

ASTAXANTHIN I MARINE PRODUKTER

Prinsipp

Et ekstrakt av prøvematerialet kromatograferes på kiselgel-kolonner. Eluatet tilsettes borhydrid som reduksjonsmiddel, og astaxanthinet og dets mono- og diester bestemmes spektrofotometrisk som tetrahydroksy β -karoten ved bølglengdene 450 og 476 nm.

Reagenser

1. Kiselgel m/20 % vann, Woelm (02753) LCN Pharmaceuticals GmbH & Co
2. Aceton
3. Eter, peroksydfri
4. n-hexan, for kromatografi
5. Etanol, absolutt, aldehydfri
6. Natriumborhydrid (NaBH_4), p.a., Merck

Utstyr

- a. Begerglass, 100 og 400 ml
- b. Homogenisator, Ba-Mix
- c. Büchnertrakt, 6 cm diameter
- d. Filter, Nr. 589 svartbånd, diameter 5,5 cm
- e. Skilletrakt, 250 ml
- f. Kromatograferingskolonne, totallengde 48 cm, med 3-veis hane. Kolonnens øverste 18 cm har innvendig diameter lik 2,3 cm. De nederste 30 cm har innvendig diameter lik 0,7 cm.
- g. Nitrogen-flaske med reduksjonsventil
- h. Rundkolbe, 250 ml
- i. Vannstrålepumpe
- j. Vakuumslangestuss med hane og B24-slip
- k. Vannbad
- l. Glassmikrofiberfilter, Whatman 5,5 cm
- m. Glasskyvetter, 1 cm
- n. Spektrofotometer
- o. Målekolbe, 25 ml

Utførelse

Tilberedning av prøve. Prøvematerialet kjøres gjennom kvern et par ganger, og massen blandes godt. En passende mengde, alt etter prøvens art, utveies for ekstraksjon. Følgende tabell gir orientering om mengde prøve og ekstraksjonsmiddel for en del marine produkter:

	gram prøve	ml acetone	ml eter
Rekeavfall	10	50	3 x 50
Hel krill	10	50	3 x 50
Rauåte	10	50	3 x 50
Laks	50	100	2 x 100
Ørret	50	100	2 x 100

Farseprøven innveies i et 400 ml begerglass, tilsettes acetone, homogeniseres i 1-2 minutter og filtreres i Büchnertrakt. Farseres-tene overføres til begerglasset og ekstraheres 2-3 ganger med eter. Hver gang filtreres i Büchnertrakten, og ekstraktene slås sammen med acetonekstraktet.

De samlede ekstraktene overføres til en 250 ml skilletrakt. Er vannfasen klar, tappes den ut og kastes. Er vannfasen guldfarget, tappes den fra og rystes med små porsjoner hexan inntil guldfargen er borte. Hexanekstraktene overføres til samleekstraktet, som fratappes eventuelle vannrester før overføring til 250 ml rundkolbe for evakuering. Det evakueres på kokende vannbad inntil et volum på 30-40 ml. Konsentratet, som består av vann og oppløsningsmiddel i to uklare faser, tilsettes 30-40 ml hexan.

Er vannfasen guldfarget, overføres den til kolbe, tilsettes litt hexan og rystes. Hexan-uttrekket dekanteres over i samleekstraktet. Prosessen gjentas til vannfasen er tilnærmet fargeløs.

Samleekstraktet fintappes for vannrester og overføres til kolbe. Det evakueres på kokende vannbad inntil liten rest, som inndampes ved håndvarme. Inndampningsresten overføres med litt hexan til 25 ml målekolbe, og det fylles til merket. Ved oppbevaring må kolben stå mørkt ved 4-5°C.

Tilberedning for kromatografering. Utløpet av kolonnen forsynes med bomullspropp. En passende mengde kiselgel blandes godt med hexan i et 100-150 ml begerglass og overføres straks til kolonnen. Det bankes forsiktig på kolonnen med en slangestump til gelen er godt pakket. Gelen må ha satt seg ca. 1 cm under overgangen fra tykkere til tynnere del av kolonnen. Det er viktig at gelen alltid har hexan over seg og ikke blir tørr.

Under trykk fra nitrogenflaske skylles kolonnen gjennom med 20-25 ml hexan. Når hexanen står ½ cm over gelen, påsettes de 25 ml astaxanthin-uttrekk, eller en alikvot av dette, til kolonnen. Astaxanthinet setter seg som et sterkt karmosinfarget bånd på toppen av

gelen. Det etterskylles med 20-25 ml hexan og elueres til den står $\frac{1}{2}$ cm over gelen.

Elueringsskjema for bestemmelse av totalt astaxanthin

Fraksjon 1. 25 ml 5 % eter i hexan. Eluatet kastes (triglycerider)

Fraksjon 2. 25-50 ml 60 % eter i hexan. Totalt astaxanthin

Ny elueringssvæske tilsettes når den foregående står $\frac{1}{2}$ cm over gelen.

Når fargebåndet står 3-5 cm fra utløpet av kolonnen, oppsamles fraksjon 2 i en 250 ml ståkolbe. Det elueres til alle fargebåndene er ute av kolonnen.

Eluatene evakueres på vannbad, og de siste restene inndampes ved håndvarme.

Det tilsettes 10 ml abs. etanol og blandes godt. En knivspiss natriumborhydrid (6) tilsettes for reduksjon ved romtemperatur i maksimum 15 minutter. Den sitrongule løsningen filtreres gjennom glassmikrofiberfilter over i glasskyvetter for spektrofotometrisk måling ved bølgelengdene 450 og 476 nm mot abs. etanol som blindprøve.

Elueringsskjema for bestemmelse av astaxanthin-fraksjoner

Fraksjon 1. 25 ml 5 % eter i hexan. Eluatet kastes (triglycerider)

Fraksjon 2. 25 ml 15 % eter i hexan. Astaxanthin-diester

Fraksjon 3. 25 ml 30 % eter i hexan. Astaxanthin-monoester

Fraksjon 4. 25 ml 60 % eter i hexan. Fritt astaxanthin

Fremgangsmåten er den samme som beskrevet for totalt astaxanthin, men fraksjonene tas ut separat under elueringen. Hver fraksjon elueres med den angitte eter/hexan-blandingen til fraksjonens fargebånd er gått ut av kolonnen. Fraksjonene samles i hver sin 50 ml målekolbe. Etter ferdig eluering fylles til merket og blandes godt.

En alikvot overføres til inndampningskolbe. Det evakueres på vannbad, og den siste resten ved håndvarme. Inndampningsresten løses i abs. etanol. Mengden abs. etanol avpasses til å gi en gunstig absorpsjonsforhold for avlesning. En knivspiss natriumborhydrid tilsettes for reduksjon. Herunder forandres fargen fra rød til sitrongul. De reduserte fraksjonene filtreres gjennom glassmikrofiberfilter over i glasskyvetter for avlesning ved bølgelengdene 450 og 476 nm mot abs. etanol som blindprøve.

Beregning

Innholdet astaxanthin (karotenoider) beregnes ut fra formelen:

$$K, \mu\text{g/g} = \frac{f_3 \cdot A_{450} + f_4 \cdot A_{476}}{2 \cdot f_1 \cdot f_2 \cdot W}, \text{ der}$$

A_{450} = Avlest absorbans ved 450 nm

A_{476} = Avlest absorbans ved 476 nm

W = Initialt utveid mengde prøvemateriale, gram

f_1 = 100 = faktor for omregning til benevnelsen $\mu\text{g/g}$

f_2 = Fortynningsfaktor

f_3 = 448 f_3 og f_4 er konstanter utledet av de spesifikke

f_4 = 520 absorbanser for astaxanthin ved de respektive bølgelengder

Eksempel: 10 g rekeskall ekstraheres ifølge beskrivelsen. Ekstraktet overføres til 100 ml hexan. 5 ml uttas for kromatografering. Astaxanthinfraksjonen overføres til 10 ml etanol og avleses.

Avlesninger: $A_{450} = 0,779$, $A_{476} = 0,675$

Fortynning : $f_2 = \frac{5}{100 \cdot 10} = 0,005$

$$K, \mu\text{g/g} = \frac{448 \cdot 0,779 + 520 \cdot 0,675}{2 \cdot 100 \cdot 0,005 \cdot 10} = 70$$

Er innholdet diester, monoester og fritt astaxanthin beregnet, vil summen av disse være lik totalt astaxanthin.

Merknad. Astaxanthin og dets estere vil som regel utgjøre hovedmengden av karotenoid-pigmentene i marine produkter. Også andre karotenoider kan være til stede i variable mengder. Av disse har cantaxanthin spesiell interesse. Syntetisk cantaxanthin er aktuell som tilsetning til fôrstoff for pigmentering av oppdrettsfisk. Cantaxanthinet blir deponert uforandret i fiskekjøttet.

Ved analyse etter den beskrevne metode vil cantaxanthinet bli medbestemt som astaxanthin, men gir i samme vektkonsentrasjon bare 94 % av astaxanthinets absorbans. Ved en tilpasset fraksjonering under kolonnekromatograferingen vil det være mulig å ta ut cantaxanthinet i egen fraksjon for separat bestemmelse, hvis dette skulle være ønskelig.

Henvisning

Lambertsen, G., Brækkan, O.R.: Method of analysis of astaxanthin and its occurrence in some marine products. J. Sci. Fd. Agric. 22, 99-101, 1971.