

Zygmunt Burnus

*Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy*

## Barwniki roślinne w estrach metylowych kwasów tłuszczowych. Część 1: Metodyki badań barwników roślinnych

Przedstawiono nowy obszar badań substancji śladowych w estrach metylowych kwasów tłuszczowych wytworzonych z oleju rzepakowego, wykorzystywanych jako samoistne paliwo lub jako biokomponenty paliwa do silników z zapłonem samoczynnym. Dokonano przeglądu literatury w zakresie zastosowania techniki HPLC do badania różnych olejów roślinnych pod kątem zawartości barwników roślinnych. W odniesieniu do uzyskanych wyników badań olejów roślinnych, dla celów przyszłościowych badań, wytypowano barwniki roślinne, które mogą występować w handlowych próbkach FAME. Zebrane informacje wykorzystano przy doborze metodyki badania barwników roślinnych w próbkach FAME wytworzonych z oleju rzepakowego.

Słowa kluczowe: barwniki roślinne, chromatografia cieczowa, biopaliwa.

### Plant dyes in fatty acid methyl esters. Part 1: Methods of test of plant dyes

A new area of research of trace components in fatty acid methyl esters obtained from rapeseed oil, for use as a fuel or as a biocomponent of fuel for diesel engines is presented. A review of the literature in the area of the use of HPLC technique for the determination of selected plant dyes in various vegetable oils was done. Regarding the available results of vegetable oil tests, plant dyes were selected. As a result of the review of analytical methods, the methods for the determination of plant dyes in commercial FAME samples produced from rapeseed oil were selected.

Key words: plant dyes, liquid chromatography, biofuels.

### Wprowadzenie

Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy zajmuje się badaniami estrów metylowych kwasów tłuszczowych FAME z wykorzystaniem metod chromatograficznych od wielu lat. W poprzednich latach zwracano szczególną uwagę na badania substancji śladowych obecnych w FAME, które mogą mieć wpływ na parametry jakościowe produktu końcowego. Były to między innymi nasycone monoacyloglicerole oraz wolne glukozydy steroli [4], sterole roślinne w formie wolnej [3, 5] oraz tokoferole [6]. Do tej pory w badaniach wykorzystywano technikę chromatografii gazowej GC z detekcją płomieniowo-jonizacyjną FID oraz spektrometrią mas MS. Oznaczanie wymienionych substancji techniką GC było możliwe z uwagi na stabilność termiczną tych substancji chemicznych. W przypadku takich substancji jak barwniki roślinne, bezpośrednie zastosowanie techniki chromatografii gazowej nie jest możliwe. Barw-

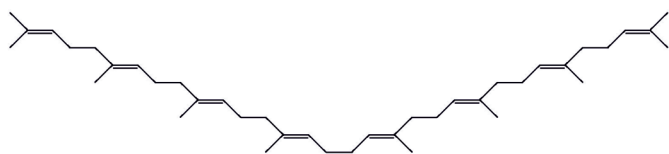
niki roślinne charakteryzuje wysoka polarność oraz temperatura wrzenia przekraczająca 600°C. Te cechy sprawiają, że najbardziej odpowiednie do ich oznaczania jest zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC.

Podjezuwa się, że barwniki roślinne mogą mieć wpływ na niektóre parametry użytkowe końcowego produktu – FAME, stosowanego jako samoistne paliwo (B100) lub jako komponent oleju napędowego. W przeprowadzonych do tej pory badaniach w INiG – PIB wykazano między innymi wpływ zawartości wolnych glukozydów steroli na właściwości FAME w niskich temperaturach [7, 20], jak również wpływ zawartości tokoferoli na stabilność oksydacyjną FAME. Podobnie jak wolne glukozydy (lub inaczej glikozydy) steroli i tokoferole, barwniki roślinne nie zostały ujęte zarówno w wymaganiach specyfikacji europejskiej dla paliwa B100 [32], jak i amerykańskiej [31].

## Wprowadzenie do tematyki barwników roślinnych

Barwniki roślinne są związkami organicznymi obecnymi w roślinach, które możemy podzielić na kilka grup. Są to między innymi chlorofile (o barwie zielonej), nadające dominującą zieloną barwę liściom, karotenoidy o barwie od żółtej do pomarańczowej, widoczne w zabarwieniu roślin w przypadku niższych zawartości chlorofili, antocyjany, betainy oraz tzw. fikobiliny (o barwie ciemnozielonej), które występują tylko w roślinach wodnych [13].

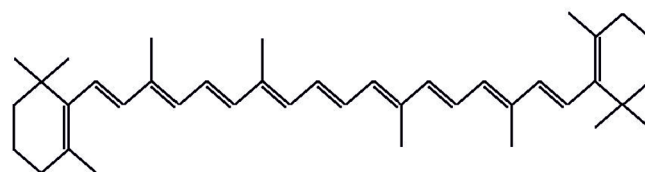
Z punktu widzenia badań biopaliw typu czystych FAME, szczególnie interesująca jest grupa związków organicznych z grupy tetraterpenów, zwanych karotenoidami. Związki te syntezowane są w roślinach w obecności enzymów, pełniąc ważną rolę w procesie fotosyntezy, poczynając od kwasu mewalonowego, który poprzez węglowodór nienasycony – fitoen o 40 atomach węgla w cząsteczce i dziewięciu wiązaniach podwójnych, jest prekursorem dwóch grup związków barwnych [16].



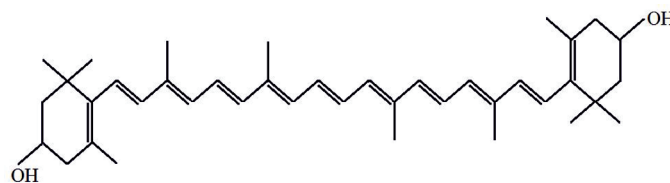
Rys. 1. Wzór strukturalny fitoenu – prekursora karotenoidów

Karotenoidy, stanowiące szeroką gamę związków organicznych, można podzielić na karoteny (np.  $\beta$ -karoten – rysunek 2), stanowiące węglowodory nienasycone, oraz ksantofile

(np. luteina – rysunek 3), posiadające dodatkowo atomy tlenu w cząsteczce. Związki te charakteryzują się barwą od żółtej, przez pomarańczową, do czerwonej. Należy zwrócić uwagę na możliwość występowania izomerów *cis/trans* karotenoidów. Z uwagi na dużą ilość wiązań podwójnych możliwa liczba izomerów sięga setek. Najczęściej występującymi izomerami są jednak izomery *trans*, takie jak przedstawiono na rysunkach 2 i 3. Możliwość wykrycia izomerów *cis* daje spektrometria UV-VIS, w postaci dodatkowego maksimum na rejestrowanym widmie UV-VIS [13].



Rys. 2. Wzór strukturalny  $\beta$ -karotenu – przedstawiciela karotenów



Rys. 3. Wzór strukturalny luteiny – przedstawiciela ksantofili

## Barwniki roślinne w biopaliwach

W przypadku typowej produkcji biopaliw typu estrów metylowych kwasów tłuszczowych z roślin oleistych mamy do czynienia z wykorzystaniem, w większości przypadków, materiału roślinnego pozbawionego części zielonych. Stąd, przy estrach metylowych wytworzonych z oleju rzepakowego, obserwujemy głównie barwę żółtą, związaną z zawartością żółtego barwnika w nasionach rzepaku. Barwa ta jest również typowa dla ksantofili. Dodatkowe, lekkie zabarwienie pomarańczowe FAME wskazuje na obecność karotenoidów. Oceniając barwę estrów metylowych kwasów tłuszczowych z oleju rzepakowego, obecnych na polskim rynku biopaliw, przewiduje się w nich obecność przedstawicieli obu tych grup barwnych związków organicznych. Dane literaturowe dla surowego oleju rzepakowego [16] wskazują, że występują w nim karotenoidy na poziomie 130 mg/kg, w tym 10% mas. karotenów i 90% mas. ksantofili.

Barwa wyprodukowanych estrów metylowych kwasów tłuszczowych zależy w głównej mierze od barwy oleju, z którego je wyprodukowano. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na barwę FAME są warunki procesu produkcji,

w tym rafinacji FAME. Barwniki roślinne z grupy karotenoidów, z uwagi na charakterystyczną dużą ilość wiązań podwójnych, są wrażliwe na podwyższoną temperaturę i łatwo ulegają utlenianiu przy dostępie powietrza [10]. Intensywna żółto-pomarańczowa barwa estrów metylowych kwasów tłuszczowych, może wskazywać z jednej strony na zastosowanie oleju nierafinowanego do produkcji FAME, ale również na brak dodatkowych procesów rafinacji wyprodukowanych FAME. Brak żółto-pomarańczowego zabarwienia FAME może świadczyć o niskiej zawartości substancji z grupy karotenoidów, usuniętych na jednym z etapów produkcji oleju lub produkcji FAME.

Przy dużym zróżnicowaniu barwy handlowych estrów metylowych kwasów tłuszczowych interesujące wydaje się zbadanie rodzajów barwników w nich występujących oraz ich zawartości. Zawartość tych związków w FAME, z uwagi na obecność w nich szeregu wiązań podwójnych, prawdopodobnie może istotnie wpływać na niektóre parametry jakościowe produktu finalnego, takie jak między innymi stabilność oksydacyjna.

## Metody chromatograficzne badania barwników roślinnych

Już od początków chromatografii, w roku 1903, kiedy Cwiet [15] zaprezentował na Cesarskim Uniwersytecie Warszawskim możliwość rozdzielenia barwników roślinnych na kolumnie wypełnionej węglanem wapnia, do badania substancji barwnych stosuje się chromatografię w układzie ciecz–ciało stałe. Należy tutaj wymienić klasyczną kolumnową chromatografię cieczową oraz chromatografię cienkowarstwową. Obie z technik są bardzo przydatne w badaniu szeregu substancji organicznych, charakteryzujących się wysoką polarnością oraz niską odpornością na podwyższoną temperaturę. Takie cechy posiadają związki organiczne z grupy karotenoidów. Chromatografia cienkowarstwową może posłużyć do badań całych grup związków barwnych, jednak bez możliwości dokładnego rozdzielania na poszczególne substancje organiczne, oraz z ograniczoną precyzją metod ilościowych. Interesujące wydaje się zbadanie poszczególnych substancji barwnych wraz z poziomem ich zawartości. Umożliwia to wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC (ang. *high performance liquid chromatography*), dzięki zastosowaniu wysokorozdzielczych kolumn chromatograficznych oraz pomp wysokociśnieniowych w połączeniu z bardzo czułym na te substancje systemem detekcji.

Obecnie, do badań w zakresie karotenoidów w olejach różnego pochodzenia wykorzystuje się najczęściej technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC wraz z różnymi systemami detekcji. W pracy Sarungallo i in. [27] wykorzystano tę technikę wraz z detekcją UV/VIS do zbadania czterech wybranych karotenoidów ( $\alpha$ -kryptoksantyny,  $\beta$ -kryptoksantyny oraz  $\alpha$ -karotenu i  $\beta$ -karotenu) w indonezyjskim oleju roślinnym *pandanus conoideus*. Wskazano na wysoką zawartość wszystkich oznaczanych karotenoidów w badanym, nietypowym oleju roślinnym (3÷20 mg/g). Jako technikę przygotowania próbek oleju roślinnego do badań zastosowano zmydlenie roztworem wodorotlenku potasu w etanolu, przerywane chlorkiem sodu, a ekstrakcję karotenoidów przeprowadzono mieszaniną heksanu z octanem etylu 9:1 (V/V). Analizę HPLC wykonano przy użyciu kolumny chromatograficznej z fazą RP-5 C30 o wymiarach 50 × 4,6 mm i średnicy ziaren wypełnienia 5  $\mu$ m. Jako system detekcji wykorzystano detektor UV-VIS, a objętość pętli dozownika wynosiła 20  $\mu$ l. Jako rozpuszczalniki zastosowano dwie mieszaniny: wody z acetonitrylem oraz acetonitrylu, metanolu i octanu etylu. Obie mieszaniny były podawane przez układ pomp w programowanym gradiencie stężeń. Wszystkie karotenoidy były wykrywane przez detektor UV-VIS przy długości fali równej 450 nm. Uzyskano współczynniki korelacji liniowej przekraczające wartość 0,992. Precyzja metody wyniosła około 11% względnego odchylenia standardowego wyniku badania.

Autorzy wskazali na krótsze czasy retencji wybranych karotenoidów od spodziewanych w literaturze przy użyciu zastosowanej kolumny chromatograficznej oraz bliskość czasów retencji dla par izomerów  $\alpha$ - i  $\beta$ - obydwu karotenoidów.

W pracy Franke i in. [9] przedstawiono wyniki oznaczania karotenoidów i witaminy E w nasionach i olejach, takich roślin jak rzepak i słonecznik. Praca jest szczególnie cenna z uwagi na podanie typu i zawartości karotenoidów, występujących w oleju rzepakowym. Według autorów, do karotenoidów, występujących w największych ilościach w oleju rzepakowym, należą luteina i zeaksantyna. Sumaryczna zawartość karotenoidów w przebadanych próbkach nierafinowanego oleju rzepakowego wyniosła 5÷15 mg/kg. Jako główny karotenoid oleju rzepakowego zidentyfikowano luteinę. W przypadku próbek rafinowanych olejów rzepakowych, zgodnie z wcześniejszymi przewidywaniami, nie uwidoczniło się sygnałów pochodzących od karotenoidów. Zastosowano dwa systemy chromatografii HPLC z detekcją UV-VIS. Jeden w układzie faz normalnych z kolumną Luna-Silica, drugi w układzie faz odwróconych z kolumną C30. Warunki badań przedstawione w pracy podano w tablicy 1.

Spośród metod zastosowanych w pracy [9], obiecującą do wykorzystania w badaniach nad karotenoidami w FAME wydaje się metoda pierwsza, z uwagi na zastosowanie łatwej do uzyskania temperatury pracy termostatu HPLC. Metoda druga wymagałaby zastosowania kriostatu. W metodzie pierwszej zastosowano układ faz normalnych, tzn. polarnej kolumny oraz rozpuszczalnika o niskiej polarności. Układ ten stwarza możliwość łatwej predykcji czasów retencji badanych substancji, ponieważ w takim układzie elucja przeważnie zachodzi wraz ze wzrostem polarności analitów. Dodatkowo, detektor UV-VIS z matrycą diodową umożliwia otrzymywanie w czasie rzeczywistym widm UV-VIS w zakresie 200÷800 nm dla eluentu z chromatografu cieczowego. Daje to możliwość między innymi oceny czystości piku, a zatem koeluujących składników oraz identyfikacji substancji charakterystycznych na podstawie widma UV-VIS. Możliwe jest uzyskanie chromatogramu dwuwymiarowego (czas retencji względem długości fali) oraz trójwymiarowego (czas retencji względem długości fali oraz intensywności sygnału).

W pracy Gupta i in. [14] wykorzystano kolumnę z fazą stacjonarną C30 oraz układ faz odwróconych. Uzyskano bardzo dobry rozdział karotenoidów obecnych w ekstrakcie z roślin techniką wysokosprawnej ultraszybkiej chromatografii cieczowej UHPLC przy zastosowaniu gradientu składu rozpuszczalników: metanolu, MTBE i wody. Zastosowana temperatura, równa 20°C, wymaga wykorzystania dodatkowego urządzenia chłodzącego.

Tablica 1. Warunki analizy karotenoidów techniką HPLC-UV-VIS według [9]

Parametry HPLC	Zastosowana aparatura/warunki badania nr 1	Zastosowana aparatura/warunki badania nr 2
Faza stacjonarna, rozmiar cząstek	Luna Silica, 5 $\mu$ m, Niemcy	C30, 5 $\mu$ m, Niemcy
Rozmiar kolumny	250 mm $\times$ 4,6 mm	250 mm $\times$ 4,6 mm
Faza ruchoma	n-heksan/izopropanol (95 + 5% (V/V)), elucja izokratyczna	Metanol/MTBE, elucja gradientowa
Temperatura	25°C	6°C
Przepływ przez kolumnę HPLC	1,5 ml/min	1,3 ml/min
Objętość próbki	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Czas rozdziału	20 minut	70 minut
Zastosowany detektor	UV-VIS z matrycą diodową DAD	UV-VIS z matrycą diodową DAD
Wykrywane karotenoidy	$\alpha$ -karoten $\beta$ -karoten kantaksantyna kryptoksantyna luteina zeaksantyna	$\alpha$ -karoten $\beta$ -karoten kantaksantyna kryptoksantyna luteina zeaksantyna
Metoda wzorcowania	wzorcowanie wewnętrzne, biksyna	wzorcowanie wewnętrzne, biksyna

Podobną kolumnę z fazą C30 zastosowano w pracy Saini i in. [26], która dotyczyła badań ekstraktów z liści różnych warzyw (rukola, roszponka). Zastosowano również podobny do poprzedniej pracy układ gradientu rozpuszczalników: metanolu, MTBE i wody. Karotenoidy wykrywano przy długościach fali 440, 445 i 450 nm. Wykryte karotenoidy wiołaksantyna, neoksantyna, luteina, zeaksantyna,  $\alpha$ , $\beta$ -karoten stanowiły od 50 do 200 mg/kg masy ekstraktu lipidowego. W innych pracach Amana i in. [1] oraz Rojas-Garbanzo i in. [25] zastosowano również kolumnę z fazą C30, wybierając do rozdzielania karotenoidów w przypadku pierwszej pracy bardzo polarny układ rozpuszczalników aceton/woda oraz metanolu, MTBE i wody, oraz temperaturę pracy termostatu wynoszącą 20°C. W pracy [25] zastosowano natomiast prostszy układ rozpuszczalników HPLC, obejmujący tylko metanol i MTBE. W pracy Gleize i in. [11] podano przykład zastosowania wyższej temperatury dla kolumny C30, wynoszącej 35°C, natomiast wskazano na możliwą koelucję  $\beta$ -karotenu z jednym ze składników badanych próbek. W przypadku pracy Melendez-Martinez i in. [21] przy zastosowaniu kolumny C30 podano również możliwość rozdzielania izomerów *cis/trans* karotenoidów.

Są przykłady prac z zastosowaniem techniki ultraszybkiej chromatografii UPLC do badania karotenoidów w owocach tropikalnych, m.in. w pracy Gongga i in. [12]. Zastosowano w niej chromatografię z fazą ruchomą CO<sub>2</sub> z metanolem. Czas analizy wyniósł tylko 0,4 minuty, dzięki zastosowaniu fazy ruchomej w stanie nadkrytycznym. W tej pracy zastosowano również detektor UV-VIS DAD. Wydaje się on odpowiednim detektorem do badania tej grupy związków organicznych. Dzięki obecności wielu sprzężonych wiązań po-

dwójnych w karotenoidach, detektor UV-VIS DAD wykazuje bardzo wysoką czułość dla tego typu substancji.

W pracy Li i in. [18] przedstawiono proces optymalizacji rozdzielania i identyfikacji barwników roślinnych ze szczególnym uwzględnieniem rozdzielania astaksantyny od między innymi  $\beta$ -karotenu, zeaksantyny,  $\beta$ -kryptoksantyny i likopenu. Zastosowano detektor UV-VIS DAD oraz kolumnę HPLC z fazą C18, która jest prawdopodobnie najbardziej rozpowszechniona w laboratoriach badawczych na świecie. Wymiary kolumny 150 mm  $\times$  3,9 mm  $\times$  4  $\mu$ m, były nietypowe z uwagi na mniejszą od przeciętnej średnicę kolumny i mniejszy rozmiar cząstek fazy stacjonarnej. Jako rozpuszczalnik zastosowano mieszaninę metanolu 61% (V/V), tetrahydrofuranu 32% (V/V) i acetonitrylu 7% (V/V). Pomiar absorbancji przeprowadzony był również przy nietypowej długości fali 474 nm, podczas gdy pozostałe publikacje w zakresie karotenoidów wskazywały na 450 nm.

Kolumnę z taką samą fazą stacjonarną C18 zastosowano w pracy Nasri i in. [22] wraz z detektorem UV-VIS DAD do badania barwników roślinnych w nasionach roślin oleistych *acacia cyanophylla*. W wyekstrahowanym oleju stwierdzono głównie obecność luteiny i zeaksantyny, podobnie jak w przypadku pracy [16] dotyczącej oleju rzepakowego. Sumaryczna zawartość karotenoidów wyniosła około 100 mg/kg. Zastosowano kolumnę o długości 250 mm, średnicy 4,6 mm i rozmiarze cząstek 4,6 mm. Dla równoczesnego oznaczania tokoferoli w badanych próbkach, zastosowano szereg rozpuszczalników: acetonitryl, metanol, woda, octan amonu, dichlorometan. W zakresie oznaczanych karotenoidów zastosowano pomiar przy długości fali równej 450 nm. Otrzymane chromatogramy wskazują na niską sprawność rozdzielania oznaczanych karotenoidów w warunkach przeprowadzonej analizy.

Spośród innych prac dotyczących badań karotenoidów technikami chromatografii cieczowej, należy wymienić zastosowanie bardzo szybkiego układu chromatografii cieczowej UHPLC zarówno z zastosowaniem specjalnych kolumn z ziarnami wypełnienia o rozmiarze poniżej 2  $\mu\text{m}$ , w pracy Chebroli i in. [8], jak również układu połączonego z tandemową spektrometrią mas UHPLC-MS/MS w pracy Rivera i in. [24]. Dzięki zastosowaniu tej techniki, dla karotenoidów nie ulegających rozdzielaniu na kolumnie HPLC, możliwe jest ich selektywne oznaczenie poprzez wybór specyficznych jonów fragmentacyjnych dla poszczególnych karotenoidów, niezależnie od zastosowanej kolumny HPLC. Również w pracach Breithaupt i in. [2] oraz Lienau i in. [19], wykorzystano sprzężenie układu HPLC ze spektrometrem mas, jednakże w tym przypadku z pojedynczym kwadrupolem. Natomiast w pracach Zhonga i in. [30] oraz Kurz i in. [17] wykorzystano podwójny system detekcji UV-VIS oraz APCI-MS. Uzyskano dzięki temu rozwiązanie możliwości identyfikacji karotenoidów. Z kolei w pracy Slavin i in. [29] zastosowano HPLC z detektorem UV-VIS oraz detektor rozpraszania

światła laserowego ELSD. Detektor ELSD umożliwił dodatkowo oznaczanie steroli roślinnych i tokoferoli w badanych próbkach. Aman i in. [1] wykorzystali w układzie połączonym, poza UV-VIS i MS, również metodę NMR, potwierdzając budowę strukturalną stereoisomerów karotenoidów. Poza zastosowaniem układu LC-ESI-MS, autorzy pracy Schex i in. [28], posłużyli się detektorem fluorescencyjnym FLD do oznaczeń karotenoidów o wyższej czułości, niż standardowy detektor UV-VIS.

Przy tak dużej ilości możliwych konfiguracji aparatury do badania barwników roślinnych, należy stwierdzić, że najbardziej odpowiedni wydaje się układ zaprezentowany w pracy Franke i in. [9], stanowiący wysokosprawny chromatograf cieczowy HPLC z detekcją UV-VIS i kolumną polarną wypełnioną żelem krzemionkowym (typu Silica). Użyteczność tego układu została potwierdzona w pracy Ramadan [23], w której wykazano dodatkowo dużą łatwość i uniwersalność zastosowania typowego układu HPLC z kolumną polarną oraz detektorem UV-VIS do badania karotenoidów, jak również innych polarnych związków organicznych w olejach roślinnych.

### Podsumowanie

Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC wraz ze spektrometrią mas lub układami łączonymi z MS/MS lub z NMR, do badań nad barwnikami roślinnymi wydaje się nieuzasadnione z uwagi na zbyt wysoki stopień skomplikowania tego typu aparatury, stąd wysokie nakłady finansowe i czasowe. Niewielkie rozpowszechnienie tych urządzeń w laboratoriach utrudniłoby przeprowadzenie ewentualnych badań porównawczych dla opracowanej metodyki, jak również utrudniłoby ewentualną komercjalizację metodyki. Dla celów badania próbek biopaliw pod kątem obecności barwników roślinnych najbardziej odpowiedni okazał się typowy układ wysokosprawnego chromatografu cieczowego HPLC z detektorem UV-VIS. Szczególnie cenny w tych badaniach może być detektor z matrycą diodową DAD, umożliwiający wykonywanie widm UV-VIS w pełnym zakresie w czasie rzeczywistym dla pików eluowanych z kolumny chromatograficznej. Do badań nad barwnikami roślinnymi wskazane jest zastosowanie polarnej kolumny chromatograficznej HPLC z fazą krzemionkową. Wybór tego typu kolumny chromatograficznej jest podyktowany możliwością zastosowania rozpuszczalnika o niskiej polarności i układu faz normalnych. Kolumna ta umożliwia bardzo dobry rozdział pomiędzy poszczególnymi karotenoidami, z możliwością rozdziału izomerów strukturalnych *cis/trans*. Dodatkowo, zastosowanie

rozpuszczalników o niskiej polarności w tym układzie może wpłynąć na wydłużenie żywotności kolumny.

Na podstawie wykonanego przeglądu literatury w zakresie oznaczania karotenoidów, które mogą występować w handlowych próbkach FAME, do badań w kolejnych etapach wytypowano pięć karotenoidów:  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, luteinę, kantaksantynę i zeaksantynę. Dobrano parametry pracy spektrometru UV-VIS. Jako najbardziej odpowiednią długość fali do pomiaru zawartości karotenoidów wybrano  $\lambda = 450 \text{ nm}$ . Ta długość fali jest najbardziej właściwa do oznaczania związków organicznych z grupy karotenoidów, ponieważ przy tej specyficznej długości fali występuje dla nich najczęściej maksimum absorpcji promieniowania UV. Dzięki zastosowaniu spektrometru UV-VIS wraz z wyborem odpowiedniej długości fali, możliwe jest również wykrycie innych substancji z grupy karotenoidów. Niezidentyfikowane karotenoidy będą widoczne w postaci sygnału przy charakterystycznej długości fali, a ich identyfikacja będzie możliwa na podstawie czasu retencji, widma UV-VIS oraz zastosowania materiałów wzorcowych.

Warunki analityczne badania karotenoidów, przedstawione w niniejszej pracy, umożliwią opracowanie i walidację metodyki badania barwników roślinnych w handlowych próbkach estrów metyloowych kwasów tłuszczowych, występujących na polskim rynku biopaliw.

Prosimy cytować jako: Nafta-Gaz 2018, nr 5, s. 406–411, DOI: 10.18668/NG.2018.05.09

Artykuł nadesłano do Redakcji 5.01.2018 r. Zatwierdzono do druku 9.03.2018 r.

Artykuł powstał na podstawie pracy statutowej pt.: *Badania chromatograficzne nad obecnością barwników roślinnych w estrach metylowych kwasów tłuszczowych* – praca INiG – PIB na zlecenie MNiSW; nr zlecenia: 0106/TA/17, nr archiwalny: DK-4100-93/17.

## Literatura

- [1] Aman R., Biehl J., Carle R., Conrad J., Beifuss U., Schieber A.: *Application of HPLC coupled with DAD, APci-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables*. Food Chemistry 2005, vol. 92, s. 753–763.
- [2] Breithaupt D.E., Schwack W.: *Determination of free and bound carotenoids in paprika (Capsicum annuum L.) by LC/MS*. Eur. Food Res. Technol. 2000, vol. 211, s. 52–55.
- [3] Burnus Z.: *Badania nad obecnością steroli roślinnych i zwierzęcych w estrach metylowych kwasów tłuszczowych z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej*. Dokumentacja INiG – PIB, Kraków 2012, nr archiwalny DK-4100/37/12.
- [4] Burnus Z.: *Badania nad oznaczaniem glikozydów sterolowych (SG) oraz nasyconych monoacylogliceroli (SMG) w oleju napędowym z dodatkiem estrów metylowych kwasów tłuszczowych przy wykorzystaniu techniki chromatografii gazowej*. Dokumentacja INiG – PIB, Kraków 2012, nr archiwalny DK-4100/36/12.
- [5] Burnus Z.: *Badania składników śladowych FAME techniką chromatografii gazowej (GC-MS)*. Dokumentacja INiG – PIB, Kraków 2016, nr archiwalny DK-4100/87/16.
- [6] Burnus Z.: *Oznaczanie wolnych steroli roślinnych i zwierzęcych w estrach metylowych kwasów tłuszczowych*. Nafta-Gaz 2013, nr 8, s. 632–645.
- [7] Burnus Z., Jakóbiec J.: *Badania nad wpływem wolnych glukozydów steroli na niskotemperaturowe parametry biopaliw do silników o zapłonie samoczynnym*. Przemysł Chemiczny 2016, nr 9, DOI: 10.15199/62.2016.9.33.
- [8] Chebrołu K.K., Yousef G.G., Park R., Tanimura Y., Brown A.F.: *A high-throughput, simultaneous analysis of carotenoids, chlorophylls and tocopherol using sub two micron core shell technology columns*. Journal of Chromatography B 2015, vol. 1001, s. 41–48.
- [9] Franke S., Frohlich K., Werner S., Bohm V., Schone F.: *Analysis of carotenoids and vitamin E in selected oilseeds, press cakes and oils*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2010, vol. 112, s. 1122–1129.
- [10] Ghazani S.M., Marangoni A.G.: *Minor components in canola oil and effects of refining on these constituents: A review*. J. Am. Oil Chem. Soc. 2013, vol. 90, s. 923–932.
- [11] Gleize B., Steibe M., André M., Reboul E.: *Simple and fast HPLC method for simultaneous determination of retinol, tocopherols, coenzyme Q10 and carotenoids in complex samples*. Food Chemistry 2012, vol. 134, s. 2560–2564.
- [12] Gong X., Qi N., Wang X., Li J., Lin L.: *A new method for determination of  $\alpha$ -tocopherol in tropical fruits by ultra performance convergence chromatography with diode array detector*. Food Anal. Methods 2014, vol. 7, s. 1572–1576.
- [13] Gross J.: *Pigments and vegetables, chlorophylls and carotenoids*. An AVI Book, Springer Science + Business Media, New York 1991.
- [14] Gupta P., Sreelakshmi Y., Sharma R.: *A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography*. Plant Methods 2015, 11:5, s. 1–12, DOI: 10.1186/s13007-015-0051-0.
- [15] Hulanicki A.: *Stulecie odkrycia chromatografii (1903–2003)*. Kwartalnik Historii Nauki i Techniki 2003, vol. 48, nr 3–4, s. 252–255.
- [16] Krinsky N.I., Mathews-Roth M.M., Taylor R.F.: *Carotenoids – Chemistry and Biology*. Plenum Press, Now York and London 1989.
- [17] Kurz Ch., Carle R., Schieber A.: *HPLC-DAD-MS characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity*. Food Chemistry 2008, vol. 110, s. 522–530.
- [18] Li L., Yu Y., Du X., Jiang Z., Chen F., Ni H.: *An improved high performance liquid chromatography method for the separation of carotenoids extracted from Phaffia rhodozyma*. Journal of Analytical Chemistry 2015, vol. 70, nr 12, s. 1512–1520.
- [19] Lienau A., Tang G., Glaser T., Albert K.: *Bioavailability of lutein in humans from intrinsically labeled vegetables determined by LC-APCI-MS*. Journal of Nutritional Biochemistry 2003, vol. 11, s. 663–670.
- [20] Łaczek T.: *Analiza zmian jakości biopaliw B100 zachodzących podczas ich magazynowania w niskich temperaturach*. Nafta-Gaz 2014, nr 2, s. 115–120.
- [21] Melendez-Martinez A.J., Stinco C.M., Liu C., Wang X.D.: *A simple HPLC method for the comprehensive analysis of cis/trans (Z/E) geometrical isomers of carotenoids for nutritional studies*. Food Chemistry 2013, vol. 138, s. 1341–1350.
- [22] Nasri N., Elfalleh W., Tlili N., Martine L., Berdeaux O., Salles Ch., Triki S., Khaldi A.: *Contents of carotenoids, tocopherols and sterols in Acacia cyanophylla seed oils*. J. Am. Oil Chem. Soc. 2013, vol. 90, s. 429–436.
- [23] Ramadan M.F., Mörsel J.-T.: *Direct isocratic normal-phase HPLC assay of fat-soluble vitamins and B-carotene in oilseeds*. Eur. Food Res. Technol. 2002, vol. 214, s. 521–527.
- [24] Rivera S., Vilaró F., Canela R.: *Determination of carotenoids by liquid chromatography/mass spectrometry: Effect of several dopants*. Anal. Bioanal. Chem. 2011, vol. 400, s. 1339–1346.
- [25] Rojas-Garbanzo C., Pérez A.M., Bustos-Carmona J., Vaillant F.: *Identification and quantification of carotenoids by HPLC-DAD during the process of peach palm (Bactris gasipaes H.B.K.) flour*. Food Research International 2011, vol. 44, s. 2377–2384.
- [26] Saini R.K., Shang X.M., Ko E.Y., Choi J.H., Kim D., Keum Y.-S.: *Characterization of nutritionally important phytoconstituents in minimally processed ready-to-eat baby-leaf vegetables using HPLC-DAD and GC-MS*. Food Measure 2016, vol. 10, s. 341–349.
- [27] Sarungallo Z.L., Hariyadi P., Andarwulan N. i in.: *Analysis of  $\alpha$ -cryptoxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin,  $\alpha$ -carotene, and  $\beta$ -carotene of Pandanus conoideus oil by high-performance liquid chromatography (HPLC)*. Procedia Food Science 2015, nr 3, s. 231–243.
- [28] Schex R., Lieb V.M., Jiménez V.M., Esquivel P., Schweiggert R.M., Carle R., Steingass C.B.: *HPLC-DAD-APCI/ESI-MS<sup>n</sup> analysis of carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol in Costa Rican Acrocomia aculeata fruits of varying maturity stages*. Food Research International 2018, vol. 105, s. 645–653.
- [29] Slavin M., Yu L.L.: *A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans*. Food Chemistry 2012, vol. 135, s. 2789–2795.
- [30] Zhong L., Gustavsson K.E., Oredsson S., Głab B., Yilmaz J.L., Olsson M.E.: *Determination of free and esterified carotenoid composition in rose hip fruit by HPLC-DAD-APCI(+)-MS*. Food Chemistry 2016, vol. 210, s. 541–550.

## Akty prawne i normatywne

- [31] ASTM D 6751-15a *Standard specification for biodiesel fuel blend stock (B100) for distillate fuels*. American Society for Testing and Materials 2015.
- [32] PN-EN 14214+A1:2014-04 *Ciekle przetwory naftowe – Estrы metylowe kwasów tłuszczowych (FAME) do użytku w silnikach samoczynowych o zapłonie samoczynnym (Diesla) i zastosowań grzewczych – Wymagania i metody badań*.



Mgr inż. Zygmunt BURNUS  
Asystent w Zakładzie Analiz Naftowych  
Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy  
ul. Lubicz 25 A  
31-503 Kraków  
E-mail: zygmunt.burnus@inig.pl