

Porovnanie rôznych metód extrakcie lykopénu z rajčiakových produktov

ŠTEFAN SCHMIDT - MAREK VAJDÁK - LUCIA ZAHRADNÍKOVÁ
- STANISLAV SEKRETÁR - JAROSLAV ZEMANOVIČ

SÚHRN. V práci sa sledovali extrakčné a analytické techniky prírodného farbiva lykopénu. Ako vzorky sa použili pretlaky bežne dostupné v obchodnej sieti a sušený rajčiakový prášok, ktorý sa používa v potravinárskej výrobe. Na extrakciu lykopénu sa použil petroleter a hexán, analýza získaných extraktov sa vykonala spektrofotometricky a HPLC chromatografiou. Vhodnejším rozpúšťadlom pre izoláciu je hexán, ale v prípade rajčiakového prášku je potrebná ešte optimalizácia izolačného postupu, pretože sa dosiahla iba 58,3% výťažnosť v porovnaní s 96,3% výťažnosťou pri pretlaku.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: lykopén; rajčiak; extrakcia; HPLC

Karotenoid lykopén je veľmi rozšírený prírodný pigment syntetizovaný rastlinami a mikroorganizmami. Dozrievaním plodov rastlín obsah chlorofylu klesá a vzrastá obsah karotenoidov, ktoré sú zodpovedné za pestré farby mnohých druhov ovocia, zeleniny, ale i mnohých kvetov. Karotenoidy tiež prispievajú k sfarbeniu niektorých suchozemských a morských živočíchov [1].

Dôvodom pre neustále rastúci záujem o lykopén sú jeho vlastnosti. Je prirodzenou zložkou krvnej plazmy a niektorých tkanív, kde je zastúpenie lykopénu omnoho vyššie ako zastúpenie ostatných karotenoidov. Zo schopnosti zhasťovať singletový kyslík $^1\text{O}_2$, vychytávať hydroperoxidové radikály $\text{ROO}\cdot$ a inhibovať oxidáciu LDL lipoproteínovej frakcie pravdepodobne vyplývajú aj jeho biologické a zdravotné účinky [2, 3], najmä zníženie rizika vzniku kardiovaskulárnych ochorení (ateroskleróza, cholesterolémia) a rakoviny (pľúc,

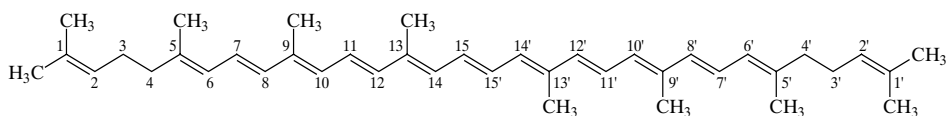
Doc. Ing. Štefan SCHMIDT, PhD., Ing. Marek VAJDÁK, Ing. Lucia ZAHRADNÍKOVÁ, Ing. Stanislav SEKRETÁR, PhD., Ing. Jaroslav ZEMANOVIČ, PhD.; Katedra potravinárskej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Korešpondujúci autor: Doc. Ing. Štefan SCHMIDT, CSc., e-mail: stefan.schmidt@stuba.sk

kože, prostaty, zažívacieho traktu). Rozsiahle použitie rajčiakovej pasty ako prírodného farbiva zvyšuje záujem aj komerčnej sféry [4].

Hlavným zdrojom lykopénu sú rajčiaky (*Lycopersicon esculentum* L.) a výrobky z nich [2, 5]. Lycopén tu predstavuje 80–90 % všetkých prítomných pigmentov. Rajčiaky a výrobky z nich možno považovať z hľadiska zdravej výživy za veľmi vhodné zložky potravy. Majú nízky obsah tukov a sú dobrým zdrojom vlákniny. Sú bohaté na obsah vitamínu A a C, β -karoténu, draslíka a lykopénu. Obsah lykopénu v čerstvých rajčiakoch závisí od odrody, stupňa zrelosti a napokon od klimatických podmienok, pri ktorých plody dozrievajú. V rajčiakovej šupke sa nachádza asi 12 mg lykopénu na 100 g, kým celý zrelý plod obsahuje iba 3,4 mg na 100 g. Koncentrácia lykopénu v rajčiakovej šupke je teda asi 3-krát väčšia ako v celom plode [1]. Bohatším zdrojom lykopénu sú plody jesennej olivy (*Elaeagnus umbellata* Thunberg), ktoré obsahujú až 18-krát viac lykopénu (15–54 mg na 100g) ako rajčiaky [6].

Štruktúra lykopénu znázornená na obr. 1 (ψ,ψ -karotén, $C_{40}H_{56}$) pozostáva z lineárneho nenasýteného uhlíkového reťazca s 13 dvojitémi väzbami, z ktorých je 11 konjugovaných.



OBR. 1. Štruktúra molekuly lykopénu.
FIG. 1. Structure of the lycopene molecule.

Lykopén môže tvoriť rôzne geometrické izoméry. V prírode sa lykopén vyskytuje v *all-trans* konfigurácii, avšak v mieste až siedmich dvojítých väzieb môže dochádzať k izomerizácii z *trans*-formy na *cis*-formu. Vplyvom tepla, svetla a chemických reakcií môžu vznikať mono- alebo poly-*cis*-formy. V rajčiakoch je prevládajúcou formou *all-trans* lykopén, ktorý je aj termodynamicky najstabilnejší. V ľudskom sére a tkanivách predstavuje *cis*-forma 50 % z celkového množstva [2].

Lykopén je veľmi citlivý na svetlo, teplo, kyslík a kyslé prostredie, pričom dochádza k jeho degradácii. Prítomnosť kovových iónov ako Cu^{2+} , Fe^{3+} v prostredí katalyzuje oxidáciu lykopénu. Lykopén je dobre rozpustný v chloroforme, hexáne, benzéne, acetóne, petroléteri, CO_2 a nerozpustný vo vode, metanole a etanole [1].

Antioxidačné vlastnosti lykopénu spočívajú v schopnosti zhášať singletový kyslík $^1\text{O}_2$ fyzikálnou alebo chemickou cestou a v schopnosti vychytávať voľné radikály. Význam zhášania singletového kyslíka spočíva v tom, že lykopén (ako aj ostatné karotenoidy) slúži ako antioxidant bez toho, aby došlo k zmene jeho štruktúry. Zhášanie singletového kyslíka vedie hlavne ku vyžiareniu energie vo forme tepla, kým reakciou lykopénu s voľnými radikálmi (pri autooxidácii lipidov), dochádza ku prenosu elektrónov [7].

Lykopén prítomný v ľudskej plazme je jedným z karotenoidov bez A-provitamínovej funkcie. Má však najvyššiu zhášaciu kapacitu singletového kyslíka in vitro. Pozorovali sa vzťahy medzi koncentráciou lykopénu v sére a rizikom vzniku nádorov, predovšetkým prostaty, pankreasu, čriev a žalúdka. Tento karotenoid bol identifikovaný v mnohých tkanivách, ako sú obličky, štítna žľaza, slezina, pečeň, semenníky a tukové tkanivo. Jeho množstvo v krvnej plazme je považované za užitočný klinický parameter asociovaný s ochoreniami srdca, pretože nízka hladina lykopénu v krvi súvisí s rastom rizika vzniku chorôb obehového systému [8, 9]. Antioxidačný účinok tohto karotenoidu zabraňuje oxidácii LDL lipoproteínov a tým prispieva k zníženiu nebezpečenstva vzniku aterosklerózy [1].

Cieľom predloženej práce bolo odskúšanie niektorých extrakčných postupov pre izoláciu lykopénu, vypracovanie analytickej metódy stanovenia izolovaného lykopénu s možnosťou použitia získaných extraktov pre ďalšie experimentálne práce.

Materiál a metódy

Vzorky pretlakov výrobcov z Talianska (pretlak A), Slovenskej republiky (pretlak B) a Českej republiky (pretlak C) sa zakúpili v obchodnej sieti potravín. Sušený rajčiakový prášok dodala spoločnosť KUK Bratislava. U všetkých vzoriek sa stanovil obsah vody sušením infražiaričmi podľa [10].

Použité chemikálie

V experimentálnej práci pri extrakcii a stanovení sa použili tieto chemikálie: acetón, acetonitril, dichlórmetán, dusík, metanol, etanol (95 %), hexán a petroléter. Použité chemikálie boli čistoty p. a., dusík bol technickej čistoty.

Pre kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu sa použil komerčný lykopén Oleoresina Tomate 5 % Licopeno (prášková forma) od firmy Exquim, Barcelona, Španielsko.

Príprava extraktov

Na extrakciu lykopénu sa použili dva extrakčné postupy. Prvým postupom bola izolácia perkoláciou na laboratórnom extraktore (typ harfa). Rajčiakový pretlak (250 g) sa rozmiešal s 250 ml destilovanej vody. Takto upravená vzorka sa extrahovala s 500 ml petroléteru počas 15 hodín. Rozpúšťadlo sa odparilo na vákuovej rotačnej odparke do konštantnej hmotnosti.

Druhou izolačnou metódou bola jednostupňová extrakcia s použitím hexánu ako rozpúšťadla [11, 12]. K návažku vzorky (4 g) sa pridalo 25 ml acetónu, v ktorom sa rozpustil BHT (0,05 % w/v) a rovnaké množstvo etanolu. K takto upravenej vzorke sa pridalo 50 ml hexánu. Po 15 minútach miešania v ľadovom kúpeli sa pridalo 20 ml destilovanej vody. Hexánový podiel sa po separácii v oddeľovacom lieviku odparil na vákuovej odparke. Získaný extrakt sa kvantitatívne rozpustil v dichlórmetáne a pred uzavretím odmernej banky sa vzduch vytesnil dusíkom.

Rajčiakový prášok (50 g) sa extrahoval v aparatúre podľa Soxhleta [13] do 250 ml petroléteru. Porovnanie účinnosti extrakcie jednotlivými metódami sa stanovila porovnaním výťažnosti. Štatistická analýza sa vykonala pomocou softvéru Microsoft Excel 97.

Identifikácia a stanovenie lykopénu

Na identifikáciu a stanovenie lykopénu sa použil UV-VIS spektrofotometer Shimadzu 1601 (Kjoto, Japonsko) a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na obrátených fázach (RP-HPLC, Laboratorní přístroje Praha, Česká republika).

Absorpčné maximá pripravených extraktov sa merali v rozsahu vlnovej dĺžky λ 250–650 nm. Analýzy pomocou HPLC sa uskutočnili pri prietoku mobilnej fázy 2 ml.min⁻¹, ktorej zloženie bolo acetonitril, dichlórmetán, metanol (v objemovom pomere 45 : 10 : 45) na kolóne Separon SGX C₁₈, dĺžky 250 mm a veľkosti častíc 7 μ m (Tessek, Praha, Česká republika). Vzorky sa injektovali v množstve 20 μ l dávkovacím slučkovým ventilom (Rheodyne Model 7010, Rohnert Park, USA). Detekcia prebiehala na UV detektore typ LCD 2040 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) pri 470 nm [14].

Výsledky a diskusia

Obsah vody

V tab. 1 sú uvedené hodnoty pre obsah vody vo vzorkách rajčiakových pretlakov a rajčiakového prášku. Z nameraných údajov je zrejmé, že medzi

TAB. 1. Obsah vody v použitých rajčiakových výrobkoch.

TAB. 1. Water content in used tomato products.

Vzorka ¹	Obsah vody ² [%]	Smerodajná odchýlka ³
pretlak ⁴ A	91,03 ± 0,36	0,15
pretlak B	74,47 ± 0,64	0,26
pretlak C	77,05 ± 1,02	0,41
prášok ⁵	9,75 ± 0,77	0,31

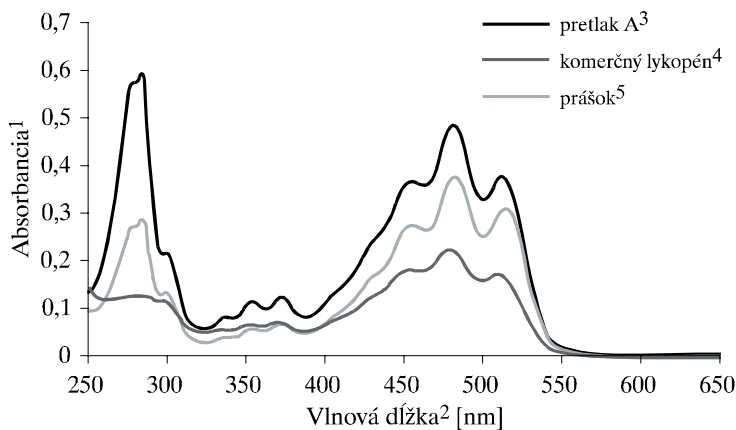
Smerodajná odchýlka sa vypočítala z 5 meraní.

Standard deviation was calculated from 5 measurements. 1 - sample, 2 - water content, 3 - standard deviation, 4 - paste, 5 - powder.

vzorkami sú značné disproporcie. Tieto rozdiely sú však s veľkou pravdepodobnosťou v relácii s konkrétnym technologickým spracovaním rajčiakov pri výrobe pretlakov v rôznych výrobniciach.

UV-VIS spektroskopia extraktov

Na identifikáciu lykopénu v extraktoch sa použila spektrálna analýza, pri ktorej sa meralo absorpčné spektrum priamo izolovaných extraktov.



OBR. 2. UV-VIS spektrum extraktov v hexáne.

Extrakt z pretlaku A a prášku sa riedili 20-krát, komerčný lykopén 40-krát.

FIG. 2. UV-VIS spectrum of extracts in hexane.

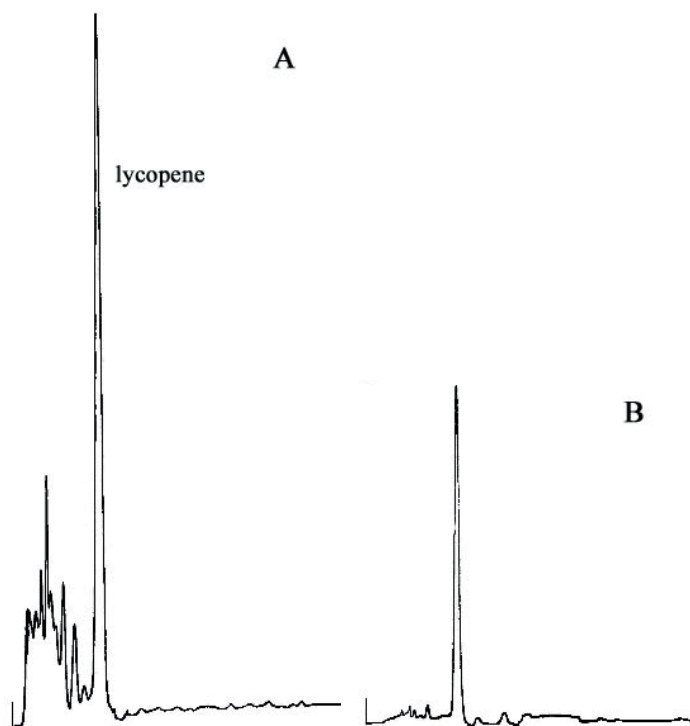
Extracts from the paste A and from the powder were diluted by a factor of 20, commercial lycopene by a factor of 40. 1 - absorbance, 2 - wavelength, 3 - paste A, 4 - commercial lycopene, 5 - powder.

V niektorých prípadoch bolo však potrebné použiť riedenia, pričom ako rozpúšťadlá sa použil hexán a dichlórmetán. Na obr. 2 sú znázornené spektrá extraktu pretlaku, prášku a komerčného lykopénu v hexáne.

Absorpčné maximá pripravených extraktov sa zistili pri vlnovej dĺžke 445, 471 a 502 nm pri hexáne a 456, 482 a 514 nm pri dichlórmetáne. Výsledky meraní sú porovnateľné s výsledkami podľa Davisa [15]. Na základe name-
raných výsledkov možno konštatovať, že vo všetkých extraktoch je prítomný lykopén, pričom jeho množstvo v jednotlivých izolátoch sa prejavilo rôznou výškou absorbancie.

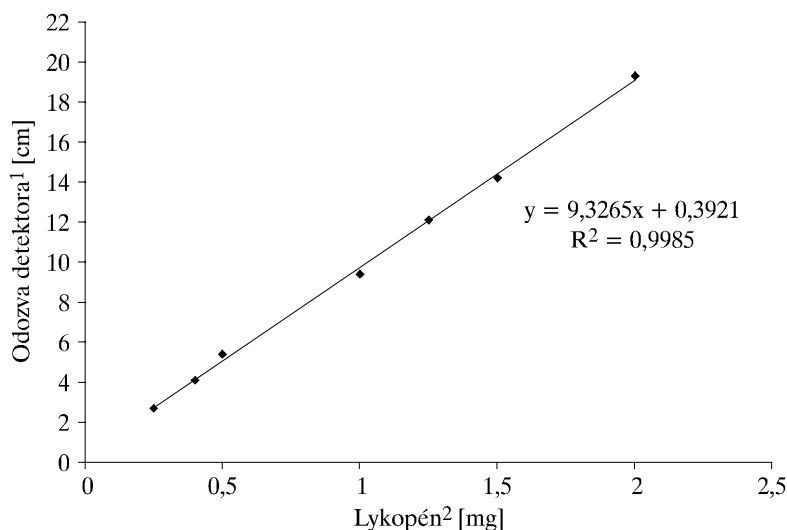
HPLC analýza extraktov

Pri identifikácii prítomnosti lykopénu v extrakte sa použilo porovnanie elučnej charakteristiky komerčného lykopénu a extraktov, ako aj porovnanie



OBR. 3. HPLC chromatogram lykopénu
v extrakte z rajčiakového pretlaku (B) a komerčného lykopénu (A).

FIG. 3. HPLC chromatogram of lycopene
in the analysed extract from tomato paste (B) and the commercial lycopene (A).



OBR. 4. Kalibračná čiara a korelačný koeficient R^2 stanovenia obsahu lykopénu pomocou HPLC.
 FIG. 4. Calibration line and the correlation coefficient R^2 value for the determination of lycopene content using HPLC.
 1 - detector response, 2- lycopene.

s údajmi už publikovanými v odbornej literatúre. Retenčný čas komerčného lykopénu bol 3,67 min a analyzovaného extraktu 3,66 min.

Z priebehu chromatografického záznamu komerčného lykopénu a vzoriek na obr. 3 je možné predpokladať vo vzorke i v komerčnom lykopéne prítomnosť aj ďalších karotenoidov. Porovnaním chromatogramu s publikovanými údajmi podľa Hakala [14] sa pred lykopénom z kolóny typu RP vymývajú xantofyly.

Pri kvantitatívnom stanovení lykopénu prítomného vo vzorkách sa použila kalibračná čiara (obr. 4).

Získané analytické hodnoty pre použité extrakčné postupy sa štatisticky vyhodnotili a obsah lykopénu sa prepočítal na 100 g vzorky. Tieto hodnoty sú uvedené v tab. 2.

Pri izolácii petroléterom sa zistil najvyšší obsah lykopénu u rajčiakového prášku. Zistený výsledok je v porovnaní s pretlakmi pravdepodobne ovplyvnený kratším tepelným namáhaním lykopénu počas izolácie, ako aj nižším obsahom vody vo vzorke. Pri použití hexánu ako extrakčného rozpúšťadla a za iných tepelných podmienok počas izolácie sa zistilo, že najvyšší obsah lykopénu je vo vzorke pretlaku C. Najnižší obsah sa namerlal u vzorky raj-

TAB. 2. Obsah lykopénu (mg/100 g) vo vzorkách pretlakov a prášku.
 TAB. 2. Lycopene content (mg/100 g) in tomato paste and powder samples.

Vzorka ¹	Izolácia petroléterom ²	Izolácia hexánom ³
	[mg/100g]	
pretlak ⁴ A	3,65 ± 0,25	127,52 ± 10,07
pretlak B	6,14 ± 0,92	140,46 ± 6,56
pretlak C	3,25 ± 0,21	143,97 ± 10,07
prášok ⁵	13,19 ± 0,38	71,94 ± 8,75

1 - sample, 2 - isolation with petroleum ether, 3 - isolation with hexane, 4 - paste, 5 - powder.

čiakového prášku. Namerané hodnoty sú porovnateľné s údajmi pre rovnaký typ vzoriek v literatúre [1, 12], avšak i literárne zdroje sa v tomto prípade rôznia.

Stanovenie výťažnosti izolačnej metódy

Pri stanovení obsahu lykopénu vo vzorkách sa merala i výťažnosť izolačných postupov metódou štandardného prídavku, vzhľadom na rôzne tepelné podmienky izolácie a použité rozpúšťadlá (tab. 3). Výťažnosť lykopénu sa stanovila pri pretlaku B.

Extrakčná metóda s použitím hexánu sa ukázala ako výhodnejšia pri pretlakoch, avšak v prípade sušeného prášku sa zistila jej nízka účinnosť. Pri extrakcii petroléterom Soxhletovým extraktorom sa u rajčiakového prášku zistila vyššia účinnosť ako v prípade extraktora typu „harfa“ použitom pri pretlakoch.

Na nižšiu účinnosť extrakcie petroléterom pri pretlakoch pravdepodobne malo vplyv dlhšie tepelné namáhanie, pri ktorom prišlo k strate určitého množstva lykopénu degradáciou.

TAB. 3. Porovnanie výťažnosti použitých izolačných metód.
 TAB. 3. Comparison of the recovery rates of isolation methods used.

Izolačný postup ¹	Výťažnosť ² [%]
petroléter (pretlak) ³	77,81 ± 2,64
petroléter (prášok) ⁴	87,36 ± 3,42
hexán (pretlak) ⁵	96,33 ± 5,45
hexán (prášok) ⁶	53,83 ± 1,61

1 - isolation method, 2 - recovery rate, 3 - petroleum ether (paste), 4 - petroleum ether (powder), 5 - hexane (paste), 6 - hexane (powder).

Záver

Cieľom práce bola izolácia, identifikácia a stanovenie lykopénu vo vybraných vzorkách pretlakov a sušeného rajčiakového prášku. Izolácia sa uskutočnila dvomi rozdielnymi postupmi, pričom sa stanovoval obsah lykopénu v extrakte a výťažnosť metódy. Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že izolačný postup a podmienky zásadne vplyvajú na obsah lykopénu v pripravenom extrakte. Vhodnejším izolačným rozpúšťadlom pre extrakciu lykopénu zo vzoriek je hexán, avšak pri príprave izolátov z rajčiakového prášku bude ešte potrebné modifikovať izolačný postup. Tu bude pravdepodobne potrebné predĺžiť dobu kontaktu vzorky s rozpúšťadlom. Rajčiakový prášok však bude zjavne menej vhodným zdrojom lykopénu vzhľadom na technologický postup výroby, pri ktorom dochádza k väčšej tepelnej a oxidačnej degradácii. Na kvalitatívnu i kvantitatívnu analýzu lykopénu sú vhodné metódy spektrálnej analýzy a vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie na obrátených fázach.

Literatúra

1. SHI, J. - MAGUER, M. L.: Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 2000, č. 1, s. 1-42.
2. SCHMIDT, Š. - KLVANOVÁ, J. - NIKLOVÁ, I. - SEKRETÁR, S.: Význam lykopénu v strave človeka. In: Sborník přednášek z XXXIX. Mezinárodní konference z technologie a analytiky tuku. Železná Ruda - Špičák : PTZ Unilever ČR, 2001, s. 38-45.
3. HARTAL, D. - ZOHAN, N.: Lycopene. Double functionality. *International Food Ingredients*, 2000, č. 3, s. 25-26.
4. BAYSAL, T. - ERSUS, T. - STARMANS, D. A. J.: Supercritical CO₂ extraction of β -carotene and lycopene from tomato waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2000, č. 10, s. 5507-5511.
5. OLLANKETO, M. - HARTONEN, K. - RIEKKOLA, M. L.: Supercritical carbondioxide extraction of lycopene in tomato skins. *European Food Research and Technology*, 121, 2001, č. 4, s. 561-565.
6. FORDHAM, I. - CLEVIDENCE, B. - WILEY, E. - ZIMMERMAN, R.: Autumn olive an unexpected source of lycopene. *ASHS Newsletter*, 17, 2001, č. 10, s. 6.
7. HAILA, K.: Effects of carotenoids and carotenoid-tocopherol interaction on lipid oxidation in vitro. [Dizertačná práca.] Helsinki : University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, 1999. 64 s.
8. TZOGANAKI, Z. D. - ATTA-POLITOU, J. - KOUPPARIS, M. A.: Development and validation liquid chromatographic method for the determination of lycopene in plasma. *Analytica Chimica Acta*, 467, 2002, s. 115-123.
9. SU, Q. - ROWLEY, K. G. - BALAZS, N. D. H.: Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography B*, 781, 2002, s. 393-418.

10. PRÍBELA, A.: Analýza potravín. 1. vyd. Bratislava : Edičné stredisko STU, 1991. 225 s.
11. DAVIS, A. R. - FISH, W. W. - PERKINS-VEAZIE, P.: A rapid hexane-free method for analyzing lycopene content in watermelon. *Journal of Food Science*, 68, 2003, č. 1, s. 328-332.
12. RAO, A. V. - WASSEM, Z. - AGARWAL, S.: Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene. *Food Research International*, 31, 1998, č. 10, s. 737-741.
13. ILAVSKÁ, E. - SCHMIDT, Š. - HOJEROVÁ, J.: Laboratórne cvičenia z mlieka a tukov. Základná analýza tukov. Bratislava : SVŠT, 1990. 283 s.
14. HAKALA, S. H. - HEINONEN, I. M.: Chromatographic purification of natural lycopene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1994, č. 6, s. 1314-1316.
15. DAVIS, A. R. - FISH, W. W. - PERKINS-VEAZIE P.: A rapid spectrophotometric method for analysing lycopene content in tomato and tomato products. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 2003, s. 425-430.

Do redakcie došlo 6.4.2004.

Comparison of different lycopene extraction methods from tomato products

SCHMIDT, Š. - VAJDÁK, M. - ZAHRADNÍKOVÁ, L. - SEKRETÁR, S. - ZEMANOVIČ, J.:
Bull. potrav. Výsk., 43, 2004, p. 79-88.

SUMMARY. The extraction and analytical methods of the natural pigment lycopene were studied. Tomato pastes from local supermarkets and tomato powder used in the food industry were used as the samples. Hexane and petroleum ether were used as extraction solvents. Extracts prepared were analysed by HPLC and UV-VIS spectroscopy. Results showed that hexane was a more suitable extraction solvent, but in case of the tomato powder, optimization of the isolation procedure was needed because the recovery rate was only 58.3 %, compared to 96.3 % at the tomato paste.

KEYWORDS: lycopene; tomato; extraction; HPLC