

BIOCHÉMIA VÝROBY KORENINOVEJ PAPRIKY (II) DYNAMIKA OBSAHU FARBÍV POČAS VÄDNUTIA

V. ZITKO, J. VALENTOVÁ

Oddelenie glycidov a biochémie Chemického ústavu Slovenskej akadémie vied
v Bratislave

Katedra chemickej technológie uhlohydrátov Chemickej fakulty Slovenskej vysokej
školy technickej v Bratislave

V priebehu vädnutia koreninovej papriky sa podstatne zvyšuje obsah farbív [1, 2]. Proces zvyšovania obsahu farbív sa doteraz vždy sledoval len stanovením farbív podľa B e n e d e k a [3]. Táto metóda udáva iba celkové zmeny obsahu farbív a tak neumožňuje hlbší pohľad na mechanizmus procesu. Hoci výskumu karotenoidných farbív papriky sa oddávna venovala značná pozornosť [4—9] a boli vypracované metódy chromatografického oddelenia a kvantitatívneho stanovenia jednotlivých zložiek [10, 11], nepoužili sa doteraz tieto metódy na sledovanie zmien obsahu farbív v priebehu prirodzeného vädnutia.

Otvorenou ostávala otázka, či zvyšovanie obsahu farbív počas vädnutia, zachytené Benedekovou metódou, je spôsobené oxydáciou β -karoténu a karotenoidných alkoholov na kapsantín, resp. kapsorubín, alebo či sa vytvárajú všetky prítomné farbivá, t. j. či proces syntézy karotenoidov pokračuje i pri vädnutí.

V predloženej práci sledujeme pomocou papierovej adsorpčnej chromatografie zmeny obsahu jednotlivých karotenoidov v priebehu prirodzeného vädnutia troch sort slovenskej koreninovej papriky (TS-18, TŽK Fekete, Hodonínska).

Experimentálna časť

Z prvého zberu sort tenkostenná 18 (TS-18), hrubostenná žitavská krajová Fekete (TŽK Fekete) a Hodonínska sa z každej sorty navliekli 3 vence a uložili sa vo vzdušnej závesovej sušiarňi pri bežných prevádzkových podmienkach. Z týchto vencov sa odoberali priemerné vzorky (1 kg plodov) v dvojtýždňových, neskôr i v dlhších intervaloch. Celkové pozorovanie trvalo 13 týždňov. Pre analýzy sa bralo iba oplodie, ktoré sa najskôr dosušilo pri 60 °C, rozomlelo a preosialo sitom 0,40 mm (DIN 1171). Farbivá sa extrahovali predestilovaným a peroxydy neobsahujúcim éterom v Soxhletovom prístroji, pričom na 5 g vzorky sa bralo 100 ml éteru. Extrakcia trvala priemerne 2 hodiny. Získaný extrakt sa zmydelnil jednohodinovým varom s 0,5 N metanolickým KOH. Éterová vrstva sa dôkladne premyla vodou, vysušila bezvodým síranom sodným a doplnila na 25 ml. Tento základný roztok sa použil na chromatografické oddelenie jednotlivých zložiek.

V literatúre [9, 10, 12] opísaná stĺpcová chromatografia karotenoidov bola príliš zdĺhavá a nevyhovovala pre analýzy veľkého počtu vzoriek, ktoré bolo nevyhnutné urobiť. Papierová chromatografia karotenoidov je v literatúre [13] opísaná v rozličných obmenách. Najlepšie sa nám však osvedčil vlastný postup, ktorý uvádzame.

Chromatografiu sme uskutočňovali vzostupným spôsobom na papieri Whatman 3. Používali sme papier o šírke 12 cm a výške 22 cm. 1 ml základného roztoku farbív sme mikropipetou naniesli 3 cm od spodného okraja vo forme tenkého pása. Používali sme rozpúšťadlovú sústavu benzín — 96 % etanol (25 : 0,4). Vyvíjanie chromatogramu trvalo 1 ½ až 2 hodiny.

Na štarte niekedy ostali stopy žltého farbiva; zóna bola široká 0,4 cm, označili sme ju ako zónu 12. Vo vzdialenosti 2,5 cm od štartu sa objavila ružová zóna o šírke 0,9 cm, ktorú sme v ďalšom označili ako zónu 11. Vo vzdialenosti 3,9 cm od štartu sa nachádzala slaboružová zóna 10' o šírke 0,6 cm. Zóna 10, široká 2,5 cm, tehlovoružovej farby, bola vo vzdialenosti 5,3 cm od štartu; zóna 8, tehlovoružová, široká 0,5 cm, bola vo vzdialenosti 7,4 cm; zóna 7, citrónovožltá, široká 0,6 cm, bola vo vzdialenosti 8 cm; žltá zóna 6, široká 0,7 cm, bola vo vzdialenosti 8,9 cm; oranžovožltá zóna 5 o šírke 0,6 cm bola vo vzdialenosti 10 cm; červenoružová zóna 4, široká 0,9 cm, bola vo vzdialenosti 10,9 cm; citrónovožltá zóna 3, široká 0,5 cm, bola vo vzdialenosti 15,2 cm a oranžovožltá zóna 1 o šírke 0,7 cm bola vo vzdialenosti 17,8 cm od štartu; pohybovala sa prakticky s čelom rozpúšťadla. Okrem toho v niektorých prípadoch sa vo vzdialenosti 17,2 cm od štartu objavila žltá zóna, široká 0,4 cm, označená ako zóna 2, a vo vzdialenosti 14,2 cm žltá zóna o šírke 0,3 cm, označená ako zóna 3'

Ako sme sa ďalšou chromatografiou jednotlivých zón presvedčili, týmto spôsobom sa nedosiahlo celkom dokonalé rozdelenie všetkých farbív (pozri diagram 1). Napriek

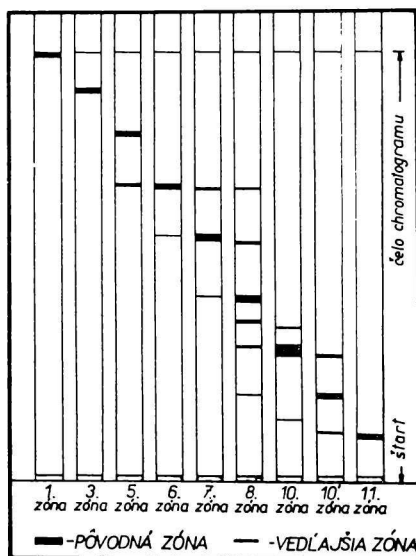


Diagram 1. Schematické znázornenie čistoty jednotlivých zón.

tomu vzhľadom na chyby, ku ktorým dochádza pri nanášaní a elúcii vzoriek, ukázalo sa presnejším robiť kvantitatívne stanovenie priamo z prvého chromatogramu. Čistenie zón druhou chromatografiou sme použili iba pri ich identifikácii.

Jednotlivé vystrihnuté zóny sa pri kvantitatívnom stanovení eluovali zostupne 96 % etanolom. Eluáty sa v odmerných bankách dopĺňali na 10 ml a extinkcia sa merala v mikrokvetách na Pulfrichovom fotometri s filtrom S 47.

Pre tieto podmienky merania sú v literatúre [11] uvedené kalibračné krivky pre benzínové roztoky niektorých farbív. Aby sme mohli použiť tieto závislosti na výpočet, stanovili sme vzťah medzi extinkciou β -karoténu, kryptoxantínu, kapsantínu a kapsorubínu v benzíne a etylalkohole (tab. 1).

Tabuľka 1

Extinkcia v etylalkohole	Extinkcia v benzíne			
	β -karotén	kryptoxantín	kapsantín	kapsorubín
0,200	0,068	0,100	0,083	0,050
0,300	0,173	0,163	0,128	0,092
0,400	0,270	0,235	0,174	0,134
0,500	0,367	0,312	0,220	0,175
0,600	0,465	0,365	0,265	0,215
0,700	0,565	0,433	0,308	0,257
0,800	0,664	0,500	0,354	0,298
0,900	0,763	0,565	0,400	0,340
1,000	0,862	0,633	0,444	0,382

Výsledky kvantitatívnych stanovení udávame jednak pre všetky farbivá v moduloch extinkcie, jednak pre uvedené 4 farbivá i v g/kg suchého paprikového oplodia. Uvádzané výsledky sú priemerom dvoch paralelných stanovení. Tieto sa od seba vo väčšine prípadov nelíšili viac než o 5 %, čo predstavuje prípustnú hodnotu vzhľadom na chyby, ktoré sa môžu vyskytnúť pri používaní chromatografických metód.

Jednotlivé zóny sme identifikovali na základe absorpčných maxím vo viditeľnej oblasti, pričom sme sa opierali o údaje viacerých autorov [9, 14, 15]. Absorpčné spektrá sme merali na spektrálnom fotometri UVISPEC Hilger so spektrálnou čistotou 5 Å.

Do úvahy sme brali aj chovanie karotenoidov pri adsorpčnej chromatografii [12] a pri rozdeľovaní v zmesi petroléter—metanol [16]. Na stanovenie prítomnosti epoxydov sme použili chromatografiu chloroformového roztoku pred reakciou a po reakcii so stopami kyseliny soľnej [13].

Prehľad výsledkov identifikácie podáva tab. 2. Keďže sme sa nezaoberali izoláciou

Tabuľka 2

Č. zóny	Rozpúšťadlo	Absorpčné maximum $m\mu$	Rozdelenie medzi petroléter—metaňol	Identifikácia
1	hexán petroléter	425, 449, 475 425, 447, 480	epifázické	β -karotén
2	chloroform	435, 460, 483	epifázické	izomér β -karoténu*
3	etanol	425, 450, 476	v oboch vrstvách	kryptoxantín
4	petroléter	481, 500	hypofázické	estery kapsantínu**
5	petroléter	420, 445, 470	hypofázické	xantofyl
6	petroléter	424, 449, 477	hypofázické	zeaxantín***
7	petroléter	426, 450	hypofázické	flavoxantín
8	petroléter	436, 462, 490	hypofázické	—
9	hexán	420, 435, 460, 490	hypofázické	×
10	petroléter	456, 470, 503	hypofázické	kapsantín
10'	etanol	453, 476, 506	hypofázické	× ×
11	petroléter	460, 487, 520	hypofázické	kapsorubín
12	etanol	vo viditeľnej oblasti nie je maximum v UV 340, 390	—	× × ×

Poznámky:

* Zóna sa objavovala len niekedy.

** Zóna sa objavovala v nedokonale zmydelnených extraktoch.

*** Pozitívna reakcia na epoxydy, takže môže ísť aj o epoxydy zeaxantínu.

× Objavovala sa zriedkavo.

× × Na začiatku vädnutia len v stopách, neskôr v merateľných množstvách.

× × × Objavovala sa v extraktoch zo starších melív; v priebehu vädnutia sa neobjavovala vôbec alebo len v stopách.

jednotlivých farbív v kryštaličkom stave, treba výsledky identifikácie získané na základe použitých kritérií chápať ako pravdepodobné.

Výsledky a diskusia

Zmeny obsahu jednotlivých farbív v priebehu prirodzeného vädnutia majú pri všetkých sledovaných sortách rovnaký charakter. Na diagrame 2 sú zná-

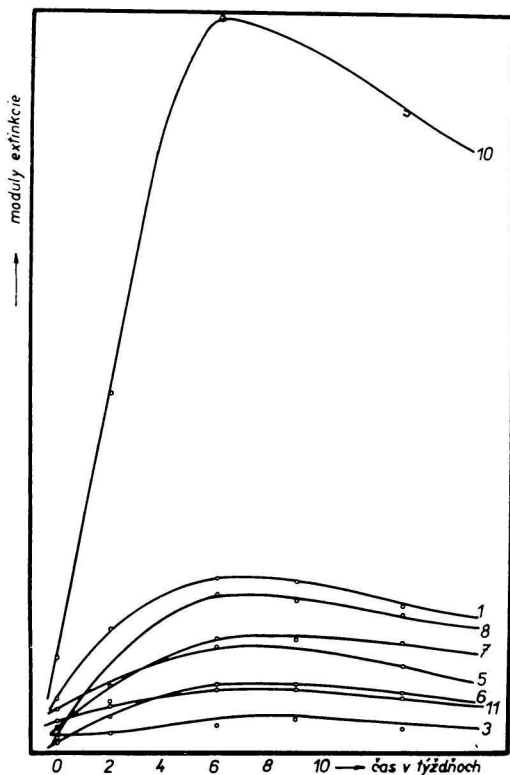


Diagram 2. Pribúdanie farbív v priebehu prirodzeného vädnutia plodov sorty TS-18. na osi úsečiek: čas v týždňoch
na osi poradnic: moduly extinkcie meranej na Pulfrichovom fotometri s filtrom S 47
Čísla zón sú vyznačené pri jednotlivých krivkách.

zorné závislosti modulov extinkcií jednotlivých zón od času vädnutia plodov sorty TS-18. Tab. 3 udáva množstvá niektorých farbív v priebehu vädnutia v g na kg suchej papriky.

Z uvedených údajov je zrejmé, že počas prirodzeného vädnutia pribúdajú všetky prítomné farbivá, teda syntéza karotenoidov v paprikovom oplodí pokračuje i za prirodzeného vädnutia. Časový priebeh pribúdania farbív

Tabuľka 3

Sorta	Čas v týždňoch	Sušina	g/kg			
			β -karotén	krypto-xantín	kapsantín	kapsorubín
Hodonínska	0	14,9	0,123	0,023	0,152	0,004
	2	23,1	0,467	0,049	1,450	0,014
	6	52,9	0,642	0,147	1,685	0,084
	9	58,8	0,833	0,167	1,945	0,110
	13	78,5	0,519	0,132	1,890	0,077
TS-18	0	14,9	0,213	0,046	0,365	0,013
	2	36,8	0,504	0,047	1,700	0,035
	6	58,1	0,742	0,087	2,090	0,133
	9	70,0	0,692	0,080	1,906	0,132
	13	77,8	0,523	0,060	1,869	0,105
Fekete	0	14,0	0,078	0,014	0,085	
	2	26,1	0,420	0,075	1,495	0,012
	6	61,8	0,635	0,135	1,317	0,062
	9	73,8	0,550	0,130	2,010	0,058
	13	80,1	0,496	0,086	1,925	0,059

potvrďuje údaje získané B e n e d e k o m [1] na maďarských sortách koreninovej papriky, i naše pozorovania na sortách TS-18, TŽK Fekete a Hodonínska [2].

Nízky obsah kapsorubínu možno vysvetliť tým, že časť kapsorubínu sa adsorbovala spolu s kapsantínom (pozri experimentálnu časť a diagram 1).

Obzvlášť intenzívne je zvyšovanie obsahu kapsantínu. Kým množstvo jednotlivých farbív sa v priebehu prvých dvoch týždňov prirodzeného vädnutia zvyšuje 2—6 krát, množstvo kapsantínu sa pri sorte Hodonínska zvyšuje

7,6 krát a pri sorte Fekete dokonca 13 krát. Naproti tomu pri sorte TS-18 pribúda kapsantínu pomalšie, nakoniec však jeho množstvo dosahuje rovnaké hodnoty ako pri ostatných dvoch sledovaných sortách.

Hoci práca L. Ch o l n o k y h o a spolupracovníkov [8] podáva možnú schému premien jednotlivých karotenoidných farbív v priebehu dozrievania paradajkovej papriky, ťažko z našich výsledkov usudzovať na mechanizmus vytvárania jednotlivých farbív počas prirodzeného vädnutia.

Rýchle pribúdanie obsahu kapsantínu nasvedčuje, že toto farbivo je konečným produktom premien jednotlivých karotenoidov. Obsah ostatných farbív sa mení približne rovnakou rýchlosťou, čo znamená, že ide o medziprodukty syntézy kapsantínu nachádzajúce sa navzájom v dynamickej rovnováhe.

Сúhrn

Sledovali sa zmeny farbív papriky v priebehu prirodzeného vädnutia na vencoach metódou papierovej adsorpčnej chromatografie na papieri Whatman 3 za použitia rozpúšťadla benzín—96 % etanol (25 : 0,4). Na takto získaných chromatogramoch bolo 12 farebných zón, z ktorých na základe absorpčných maxím vo viditeľnej oblasti s prihliadnutím na chovanie pri chromatografii a pri roztrepávaní v sústave petroléter—metanol sa identifikovali: β -karotén, izomér β -karoténu, kryptoxantín, xantofyl, zeaxantín, flavoxantín, kapsorubín a kapsantín. Jednotlivé zóny sa eluovali etanolom a extinkcia sa merala Pulfrichovým fotometrom s filtrom S 47. Vyhodnotenie chromatogramov vzoriek postupne odoberaných v priebehu prirodzeného vädnutia ukázalo, že počas prirodzeného vädnutia koreninovej papriky pribúda obsah všetkých farbív, t. j. že i v tomto štádiu pokračuje syntéza karotenoidov.

БИОХИМИЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРЯНОГО ПЕРЦА (II) ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ КРАСЯЩИХ ВЕЩЕСТВ В ТЕЧЕНИИ УВЯДАНИЯ

В. ЗИТКО, Я. ВАЛЕНТОВА

Отдел глицидов и биохимии Химического института Словацкой Академии Наук
в Братиславе

Кафедра химической технологии углеводов Химического факультета Словацкой высшей
технической школы в Братиславе

Выводы

Мы исследовали изменения красящих веществ перца в течении естественного увядания в венках методом бумажной адсорбционной хроматографии на бумаге Whatman 3 при применении растворителя бензин—96 % этанол (25 : 0,4). На полученных таким образом хроматограммах было 12 окрашенных зон, из которых на основании адсорбционных максимумов в видимой области, принимая во внимание поведение при хроматографии и при разделении в системе петролейный эфир—метанол, были идентифицированы:

β -каротен, изомер β -каротена, криптоксантин, ксантофил, зеаксантин, флавоксантин, капсорубин и капсантин. Отдельные зоны были элюированы этанолом и проведены определения экстинкции на Пульфриховом фотометре при применении фильтра S 47. Оценивание хроматограмм у проб отобранных постепенно в течении естественного увядания указало, что во время естественного увяданияпряного перца, прибывает содержание всех красящих веществ, т. е., что и в этой стадии продолжается синтез каротиноидов.

Поступило в редакцию 25. 7. 1958 г.

BIOCHEMIE DER ERZEUGUNG VON GEWÜRZPAPRIKA (II) DYNAMIK DES INHALTES VON FARBSTOFFEN WÄHREND DES WELKENS

V. ZITKO, J. VALENTOVÁ

Abteilung für Glyzide und Biochemie des Chemischen Instituts an der Slowakischen Akademie der Wissenschaften in Bratislava

Lehrstuhl für chemische Technologie der Kohlenhydrate der Chemischen Fakultät an der Slowakischen Technischen Hochschule in Bratislava

Zusammenfassung

Es wurden die Änderungen der Farbstoffe in Paprika während des natürlichen Welkens mittels papierchromatographischer Methode mit Whatmann-Papier Nr. 3 und Benzin—96 % Alkohol (25 : 0,4) als Lösungsmittel verfolgt. An so gewonnenen Chromatogrammen wurden 12 Farbzonen festgestellt und auf Grund der Absorptionsmaxima in sichtbarem Gebiete und unter Berücksichtigung des Verhaltens bei der Verteilung in dem System Petroläther—Methylalkohol wurden β -Carotin, Isomere des β -Carotins, Kryptoxanthin, Xantophyll, Zeaxanthin, Flavoxanthin, Capsorubin und Capsanthin identifiziert. Die einzelnen Zonen wurden mit Alkohol eluiert und die Extinktion im Pulfrich-Photokolorimeter mit Filter S 47 gemessen. Die Auswertung von Chromatogrammen der stufenweise im Verlaufe des natürlichen Welkens entnommenen Proben bewies, dass der Inhalt aller Farbstoffe während des natürlichen Welkens zunimmt, d. h. dass die Synthese von Carotinoiden auch in diesem Stadium andauert.

In die Redaktion eingelangt den 25. 7. 1958

LITERATÚRA

1. K a r d o š E., *A magyar fűszerpaprika*, Budapest 1954, 109—112. — 2. Z i t k o V., G a l v á n e k M., Chem. zvesti 13, 124 (1959). — 3. K a r d o š E., *A magyar fűszerpaprika*, Budapest 1954, 227—228. — 4. Z e c h m e i s t e r L., C h o l n o k y L., Ann. 509, 269 (1934). — 5. Z e c h m e i s t e r L., C h o l n o k y L., Ann. 516, 30 (1935). — 6. Z e c h m e i s t e r L., C h o l n o k y L., Ann. 523, 101 (1936). — 7. V a l e n t i n F., Chem. zvesti 9, 638—645 (1955). — 8. C h o l n o k y L., G y ö r g y f y K., N a g y E., P á n c z e l M., Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 6, 143—171 (1955). — 9. G a r c i a F. M., Revista da Faculdade de Ciencias da Universidade de Coimbra, Vol. XX (1951). — 10. C h o l n o k y L., Z. Lebensmitt. Untersuchung Forschung 78, 157—161 (1939).
11. C h o l n o k y L., Z. Lebensmitt. Untersuchung Forschung 78, 401—407 (1939). — 12. Z e c h m e i s t e r L., C h o l n o k y L., *Die chromatographische Adsorptionsmethode*,

Wien 1938, 117—125. — 13. Schramm R. W., *Postepy biochemii* 3, 5—15 (1957). — 14. Goodwin T. W., *Sravnitel'naja biochimija karotenoidov*, Moskva 1954. — 15. Karrer P., Jucker E., *Carotenoids*, London 1951. — 16. Šemjakin F. M., Micelovskij E. S., Romanov D. V., *Chromatografičeskij analiz*, Moskva 1955.

Došlo do redakcie 25. 1958

Adresa autorov:

Inž. Vladimír Z i t k o, inž. J ú l i a V a l e n t o v á, Bratislava, Kollárovo nám. 2, Chemický pavilón.