

Z Katedry Chemii Ogólnej Wydziału Rolniczego WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr Zenon Wierzchowski

Zenon WIERZCHOWSKI i Maria BUBICZ

Karotenoidy owoców berberysu zwyczajnego

Каротиноиды в плодах барбариса обыкновенного (*Berberis vulgaris*)

Carotenoids of the Berries of *Berberis vulgaris*

Występowanie karotenoidów w owocach roślin nie jest tak powszechne jak w zielonych tkankach i dotychczas znaleziono je tylko w stu kilkudziesięciu gatunkach roślin. Nadto szczegółowe badania wykazały, że skład karotenoidów owocowych różni się przeważnie bardzo znacznie jakościowo i ilościowo od składu karotenoidów występujących w liściach. Cechuje go przede wszystkim znacznie większa różnorodność indywidualnych przedstawicieli karotenów i ksantofili.

Na przykład stwierdzono występowanie δ i ξ karotenów, cis-izomerów lykopenu, fytofluenów oraz epoksydów i keto-karotenoidów. Nadto w owocach zaznacza się wielka zmienność, od gatunku do gatunku, ogólnej koncentracji i wzajemnych stosunków ilościowych w mieszaninach. Na przykład notuje się w wielu przypadkach brak albo śladowe ilości β -karotenu i luteiny, w innych znów znaczny ich udział w ogólnej sumie. Ogólna koncentracja waha się w granicach od ułamków $\mu\text{g/g}$ do ułamków mg/g świeżej masy (T. W. Godwin — 3).

Ponieważ występowanie w owocach obok głównych pierwszorzędnych przedstawicieli polyenów także drugorzędnych związków i ich wielka zmienność podczas dojrzewania mają duże znaczenie dla badań biochemicznych w tej dziedzinie, np. dla wyjaśnienia ich biogenezy, dlatego podjęliśmy prace nad nie zbadanymi dotychczas karotenoidami owoców berberysu zwyczajnego (*Berberis vulgaris*). Prowadzmy, je zarówno na dojrzałych owocach, jak i podczas ich dojrzewania, uzupełniając je badaniem kwiatów i liści podczas wegetacji. Pierwszą część tych prac przedstawiamy poniżej. Berberys zwyczajny szczególnie dobrze nadaje się do

takich badań, bo jest w Polsce rozpowszechniony i bogato owocuje. Jego czerwone owoce zawierające kwas jabłkowy, cytrynowy i winowy są nieraz stosowane w przetwórstwie. Nadto z rodzaju *Berberis* znanych jest około 450 gatunków. Wszystkie są krzewami o kwiatach i owocach intensywnie barwnych; rosną one w różnych warunkach klimatycznych Azji, Europy i Południowej oraz Środkowej Ameryki, a bardzo wiele gatunków jest ogrodniczo uprawianych (np. w Anglii 170 gatunków). Badania porównawcze nad ich owocami byłyby więc bardzo ciekawe i stosunkowo łatwe, o ile chodzi o materiał doświadczalny.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiał

Badanym surowcem były w pełni dojrzałe owoce berberysu (*Berberis vulgaris*), które zostały zebrane w okresie X—XI 1958 r. z wawozów położonych w pobliżu Lublina i Puław w ilości około 10 kg. Analizowano tylko miąższ świeżo wydreLOWANYCH owoców. Brązowe pestki odrzucano, gdyż nie rozcierały się z piaskiem na jednolitą miazgę. Znając stosunek pestek i miąższu w owocach, otrzymane wyniki przeliczano na zawartość karotenoidów w całym owocu.

Ekstrakcja i rozdzielenie karotenoidów

Karotenoidy z miąższu owoców berberysu ekstrahowano najpierw próbnie trzema rozpuszczalnikami, celem przekonania się, który z nich jest najlepszym ekstraktorem. Do tego celu użyto:

a) mieszaniny acetonu z eterem naftowym w stosunku objętościowym 1:1, b) czystego acetonu, c) czystego eteru etylowego.

W identyczny sposób przerabiano równolegle po trzy próbki (po 10 g każda) miąższu ze świeżo wydreLOWANYCH owoców. Po roztarciu miąższu z piaskiem na jednolitą masę, zalewano próbkę porcjami danego rozpuszczalnika, powtarzając za każdym razem rozcieranie miazgi miąższu. Ekstrację prowadzono do chwili otrzymania bezbarwnego ekstraktu. Do całkowitej ekstrakcji pigmentów zwykle było koniecznych 7—10 powtórzeń, na co zużywano w sumie około 100 ml. roztworu. W przypadku użycia mieszaniny acetonu z eterem naftowym połączone ekstrakty składały się z dwóch warstw: eterowej, zabarwionej na kolor żółty i acetonowo-wodnej, zabarwionej czerwono. Fazę acetonowo-wodną wytrząsano z małą objętością eteru naftowego, celem wymycia z niej śladów barwników karotenoidowych. Wyekstrahowany barwnik dołączano do głównej fazy eterowej. Aby przekonać się czy faza acetonowo-wodna zawiera karotenoidy, fazę tę rozcieńczano równą objętością wody i wytrząsano z czystym eterem etylowym. Otrzymywano bezbarwny

ekstrakt, co świadczyło o tym, że faza acetonowo-wodna nie zawierała już żadnych karotenoidów.

Stąd wniosek, że karotenoidy obecne w dojrzałych owocach berberysu dadzą się ilościowo przeprowadzić do fazy eteru naftowego. Aceton z fazy eterowej wmywano dokładnie wodą, ekstrakt osuszano siarczanem sodu i w miarę potrzeby zagęszczano w próżni (przy użyciu ciemnego eksykatora próżniowego) do objętości około 90 ml. Ekstrakt przenoszono następnie do kolbki miarowej na 100 ml i uzupełniano eterem naftowym do kreski. W tak przygotowanym ekstrakcie oznaczano koncentrację sumy karotenoidów przez pomiar jego ekstynkcji na fotometrze wizualnym (Zeiss-Pulfrich), przy użyciu filtru S-47. Koncentracja sumy karotenoidów dla poszczególnych próbek wynosiła: 15,9; 16,6; 16,1; średnio — 16,2 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy mięszu, co stanowi 10,5 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy całych owoców.

W przypadkach ekstrahowania acetonem połączone acetonowe ekstrakty przenoszono do rozdzielacza, dodawano równą objętość wody i równą objętość świeżo przedestylowanego eteru etylowego. Całość wytrząsano. Po wytrząśnięciu powstały dwie warstwy: faza eterowa — żółta i faza acetonowo-wodna — czerwona. Fazę eterową oddzielano od fazy acetonowo-wodnej. Tę ostatnią wytrząsano dwukrotnie z eterem etylowym (do wytrząsania brano po 20 ml). Fazę acetonowo-wodną odrzucano po ilościowym przeniesieniu z niej karotenoidów do eteru etylowego. Połączone ekstrakty fazy eterowej wmywano dokładnie wodą celem pozbycia się acetonu. Ekstrakt wolny od acetonu osuszano siarczanem sodu, odparowywano do sucha w ciemnym eksykatorze próżniowym w temperaturze pokojowej, a suchą pozostałość rozpuszczano w eterze naftowym. W otrzymanym ekstrakcie oznaczano koncentrację sumy karotenoidów, tak jak wyżej podano. Koncentracja sumy karotenoidów dla poszczególnych próbek wynosiła 15,2; 15,9; 15,7; — średnio 15,6 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy mięszu, co stanowi 10,2 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy całych owoców.

W przypadku ekstrahowania czystym eterem etylowym połączone ekstrakty mające objętość około 100 ml odparowywano do sucha w ciemnym eksykatorze próżniowym w temperaturze pokojowej. Suchą pozostałość rozpuszczano w eterze naftowym. W otrzymanym ekstrakcie oznaczano koncentrację sumy karotenoidów w ten sam sposób jak poprzednio. Koncentracja sumy karotenoidów dla poszczególnych próbek wynosiła: 16,3; 15,7; 16,0; średnio — 16,0 $\mu\text{g/g}$ świeżego mięszu, co stanowi 10,4 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy całych owoców. Ogólna koncentracja karotenoidów przy ekstrakcji:

mieszaniną acetonu z eterem naftowym — 16,2 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy mięszu

czystym acetonem — 15,6 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy mięszu

czystym eterem etylowym — 16,0 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy mięszu

Jak widać z powyższych wyników, eter etylowy i mieszanka eteru naftowego z acetonem ekstrahują jednakowo dokładnie karotenoidy z owoców berberysu, natomiast czysty aceton czyni to gorzej.

Do właściwych badań wybrano ekstrakcję mieszanką, gdyż pozwala to uniknąć odparowywania roztworu barwników do sucha, powodującego izomeryzację pigmentów. Do rozdzielania poszczególnych karotenoidów zastosowano metodę chromatografii adsorpcyjnej. Jako adsorbentów używano Ca(OH)_2 , $\text{MgO} + \text{Hyflo supercel}$ (preparat ziemi krzemkowej) i aktywnego Al_2O_3 . Stosowano kolumny o wymiarach 12 cm/1,2 cm; 15 cm/2 cm; 18 cm/2,5 cm i 30 cm/3,5 cm. Na kolumnę wprowadzano zagęszczony do małej objętości ekstrakt karotenoidów w eterze naftowym. Odpowiednio do rozmiaru kolumny brano od 1 do 10 ml ekstraktu uzyskanego z 30—500 g owoców. Chromatogram rozwijano eterem naftowym przy zastosowaniu ssania i ciśnienia z góry. Najkorzystniej przedstawia się praca na kolumnach o wymiarach średnich i małych; uzyskiwano lepszy rozdział pigmentów i znaczne skrócenie czasu elucji, np. z 12 godz. przy średnicy 3,5 cm do 4—6 godz. przy średnicy 1,2—2,5 cm. W związku z tym do ilościowych badań używano tylko kolumn o wymiarach 12 cm/1,2 cm. Poszczególne warstwy uzyskane z rozdziału na małych kolumnach były przeważnie jednorodne, tylko niektóre z nich były mieszaniną sąsiednich pigmentów. Stwierdzono to na podstawie rechromatografowania poszczególnych warstw.

Przy pracy na małych kolumnach postępowano w następujący sposób: Poszczególne warstwy rozdzielone np. na 5-ciu równoległych kolumnach były zbierane do jednego naczynia, a następnie po usunięciu z nich acetonu i zagęszczeniu w próżni były rechromatografowane na odpowiednich adsorbentach (Ca(OH)_2 , CaCO_3 , ZnCO_3). Najlepsze chromatogramy przedstawiono w tabelach nr 1, 2, 3. (Chromatogram uzyskany na kolumnie Ca(OH)_2 o wymiarach 12 cm/1,2 cm jest identyczny z chromatogramem kolumny o wymiarach 15 cm/2 cm). Na dużej kolumnie (tab. 1), otrzymano 8 warstw barwnych, lecz przy elucji nie udało się warstwy E oddzielić od C, tak, że ostatecznie otrzymano roztwory siedmiu barwników. Tylko barwniki warstwy O i M były jednorodne, jak to wykazało rechromatografowanie ich na kolumnach z $\text{MgO} + \text{Hyflo supercel}$. Wszystkie pozostałe przy rechromatografowaniu na kolumnach z Ca(OH)_2 i CaCO_3 rozdzielały się na 2—3 warstwy i dopiero przy powtórnych chromatografowaniu uzyskiwano w większości przypadków czysty rozdział i jednorodne barwniki. Na kolumnie z $\text{MgO} + \text{Hyflo supercel}$ (tabela 2) rozdzielenie barwników było lepsze niż poprzednio, bo uzyskano 9 warstw barwnych, z których cztery zawierały jednorodne

czyste barwniki, jak to wykazało rechromatografowanie. Były to barwniki warstwy G, K, O, Q.

Najlepszy rozdział uzyskano na wąskich kolumnach z $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (tabela 3). Te chromatogramy wykazały 10 warstw barwnych wyraźnie rozdzielonych; 6 warstw A, E, K, O, Q, S, jak się okazało przy badaniu rechromatograficznym, zawierało jednorodnie czyste pigmenty, a pozostałe były mieszaniną 2 lub więcej pigmentów.

Tab. 1. Chromatogram owoców berberysu na kolumnie z wodorotlenku wapnia (30 cm/3,5 cm). Nawazka 500 g, ilość ekstraktu 10 ml. Rozwinięcie eterem naftowym.

Warstwy numerowane w kierunku zmniejszającej się siły adsorpcji.

Chromatogram of *Berberis vulgaris* berries (Column of $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 30 cm/3,5 cm). Developed with light petroleum. The zones in order of decreasing adsorptive power.

Barwik Pigment	Warstwa Zone	Szerokość Depth (mm)	Opis Description	Rozpuszczalnik użyty do wymycia eter naftowy Solvent Light petroleum
8	A	3,0	jasnożółta pale yellow	10% metanol 10% methanol
	B	1,0	bezbarwna colourless	
7	C	2,0	różowiolet. pink-violet	9% aceton 9% acetone
	D	1,0	bezbarwna colourless	
6	E	4,0	żółta yellow	8% aceton 8% acetone
	F	5,0	bezbarwna colourless	
5	G	20,0	silnie żółta dark yellow	6% aceton 6% acetone
	H	10,0	bezbarwna colourless	
4	I	8,0	pomarańczowoczerw. orange-red	3% aceton 3% acetone
	J	10,0	bezbarwna colourless	
3	K	25,0	żółtopomarańczowa yellow-orange	2% aceton 2% acetone
	L	179,0	bezbarwna colourless	
2	M	4,5	pomarańczowa orange	czysty eter naftowy light petroleum
	N	20,0	bezbarwna colourless	
1	O	2,0	jasnożółta pale yellow	czysty eter naftowy light petroleum
	P	5,0	bezbarwna colourless	

Tab. 2. Chromatogram owoców berberysu na kolumnie z MgO + Hyflo supercel (1:1) 12 cm/1,2 cm. Naważka 30 g, ilość ekstraktu 1,5 ml. Rozwinięcie 15% acetonem w eterze naftowym. Warstwy numerowane w kierunku zmniejszającej się siły adsorpcji.

Chromatogram of *Berberis vulgaris* berries (Column of MgO + H + S(1:1), 12 cm/1,2 cm). Developed with light petroleum containing 15% (v/v) acetone. The zones in order of decreasing adsorptive power.

Barwik Pigment	Warstwa Zone	Szerokość Depth (mm)	Opis Description	Rozpuszczalnik użyty do wymycia eter naftowy Solvent Light petroleum
9	A	2,0	jasno żółta pale yellow	20% metanol 20% methanol
	B	2,0	bezbarwna colourless	
8	C	1,0	różowiolet. pink-violet	10% metanol 10% methanol
	D	1,0	bezbarwna colourless	
7	E	3,0	jasnożółta pale yellow	30% aceton 30% acetone
	F	5,0	bezbarwna colourless	
6	G	2,0	żółta yellow	23% aceton 23% acetone
	H	3,0	bezbarwna colourless	
5	I	4,0	silnie żółta dark yellow	20% aceton 20% acetone
	J	5,0	bezbarwna colourless	
4	K	3,0	pomarańczowoczerw. orange-red	15% aceton 15% acetone
	L	10,0	bezbarwna colourless	
3	M	7,0	żółto-pomarańcz. yellow-orange	10% aceton 10% acetone
	N	49,0	bezbarwna colourless	
2	O	2,0	pomarańczowa orange	5% aceton 5% acetone
	P	20,0	bezbarwna colourless	
1	Q	1,0	jasnożółta pale yellow	5% aceton 5% acetone

Zmydlenie

Aby przekonać się w jakiej postaci występują ksantofile w owocach berberysu (czy w formie wolnej, czy też jako estry), zmydlano poszczególne frakcje otrzymane po chromatograficznym rozdziale. Zmydlenie

prowadzono metodą T. W. Goodwina (12). Ekstrakt odparowywano do sucha. Suchą pozostałość rozpuszczano w 10 ml alkoholu etylowego i do otrzymanego roztworu dodawano 1 ml 60% wodnego KOH. Całość po wytrząśnięciu pozostawiono na 12 godz. w ciemni w temperaturze

Tab. 3. Chromatogram owoców berberysu na kolumnie z wodorotlenku wapnia 15 cm/2 cm. Naważka 50 g, ilość ekstraktu 2 ml. Rozwinięcie eterem naftowym.

Warstwy numerowane w kierunku zmniejszającej się siły adsorpcji.

Chromatogram of *Berberis vulgaris* berries (Column of Ca(OH)₂ — 15 cm/2 cm) Developed with light petroleum. The zones in order of decreasing adsorptive power.

Barwik Pigment	Warstwa Zone	Szerokość Depth (mm)	Opis Description	Rozpuszczalnik użyty do wymycia eter naftowy Solvent Light petroleum
10	A	2,0	jasnożółta pale yellow	10% metanol 10% methanol
	B	1,0	bezbarwna colourless	
9	C	1,0	różowioletowa pink-violet	5% metanol 5% methanol
	D	3,0	bezbarwna colourless	
8	E	2,5	żółta yellow	8% aceton 8% acetone
	F	15,0	bezbarwna colourless	
7	G	8,0	silnie żółta dark yellow	6% aceton 6% acetone
	H	1,0	bezbarwna colourless	
6	I	2,0	żółta yellow	4% aceton 4% acetone
	J	10,0	bezbarwna colourless	
5	K	4,0	pomarańczowoczerw. orange-red	3% aceton 3% acetone
	L	15,0	bezbarwna colourless	
4	M	3,0	żółta yellow	2% aceton 2% acetone
	N	2,0	bezbarwna colourless	
3	O	7,0	żółtopomarańczowa yellow-orange	1% aceton 1% acetone
	P	45,0	bezbarwna colourless	
2	Q	2,0	pomarańczowa orange	eter naftowy light petroleum
	R	25,0	bezbarwna colourless	
1	S	1,0	jasnożółta pale yellow	eter naftowy light petroleum

pokojujowej. Po upływie tego czasu mieszaninę rozcieńczano 3—4 krotnie wodą i ekstrahowano z niej karotenoidy czystym eterem etylowym. Ekstrakcję prowadzono kilkakrotnie, aż uzyskano bezbarwny ekstrakt (zwykle konieczne były 4 ekstrakcje). Celem usunięcia śladów ługu potasowego połączone ekstrakty wymywano ciepłą wodą aż do zaniku zabarwiania się z fenolftaleiną. Ekstrakt po osuszeniu siarczanem sodu odparowywano do sucha w próżni, a suchą pozostałość rozpuszczano w eterze naftowym.

Badano zachowanie się ekstraktu barwników w eterze naftowym podczas wytrząsania go z 90% (v/v) wodnym alkoholem metylowym.

Przy wytrząsaniu ekstraktu w eterze naftowym z 90% (v/v) wodnym alkoholem metylowym wszystkie ksantofile zawierające dwie lub więcej wolnych hydroksy albo keto grup przechodzą do hipofazy (faza metalolowa), zaś karoteny, ich epoksydy oraz estry ksantofili i epoksydów pozostają w epifazie (faza eteru naftowego).

K r y s t a l i z a c j a

Roztwory dwóch głównych karotenoli owoców berberysu, tj. luteiny i zeaksantyny poddano krystalizacji. Udała się tylko krystalizacja pierwszego barwika. Przeprowadzono ją w następujący sposób. Do krystalizacji użyto zmydlonego roztworu barwików 3 i 4 (tabela 3) otrzymanych z około 6 kg owoców berberysu. Roztwór barwików w eterze naftowym odparowywano do sucha w próżni. Do suchej pozostałości dodawano 5 ml eteru etylowego i 5 ml metanolu. Metanol dodawano kroplami, po dodaniu każdej kropli całość dokładnie wytrząsano. Mieszaninę wstawiano do lodówki i dopiero po czterech dniach na dnie naczynia zaobserwowano lśniące kryształki luteiny. Kształt ich przedstawia mikrofotografia (ryc. 2).

Zeaksantynę (barwik 5, tabela 3), próbowano krystalizować z różnych rozpuszczalników: metanolu, etanolu i mieszaniny CS₂, eteru naftowego i etylowego, ale zawsze otrzymywano tylko intensywnie pomarańczowy olej.

O z n a c z a n i e k o n c e n t r a c j i k a r o t e n o i d ó w

Do ilościowych oznaczeń karotenoidów owoców berberysu używano małych kolum 12 cm/1,2 cm. Na kolumnę wprowadzano ekstrakt otrzymany z 10 g miąższu owoców, zagęszczony do objętości 1 ml. Koncentrację karotenoidów oznaczano przez pomiar ich ekstynkcji na fotometrze wizualnym (Zeiss-Pulfrich). Przy pomiarze ekstynkcji karotenów stosowano filtr S-45, przy pomiarze ekstynkcji ksantofili S-47. Do wszystkich obliczeń używano jednego współczynnika opartego na $E 1\%/1 \text{ cm} = 2340$.

Wielkość tę ustaliliśmy doświadczalnie dla danego aparatu, przy użyciu roztworów czystego β -karotenu (Z. Wierzchowski et al. — 13). Błąd jaki z tego wynikał, przy oznaczeniach koncentracji ksantofili, był niewielki jeśli zważymy, że wartości E 1⁰/0/1 cm dla β -karotenu, luteiny i zeaksantyny, np. w roztworze CS₂, są do siebie bardzo zbliżone (1940, 1910 i 1850).

Rozdzielanie barwików i ich identyfikacja

Barwiki rozdzielone na wąskich kolumnach wodorotlenku wapnia i ewentualnie oczyszczone przez rechromatografowanie identyfikowano przez badanie ich widma absorpcyjnego, ich siły adsorpcji, przez określenie położenia na kolumnie i zachowanie się przy rozdziale fazowym przed i po zmydleniu, a w jednym przypadku przez krystalizację. Zidentyfikowano barwiki 9 warstw. Barwika warstwy A na czole kolumny oraz barwika 7b nie rozpoznano. Rozdzielenie karotenoidów owoców berberysu na kolumnie z wodorotlenku wapnia ilustruje tabela 4.

Oto wyniki:

Warstwa S. Barwik tej warstwy wykazuje najmniejszą siłę adsorpcji lokalizując się na samym dole kolumny. Szerokość warstwy 0,5 mm. Barwa jasno żółta. Ze względu na to, że ilość barwika otrzymanego z jednej kolumny była bardzo mała, do identyfikacji użyto barwik otrzymany z 5 kolumn chromatograficznych. Wymywano go z kolumny czystym eterem naftowym. Widmo absorpcyjne barwika warstwy S badane w eterze naftowym i dwusiarczku węgla na spektrofotometrze Beckmanna (model DU) wykazało, że jest to α -karoten, gdyż maksima absorpcji i kształt krzywych były takie, jakie ustalono dla α -karotenu. Rechromatografowany na kolumnie z wodorotlenku wapnia przeszedł przez nią jako jednolita jasnożółta warstwa. Otrzymany chromatogram owoców porównywano z chromatogramem liści berberysu. Barwa warstwy S i położenie na kolumnie z wodorotlenku wapnia były takie same jak dla α -karotenu z chromatogramu liści.

Warstwa Q. Barwik tej warstwy został zaadsorbowany na kolumnie z wodorotlenku wapnia nad frakcją pierwszą w odległości 20 mm. Szerokość warstwy 1 mm, barwa silnie pomarańczowa. Wymyło go z kolumny czystym eterem naftowym. Rechromatografowanie na dwóch kolumnach (Ca(OH)₂ i MgO + Hyflo supercel) wykazało jego chemiczną jednorodność. Maksima absorpcji tego barwika badane w eterze naftowym i dwusiarczku węgla były zgodne z maksimami absorpcji β -karotenu. Własności absorpcyjne barwika warstwy Q oraz jego odległość w chromatogramie od warstwy S i barwa (w porównaniu z chromatogramem liści) były identyczne jak dla β -karotenu z liści.

Tab. 4. Rozdzielenie karotenoidów owoców berberysu (*Berberis vulgaris*) na kolumnie z $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (12 cm/1,2 cm). Naważka 10 g miąższu, ilość ekstraktu 1 ml. Rozwinięcie eterem naftowym. Warstwy numerowane w kierunku zmniejszającej się siły adsorpcji.

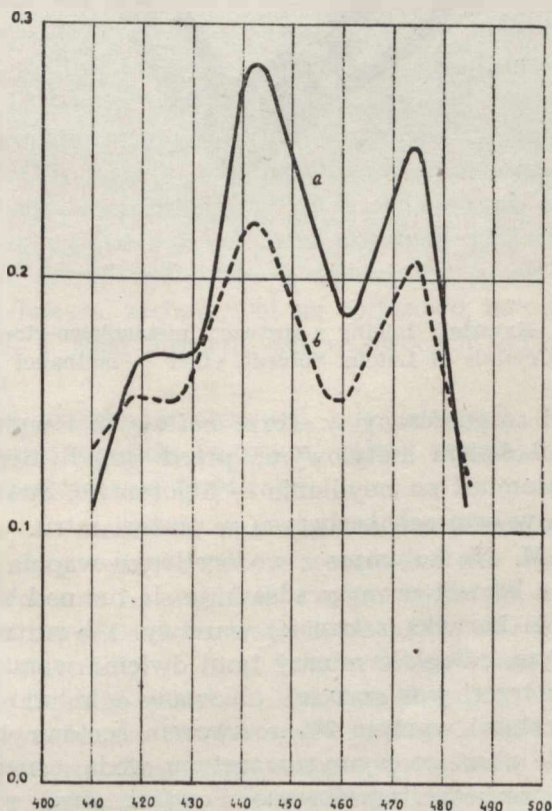
The separation of carotenoids of *Berberis vulgaris* berries on a column of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (12 cm/1,2 cm) using light petroleum as developer. The zones in order of decreasing adsorptive power.

Bar-wik Pig-ment	Wars-twa Zone	Szero-kość Depth (mm)	Opis Description	Widmo absor- pcyjne Mak- sima w CS_2 Absorption spectrum Ma- xima in CS_2 (m μ)	Widmo absor. Maksima w eterze nafto. Absorption spectrum Ma- xima in light petrol. (m μ)	Identyfikacja Identification
10	A	1,0	jasnożółta pale yellow	—	420	*
	B	1,0	bezbarwna colourless			
9	C	0,5	różowioletowa pink-violet	501,539	—	kapsantyna Capsanthin
	D	2,0	bezbarwna colourless			
8	E	1,0	żółta yellow	423,452	400,423	auroksantyna Auroxanthin
	F	10,0	bezbarwna colourless			
7	G*	4,0	silnie żółta dark yellow	—	—	mieszanina mixture
	H	10,0	bezbarwna colourless			
6	I	1,0	żółta yellow	450,479	420,448	chryzantema- ksantyna + flawoksantyna mixture
	J	10,0	bezbarwna colourless			
5	K	2,0	pomarańczowoczerw. orange-red	449,482,516	423,450,479	zeaksantyna Zeaxanthin
	L	10,0	bezbarwna colourless			
4	M	2,0	żółta yellow	443,472,505	421,442,475	luteina b Lutein b
	N	2,0	bezbarwna colourless			
3	O	4,0	żółtopomarańczowa yellow-orange	445,475,507	418,442,472	luteina a Lutein a
	P	60,0	bezbarwna colourless			
2	Q	1,0	pomarańczowa orange	450,484,519	425,448,475	β karoten β carotene
	R	20,0	bezbarwna colourless			
1	S	0,5	jasnożółta pale yellow	477,507	423,445,472	α karoten α carotene

* Warstwa G rechromatografowana na CaCO_3 rozdzieliła się na dwie warstwy Ga i Gb.
Separation of zone G on CaCO_3

7a	Ga	2,0	jasnożółta pale yellow	449,478	421,449	flawoksantyna Flavoxanthin
		10,0	bezbarwna colourless			
7b	Gb	1,5	żółta yellow	—	—	mieszanina Mixture

Warstwa O. Jest to najszersza jednorodna, żółtopomarańczowa warstwa otrzymana przez chromatografowanie ekstraktu owocu berberysu. Barwik tej warstwy ma o wiele większą siłę absorpcji od barwika poprzedniego. Na kolumnie z wodorotlenku wapnia jest w odległości 60 mm od warstwy Q. Z kolumny wymyto go 1% roztworem acetonu w eterze naftowym. Rechromatografowany na kolumnach z węglanu wapnia i wodorotlenku wapnia nie rozdzielał się, a więc był najwidoczniej chemicznie jednorodną frakcją. Maksima absorpcji badane w eterze naftowym i dwusiarczku węgla odpowiadają wartościom maksimum absorpcji dla luteiny. Porównanie krzywej absorpcji luteiny w eterze naftowym otrzymanej z owoców berberysu (*Berberis vulgaris*) z luteiną otrzymaną przez T. W. Goodwina (4) daje ryc. 1.



Ryc. 1. Widma absorpcyjne luteiny w eterze naftowym: a — wg T. W. Goodwina, b — z *Berberis vulgaris*

The absorption spectrum of Lutein in light petroleum, a — according to the account of T. W. Goodwin (4), b — of *Berberis vulgaris*

Otrzymano ją w stanie krystalicznym z roztworu metanolowo-eterowego w postaci charakterystycznych pryzm identycznych z kryształami czystej luteiny, otrzymanej z tego samego rozpuszczalnika (ryc. 2).



Ryc. 2. Kryształy luteiny z roztworu metanolowo-eterowego
Crystals of Lutein. Solvent, ether + methanol

Barwik trzeci rozpuszczony w eterze naftowym i wytrząsany z 90% (v/v) wodnym alkoholem metylowym, przed zmydleniem zachowywał się epifazowo, natomiast po zmydleniu — hipofazowo. Świadczy to o tym, że występuje on w owocach berberysu w postaci estru.

Warstwa M. Na kolumnie z wodorotlenku wapnia po rozwinięciu eterem naftowym barwik czwarty adsorbuje się tuż nad warstwą trzecią. Podczas eluowania barwika z trzeciej warstwy 1% roztworem acetonu w eterze naftowym, odległość między tymi dwiema warstwami zwiększa się, gdyż barwik trzeci jest szybciej eluowany z kolumny od barwika czwartego. Ten ostatni wymyto 2% roztworem acetonu w eterze naftowym, a następnie eluat po wymyciu acetonu wodą, csuszeniu i zagęszczeniu w próżni, rechromatografowano. Powstały dwie warstwy, dolna żółtopomarańczowa, szeroka 0,5 mm i górna, żółta — 2 mm, przedzielone 5 mm bezbarwnym paskiem. Odległość między tymi barwnymi warstwami w miarę wymywania zwiększyła się do 10 mm. Warstwa czwarta zawiera więc ślad warstwy trzeciej. Ponownie rechromatografowana przeszła przez kolumnę jako jednolita żółta warstwa.

Maksima absorpcji frakcji czwartej (w eterze naftowym i dwusiarczku węgla) są bardzo zbliżone do maksimów absorpcji luteiny. Podczas działania na niezmydlony eterowy roztwór czwartego barwika, 90% (v/v) wodnym alkoholem metylowym, barwik zachowywał się epifazowo, po zmydleniu — hipofazowo. Świadczy to o tym, że w owocach berberysu barwik 4 występuje w formie estru.

Polożenie warstw M i O w chromatogramie na kolumnie z MgO + Hyflo supercel było identyczne z omówionym powyżej. Nie zaobserwowano żadnego rozdziału, gdy barwiki 3 i 4 zmydlono i po zmydleniu wprowadzono na dwie kolumny: jedną z wodorotlenku wapnia, a drugą z MgO + Hyflo supercel. Barwik tej warstwy zebrany w eluacie zidentyfikowano przez pomiar maksimów absorpcji, które w dwusiarczku węgla dla niego wynosiły: 445, 475, 507, a więc były zgodne z maksimami absorpcji otrzymanymi dla warstwy O. Wszystkie wyżej wymienione własności świadczą, że barwik warstwy M jest monoestrem luteiny.

Warstwa K. Jest to 2 mm szerokości, ceglasto czerwona warstwa, oddzielona 10 milimetrowym pasem bezbarwnym. Barwik jej wymyto z kolumny 3% roztworem acetonu w eterze naftowym. Rechromatografowany na ZnCO₃ okazał się barwikiem chemicznie jednorodnym. Maksima absorpcji w eterze naftowym i dwusiarczku węgla znalezione dla barwika 5 są zgodne z maksimami absorpcji zeaksantyny. Barwik 5 rozpuszczony w eterze naftowym i wytrząsany z 90% (v/v) wodnym alkoholem metylowym, zachowywał się epifazowo, natomiast po zmydleniu hipofazowo, a więc pigment ten w owocach berberysu występuje w postaci estru.

Na podstawie maksimów absorpcji, siły adsorpcji, jak i zachowania się pigmentu przy rozdziale fazowym, należy przyjąć, że barwik 5 jest dwuestrem zeaksantyny — fyzalienem.

Warstwa I. Stanowiła ona wąski żółty pasek szerokości 1 mm. Barwik tej warstwy wymyto 6% roztworem acetonu w eterze naftowym. Rechromatografowanie na węglanie wapnia wykazało, że warstwa I jest zanieczyszczona barwikiem warstwy G, od której oddzielał ją tylko bezbarwny pasek szerokości 1 mm. Ponowne rechromatografowanie tych warstw nie dało lepszego rozdziału. Maksima absorpcji barwika 6 w eterze naftowym i dwusiarczku węgla były zgodne z maksimami absorpcji chryzantemaksantyny. Zmydlony roztwór barwika w eterze naftowym, wytrząsany z wodnym roztworem stężonego kwasu solnego, zabarwił go na kolor jasnoniebieski; roztwór barwika przy rozdziale fazowym zachowywał się epifazowo.

Na podstawie tych danych należy wysnuć wniosek, że barwik 6 jest chryzantemaksantyną zanieczyszczoną jej stereoisomerem flawoksantyną, i że występuje w formie estru.

Warstwa G. Żółtopomarańczowe pasmo o intensywnym zabarwieniu, szerokości 4 mm. Warstwa ta wymywa się z kolumny 6% roztworem acetonu w eterze naftowym, jest więc bardzo silnie adsorbowana. Podczas wymywania zaobserwowano na samym dole kolumny rozdział na dwie intensywnie żółte warstwy a i b. Eluat z obydwu tych frakcji po wymyciu acetonu, osuszeniu i zagęszczeniu w próżni był rechromatografowany na węglanie wapnia. Powstały dwie warstwy: Ga — jasnożółta, 2 mm szeroka, adsorbowana niżej, oraz znajdująca się nad nią w odległości 10 mm warstwa Gb — żółta, szeroka 1,5 mm.

Warstwę Ga wymyto z kolumny 1%, Gb — 2% roztworem acetonu w eterze naftowym. Otrzymane roztwory barwika 7a i 7b po wymyciu z nich acetonu, osuszeniu i zagęszczeniu w próżni ponownie rechromatografowano na kolumnach z węglanu wapnia. Barwik 7a był jednorodny, gdyż nie rozdzielał się już na więcej warstw.

Barwik 7b rozdzielił się na 3 wąskie żółte warstwy 0,5 mm, przy czym odległości między nimi wynosiły zaledwie 0,5 mm. W czasie wymywania i rozwijania nie uzyskano lepszego rozdziału. Barwiki te zebrano razem w eluacie. Zachowanie się ekstraktu barwików przy rozdziale fazowym przed i po zmydleniu wykazywało, że w owocach występują one w formie estrów. Z powodu ich śladowej koncentracji nie starano się ich zidentyfikować.

Barwik 7a miał maksima absorpcji i siłę adsorpcji bardzo podobną do barwika 6. Występował on również w owocach w formie estru, o czym przekonano się na podstawie jego zachowania się przy rozdziale fazowym. Zmydlony eterowy roztwór barwika 7a wytrząsany ze stężonym wodnym roztworem kwasu solnego barwił go intensywnie niebiesko. Reakcja ta jest charakterystyczna dla flawoksantyny, natomiast chrysanthemaksantyna nie daje żadnego zabarwienia z kwasem solnym. Wobec tych danych należy przyjąć, że barwik 7a jest flawoksantyną występującą w formie estru.

Warstwa E. Jest jasnym żółtym pasmem szerokości 1 mm. Barwik tej warstwy był silnie zaadsorbowany, bo dopiero 8% roztwór acetonu w eterze naftowym zdołał go wyeluować. Rechromatografowany na węglanie wapnia i eluowany 3% roztworem acetonu w eterze naftowym przeszedł przez kolumnę jako jednolity jasnożółty pasek. Maksima absorpcji barwika warstwy E badane w eterze naftowym i dwusiarczku węgla są zgodne z maksimami absorpcji auroksantyny. Barwik E dawał trwałie niebieskie zabarwienie z 15% kwasem solnym, co jest charakterystyczne dla auroksantyny.

Zachowanie się jego przy rozdziale fazowym przed i po zmydleniu świadczyło o tym, że występuje on w formie estru. Powyższe dane pozwalają przyjąć, że barwik 8 jest auroksantyną.

Warstwa C. Wąski pasek barwy różowo-fioletowej (szerokość 0,5 mm). Barwik ten bardzo silnie adsorbowany (prawie na samym wierzchu kolumny z wodorotlenku wapnia) wymywa się dopiero 5% roztworem metanolu w eterze naftowym. Jego maksima absorpcji w dwusiarczku węgla (501, 539) są podobne do maksimów absorpcji kapsantyny. Zachowanie się jego eterowego roztworu przy rozdziale fazowym było identyczne jak u omówionych powyżej barwików. Występuje on w owocach w formie zestryfikowanej.

Na podstawie siły adsorpcji, maksimów absorpcji i różowofioletowej barwy można przyjąć, że jest to ester kapsantyny.

Warstwa A. Jest to jasnożółte, absorbowane na samym szczycie kolumny pasemko o szerokości 1 mm. Wymywa się z kolumny 10%

Tab. 5 Koncentracja poszczególnych karotenoidów w owocach berberysu (*Berberis vulgaris*). Sucha masa miąższu — 22,7%, sucha masa całych owoców — 34%.

Miąższ stanowi 65% owocu.

Carotenoids concentration in the berries of *Berberis vulgaris*. Dry weight of pulp — 22,7%. Dry weight of total berries — 34%. Pulp — 65%.

Bar-wik Pig-ment	Nazwa Name	µg/g świeżej masy miąższu µg/g wet. wt. pulp.	µg/g suchej masy miąższu µg/g dry wt. pulp	µg/g świeżej masy owoców µg/g wet. wt. berries	µg/g suchej masy owoców µg/g dry wt. berries
I	Karotenoidy Carotenoids	16,2	69,7	10,5	30,9
II	Karoteny Carotenes	1,1	4,8	0,7	2,1
III	Ksantofile Xanthophylls	15,1	66,5	9,8	29,0
1	Alfa karoten Alfa Carotene	0,1	0,4	0,08	0,3
2	Beta karoten Beta Carotene	1,0	4,4	0,6	1,8
3+4	Luteina Lutein	6,3	27,8	4,1	12,0
5	Zeaksantyna Zeaxanthin	1,3	5,8	0,9	2,7
6	Chryzantemaksantyna Chrysanthemaxanthin	1,2	5,3	0,8	2,4
7a	Flavoksantyna Flavoxanthin	2,0	8,8	1,3	3,8
7b	niezidentyfikowany unidentified	1,5	6,6	1,0	2,9
8	Auroksantyna Auroxanthin	1,0	4,4	0,6	1,8
9	Kapsantyna Capsanthin	0,4	1,8	0,2	0,6
10	niezidentyfikowany unidentified	0,9	4,0	0,6	1,8

alkoholem metylowym w eterze naftowym. Jest to prawdopodobnie jakiś epoksyd, gdyż daje on barwną reakcję ze stężonym kwasem solnym. Na podstawie maksimów absorpcji w eterze naftowym nie można go dokładnie rozpoznać, ma on bowiem jedno maksimum przy 420 m μ . Ze względu na małą koncentrację barwika warstwy A, nie badano go dokładnie.

Tab. 6. Zawartość karotenów i ksantofili jako % ogólnej sumy karotenoidów.
Carotenes and Xanthophylls as % of total Carotenoids.

Barwik Pigment	procentowa zawartość %
Karoteny Carotenes	6,5
Ksantofile Xanthophylls	93,5

Tab. 7. Koncentracja poszczególnych pigmentów jako % ogólnej sumy karotenoidów lub ksantofili.

Concentration of individual pigments as % of total Carotenoides or Xanthophylls.

Barwik Pigment	Nazwa Name	Koncentracja pigmentów Concentration of pigments	
		jako % sumy karotenoidów as % of total Carotenoids	jako % sumy ksantofii as % of total Xanthophylls
1	Alfa karoten Alpha Carotene	0,3	—
2	Beta karoten Beta Carotene	5,7	—
3+4	Luteina Lutein	39,0	41,8
5	Zeaksantyna Zeaxanthin	8,6	9,2
6	Chryzantemaksantyna Chrysanthemaxanthin	7,6	8,2
7a	Flawoksantyna Flavoxanthin	11,7	13,2
7b	niezidentyfikowany unidentified	9,5	10,2
8	Auroksantyna Auroxanthin	5,7	6,1
9	Kapsantyna Capsanthin	1,9	2,0
10	niezidentyfikowany unidentified	5,7	6,1

Koncentrację poszczególnych karotenoidów obecnych w owocach berberysu (*Berberis vulgaris*) przedstawia tabela 5. Zawartość pigmentów podawana jest w $\mu\text{g/g}$ świeżej i suchej masy mięszu oraz świeżej i suchej masy całych owoców. Zawartość karotenów i ksantofili obliczona jako procent ogólnej sumy karotenoidów przedstawia tabela 6. Koncentrację poszczególnych pigmentów jako procent ogólnej sumy karotenoidów lub ksantofili przedstawia tabela 7. Barwiki 1, 2, 3, 5 i 8 były oznaczane ilościowo bez rechromatografowania, gdyż wielokrotne badania wykazały, że na wąskich kolumnach rozdzielały się one od razu w formie jednorodnej, natomiast barwiki 4, 6, 7, 9, i 10 były oznaczane ilościowo po rechromatografowaniu.

DYSKUSJA

Pierwszy ogólny wniosek, jaki należy wyciągnąć z wyników naszej pracy, jest ten, że owoce berberysu zwyczajnego, mimo intensywnie czerwonej barwy, mają niewielką koncentrację karotenoidów: 1,6 mg^0/o w mięszu a 1,0 mg^0/o w całych owocach. Spośród owoców 24 gatunki roślin przynależnych do 7 rodzin (*Araceae*, *Solanaceae*, *Berberidaceae*, *Rosaceae*, *Elaeagnaceae*, *Caprifoliaceae*, *Taxaceae*), które zbadał T. W. Goodwin (5), 10 wykazało znacznie wyższą koncentrację karotenoidów, wynoszącą 2,5—60 mg^0/o świeży masy, przy czym zabarwienie ich było intensywnie szkarłatne, purpurowe lub pomarańczowe, 7 miało podobną zawartość wynoszącą 0,9—1,8 mg^0/o , a 6 niższą, wynoszącą 0,02—0,5 mg^0/o .

Zwraca uwagę fakt, że w ostatniej grupie znajdują się dwa gatunki berberysu: *Berberis barbarossa* i *Berberis* sp. (Pirate King) zawierające tylko śladowe ilości karotenoidów od 0,02—0,025 mg^0/o . Mamy więc w rodzaju *Berberis* dużą rozpiętość koncentracji międzygatunkowej, podobnie jak to stwierdzono w rodzaju *Pyracantha*. (P. Karrer i Rutschman 7). Wobec tego pogląd wynikający z dotychczasowych badań, że rozmieszczenie karotenoidów w owocach nie ma znaczenia taksonomicznego, zyskuje nowe potwierdzenie. Mimo niskiej zawartości karotenoidów w owocach berberysu (*Berberis vulgaris*) skład ogólnej sumy był dość urozmaicony, zwłaszcza jeżeli chodzi o ksantofile. Wykryto ich bowiem i zidentyfikowano sześć, nie zidentyfikowano czterech. Natomiast znaleziono tylko dwa węglowodory, głównie β -karoten a α -izomer w śladach.

Koncentracja β -karotenu była niska, bo wynosiła 6% ogólnej sumy karotenoidów, tj. 0,06 mg^0/o świeżej masy, a więc podobnie jak w wielu innych owocach np. w czerwonym mięszu owocu *Celastrus scandens*. (Le Rosen i Zechmeister — 10), w słabo zabarwionych owocach jabłek (0,05—0,08 mg^0/o), w gruszkach (0,01—0,03 mg^0/o), w figach, cytrynach, dyniach itp. (T. W. Goodwin 3). Inne gatunki z rodzaju

Berberis badane przez Goodwina (5) zawierały tylko jego ślady. α -Karoten stanowił około 10% ogólnej sumy karotenów, a więc występował w bardzo niskiej koncentracji. Zupełnie podobne dane notuje literatura dla gruszek *Avocado* (T. W. Goodwin — 3), u których znaleziono ogółem 0,06 mg% karotenów, w czym 10% α -izomeru. Odnośnie występowania α -karotenu mało znajdujemy wzmianek w literaturze, wyrażony natomiast jest pogląd — stosunkowo słabo uzasadniony — że występuje on tutaj w większych ilościach tak bezwzględnych, jak i względem β -karotenu, niż liściach. Głównym ksantofilem była luteina. Występuje ona prawdopodobnie w postaci jedno- i dwuestru. Suma obydwu estrów wynosiła 4,1 μ g/g świeżej masy całych owoców, tj. 0,4 mg%, co stanowi 39% ogólnej sumy karotenoidów, a 41,4% ogólnej sumy ksantofili. Podobne wysokie względne koncentracje znalazł Goodwin (5) w owocach *Berberis* sp. — 44,6% ogólnej sumy ksantofili i w *Pyracantha flava* — 48%, natomiast znacznie większe w dzikim bzie (*Sambucus nigra*) — 76,8% i u psianki słodkogórz (*Solanum dulcamara*) — 70,4%.

Z dawnych prac wiemy, że luteina jest głównym ksantofilem liści i że dość często występuje również w owocach np. w ananasach, owocach citrusowych oraz w owocach niektórych gatunków róż, śliw itd.

Z ostatniej pracy T. W. Goodwina (5) wynika, że luteina w mniejszej koncentracji względnej występuje jeszcze w owocach głogu dwuszyjkowego (*Crataegus oxyacantha*), *Rosa moyesii*, rokitnika pospolitego (*Hippophae rhamnoides*), wiciokrzewu japońskiego (*Lonicera japonica*), jarzębiny (*Sorbus aucuparia*) i cisu (*Taxus baccata*).

Z prac Kuhna, Lederera, Wintersteina (9) wiemy, że luteina występuje w świecie roślinnym jako dwupalmitynian luteinyhelenien.

A. L. Curl i C. F. Bailey (1, 2) stwierdzili, że luteina w soku pomarańczy istnieje jako jedno- i dwueter; natury kwasów autorzy nie badali. Nasze badania również wyraźnie wykazują formę mono i dwueterową występowania luteiny u berberysu zwyczajnego, przyczym układ na chromatogramie z MgO był taki sam jak i u wyżej wymienionych autorów.

Drugim z kolei głównym przedstawicielem grupy ksantofili, związanym strukturalnie z luteiną, była flawoksyantyna z towarzyszącą jej chryzantemaksantyną. Występowała ona w warstwie 7, która okazała się niejednorodną. Frakcja sąsiednia 6 zawierała chryzantemaksantynę zmieszaną z flawoksyantyną. Własności obu tych warstw były bardzo do siebie zbliżone, co wskazuje na ich strukturalną identyczność i potwierdza ich stereozomerię furanoidowych epoksydów luteiny. Według danych z literatury w świecie roślinnym występują obydwa barwiki razem,

przede wszystkim w kwiatach. W owocach notowano ich występowanie bardzo rzadko i tak A. L. Le Rosen i Zechmeister (10) wykryli je dawniej u irgi (*Cotoneaster occidentalis*), i u *Pyracantha coccinea*, a ostatnio T. W. Goodwin (5) podaje, że znalazł te barwiki w większej ilości w owocach *Cotoneaster frigida* i *Cotoneaster hebeophylla* (32—41% sumy ksantofili), a w mniejszej koncentracji u *Capsicum annum*, *Pyracantha flava*, *Sambucus nigra* i *Rosa rubrifolia*, (4,5—14,6%). Ich mieszaniny autor nie rozdzielił. Nam również nie udało się ich dokładnie i czysto rozdzielić przez rechromatografowanie. Barwik warstwy 7a dawał ze stężonym kwasem solnym intensywnie niebieskie zabarwienie, zaś barwik warstwy 6 dawał zabarwienie znacznie słabsze (przy tej samej koncentracji). Oba barwiki stanowiły razem 19,3% ogólnej sumy karotenoidów a 21,4% ogólnej sumy ksantofili.

Oprócz luteiny znaleźliśmy drugą pochodną karotenów — zeaksantynę. W warstwie 5-ej występowała ona w postaci dwuestru i stanowiła 8,6% ogólnej sumy karotenoidów i 9,2% ogólnej sumy ksantofili. Dawniejsza literatura notuje jej występowanie w purpurowych dojrzałych owocach *Physalis Alkekengi* (P. Karrer, E. Jucker i K. Steinlin — 8), nadto w owocach kaki (*Diospyros kaki*) (P. Karrer, E. Krauss i A. Zubrys — 6), a jako główny karotenoid w owocach palmy (*Cycas revoluta*) (C. Manunta, — 11). T. W. Goodwin (5) znalazł ją w większości badanych ostatnio roślin jagodowych, przy czym dla rokitnika i dla wiciokrzewu pomorskiego była ona głównym karotenoidem (40,5—57,1% ogólnej sumy), a u innych jej udział w ogólnej sumie wynosił od 4,2—23,7%. A. L. Curl i G. F. Bailey (1, 2) znaleźli ją niedawno w soku pomarańczy *Valencia* w ilości do 15% ogólnej sumy.

Dwuepoksyd zeaksantyny czyli auroksantynę znaleźliśmy w formie estru (5,7% ogółu karotenoidów a 6,1% ogółu ksantofili). Jest to charakterystyczny pigment kwiatów. Natomiast w owocach występuje rzadko. T. W. Goodwin (5) znalazł ją w małej koncentracji tylko w trzech przypadkach: *Crataegus oxyacantha* — 14,9% — *Lonicera japonica* — 6%, *Lonicera periclymenum* — 13%, a A. L. Curl i G. F. Bailey (2) w soku pomarańczy znaleźli tylko 2,1% całości.

Z nowych rzadko występujących typów karotenoidów stwierdziliśmy w przedostatniej warstwie na kolumnie obecność kapsantyny w ilości 1,9% ogólnej sumy karotenoidów, a 2,0% ogólnej sumy ksantofili. Ten typowy dla papryki karotenoid został wykryty przez L. Zechmeistera i L. Cholnoky (14) w *Capsicum annum* i *Capsicum frutescens*. Również T. W. Goodwin (5) wykrył ją obok luteiny jako drugi główny składnik karotenoidów dwóch badanych gatunków berberysu w śladowych ilościach.

Wszystkie zidentyfikowane przez nas ksantofile występują w formie estrów. Jak wiadomo ta forma występowania jest cechą charakterystyczną ksantofili owoców. Natury kwasów estrowych nie badaliśmy. Jak wynika z dostępnej nam literatury przeważnie jest ona nieznaną.

A. L. Curl i G. F. Bailey (1, 2), którzy dokładnie badali formę występowania ksantofili w soku pomarańcz metodą ekstrakcji przeciwną stwierdzili również, że luteina i zeaksantyna występują głównie jako estry a tak samo (5, 6) epoksydy a np. antheraksantyna wyłącznie jako ester, natomiast ich izomery furainodowe zarówno w formie wolnej jak i związanej.

OGÓLNE WNIOSKI

Głównym karotenem owoców berberysu zwyczajnego jest β -karoten, zaś głównym ksantofilem luteina, której towarzyszą w pokaźnej ilości jej furanoidowe epoksydy — flawoksantyna i chryzantemaksantyna. Drugim karotenem jest zeaksantyna, która wraz ze swoim dwuepoksydem furanoidowym tzw. auroksantyną występuje już w znacznie mniejszej koncentracji. Stwierdzono, że najmniejszy procentowy udział w ogólnej sumie ksantofili miał ketokarotenoid — kapsantyna (2%).

Pomiary widm absorpcyjnych karotenoidów były wykonywane w P.Z.H. w Warszawie w Zakładzie Prof. A. Szczygła i w Zakładzie Chemii Fizycznej UMCS Prof. Dr A. Waksmundzkiego w Lublinie. W pierwszym przypadku wykonywała je Mgr B. Dietl, asystent zakładu, za co Jej serdecznie dziękujemy. Również dziękujemy Adiunktowi Dr E. Soczewińskiemu za okazaną nam pomoc.

PIŚMIENICTWO

1. Curl A. L., Bailey G. F.: Orange Carotenoids. Agr. Food. Chełm. 2, 1954.
2. Curl A. L., Bailey G. F.: The State of Combination of the Carotenoids of Valencia Orange Juice. Food Research. 1, 1955.
3. Goodwin T. W.: The Comparative Biochemistry of the Carotenoids. Chapman Hall, Ltd. London 1952.
4. Goodwin T. W.: Pigments in Color Phases of the Larvae of *Plusia gamma*. Biochemical Journal 55, 1953.
5. Goodwin T. W.: A survey of the polyenes in number of ripe berries. Biochemical Journal. 62, 1956.
6. Karrer P., Krauss E., Zubryś A.: Pflanzenfarbstoffe XXXIX, Vermischte Beobachtungen über Carotinoide. Helv. Chim. Acta. 15, 1932.
7. Karrer P., Rutschmann J.: Carotinoide aus der Früchten von *Cotoneaster occidentalis* und *Pyraacantha coccinea*. Helv. Chim. Acta. 28, 1945.
8. Karrer P., Jucker E., Steinlin K.: Ein neuer Blattfarbstoff: *Xanthophyllepoxid* Helv. Chim. Acta. 31, 1948.
9. Kuhn R., Winterstein A., Lederer E.: Zur Kenntnis der Xanthophylle. Ztschr. physiol. Chem. 197, 1931.
10. Le Rosen A. L., Zechmeister L.: Carotenoid pigments of the fruits of *Celastrus scandens*. Arch. Biochem. 1, 1942.

11. Manunta C.: Sulla sostanza colorante dei frutti di una palma, (*Cycas revoluta*), Helv. Chim. Acta. 22, 1939.
12. Peach K., Tracey M. V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse III. Springer Verlag. Berlin 1955.
13. Wierzchowski Z., Leonowicz A., Sapięcha K., Sykut A.: Studia nad występowaniem alfa i beta karotenu w świecie roślinnym. Cz. I. Drzewa. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. C, vol. XII, 10, Lublin 1958.
14. Zechmeister L., Cholnoky L.: Untersuchungen über den Paprika-Farbstoff VIII. Zur Konstitution des Capsanthins und Capsorubins. Liebigs Ann. 516, 1935.

Р Е З Ю М Е

Автор занялся точным исследованием наличия каротеноидов в зрелых ягодах барбариса обыкновенного (*Berberis vulgaris*).

В преобладающем количестве имеются в них ксантофилы, составляющие 95% от всего количества каротеноидов. Их концентрация составляет 15,1 мкг/г свежей массы мякоти т.е. 9,8 мкг/г свежей массы ягоды в целом, в то время как концентрация каротинов (преимущественно бета-альфа в следах) была гораздо ниже и составляла соответственно 1,1 мкг/г и 0,7 мкг/г.

Главным ксантофиллом плодов является лютеин, появляющийся совместно с фураноидными эпоксидами — флавоксантином и хризантемаксантином; другим же представителем этой группы является зеаксантин вместе со своим фураноидным диэпоксидом — ауроксантином.

В общей сумме ксантофиллов наименьшее процентное участие оказалось за кетокаротеноидом — капсантином (2%).

Установлено, что все ксантофиллы выступают в виде эфирных соединений.

Из общего числа 10 пигментов, разделенных хроматографически, не удалось идентифицировать два пигмента из-за их очень низкой концентрации.

Пигменты барбариса обыкновенного разделялись главным образом на колонке из $\text{Ca}(\text{OH})_2$ кроме того были использованы в качестве адсорбентов $\text{MgO} + \text{Hyflo supercel}$, Al_2O_3 , а для рехроматографирования были употреблены CaCO_3 и ZnCO_3 .

Пигменты идентифицировались измерением их абсорбционных спектров, при помощи цветных реакций с соляной кислотой, а также на основании расположения на хроматограмме.

Сверх того автор рассматривал поведение пигментов перед омылением и после омыления, при фазовом разделении.

Главный каротеноид — лютеин — был получен в виде типичных, хорошо сформированных кристаллов.

- Рис. 1. Абсорбционные спектры лютеина в петролейном эфире; а — данные из литературы, б — спектры (*Berberis vulgaris*).
- Рис. 2. Кристаллы лютеина из метанол эфирного раствора.
- Таб. 1. Хроматограмма ягод барбариса на колонке из $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 30 см/3,5 см. Вес ягод 500 г. количество экстракта 10 мл. Проявление петролейным эфиром. Зоны обозначены номерами соответственно к уменьшающейся силе адсорбции.
- Таб. 2. Хроматограмма плодов барбариса на колонке из $\text{MgO} + \text{Hyflo supencel}$ (1:1) 12 см/1,2 см. Вес ягод 30 г. количество экстракта 1,5 мл. Проявление 15% ацетоном в петролейном эфире. Зоны обозначены номерами согласно с уменьшающейся силой адсорбции.
- Таб. 3. Хроматограмма плодов барбариса на колонке из $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 15 см/2 см. Вес ягод 50 г, количество экстракта 2 мл. Проявление петролейным эфиром. Зоны обозначены номерами согласно с уменьшающейся силой адсорбции.
- Таб. 4. Разделение каротиноидов, содержащихся в ягодах барбариса (*Berberis vulgaris*) на колонке из $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 12 см/1,2 см. Вес мякоти 10 г, количество экстракта 1 мл. Проявление петролейным эфиром. Зоны обозначены номерами соответственно к уменьшающейся силе адсорбции.
- Таб. 5. Концентрация отдельных каротиноидов в ягодах барбариса (*Berberis vulgaris*). Сухая масса мякоти = 22,7%, сухая масса целых плодов = 34%. Мякоть составляет 65% массы ягоды.
- Таб. 6. Количество каротинов и ксантофиллов в процентах от общего количества каротиноидов.
- Таб. 7. Концентрация отдельных пигментов в процентах от общей суммы каротиноидов и ксантофиллов.

SUMMARY

A detailed survey of carotenoids which occur in ripe berries of *Berberis vulgaris* was carried out.

The majority of carotenoids consist of xanthophylls, 95 per cent of the total amount of the carotenoids. Their content is 15.1 $\mu\text{g/g}$ of the pulp of *Berberis vulgaris* i. e. 9.8 $\mu\text{g/g}$ of the wet weight of the whole fruits. However, the content of carotenes, chiefly that of beta isomer (alfa isomer in traces) was much lower, 1.1 $\mu\text{g/g}$ and 0.7 $\mu\text{g/g}$ respectively. Detailed quantitative distribution of carotenoids is recorded in Tables 5, 6, 7.

The major xanthophyll in the fruits of *Berberis vulgaris* is lutein, with an addition of furanoid epoxide flavoxanthin and chrysanthemaxanthin. The second constituent in this group is zeaxanthin with its di-epoxide furanoid, i. e. auroxanthin.

The smallest constituent of the total xanthophylls content was keto-carotenoid, i. e. capsanthin (2 per cent). It was established that all xanthophylls occur in the form of esters. Among 10 pigments which

were chromatographically separated the authors failed to identify 2 pigments because they occurred in very low concentrations.

Pigments of *Berberis vulgaris* were chiefly separated on chromatographic column of Ca(OH)_2 , using $\text{Mg} + \text{Hyflo supercel}$, Al_2O_3 as adsorbents, and CaCO_3 as well as ZnCO_3 for rechromatographic separation.

They were identified by the measurement of their absorption spectra as well as by their colour reactions of HCl and their position in a chromatogram.

An examination of the pigments before saponification and after it was also carried out by phase separation.

The major carotenoid, lutein, was obtained in the form of characteristic well developed crystals.

