

CAROTENOS Y XANTOFILAS EN EL PIMENTÓN

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Los colorantes naturales vegetales carotenos y xantofilas presentan una retención selectiva sobre alúmina.

La concentración de carotenos o xantofilas de cada fracción separada se determinan espectrofotométricamente.

MATERIAL

Balanza analítica.

Columna cromatográfica con sistema de vacío, según esquema adjunto, de unos 2 cm de Φ .

Embudo cónico.

Embudo pequeño para sólidos.

Frasco lavador.

Matraz aforado de 100 ml.

Matraces aforados de 50 ml (2)

Pesasubstancias.

Pipeta aforada de 1 ml.

Pipeta aforada de 2 ml.

Pipetas aforadas de 25 ml.

Pipetas aforadas de 5 ml.

Pipetas graduadas de 5 i 10 ml.

Probetas de 100 y 50 ml.

Espectrofotómetro.

Cubetas para lectura espectrofotométrica

REACTIVOS

Agua destilada.

Alúmina para cromatografía en columna, actividad media.

Disolución de Na₂SO₄ al 10 % (disolver 50 gramos de sulfato de sodio pa hasta 500 ml en agua)

Disolució patrón de Sudán I [disolver 0'1241 gramos de Sudan I pa en 500 ml de acetona-isopropanol (1/1) pa].

Disolvente HAET (hexano, acetona, etanol y i tolueno, todos de calidad pa, en las proporciones 10/7/6/7).

Hexano pa.

Hexano-acetona 90/10 (calidad pa en las proporciones indicadas).

Hexano-acetona 96/4 (calidad pa en las proporciones indicadas).

Hexano-acetona-metanol 80/10/10 (calidad pa en las proporciones indicadas).

KOH al 40 %, disolución metanólica (disolver 47'1 gramos de hidróxido de potasio pa del

85% en alcohol metílico hasta 100 ml y filtrar con placa porosa si se presentara residuo insoluble).

Na₂SO₄ anhidro pa.

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar exactamente alrededor de 0'5 gramos de harina de pimentón y pasar a un matraz aforado de 100 ml.
- 2.- Pipetear 30 ml de disolvente HAET en matraz aforado; tapar y agitar 1 minuto.
- 3.- Añadir 1 ml de agua, tapar, agitar 1 minuto y dejar reposar 16 horas en la oscuridad.
- 4.- Añadir 2 ml de disolución metanólica de KOH al 40 %, agitar 1 minuto y dejar reposar 1 hora en la oscuridad.
- 5.- Añadir, con pipeta, 30 ml de hexano, agitar 1 minuto y añadir disolución de Na₂SO₄ al 10 % hasta llenar parte del cuello del matraz (no es preciso enrasar exactamente); tapar y agitar con energía durante 2 minutos.
- 6.- Dejar reposar 1 hora en las oscuridad.
- 7.- Preparar una columna cromatográfica al vacío según el esquema. Llenarla asta 10-12 cm con alúmina, adicionando la alúmina en capas pequeñas y presionando con suavidad; pone encima una capa de 1 cm de sulfato de sodio anhidro.
- 8.- Poner 5 ml de la capa superior (zona del cuello) del matraz en la columna; hacer vacío muy suave hasta que los 5 ml añadidos queden absorbidos en la parte superior de la columna.
- 9.- Pasar per la columna hexano-acetona(96/4), hasta que comience a salir líquido por la parte inferior de la columna.
- 10.- Pasar hexano-acetona(90/10) hasta eluir la banda de carotenos, recogiendo el líquido en un matraz aforado de 50 ml; llevar a volumen con hexano-acetona(90/10) y homogeneizar.
- 11.- Pasar hexano-acetona-metanol (80/10/10) hasta elución de la banda de les xantofilas, recogiendo el líquido en un matraz aforado de 50 ml; llevar a volumen con el mismo disolvente y homogeneizar.
- 12.- Leer en espectrofotómetro la absorbancia de la disolución de carotenos a 435 nm y la de la disolución de xantofilas a 475 nm, frente a un blanco de los disolventes empleados en cada caso.

Determinación de los factores de corrección del espectrofotómetro

- 1.- Recalibrar el espectrofotómetro de manera que entre 470 y 480 nm, la absorbancia de la disolución patrón de sudan I (acabada de preparar), tenga el máximo de absorbancia a 475 nm.
- 2.- Determinar la absorbancia de la disolución extemporánea de patrón de sudan I, a 435 nm y a 475 nm y calcular los factores de corrección.

CÁLCULOS

El resultado se expresa en miligramos/kg (ppm):

$$\text{Carotenos} = 255 \cdot A_{435} \cdot \frac{V_f}{V_d} \cdot \frac{F_{435}}{m}$$

$$\text{Xantofilas} = 212 \cdot A_{475} \cdot \frac{V_f}{V_d} \cdot \frac{F_{475}}{m}$$

expresiones en las cuales:

A₄₃₅ = Absorbancia a 435 nm.

A₄₇₄ = Absorbancia a 475 nm.

V_f = Volumen final de la porción eluida.

V_d = Volumen de la porción que se pasa por columna.

F₄₃₅ = Factor de corrección espectrofotométrico a 435 nm.

F₄₇₅ = Factor de corrección espectrofotométrico a 475 nm.

m = peso de la muestra en gramos.

Los valores de los factores de corrección son:

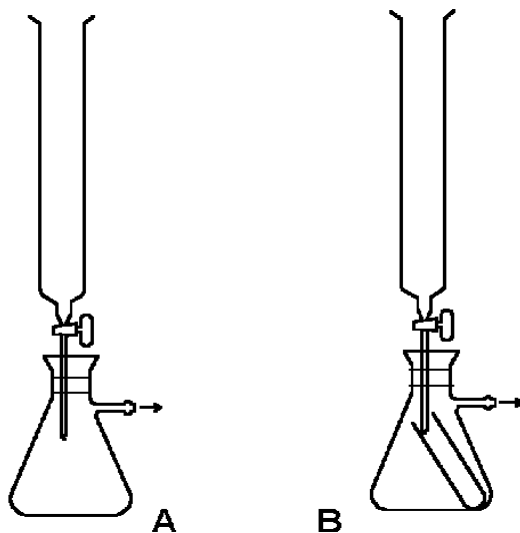
$$F_{435} = \frac{0'460}{A_{435}^o} \quad (\text{carotenos})$$

$$F_{475} = \frac{0'561}{A_{475}^o} \quad (\text{xantofilas})$$

en donde los **A_o** son las absorbancias de la disolución patrón de sudan I.

OBSERVACIONES

El método es aplicable, cambiando la cantidad a pesar y los volúmenes de elución y de enrase de los eluidos, parra alfalfa deshidratada, maíz, curry y piensos de contenido graso moderado.



Montaje para cromatografía en columna al vacío:

A) Sin recoger fracción

B) Recogiendo fracción

Cuestionario 19.1.- Carotenos y xantofilas en pimentón

- 1.- Deducir razonadamente las fórmulas utilizadas en los cálculos (considerando que la actividad óptica del sudan I en las condiciones mencionadas equivale a la de 255 mg de carotenos y 212 mg de xantofilas, considerando las eluciones hasta el punto 9).
- 2.- Que objeto tiene la adición de KOH (subapartado 4 de la metodología)?
- 3.- Por que motivo se deja reposar la muestra en la oscuridad en los puntos 3, 4 y 6 de la metodología?
- 4.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 5.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".