethanol, $c(C_2H_5OH) \approx 96 \%$, denaturovaný.
- 6 Směsný roztok.

Příprava: Hexan (3), aceton (4) a ethanol (5) se smíchají v poměru 2 : 1 : 1 (V/V/V) v Erlenmeyerově baňce se zábrusem. Množství směsného roztoku se volí podle celkového objemu potřebného na extrakci.

- 7 Síran sodný bezvodý.
- 8 Standard lykopenu, čistota > 90 %.
- 9 Lykopen, zásobní roztok.

Příprava: Naváží se 2 mg lykopenu (9) s přesností 0,01 mg a v 50ml odměrné baňce se rozpustí ve 3 ml dichlormethanu (2). Odměrná baňka se umístí přibližně na 30 s do ultrazvukové lázně a poté se doplní hexanem (3) po značku. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 40 μ g lykopenu v hexanu/dichlormethanu (4/3) (V/V). Zásobní roztok se skladuje v lednici, chráněn před světlem.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50211.1 – Stanovení obsahu lykopenu spektrofotometricky	Vydání	1
		Revize	1

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Kuchyňský mixer.
- 2 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.
- 3 Laboratorní třepačka.
- 4 Spektrofotometr.
- 5 Alobal.
- 6 Filtrační papír střední hustoty.

5 Postup

5.1 Příprava vzorku


Vzorek se homogenizuje a upravuje těsně před vlastním stanovením. Musí se chránit před světlem a UV zářením. Vzorek zeleniny (rajčat) se rozmixuje pod ochranou atmosférou oxidu uhličitého a převede se do tmavé prachovnice. Příprava zkušební vzorku je podrobně popsána v JPP – Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu, kap. 5.9, postup 60150.1 Úprava vzorků čerstvých hmot.

5.2 Extrakce směsí rozpouštědel

Naváží se 1,5 g vzorku s přesností na 1 mg a kvantitativně se převede do 200ml Erlenmeyerovy baňky. Baňka se obalí alobalem, aby se zabránilo přístupu světla. Přidá se 50 ml směsného roztoku (6) a 30 min se třepe na třepačce. Poté se přidá 10 ml vody (1) a třepe se dalších 5 min. Směs se převede do dělicí nálevky, uzavře zátkou a nechá 30 min stát, aby došlo k dokonalému oddělení fází. Spodní vodno-ethanolická fáze se převede zpět do Erlenmeyerovy baňky, přidá se 25 ml směsného roztoku (6) a provede se druhé třepání. Horní hexanová vrstva se přefiltruje přes papírový filtr, na který se přidá asi 1 g bezvodého síranu sodného (7), aby došlo k odstranění zbytků vody z extraktu. Filtruje se do 50ml odměrné baňky. Směs po druhém třepání se znovu nalije do dělicí nálevky a nechá se 30 min stát. Po oddělení se spodní vodná vrstva velmi opatrně odstraní a horní organická vrstva se opět filtruje přes stejný filtr s přidavkem síranu sodného (7) do 50ml baňky obsahující první podíl. Erlenmeyerova baňka, dělicí nálevka, i nálevka se opakovaně promyjí malým množstvím hexanu (3), který se přidá k oběma podílům. Nakonec se odměrná baňka doplní hexanem (3) po značku.

Poznámky

- 1 Po každém úkonu se nádoby uzavírají zátkami, aby nedocházelo k odpařování hexanu.
- 2 Roztok lykopenu se chrání před přímým slunečním světlem a UV zářením.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50211.1 – Stanovení obsahu lykopenu spektrofotometricky	Vydání	1
		Revize	1

5.3 Příprava kalibračních roztoků lykopenu

Do sady 50ml odměrných baněk se pipetuje (0; 1; 3; 4; 5; 6; 8; 10) ml zásobního roztoku lykopenu (9) a doplní se hexanem (3) po značku. Získají se tak kalibrační roztoky o koncentraci (0; 0,8; 2,4; 3,2; 4,0; 4,8; 6,4; 8,0) $\mu\text{g/ml}$.

5.4 Spektrofotometrické stanovení

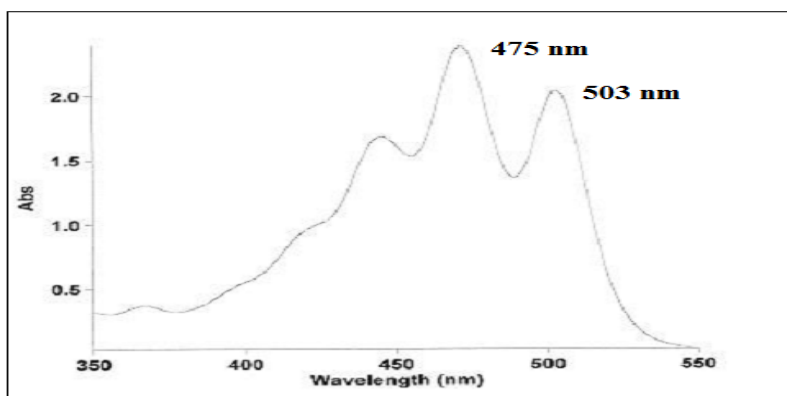
Spektrofotometrické měření probíhá při vlnové délce 503 nm. Nastavení absorbanční nuly přístroje se provádí na směsný roztok (6). Před vlastním stanovením se vždy proměří sada kalibračních roztoků lykopenu a vytvoří se kalibrační závislost.


Poté se proměří připravený vzorek (5.2) a získaná hodnota absorbance se vyhodnotí podle kalibrační závislosti.

Poznámky

- 3 *Pro spektrofotometrické stanovení byla zvolena vlnová délka 503 nm. Lykopen zde má jedno ze svých maxim (obrázek č. 1), které však není ovlivněno jinými pigmenty jako jsou např. lutein nebo β -karoten.*
- 4 *Při výpočtu koncentrace kalibračních roztoků je nutné zohlednit čistotu použitého standardu (obvykle 90 %).*

Obrázek. č. 1. Absorpční spektrum lykopenu.



 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50211.1 – Stanovení obsahu lykopenu spektrofotometricky	Vydání	1
		Revize	1

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Sestrojí se graf závislosti absorbance lykopenu na jeho koncentraci v požadovaném rozsahu a ze směrnice přímky se vypočítá obsah lykopenu v extraktu, vyjádřený v $\mu\text{g/ml}$.

Výsledná koncentrace lykopenu ve vzorku, vyjádřená v mg/kg se vypočte ze vztahu

$$X = \frac{c \times V}{m}$$

kde V je celkový objem pracovního roztoku v ml,

c změřená koncentrace lykopenu na spektrofotometru, stanovená odečtem z kalibrační závislosti v $\mu\text{g/ml}$ při vlnové délce 503 nm,

m navážka vzorku v g.

Výsledky se získávají jako průměr minimálně dvou paralelních stanovení a uvádějí se v mg/kg čerstvé hmoty.

7 Literatura

- 1 Ravelo-Peréz, L.M., Hernández-Borger, J., Rodrigues-Delgado, M., Borgas-Miguel, T.: Spectrofotometric Analysis of Lycopene in Tomatoes and Watermelons. A practical Class, Chem Educator, 2008, 13, 11-13.
- 2 Novotná, P., Holasová, M., Friedlerová, V., Zelený, F., Zelená, V., Průchová, J., Strohan, J., Kýhos, K., Houška, M.: Vliv výše teploty a doby výdrže na obsah lykopenu a barvu homogenizátu z rajčat - poster, XL. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, 2010.