

PORÓWNANIE SPEKTROFOTOMETRYCZNYCH METOD OZNACZANIA BARWY OLEJÓW ROŚLINNYCH

Magdalena Ropelewska, Artur Kalinowski

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno – Spożywczego Oddział
Technologii Mięsa i Tłuszczu, Dział Przetwórstwa Tłuszczów ul.
Jubilerska 4
04–190 Warszawa

Streszczenie

Porównano spektrofotometryczne metody oznaczania barwy olejów ze szczególnym uwzględnieniem ilościowego oznaczenia zawartości barwników chlorofilowych (jako feofityny *a*). W tym celu przygotowano wzorce feofityny *a* w dichlorometanie oraz w rafinowanym oleju rzepakowym. Barwę olejów oznaczano metodą spektrofotometryczną w zakresie światła widzialnego oraz za pomocą tintometru Lovibond. Dla każdego standardu obliczano poprawioną absorbancję i współczynnik absorbancji wg metody AOCS Official Method Cc 13d – 55: 1997. Na podstawie zależności absorbancji od stężenia feofityny *a* [ppm] wykreślano proste kalibracyjne i określano liniowość. W przypadku wzorców feofityny *a* w oleju, oznaczano także wartości absorbancji dla barwników chlorofilowych i karotenoidowych oraz wartości barwy ogólnej wg normy PN – A – 86934: 1995, jak również zawartość β – karotenu [BS 684: Roz. 2.20: 1977].

Wartość średnia współczynnika absorbancji, wyznaczona wg AOCS Official Method Cc 13d – 55: 1997 dla roztworów wzorcowych feofityny *a* w dichlorometanie wynosi 0,04767 i jest zbliżona do wartości literaturowej (0,04074) wg BFM Os - 8. W przypadku standardów olejowych, wartość średnia współczynnika absorbancji jest zdecydowanie wyższa (0,06949). Wyznaczone równanie prostej wzorcowej $y = 0,035x + 0,003$ stwarza możliwość ilościowego określenia zawartości [ppm] feofityny *a* w olejach badanych wg normy PN – A – 86934: 1995.

Słowa kluczowe: barwa, feofityna *a*, spektrofotometr, Lovibond, olej, chlorofil

COMPARISON BETWEEN SPECTROPHOTOMETRIC METHODS OF DETERMINATION OF VEGETABLE OIL COLOUR

Summary

Compared the spectrophotometric method for the determination of colour oils, with particular emphasis on the quantitative determination of chlorophyll pigments (as pheophytin *a*). To this end, patterns of pheophytin *a* prepared in methylene chloride and in fully refined rapeseed oil. The colour of the oils were determined by spectrophotometry in the visible light range, and by use of the Lovibond tintometer. The corrected absorbance and absorptivity coefficient were calculated for each standards by AOCS Official Method Cc 13d – 55: 1997. Based on the dependence of absorbance on the concentration of pheophytin *a* [ppm] plotted calibration curves and linearity were determined. In the case of pheophytin *a* prepared in oil, determined the absorbance values for chlorophyll and carotenoid pigments and the general colour values according to the standard PN – A – 86934: 1995 , as well as the β – carotene content [BS 684: Roz. 2.20: 1977].

The average value of absorptivity coefficient, determined by AOCS Official Method Cc 13d – 55: 1997 for pheophytin *a* standards, prepared in methylene chloride is totaled 0,04767, and it is similar to the literature value (0,04074) by BFM Os - 8. In the case of oils standard, the average value of absorptivity coefficient is much higher (0,06949). Designated calibration curve equation $y = 0,035x + 0,003$ makes it possible to quantify the content [ppm] of pheophytin *a* in the tested oils according to PN – A – 86934: 1995.

Key words: colour, pheophytin *a* , spectrophotometer, Lovibond, oil, chlorophyll

WSTĘP

Większość surowych olejów roślinnych charakteryzuje specyficzna barwa. Z reguły posiadają one odcień pomarańczowy na skutek obecności rozpuszczonych karotenoidów. Czasami wykazują odcień brązowy, co zazwyczaj jest spowodowane utlenieniem. Niektóre tłuszcze, zwłaszcza olej oliwkowy, oraz w mniejszym stopniu oleje sojowe i rzepakowe, mają zielonkawe zabarwienie pochodzące od chlorofili i związków pokrewnych. Z wyjątkiem oleju oliwkowego zabarwienie to nie jest pożądane [Drozdowski 2000]. Poziom barwników w surowych olejach roślinnych różni się bardzo w stopniu zależnym od warunków pogodowych w czasie wzrostu i zbiorów oraz gatunku surowca olejarskiego, jak również technologii wydobywania oleju. Zainteresowanie barwnikami olejów wynika z ich funkcji żywieniowej oraz technologicznej, w której największe znaczenie ma aktywność pro- lub

antyoksydacyjna [Rotkiewicz, Konopka i Tańska 2002]. Chlorofil i jego pochodne są szeroko znanymi prooksydantami, obniżającymi tlenową stabilność olejów w obecności światła. Dlatego istnieje konieczność redukcji ich koncentracji w oleju do poziomu poniżej 0,2 ppm [Prior, Bogdanor i Welsh 1987]. Dotyczy to przede wszystkim surowego oleju rzepakowego, który zawiera przeciętnie 5 – 25 ppm barwników chlorofilowych, a stanowią je dwie główne formy: chlorofil *a* i chlorofil *b* [Koseoglu i Lusas 1990]. W wyższych temperaturach, przede wszystkim w środowisku kwaśnym, ulegają one stosunkowo łatwo feofitynizacji, podczas której magnez w strukturze chlorofili zostaje zastąpiony wodorem. Powstałe związki zwane są odpowiednio feofitynami *a* i *b* [Drozdowski 2000]. Z ich obecnością związana jest niekorzystna zmiana barwy olejów [Wilska – Jeszka 2000].

Do barwników, które uznawane są za związki najbardziej skuteczne w hamowaniu utleniania fotosensybilizowanego należą karotenoidy. Chemiczne oddziaływanie tych barwników z tlenem singletowym prowadzi do ich degradacji, w wyniku czego ulegają odbarwieniu [Goldman, Horev i Saguy 1983]. Surowy olej rzepakowy zawiera przeciętnie 126 – 216 ppm karotenoidów [Prior, Vadke i Sosulski 1991]. Pomimo, iż obecność tych barwników w olejach jest wysoce przydatna, nie tylko z powodu ich działania przeciwutleniającego, ale i prowitaminowego, są one usuwane w procesach rafinacyjnych wraz z barwnikami chlorofilowymi, a ponadto w procesie odwaniania ulegają rozkładowi termicznemu i oddestylowaniu z parą wodną [Niewiadomski 1983].

Pomiar barwy stanowi istotny wskaźnik kontroli jakości olejów surowych i przetworzonych, w tym poddanych zabiegom rafinacyjnym. Bardzo przydatne do badania różnic intensywności zabarwienia olejów są instrumentalne metody spektrofotometryczne. Są one ważnym badaniem kontrolno – pomiarowym, umożliwiają uchwycenie tych zjawisk w sposób powtarzalny i precyzyjny.

Powszechnie na świecie stosowaną metodą analizy barwy jest pomiar spektrofotometryczny z wykorzystaniem tintometru Lovibond. Nazwa aparatu pochodzi od nazwiska wynalazcy. Zasada działania tych kolorymetrów polega na pomiarze przez detektor absorbancji trzech wiązek światła wychodzących z tego samego źródła i przechodzących przez kuetę o znanej długości drogi optycznej wypełnionej ciekłym tłuszczem lub olejem. Wyniki pomiaru przeliczane są na jednostki Lovibonda (R, Y, B, N) [Rossel 1986]. Produkowane w ostatnich latach spektrofotometry Lovibond umożliwiają także ilościowy pomiar chlorofilu *a* i *b* [AOCS Cc 13 – 55: 1997] oraz β – karotenu [BS 648 Section 2.20: 1997], jak również pomiar barwy w wielu innych skalach barw, akceptowanych na świecie.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Jako materiał badawczy posłużył wzorzec chlorofilu *a* firmy BioChemika. W wyniku przekształcenia 1 mg tego standardu, wg procedury analitycznej BFM Os – 8, otrzymano 100 ml roztworu feofityny *a* w dichlorometanie o stężeniu 10000 ppb (10 ppm). Stanowił on roztwór wyjściowy do przygotowania wzorców o określonym stężeniu feofityny *a* w dichlorometanie i w oleju. Na podstawie otrzymanych wzorców, porównywano spektrofotometryczne metody oznaczania barwy w olejach ze szczególnym uwzględnieniem barwników chlorofilowych (jako feofityny *a*).

Barwę ogólną (określenie wg Jerzewskiej 1995) wzorców olejowych mierzono (przy długościach fal 442 nm dla barwników karotenoidowych i 668 nm dla barwników chlorofilowych) wg normy PN - A - 86934: 1995 za pomocą spektrofotometru Hitachi. W celach porównawczych badano barwę wzorców w dichlorometanie i w nośnikach olejowych za pomocą tintometru Lovibond PFX 990 wg PN ISO 15305: 2001 w międzynarodowej skali Lovibonda (red, yellow, blue, neutral), Lovibond AF 960 (red, yellow), skali jodowej [DIN 6162:1981], jak również zawartość chlorofilu *a* i *b* [AOCS Cc 13d – 55: 1997]. Ilościowego oznaczenia β – karotenu dokonywano tylko we wzorcach olejowych [BS 684: Roz. 2.20: 1977].

Metodą spektrofotometryczną w zakresie światła widzialnego przy użyciu spektrofotometru Hitachi oznaczano zawartość barwników chlorofilowych wg AOCS Official Method Cc 13d – 55: 1997 dla wzorców w dichlorometanie i w oleju rzepakowym. W tym celu wyznaczono proste wzorcowe, na podstawie zależności absorbancji od stężenia feofityny *a* [ppm], z równaniami. Dla każdego standardu obliczono poprawioną absorbancję korzystając z równania:

$$\text{Poprawiona absorbancja} = B - (A + C)/2 \quad [1]$$

gdzie:

A – wartość odczytu w 630 nm,

B – wartość odczytu w 670 nm,

C – wartość odczytu w 710 nm.

Dodatkowo obliczano współczynnik absorbancji wg wzoru:

$$\text{Współczynnik absorbancji} = \frac{\text{Poprawiona absorbancja} \times 1000}{\text{Stężenie analitu [ppb]} \times \text{długość kuwety [cm]}} \quad [2]$$

WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki instrumentalnej oceny barwy standardów feofityny *a* w dichlorometanie i w oleju rzepakowym, wykonanej metodą AOCS Official Method Cc 13d – 55: 1997 za pomocą spektrofotometru Hitachi, wykazały, że wartość średnia współczynnika absorbancji dla roztworów wzorcowych w dichlorometanie jest zbliżona do wartości literaturowej (0,04074) wg BFM Os - 8 i wynosi 0,04767. W przypadku nośników olejowych, wartość średnia współczynnika absorbancji jest zdecydowanie wyższa, gdyż wynosi 0,06949. Na podstawie wyznaczonych wartości poprawionej absorbancji i współczynnika absorbancji istnieje możliwość obliczenia zawartości [ppm] feofityny *a*, stosując następujące wzory:

$$Feofityny [ppb] = \frac{\text{Poprawiona absorbancja} \times 1000}{L \times \text{współczynnik rozcieńczenia} \times \text{współczynnik absorbancji}} \quad [3]$$

gdzie:

L – długość kuwety [cm]

$$\text{współczynnik rozcieńczenia} = \frac{m_{\text{oleju}}}{m_{\text{oleju}} + m_{\text{rozp.}}} \quad [4]$$

gdzie:

m – masa [g]

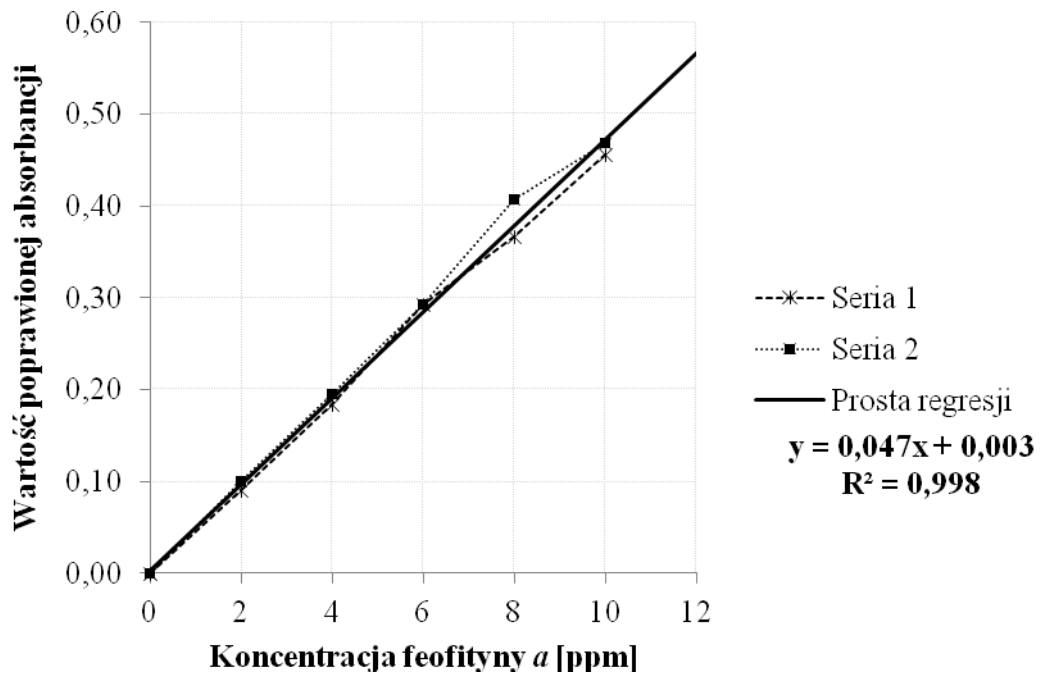
współczynnik absorbancji - wartość literaturowa (0,04074) wg BFM Os – 8

- wartość średnia dla wzorców feofityny *a* w CH₂Cl₂ (0,04767)

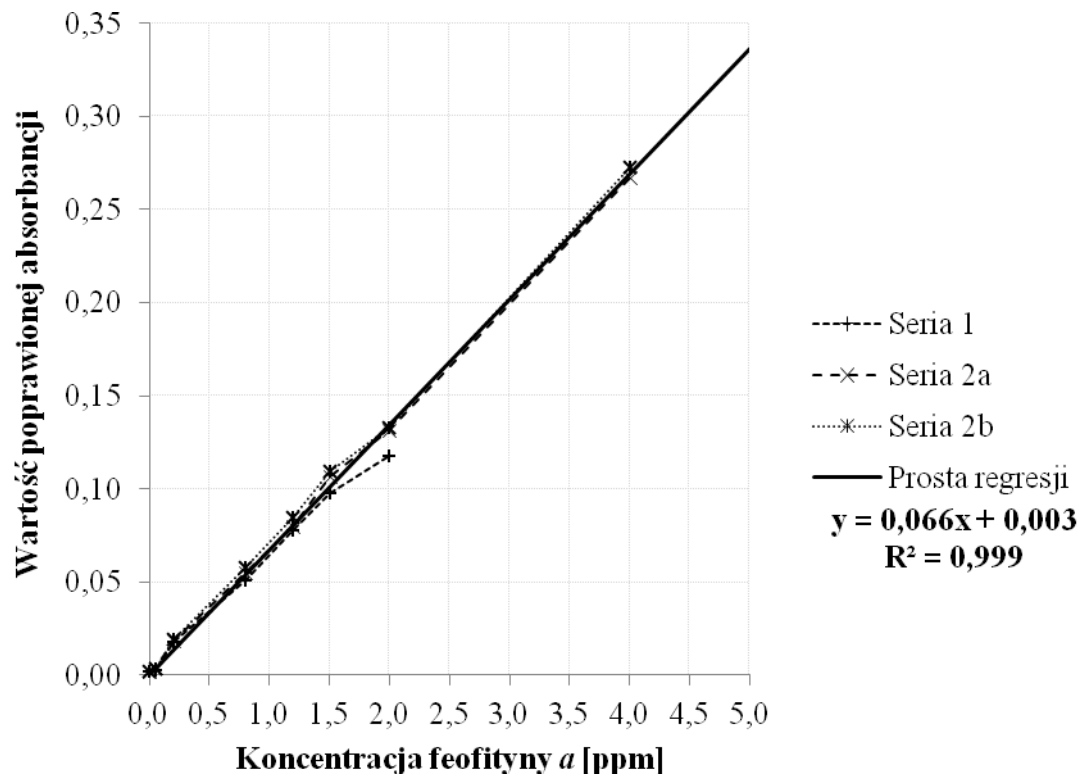
- wartość średnia dla wzorców feofityny *a* w oleju (0,06949)

Proste regresji przedstawiające zależność absorbancji od stężenia feofityny *a* przedstawia Rysunek 1.

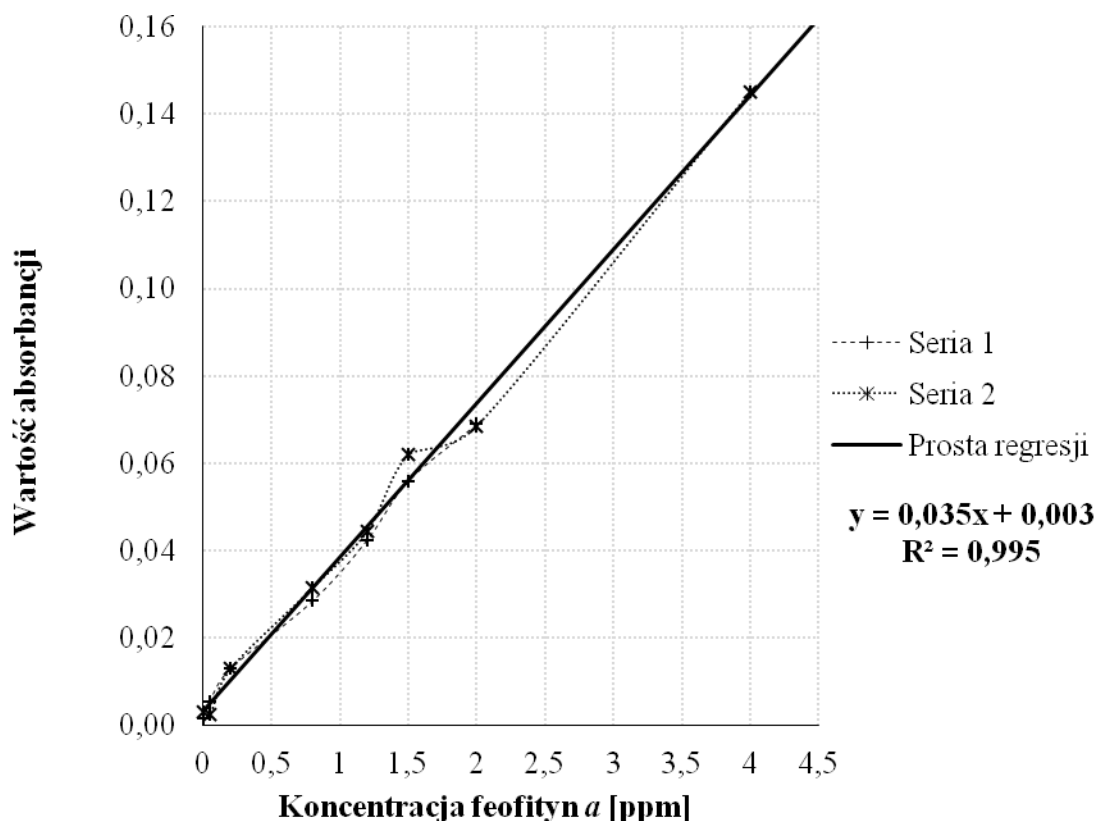
a)



b)



c)



Rysunek 1. Proste regresji przedstawiające zależność absorbancji od stężenia feofityny a [ppm] / *Simple regression of the dependence of absorbance on the concentration of pheophytin a [ppm].*

- a) w dichlorometanie / *in methylene chloride*
- b) w rafinowanym oleju rzepakowym wg AOCS Official Method Cc 13d – 55: 1997/ *in fully refined rapeseed oil by AOCS Official Method Cc 13d – 55: 1997*
- c) w rafinowanym oleju rzepakowym wg normy PN – A – 86934: 1995 / *in fully refined rapeseed oil by PN – A – 86934: 1995.*

Równania prostych najlepiej pasujących do pomiarów, wyznaczone metodą najmniejszych kwadratów, mają następującą postać:

- a) w roztworach dichlorometanu: $f(x) = 0,048x + 0,003$; $R^2 = 0,998$
- b) w nośniku olejowym: $f(x) = 0,066x + 0,003$; $R^2 = 0,999$
- c) w nośniku olejowym wg PN – A – 86934: 1995: $f(x) = 0,035x + 0,003$; $R^2 = 0,995$

Porównanie spektrofotometrycznych metod oznaczania barwy olejów roślinnych ze szczególnym uwzględnieniem barwników chlorofilowych zestawiono w Tabeli 1.

Stężenie feofityny <i>a</i> [ppm] <i>Concentration of pheophytin a</i>	spektrofotometr Hitachi / <i>Spectrophotometer Hitachi</i>							tintometr Lovibond PFX 990	
	AOCS Official Method Cc 13d – 55: 1997					Norma PN-A-86934: 1995			
	Poprawiona absorbancja	Współczynnik absorbancji <i>Absorptivity coefficient</i>			Równanie prostej <i>Calibration curve equation</i>		Absorbancja <i>Absorbance</i>	Równanie prostej <i>Calibration curve</i>	
		0,04074 ^a	0,04767 ^b	0,0694 ^c	f(x)=0,047x+0,003 ^b f(x)=0,066x+0,003 ^c			f(x)=0,035x+0,003 ^e	
Koncentracja feofityny <i>a</i> [ppm] <i>Concentration of pheophytin a [ppm]</i>					Koncentracja feofityny <i>a</i> [ppm] <i>Concentration of pheophytin a [ppm]</i>				
Rafinowany olej rzepakowy <i>Fully refined rapeseed oil</i>	0,002	0,049	0,042	0,029	- 0,021	- 0,015	0,003	0,000	0,023
	0,002	0,049	0,042	0,029	- 0,021	- 0,015	0,003	-0,000	0,027
4	0,2670	6,554	5,601	3,847	5,617	4,000	0,153	4,286	2,502
	0,2725	6,689	5,716	3,926	5,734	4,083	0,137	3,829	2,509
2	0,1315	3,228	2,758	1,895	2,734	1,947	0,066	1,800	1,236
	0,1330	3,265	2,790	1,916	2,766	1,970	0,071	1,943	1,235
1,5	0,1070	2,626	2,245	1,542	2,213	1,576	0,063	1,714	1,013
	0,1095	2,688	2,297	1,578	2,266	1,614	0,061	1,657	1,017
1,2	0,0795	1,951	1,668	1,145	1,628	1,159	0,039	1,023	0,770
	0,0845	2,074	1,773	1,218	1,734	1,235	0,050	1,343	0,770
0,8	0,0550	1,350	1,154	0,792	1,106	0,788	0,032	0,829	0,520
	0,0575	1,411	1,206	0,828	1,160	0,826	0,031	0,800	0,522
0,2	0,0185	0,454	0,388	0,267	0,330	0,235	0,015	0,343	0,180
	0,0195	0,479	0,409	0,281	0,351	0,250	0,011	0,229	0,186
0,05	0,0040	0,098	0,084	0,058	0,021	0,015	0,003	0,000	0,036
	0,0035	0,086	0,073	0,050	0,011	0,008	0,007	0,114	0,037

Tabela 1. Porównanie spektrofotometrycznych metod oznaczania barwy olejów roślinnych / *Comparising spectrophotometric methods determine of vegetable oil colour. Seria 2 / Series 2.*

^a wartość literaturowa wg BFM Os - 8 / *literature value by BFM Os - 8*; ^b dla wzorców feofityny *a* w dichlorometanie / *for patterns of pheophytin a in methylene chloride*; ^c dla wzorców feofityny *a* w oleju rzepakowym / *for patterns of pheophytin a in fully refined rapeseed oil*

PODSUMOWANIE

1. Wyniki instrumentalnej oceny barwy standardów feofityny *a* w dichlorometanie i w oleju rzepakowym, wykonanej metodą AOCS Official Method Cc 13d – 55: 1997 za pomocą spektrofotometru Hitachi, wykazały, że wartość średnia współczynnika absorbancji dla roztworów wzorcowych w dichlorometanie jest zbliżona do wartości literaturowej (0,04074) wg BFM Os - 8 i wynosi 0,04767. W przypadku nośników olejowych, wartość średnia współczynnika absorbancji jest zdecydowanie wyższa, gdyż wynosi 0,06949.
2. Wyznaczone równanie prostej wzorcowej $f(x) = 0,035x + 0,003$, na podstawie zależności absorbancji od stężenia feofityny *a* w oleju rzepakowym, stwarza możliwość ilościowego określania zawartości [ppm] feofityny *a* w olejach badanych wg normy PN – A – 86934: 1995.
3. Na podstawie porównania zestawionego w Tabeli 1 możemy stwierdzić, iż najbardziej zbliżone wyniki do wartości oczekiwanej uzyskujemy korzystając z prostych regresji, wyznaczonych dla wzorców feofityny *a* przygotowanych w rafinowanym oleju rzepakowym.
4. Zawartość barwników chlorofilowych we wzorcach, oznaczona za pomocą tintometru Lovibond PFX 990 wg normy PN ISO 15305: 2001, jest niższa od spodziewanej wartości. Szczególnie duże różnice są widoczne przy większych stężeniach barwników.
5. Barwa, oznaczona wg skali jodowej nie zmienia się, podobnie jak zawartość chlorofilu *b* (0,000 ppm) dla wszystkich wzorców o stężeniu feofityny *a* powyżej 0,05 ppm. Tym samym staje się ona bezużyteczna podczas szacowania różnic intensywności barwy olejów o stałej zawartości barwników karotenoidowych, a zmieniającej się zawartości barwników chlorofilowych.
6. Ze wzrostem zawartości barwników chlorofilowych w nośnikach olejowych wzrasta

istotnie wartość barwy ogólnej (z wartości ok. 6 dla rafinowanego oleju rzepakowego do ok. 154 dla oleju zawierającego 4 ppm feofityny *a*), pomimo stałej zawartości barwników karotenoidowych.

PIŚMIENNICTWO

1. AOCS Official Method Cc 13d – 55: 1997. Sampling and analysis of commercial fats and oils chlorophyll pigments.
2. BFM Os – 8 – Analytical Procedures. Pheophytin (Chlorophyll).
3. BS 684: Section 2.20: 1977. Carotene.
4. DIN 6162: 1981. Bestimmung der Iodfarbzahl.
5. Drozdowski B. (2000): Lipidy – Lipochromy – substancje barwne tłuszczów. W: Chemia Żywności. Pr. zbior. pod red. Z. E. Sikorskiego. Warszawa: WNT.
6. Goldman M., Horev B., Saguy I. (1983): Decolorization of β – carotene in model system simulating dehydrated foods. Mechanism and kinetic principles. J. Food Sci., 48, 751 – 754.
7. Jerzewska M. (1995): Spektrofotometryczne oznaczanie barwy olejów i tłuszczów roślinnych w świetle weryfikacji metody, Tłuszcze Jadalne, t. 30, nr 3, 131 – 136.
8. Koseoglu S.S., Lusas E. W. (1990): Hydrogenation of canola oil. Chapter 8. W: Canola and rapeseed. Van Nostrand Reinhold.
9. Niewiadomski H. (1983): Technologia nasion rzepaku. Warszawa: PWN.
10. PN – A – 86934: 1995. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Spektrofotometryczne oznaczanie barwy.
11. PN – ISO 15305: 2001. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie barwy w skali Lovibonda.
12. Prior J. N., Bogdanor J. M., Welsh W. A. (1987). Usuwanie chlorofilu z olejów jadalnych. W: Opracowanie z 78 Dorocznej Konferencji Amerykańskiego Towarzystwa Chemików Tłuszczowych.
13. Prior E. M., Vadke V. S., Sosulski F. W. (1990): Effect of heat treatments on canola press oils. Non – triglyceride components. JAOCS, 68(6): 401 – 406.
14. Rossell J. B. (1986): Classical Analysis of Oils and Fats. W: Analysis of Oils and Fats. Elsevier Applied Science Publishers. London – New York, 19 – 23.
15. Rotkiewicz D., Konopko I., Tańska M. (2002): Barwniki karotenoidowe i chlorofilowe

olejów roślinnych oraz ich funkcje. W: Rośliny Oleiste. Tom XXIII – Zeszyt 2. Poznań: IHiAR w Radzikowie.

16. Wilska – Jeszka J. (2000): Barwniki – Barwniki naturalne. W. Chemia Żywności. Pr. zbior. pod red. Z. E. Sikorskiego. Warszawa: WNT.