

PŘÍRODNÍ ZASTOUPENÍ KAROTENOIDŮ V BRAZILSKÉM OVOCI

Miroslava Zelená¹, Daniele Giuffrida², Francesco Cacciola², Rosana Goncalves³,
Lenka Česlová¹, Paola Dugo⁴ a Luigi Mondello⁴

¹*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,
Studentská 573, 532 10 Pardubice, Česká republika*

²*Dipartimento di Scienze biomediche, odontoiatriche e delle immagini morfologiche e
funzionali, University of Messina, P.zza Pugliatti, 1 98122 Messina, Italy*

³*Centro de Saude, Universidade Federal de Ouro Preto, R. Diogo de Vasconcelos, 122 -
Pilar, 35400-000, Ouro Preto - MG, Brazil,*

⁴*Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, University of
Messina, P.zza Pugliatti, 1 98122 Messina, Italy*

Abstract

This work is focused on the extraction of carotenoids with hexane and ethyl acetate in two types of Brazilian fruit: pequi and ora-pro-nobis. The optimization of carotenoid separation by high performance liquid chromatography coupling with mass spectrometry (HPLC/MS) was performed in the next phase. Since the natural carotenoids composition in this fruit has not yet been studied, the aim of this work was to identify individual carotenoids.

Souhrn

Tato práce je zaměřena na extrakci karotenoidů hexanem a ethylacetátem ve dvou druzích brazilského ovoce: pequi a ora-pro-nobis. V další fázi byla provedena optimalizace separace karotenoidů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS). Jelikož přirozené složení karotenoidů v tomto ovoci nebylo dosud zkoumáno, byla cílem této práce snaha o identifikaci jednotlivých karotenoidů.

1. Úvod

Karotenoidy patří mezi fytochemikálie, o nichž se předpokládá, že jsou odpovědné za snížené riziko vzniku některých degenerativních onemocnění. Barva a biologická aktivita karotenoidů závisí na jejich struktuře. Konjugovaný polyenový chromofor [1] určuje nejen absorpční vlastnosti světla a tudíž i barvu, ale také chemickou reaktivitu karotenoidů vůči oxidačním činidlům s volným radikálem. Karotenoidy jako lykopen a β -karoten jsou známy svou antioxidační aktivitou; β -karoten a α -karoten (ale ne lykopen) jsou provitaminem A [2].

Vysoko nenasycené karotenoidy jsou také náchylné k izomeraci a oxidaci. Mnoho tropických a subtropických plodů má velký zdravotní potenciál kvůli možné přítomnosti bioaktivních fotochemikálií [3]. Cílem této studie byla snaha o identifikaci jednotlivých karotenoidů po extrakci pomocí HPLC/MS ve dvou druzích brazilského ovoce - pequi (*Caryocar brasiliense*) a ora- pro nobis (surinamský angrešt, *Pereskia aculeata*).

2. Experimentální část

2.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

K extrakci byly použity chemikálie: hexan a ethylacetát. Pro opětovné rozpuštění a následnou analýzu byly použity methanol a methyl-*terc*-butylether (MTBE). Všechny tyto chemikálie byly zakoupeny od Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Demineralizovaná voda byla připravena pomocí čistícího systému Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francie) s využitím filtru Millipak Express 40.

Optimalizace separace byla prováděna na modulárním kapalinovém chromatografu Shimadzu (Kyoto, Japonsko) ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 4500 (AB SCIEX, USA). K separaci byly použity dva typy kolon: plně porézní kolona C30, YMC (250 x 4,6 mm, 5 µm) a povrchově porézní kolona C30, Thermo Scientific (150 x 4,6 mm, 2,6 µm).

2.2 Extrakce

Z důvodu vysoké termolability karotenoidů bylo nutné pracovat se vzorky po celou dobu v tmavém skle a téměř bez přístupu světla. Odměřené množství lyofilizovaného vzorku ovoce bylo extrahováno v několika krocích. Nejprve byl vzorek homogenizován po dobu 10 min v ultrazvukové lázni a poté extrahován 10 min pomocí magnetického míchadla hexanem. Tyto dva kroky byly opakovány, dokud vzorek poskytoval barevné zbarvení rozpouštědla. Poté následoval stejný proces s použitím rozpouštědla ethylacetátu opět dokud vzorek zbarvoval roztok. V průběhu extrakce bylo extrakční rozpouštědlo odebíráno do odpařovací baňky a po ukončení extrakce bylo odpařeno pomocí vakuové odpary. Odparek byl poté rozpuštěn ve 2 ml roztoku MeOH/MTBE (1:1) a přefiltrován pomocí PTFE filtru.

2.3 Optimalizace separace

V dalším kroku bylo nutné provést optimalizaci separace karotenoidů. S ohledem na nepolárnost struktury karotenoidů byla zvolena kolona C30, konkrétně dva typy této kolony, a to jak kolona s plně porézními částicemi, tak kolona s částicemi povrchově porézními.

Protože karotenoidy nepatří mezi jednoduše analyzovatelné látky, byl pro mobilní fázi optimalizován systém tří rozpouštědel (MeOH, MTBE a voda) a jejich vzájemné poměry. Optimalizovány byly i následující parametry, jako průtok mobilní fáze a samotný gradient.

3. Výsledky a diskuze

V rámci optimalizace separace byla nejprve použita kolona s plně porézními částicemi. Pro tuto kolonu byly zvoleny následující podmínky:

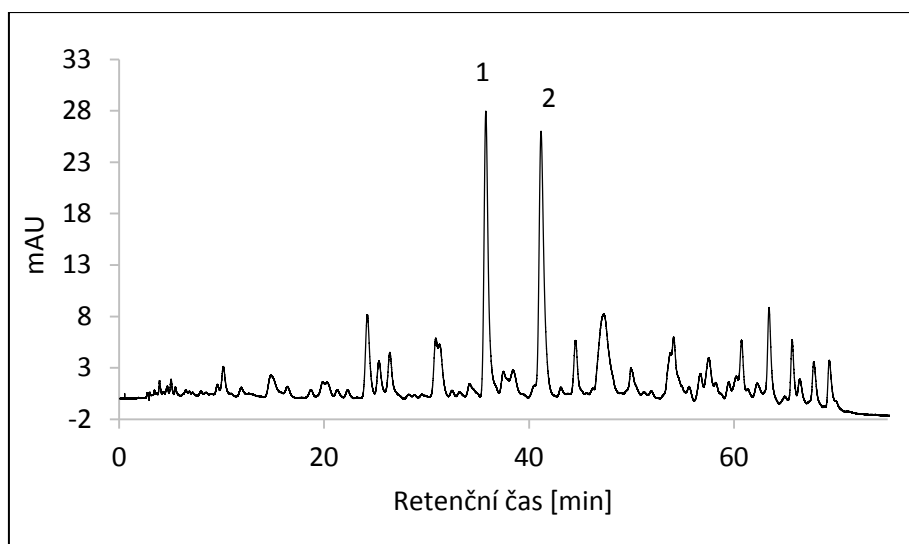
- Mobilní fáze A: 90 % MeOH, 8 % MTBE, 2 % H₂O
- Mobilní fáze B: 90 % MTBE 8 % MeOH, 2 % H₂O
- Průtok: 0,5 ml/min
- Gradient: 0 min, 0 % B; 20 min, 30 % B; 35 min, 80 % B; 65 min, 100 % B; 75 min, 100 % B
- Rozsah PDA detektoru: 200-600 nm
- Rozsah MS detektoru: 100-1200 m/z
- MS: APCI (+,-)

V další části byla pro porovnání použita kolona s povrchově porézními částicemi. Vzhledem k rozdílnému chování zadržovaných látek, bylo nutné pro tuto kolonu znovu optimalizovat podmínky separace. Zde jsou shrnuty optimální podmínky:

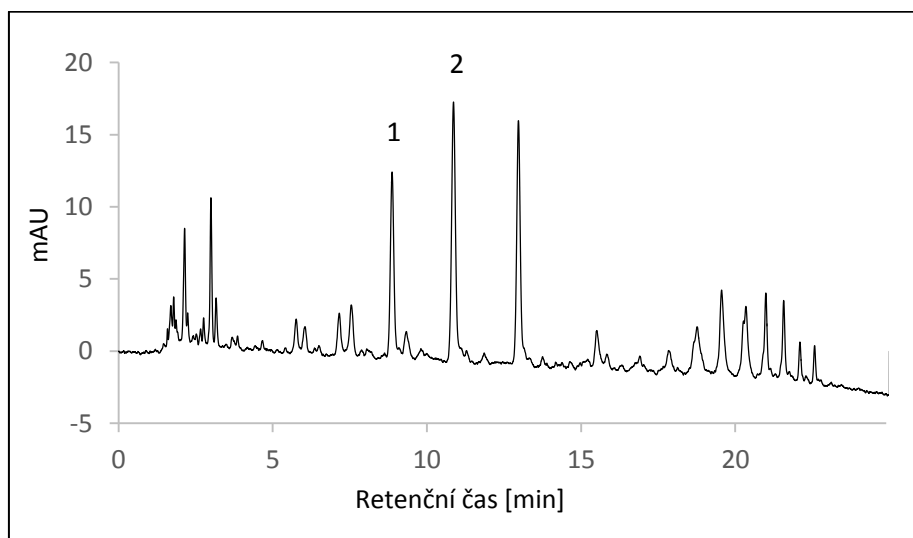
- Mobilní fáze A: 90 % MeOH, 8 % MTBE, 2 % H₂O
- Mobilní fáze B: 90 % MTBE 8 % MeOH, 2 % H₂O
- Průtok: 0,5 ml/min
- Gradient: 0 min, 0 % B; 10 min, 15 % B; 25 min, 80 % B
- Rozsah PDA detektoru: 200-600 nm
- Rozsah MS detektoru: 100-1200 m/z
- MS: APCI (+,-)

Při porovnání chromatogramů separací na obou kolonách (obr. 1, 2) je na první pohled patrné, že povrchově porézní částice umožňují podstatně rychlejší analýzu při současném zachování rozlišení a citlivosti separace. Lze tedy říci, že použití kolony s povrchově porézními částicemi umožnilo zkrácení času na třetinu se zachováním kvality dat a s výrazně nižší spotřebou rozpouštědel. Tento aspekt je přínosný nejen z ekonomického hlediska, ale zároveň s ohledem na životní prostředí.

V ovoci pequi (obr. 1, 2) byla karotenoidová kompozice tvořena především monoestery kyseliny myristové a kyseliny palmitové s β -kryptoxantinem. Esterifikace poskytuje větší stabilitu karotenoidů a zvyšuje jejich biologickou dostupnost; navíc β -cryptoxanthin je dobře známý prekurzor vitamínu A.

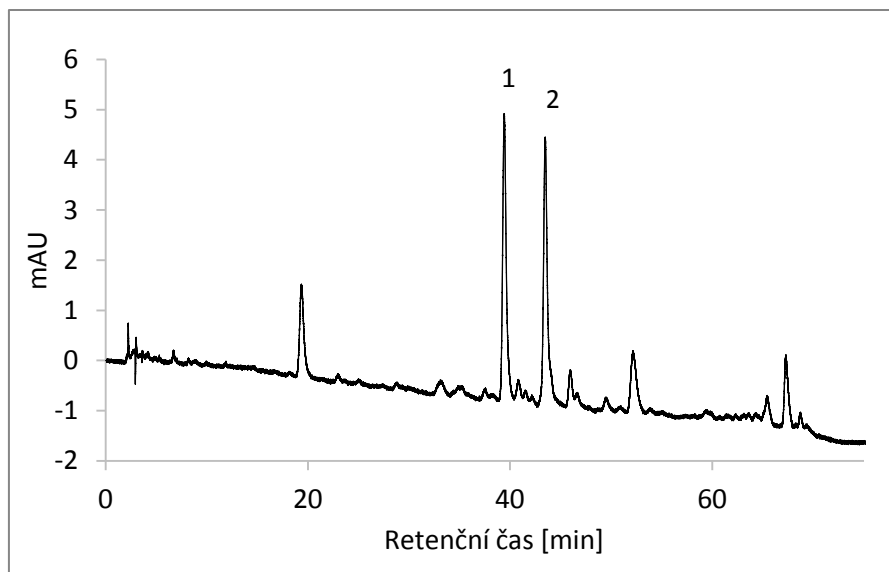


Obr. 1: Chromatogram extraktu karotenoidů pequi na koloně C30 s plně porézními částicemi. Látka č. 1: β -cryptoxanthin-C14:0, č. 2: β -cryptoxanthin-C16:0

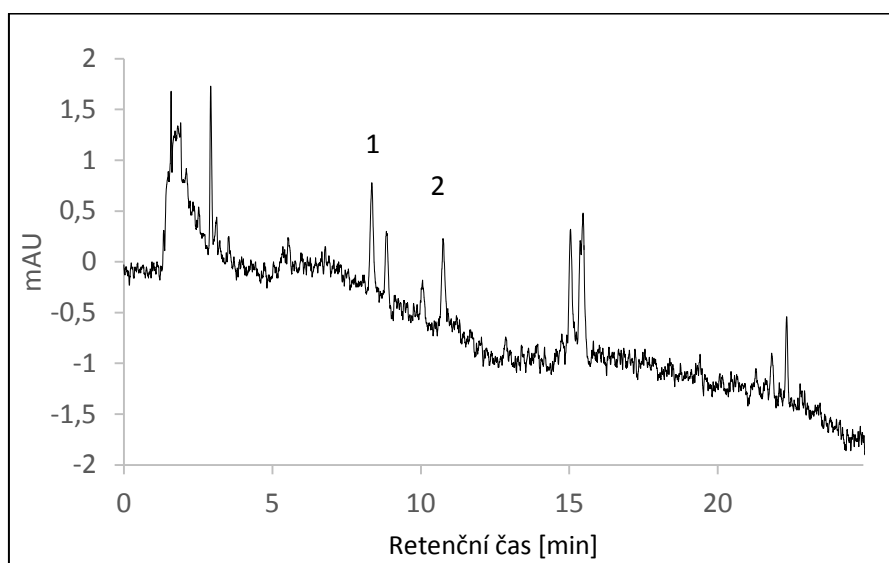


Obr. 2: Chromatogram extraktu karotenoidů pequi na koloně C30 s povrchově porézními částicemi. Látka č. 1: β -cryptoxanthin-C14:0, č. 2: β -cryptoxanthin-C16:0

V ovoci ora-pro-nobis (obr. 3, 4) byl obsah karotenoidů tvořen hlavně monoestery kyseliny laurové s luteinem a zeaxantinem. Jak lutein, tak zeaxantin jsou důležitými xantofyly s dobře zdokumentovaným pozitivním účinkem v prevenci makulární degenerace způsobené věkem.



Obr. 3: Chromatogram extraktu ora-pro-nobis na koloně C30 s plně porézními částicemi
Látka č. 1: Lutein-C12:0, č. 2: Zeaxanthin-C12:0



Obr. 4: Chromatogram extraktu ora-pro-nobis na koloně C30 s povrchově porézními částicemi
Látka č. 1: Lutein-C12:0, č. 2: Zeaxanthin-C12:0

4. Závěr

Metody popisující složení potravin jsou velmi důležitým zdrojem informací ve vztahu k přírodní potravinové rozmanitosti a výživovým vlastnostem. Brazílské ovoce pequi a ora-pro-nobis bylo analyzováno za účelem určení přírodního složení karotenoidů, jež nebylo dosud objasněno. Byla optimalizována metoda pro analýzu karotenoidů na dvou typech C30 kolon. V ovoci pequi byly identifikovány monoestery kyseliny myristové a kyseliny

palmitové s β -kryptoxantinem. V ovoci ora-pro-nobis byly identifikovány monoestery kyseliny laurové s luteinem a zeaxantinem.

Poděkování

Tato práce byla financována z grantu SGS_2017_001 Univerzity Pardubice. Autoři také děkují za spolupráci firmě Shimadzu, M. Z. navíc vděčí programu ERASMUS za umožnění studijního pobytu na zahraničním pracovišti.

Literatura

1. Delia B. Rodriguez-Amaya D.B., Kimura M.: *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. HarvestPlus, Washington, 2004, p. 2.
2. Rivera, S. Canela-Garayoa, R.: Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *J. Chromatogr. A* **1224** (2012) 1-10.
3. Vílchez C., Forján E., Cuaresma M., Bédmar F., Garbayo I., Vega J.M.: Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Mar. Drugs* **9** (2011) 319-333.