UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra učitelství a didaktiky chemie

IZOLACE PIGMENTŮ ZE SUŠENÉ ČERVENÉ PAPRIKY A JEJICH IDENTIFIKACE POMOCÍ NMR SPEKTROSKOPIE

Isolation of Pigments from Dryed Red Pepper and Their Identification by NMR Spectroscopy

Bakalářská práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2008

Monika Hejnová

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přírodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

přír. 123 b/08 stud

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Mgr. Simony Hybelbauerové (a konzultanta Mgr. Milady Roštejnské), a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....29.2008.....

.....
podpis

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Mgr. Simony Hybelbauerové a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 2. září 2008.

Seznam použitých zkratek

HPLC.....vysokoúčinná/vysokotlaká kapalinová chromatografie
(high performance/pressure liquid chromatography)

TLC.....tenkovrstevná chromatografie (thin layer chromatography)

NMR.....nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)

K_D.....distribuční konstanta

$[X]_s$ .....molární koncentrace složky X ve stacionární fázi

$[X]_m$ .....molární koncentrace složky X v mobilní fázi

Obsah

CÍL **5**

1. ÚVOD **6**

1.1. ROD *CAPSICUM* 6

1.2. ROSTLINNÁ BARVIVA 8

1.2.1. Karotenoidy 9

1.2.1.1. Karotenoidy obecně 9

1.2.1.2. Karotenoidy červené papriky 12

2. METODY **16**

2.1. CHROMATOGRAFIE 16

2.1.1. Chromatografie obecně 16

2.1.2. HPLC – vysokoúčinná/vysokotlaká kapalinová chromatografie 17

2.1.3. Planární chromatografie 18

2.2. SAPONIFIKACE 18

2.3. NMR – NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE 19

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **20**

3.1. OBECNÉ POZNÁMKY K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI 20

3.2. EXTRAKCE A HRUBÉ DĚLENÍ PIGMENTŮ ZE SUŠENÉ ČERVENÉ PAPRIKY 21

3.2.1. Extrakce 21

3.2.2. Chromatografie 21

3.2.3. NMR chromatografie 22

3.2.4. Saponifikace 24

3.2.5. HPLC 24

4. ZÁVĚR A DISKUZE **26**

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A INTERNETOVÉ ODKAZY **27**

5.1. INTERNETOVÉ ODKAZY NA PŘEVZATÉ OBRÁZKY 28

Cíl

Cílem bakalářské práce bylo pomocí chromatografických metod (kolonová chromatografie, HPLC) rozdělit jednotlivé rostlinné pigmenty červené papriky a následně je identifikovat pomocí NMR spektroskopie. Mírným zjednodušením bylo použití již sušené červené papriky.

Vzhledem k omezeným časovým možnostem je bakalářské práce založena především na literární rešerši (tedy na výtahu faktů, které byly doposud o daném tématu sepsány), na zvládnutí stěžejních praktických dovedností při izolaci jednotlivých látek a v neposlední řadě také na nahlédnutí do základů NMR spektroskopie.

1. Úvod

1.1. Rod *Capsicum*

Rod *Capsicum* patří do čeledi Lilkovitých (*Solanaceae).* Tvoří jej přibližně 22 druhů rostoucích divoce v přírodě a 5 "domestikovaných" druhů (*C. annuum, C. baccatum, C. chinense, C. frutescens, C. pubescens*).[1] (obr. 1)

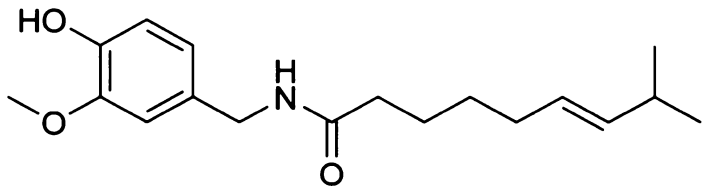
Capsicum annuum *Capsicum baccatum* *Capsicum chinense* *Capsicum frutescens* *Capsicum pubescens*

Obr. 1. "Domestikované" druhy paprik rodu Capsicum [1-5]

Paprika je jedním z hlavních zdrojů **karotenoidů**. Jsou to důležité přírodní pigmenty, kterým červená paprika vděčí za svou intenzivní barvu. Některé z nich (kapsanthin, kapsorubin) jsou dokonce syntetizovány pouze rodem *Capsicum.* Karotenoidy vykazují významnou biologickou aktivitu – mají antioxidační schopnosti, redukují riziko rakoviny a mají pozitivní vliv na imunitní systém. Některé z nich mají aktivitu provitaminu A (např. β-karoten, β-kryptoxanthin), který se v těle přeměnuje na vitamin A.[2, 3, 4]

Dále je neobyčejně bohatá na antioxidační **vitamin C**, který chrání buňky před karcinogeny. Červená paprika obsahuje téměř čtyřikrát více vitaminu C než citróny nebo pomeranče. Přispívá k prevenci rakoviny, a to zejména trávicích orgánů (žaludku a tlustého střeva). Paprika je výborným zdrojem neutrálních a kyselých fenolických sloučenin (včetně flavonoidů) vyznačující se antioxidačními schopnostmi.[4]

Další skupinou látek charakteristickou pro rod *Capsicum* jsou **kapsaicinoidy** (nejvýznamnějším je kapsaicin – obr. 2). Chemicky náleží mezi amidy. Jsou to sloučeniny zodpovědné za ostrou, pálivou chuť přítomné v mnoha odrůdách paprik. Velmi vysokým obsahem se vyznačují čili papričky a papriky habanero (*Capsicum chinense*), oproti tomu sladká paprika jich obsahuje přibližně desetkrát méně než pálivá. Papriky si kapsaicinoidy vyvinuly jako účinnou obranu proti býložravcům. Kromě toho kapsaicinoidy vykazují biologickou aktivitu (např. mají antioxidační, protinádorové a protizánětlivé účinky, stimulují kardiovaskulární a respirační systém).[1, 4, 5, 6, 7]



Obr. 2. Kapsaicin

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala studiem pigmentů **papriky roční** (*Capsicum annuum*) (obr. 3). Jedná se o jednoletou teplomilnou rostlinu známou již více než čtyři tisíce let pocházející z Jižní a Střední Ameriky. Do Evropy ji přivezli Španělé a její plody se staly velmi rychle oblíbenou součástí našeho jídelníčku. Podle velikosti, tvaru, barvy a pikantnosti plodů se dělí na jednotlivé odrůdy.[1, 6]

Hojně se používá jako přírodní potravinové barvivo. Bývá distribuována ve formě koncentrovaného extraktu (oleoresin) nebo v sušené a mleté formě jako koření.[8]

Obr. 3. Červená paprika (Capsicum annuum) [6]

1.2. Rostlinná barviva

Rostlinná barviva jsou organické látky různého složení, které mají pro rostliny životní význam. Rozdělují se na:

- barviva rozpustná v tucích – **lipochromy;**
- barviva rozpustná ve vodě – **hydrochromy.**

Lipochromy jsou obsaženy v plastidech a patří k nim zelené chlorofyly, žluté xanthofyly a červené karoteny. Chlorofyly mají význam pro fotosyntézu, xanthofyly a karoteny způsobují žluté, oranžové a červené zbarvení listů, květů a plodů. Mezi hydrochromy patří zejména anthokyany, které jsou obsaženy ve vakuolách a způsobují modré, červené, fialové až černé zbarvení zejména květů a plodů.[9]

Během dozrávání se obsah jednotlivých barviv mění. Chloroplastová barviva (chlorofyl a některé karotenoidy) při dozrávání postupně ubývají, zatímco chromoplastová barviva přibývají.[3]

1.2.1. Karotenoidy

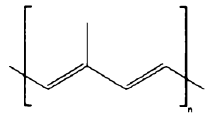
1.2.1.1. Karotenoidy obecně

Karotenoidy jsou rozsáhlá skupina přirozeně se vyskytujících organických barviv, které jsou přítomny v rostlinách, řasách a různých mikroorganismech. V přírodě bylo identifikováno více než 750 karotenoidů, ale pouze 24 jich bylo zjištěno v lidské tkáni.[10] Jejich přítomnost ovlivňuje výslednou barvu rostlin a uplatňuje se i při zrání ovoce. Jelikož rostliny slouží jako potrava pro řadu živočichů, ovlivňují karotenoidy i zabarvení některých částí živočišných těl a produktů (vaječný žloutek, ptačí peří apod.).[11]

- *Chemické složení*

Na základě své chemické struktury se řadí mezi tetraterpeny (isoprenoidy – obr. 4), jedná se tedy o odvozené lipidy. Do kategorie lipidů je můžeme zařadit proto, že velmi dobře splňují podmínku nerozpustnosti a nemísitelnosti s vodou, která je dána jejich hydrofobním charakterem.[12]

Společným znakem pro všechny karotenoidy je systém konjugovaných dvojných vazeb (páteř molekuly tvoří dlouhý polyenový řetězec). Tento systém je zodpovědný za jejich barevnost (od odstínů žluté až po červenohnědou). S rostoucím počtem dvojných vazeb se prohlubuje jejich zabarvení.[10, 11, 12]



Obr. 4. Obecný vzorec isoprenoidů

❖ *Dělení karotenoidů*

Karotenoidy tvoří dvě velké skupiny látek a to **karoteny** a **xanthofyly**. Karoteny jsou po chemické stránce uhlovodíky a xanthofyly jejich kyslíkaté deriváty (alkoholy, epoxidy, kyseliny, estery).[12]

Karoteny – nacházejí se ve všech zelených listech, květech, plodech a také v živém organismu (v tuku, krevním séru a v mléce). Největší množství karotenu je obsaženo v kořenech mrkve.

Xanthofyly – karotenoidová barviva obsahující kyslík. Nachází se v mnoha zelených rostlinách, ve žlutých listech, v květech pampelišky, ve vaječném žloutku atd.[11]

❖ *Vlastnosti karotenoidů*

Díky systému konjugovaných dvojných vazeb jsou karotenoidy v izolovaném stavu poměrně nestálé sloučeniny, snadno se oxidují vzdušným kyslíkem, zejména na světle. Při izolaci musíme tedy pracovat opatrně, bez přítomnosti světla a kyslíku. Čisté vzorky by měly být uchovávány při nízké teplotě. V přirozeném stavu jsou chráněny a stabilizovány obvykle vazbou na proteinovou strukturu ve formě tzv. *karotenoproteinů*.[12, 13]

❖ *Syntéza karotenoidů*

Jsou syntetizovány za současné esterifikace mastnými kyselinami. Částečná případně úplná esterifikace udílí řadě karotenoidů vyšší odolnost proti teplotě a fotooxidačním reakcím. Přímé extrakci barviv by měla předcházet deesterifikace, aby se snížilo množství chromatografických píků a tím se zjednodušila celá chromatografie vzorku. Nejběžnější je deesterifikace pomocí roztoku hydroxidu draselného – tzv. saponifikace.[3]

❖ *Funkce karotenoidů*

Schopnosti karotenoidů absorbovat světelné záření je využito při procesu fotosyntézy, kde mají karotenoidy za úkol působit jako tzv. doplňkové (pomocné) světlosběrné pigmenty. Rozšiřují takto spektrum fotosyntetického účinného záření – karotenoidy doplňují záření ve žlutozelené části spektra.[12]

Konjugovaný systém karotenoidů bohatý na elektrony je zodpovědný za jejich antioxidační vlastnosti, protože jsou schopny vázat tzv. reaktivní formy kyslíku. Byly prokázány i jejich antikarcinogenní účinky.[10, 12]

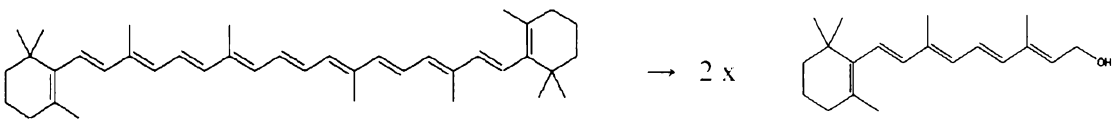
Antioxidanty

Antioxidanty jsou přírodní či syntetické sloučeniny, které mají vyvinutý obranný mechanismus proti ultrafialovému záření a nadměrné produkci volných radikálů, čímž redukují míru oxidačních reakcí.

Mezi nejvýznamnější antioxidanty patří sloučeniny bohaté na vitaminy E a C, karotenoidy, polyfenoly a další nízkomolekulární sloučeniny.

V současné době se zvyšuje zájem o látky s antioxidačními účinky a o jejich roli pro zdraví člověka, ať už jako lék či prevence. Epidemiologické výzkumy prokázaly, že konzumace potravin bohatých na antioxidanty pomáhá redukovat riziko takových nemocí jako rakovina, mozková mrtvice, kornatění cév, revmatická artritida, záněty střev, šedý zákal nebo neurologické degenerace. [14]

Po požití živočichy se rostlinné karotenoidy vylučují z organismu v nezměněné formě, část se jich ukládá v tukové a nervové tkáni jako zásoba provitaminu A a následně probíhá enzymy řízené symetrické štěpení β-karotenu na dvě molekuly retinolu – vitaminu A (obr. 5). Některé karotenoidy jsou vázány na bílkoviny (např. v krevním séru ve formě tzv. chromoproteinů).[12]

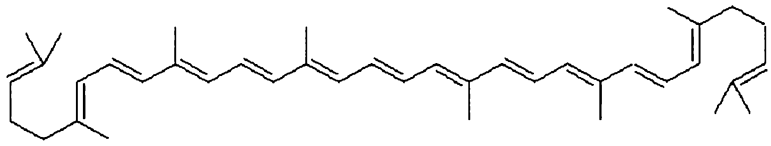


β-karoten retinol (vitamin A)

Obr. 5. Rovnice štěpení β-karotenu na dvě molekuly retinolu

1.2.1.2. Karotenoidy červené papriky

Všechny karotenoidy přítomné v červené paprice jsou C40 isoprenoidy (vznikají tedy kondenzací 8 isoprenoidních jednotek). Obsahují devět konjugovaných dvojných vazeb v centrálním polyenovém řetězci. Liší se koncovými skupinami, které mají za následek různé vlastnosti každého pigmentu. Všechny lze odvodit od lykopenu (obr. 6), hlavního pigmentu rajčat a šípků. Podléhají různým strukturním modifikacím, např. cyklizaci, hydroxylaci, epoxidaci.[2, 12]



Obr. 6. Strukturní vzorec lykopenu

V červené paprice bylo nalezeno okolo 40 karotenoidů, z nichž bylo 34 identifikováno.[15]

Zralý plod červené papriky obsahuje zhruba 37% kapsanthinu, 8% zeaxanthinu, 7% kukurbitaxanthinu A, 3% kapsorubinu a 9% β-karotenu. Významné procento zabírají také kapsanthin-5,6-epoxid, kapsanthin-3,6-epoxid, antheraxanthin, β-kryptoxanthin, violaxanthin a některé jejich *cis* isomery.[16]

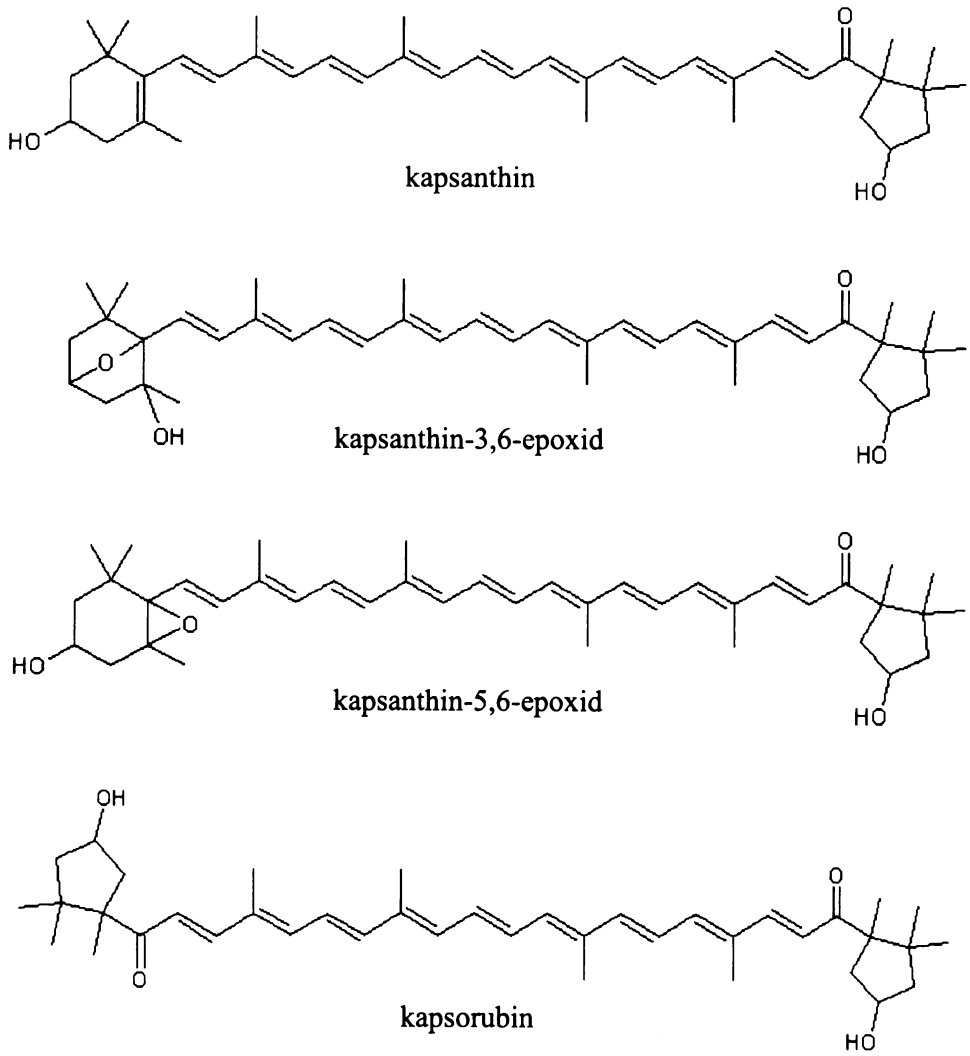
S dozráváním plodu se koncentrace jednotlivých barviv mění:

- obsah luteinu a neoxanthinu se snižuje, případně mizí úplně;
- koncentrace β-karotenu, antheraxanthinu a violaxanthinu se zvyšuje;
- některé pigmenty jsou biosyntetizovány *de novo* (zeaxanthin, β-kryptoxanthin, kapsanthin, kapsorubin, kapsanthin-5,6-epoxid a kukurbitaxanthin A).[2]

Můžeme je rozdělit na pigmenty červené frakce (obr. 7) a pigmenty frakce žluté (obr. 8),[2] přičemž pigmenty žluté frakce jsou prekurzory pro syntézu pigmentů frakce červené. Z těch nejdůležitějších si uveďme:

<u>červená frakce:</u>

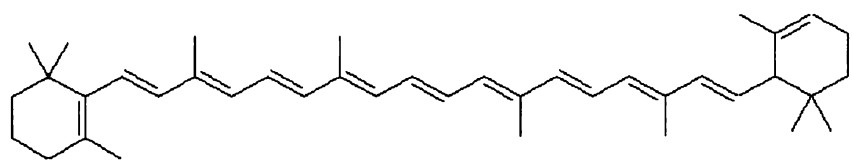
- kapsanthin
- kapsanthin-3,6-epoxid
- kapsanthin-5,6-epoxid
- kapsorubin



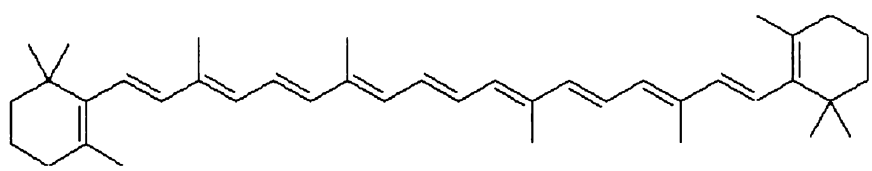
Obr. 7. Strukturní vzorce pigmentů červené frakce

žlutá frakce:

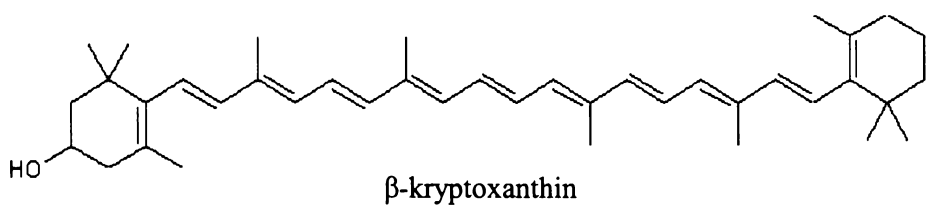
- α-karoten
- β-karoten
- β-kryptoxanthin
- lutein
- zeaxanthin
- violaxanthin
- antheraxanthin
- kukurbitaxanthin A
- luteoxanthin
- neoxanthin



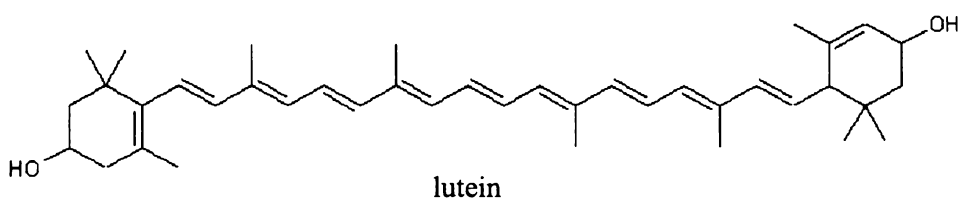
α-karoten



β-karoten

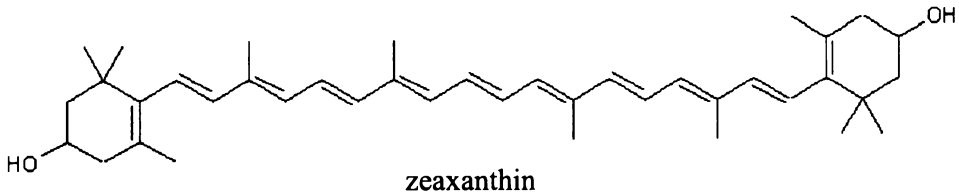


β-kryptoxanthin

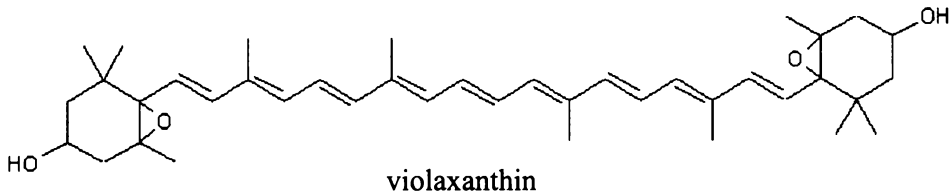


lutein

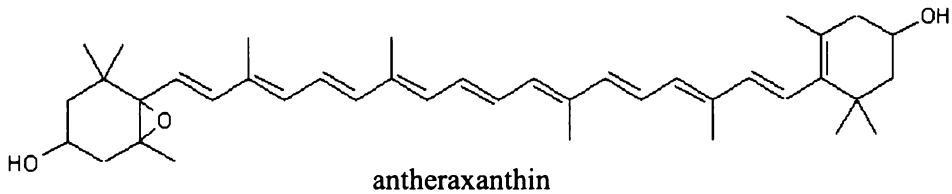
Obr. 8a. Strukturní vzorce pigmentů žluté frakce – 1. část



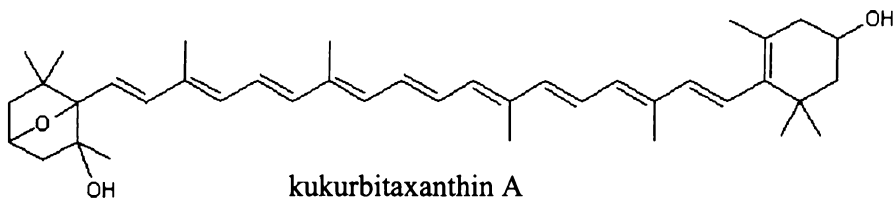
zeaxanthin



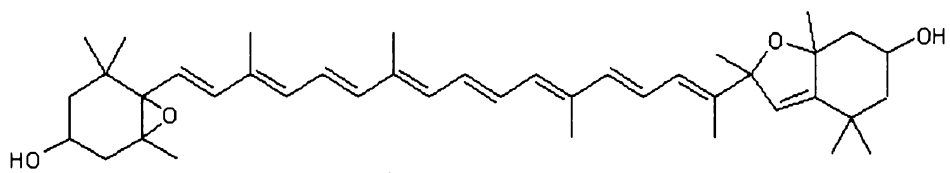
violaxanthin



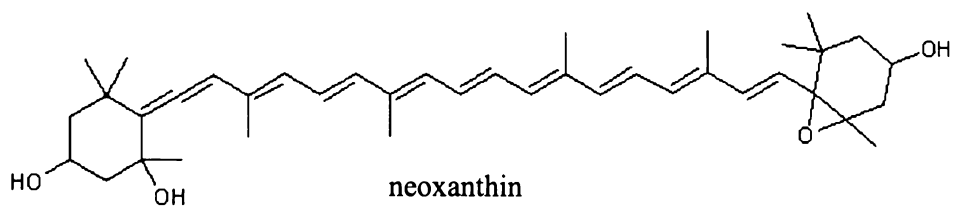
antheraxanthin



kukurbitaxanthin A



luteoxanthin



neoxanthin

Obr. 8b. Strukturní vzorce pigmentů žluté frakce – 2. část

2. Metody

2.1. Chromatografie

2.1.1. Chromatografie obecně

❖ *Princip chromatografie*

Chromatografie je separační metoda, jejíž dělící proces je založen na opakovaném ustavování rozdělovacích rovnováh vzorku mezi stacionární a mobilní fází. Při průchodu vzorku kolonou, kterou je unášen pomocí mobilní fáze, dochází k jeho opakované interakci s nepohyblivou stacionární fází tvořící náplň kolony. Komponenty vzorku jsou touto interakcí selektivně brzděny ve svém pohybu, míra brždění je úměrná vazebné síle této interakce.

Míru distribuce složky vzorku X mezi mobilní (m) a stacionární (s) fázi můžeme popsat distribuční konstantou K_D.

$$K_D = [X]_s / [X]_m$$

$[X]_s$ .....molární koncentrace složky X ve stacionární fázi
$[X]_m$ .....molární koncentrace složky X v mobilní fázi

S rostoucí hodnotou K_D bude látka více zadržována stacionární fází, bude se pomaleji pohybovat separačním prostorem. Daná látka může být charakterizována různými hodnotami K_D v závislosti na použité mobilní a stacionární fázi.

❖ *Dělení chromatografických metod*

Chromatografické metody je možno roztřídit podle několika hledisek, ale základním kritériem je dělení podle skupenství použité mobilní fáze (plynná, kapalinová, resp. superkritická fluidní chromatografie).[17]

Klasické studie pigmentů používají kolonovou chromatografii, papírovou chromatografii a TLC se silikagelem jako stacionární fází. Taková polární fáze má ale tu nevýhodu, že může docházet k isomeraci a transformaci látek během separace.[8] V současnosti je nejčastěji využívanou technikou izolace rostlinných barviv HPLC a to díky její rychlosti, možnosti detekce většího množství látek současně a skutečnosti, že nedochází k přeměnám vzorků.[18]

2.1.2. HPLC – vysokoúčinná/vysokotlaká kapalinová chromatografie

HPLC je v současné době velmi pokročilou a významnou chromatografickou metodou. V podstatě se jedná o kolonovou chromatografii využívající vysokého tlaku mobilní fáze. Je dosahováno vysoké účinnosti separačního procesu.

V HPLC se používají kolony naplněné stacionární fází o malé a přesně definované velikosti částic. Separační kolony se vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze a tedy i velkým hydrodynamickým odporem.

Pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze je nutný přetlak až desítek MPa. Dávkování vzorku probíhá nástřikem do proudu mobilní fáze. Eluční pořadí je určeno vzájemným vztahem polarity separovaných látek a polarity mobilní a stacionární fáze, proto je významná volba složení mobilní fáze. Při použití polární stacionární fáze jsou kolonou nejméně zadržovány nepolární složky vzorku a naopak.

K detekci se nejčastěji využívají fotometrické a hmotnostní detektory. Pro látky vykazující fluorescenci je možno použít fluorimetrický detektor.

Výhodami HPLC jsou její rychlost, vysoká účinnost a automatizovatelnost. Oproti tomu nevýhodou je vysoká cena přístrojového vybavení a nemožnost analyzovat více než jeden vzorek najednou.

2.1.3. Planární chromatografie

Planární chromatografie patří mezi instrumentálně nejjednodušší variantu kapalinové chromatografie. Podle typu použité stacionární fáze se dělí na papírovou chromatografii (PC) a tenkovrstevnou chromatografii (TLC).

Tenkovrstevná chromatografie

U tenkovrstvé chromatografie se jako stacionární fáze používá tenká vrstva sorbentu na podložní hliníkové fólii (resp. na skleněné destičce).

Spodní okraj této destičky je ponořen do malého množství mobilní fáze v uzavíratelné nádobě, což zabraňuje vysychání sorbentu. Důvodem je fakt, že celý prostor nádoby je nasycen parami mobilní fáze. Mobilní fáze vzlíná tenkou vrstvou směrem vzhůru a unáší jednotlivé komponenty vzorku podle zvolené polarity.

Detekce se většinou provádí subjektivně zjištěním pozic skvrn odpovídajících separovaným látkám.[17]

2.2. Saponifikace

Saponifikace je metoda založená na chemické reakci esterů s hydroxidem alkalického kovu, estery jsou hydrolyzovány na alkalickou sůl kyseliny a příslušný alkohol. Může být použita jako způsob, jakým lze ze vzorku odstranit estericky vázané mastné kyseliny, které by mohly ovlivňovat stanovení analytu ve vzorku. Nejběžnějším využitím této metody je ale výroba mýdla (saponifikace = zmýdelnění), kdy vedle alkoholu (glycerolu) vznikají soli vyšších mastných kyselin (palmitany, stearany), tedy mýdlo.[19]

obecná rovnice:

$$R_1—COOR_2 + OH^- \rightarrow R_1—COO^- + R_2—OH$$

2.3. NMR – nukleární magnetická rezonance

NMR neboli **nukleární magnetická rezonance** je spektroskopická technika, která je významná především v organické chemii.[20] Poskytuje detailní informace o struktuře a dynamických vlastnostech zkoumané látky.[21] Pomocí NMR se často podaří zjistit strukturu i velmi složitých organických sloučenin včetně stereoisomerů.[20]

❖ *Princip NMR*

NMR je založená na sledování interakcí magneticky aktivních jader umístěných v silném magnetickém poli s elektromagnetickým zářením v oblasti radiových vln. Vlivem molekulového okolí a vzájemných interakcí sledovaných jader dochází k charakteristickým posunům a štěpením signálů jednotlivých jader ve spektru. Tak je zpětně možné usuzovat na strukturu sledované molekuly nebo jejích částí.[17]

❖ *NMR spektrum*

Jedinečnost elektronového okolí každého z jader vede ke vzniku samostatného signálu v NMR spektru. Dvě různé látky mají vždy různá NMR spektra.[22]

❖ *Aplikace v praxi*

Dnes asi nejvýznamnějším analytickým využitím NMR spektroskopie je charakterizace dané látky (při kontrole léčiv a chemikálií určených pro speciální použití), dále také skupinová analýza sloučenin, nalezení látky ve směsi nebo vyloučení její přítomnosti.[23]

3. Experimentální část

3.1. Obecné poznámky k experimentální části

Složení jednotlivých frakcí bylo sledováno pomocí tenkovrstevné chromatografie na fóliích Kieselgel 60 F 254 (Merck). Detekci TLC fólií jsem prováděla postřikem 10% kyselinou sírovou a zahřátím. Pro sloupcovou chromatografii byl používán silikagel Kieselgel 60 (63 – 200 μm, Merck).

Veškerá rozpouštědla používaná při experimentu byla předem předestilována. Silikagel pro sloupcovou chromatografii jsem před použitím vždy nejdříve promyla diethyletherem.

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian VNMRS 300. ^{1}H NMR spektra byla měřena při 299,94 MHz v $CDCl_3$. Jako standard byl pro ^{1}H NMR spektra použit tetramethylsilan.

Pro dočištění pigmentů byla používána gradientní analytická soustava HPLC ECOM.

Vzorky jsem se snažila během celé práce co nejvíce chránit před přímým světlem, aby nedošlo k oxidaci pigmentů.

3.2. Extrakce a hrubé dělení pigmentů ze sušené červené papriky

Sušenou sladkou červenou papriku Kotányi (8 pytlíků) jsem nakoupila v supermarketu v říjnu 2007. Obsah všech pytlíků papriky (249,1 g) jsem rozmělnila v třecí misce, aby byla extrakce pigmentů co nejúčinnější.

3.2.1. Extrakce

Provedla jsem extrakci sušené papriky pomocí směsi acetonu a methanolu v poměru zhruba 1 : 2,5 (přibližně 20 ml acetonu a 50 ml methanolu) a přefiltrovala přes filtrační papír. Papriku jsem promývala roztokem tolikrát, dokud nebyl filtrát bezbarvý. Výsledný filtrát jsem odpařila do sucha na vakuové odparce a zvážila (59,7 g).

3.2.2. Chromatografie

Pomocí TLC chromatografie jsem zjišťovala, která mobilní fáze bude vhodná pro separaci na koloně, tedy v jaké mobilní fázi se barviva budou dělit nejlépe. Nejlépe se jevila směs hexan-ether v poměru 5:1. Na kolonu jsem jako výchozí použila o něco méně polární mobilní fázi 10:1.

Svou teorii jsem vyzkoušela pomocí orientační sloupcové chromatografie. Pro přípravu kolony jsem použila 30 g silikagelu a poté jsem na ni nanesla 2 ml extraktu (0,5 g jsem rozpustila ve směsi hexan-ether v poměru 10:1). Získala jsem 32 frakcí. Důvodem orientační chromatografie bylo ovládnutí a zautomatizování této techniky, aniž bych výrazně plýtvala získaným extraktem.

Na přípravu kolony na hlavní chromatografii jsem použila 150 g silikagelu a nanesla jsem na ni 10,3 g extraktu rozpuštěné ve směsi hexan-ether v poměru 10:1. Kolonu jsem promývala postupně směsí hexan-ether v poměrech 10:1 – 1:10, následně čistým etherem a na závěr chloroformem a methanolem (viz tabulka 1). Jímala jsem frakce o objemu cca 35 ml a jednotlivé frakce jsem smíchala podle TLC. Získala jsem dalších 22 frakcí (33. - 54. frakce).

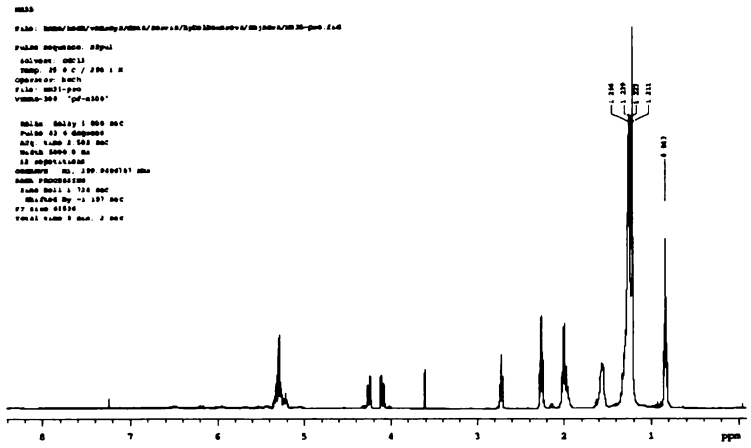
Tab. 1. Přehled frakcí získaných hlavní chromatografií

Číslo frakce	Zkumavky	Poměr hexan : ether	Hmotnost frakce
33	1-3	10:1	0,006 g
34	4-5	10:1	0,053 g
35	6-8	10:1	0,510 g
36	9-13	10:1	1,264 g
37	14-17	10:1	0,552 g
38	18-23	10:1	0,549 g
39	24-35	10:1	0,715 g
40	36-40	10:1	0,175 g
41	41-61	10:1	0,378 g
42	62-65	10:1	0,043 g
43	66-69	10:1	0,033 g
44	70-98	10:1	1,036 g
45	99-140	10:1, 8:1	0,974 g
46	141-188	8:1, 5:1	0,068 g
47	189-206	3:1	0,068 g
48	207-218	1:1	0,115 g
49	219-221	1:3	0,027 g
50	222-225	1:3	0,024 g
51	226-234	1:3	0,033 g
52	235-253	1:3, 1:5	0,226 g
53	254-310	1:5, 1:10, ether, chloroform	0,073 g
54	311-333	methanol	1,536 g

3.2.3. NMR chromatografie

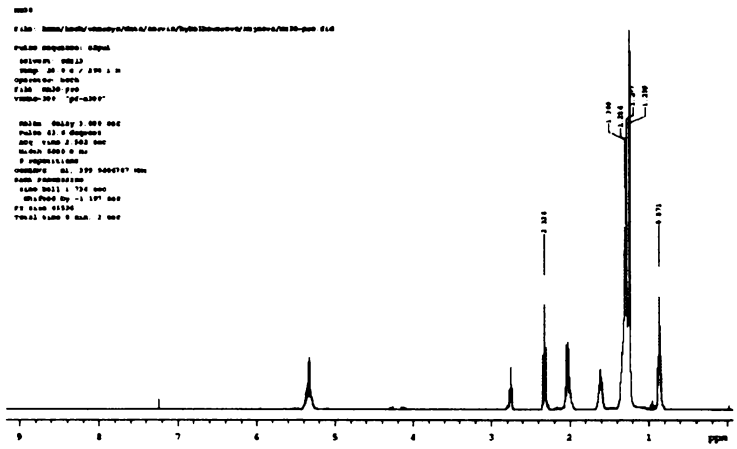
U všech získaných frakcí bylo změřeno NMR spektrum a to bylo porovnáno s literaturou.[25] Ve všech jsem identifikovala převládající mastné kyseliny (obr. 9, obr. 10), obsah karotenoidů byl pro rozpoznání pomocí NMR příliš malý.

❖ frakce 35 - převládající látkou je **glyceryl-trilinolát**



Obr. 9. ^{1}H NMR spektrum frakce 35

❖ frakce 38 - převládající směs **linolové** a **stearové kyseliny**



Obr. 10. ^{1}H NMR spektrum frakce 38

3.2.4. Saponifikace

V další fázi experimentální části bakalářské práce jsem se zaměřila na srovnání saponifikované a nesaponifikované frakce.

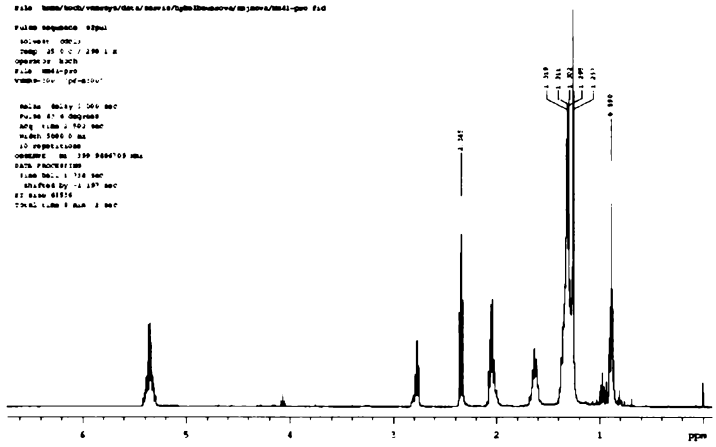
Vybrala jsem barevně výraznou frakci (41. frakce) a přidala jsem k ní 10 % roztok KOH v methanolu (1 g KOH + 10 ml methanolu). Po dobu 3 hodin jsem nechala roztok míchat a pak jej přelila do dělící nálevky. Po ustálení fází jsem odpustila vodnou frakci. K frakci etherické jsem přidala 10 ml destilované vody, vytřepala a po ustálení (cca 1 hodina) opět odpustila vodnou frakci. Tento postup jsem několikrát opakovala. Etherickou frakci jsem následně vysušila bezvodým síranem sodným a zvážila (0,129 g). Na závěr bylo změřeno NMR spektrum saponifikované frakce 41 (obr. 11) a porovnáno s NMR spektrem frakce 41, u které saponifikace provedena nebyla (obr. 12). Stejný postup jsem provedla s další barevně výraznou frakcí č. 36.

3.2.5. HPLC

Saponifikovanou frakci 36, ve které podle TLC převažovalo červené barvivo, jsem pomocí HPLC přečistila. Barvy se dobře rozdělily, ale získané množství bylo tak malé, že bylo pomocí NMR neidentifikovatelné.

Frakce 41 – před saponifikací

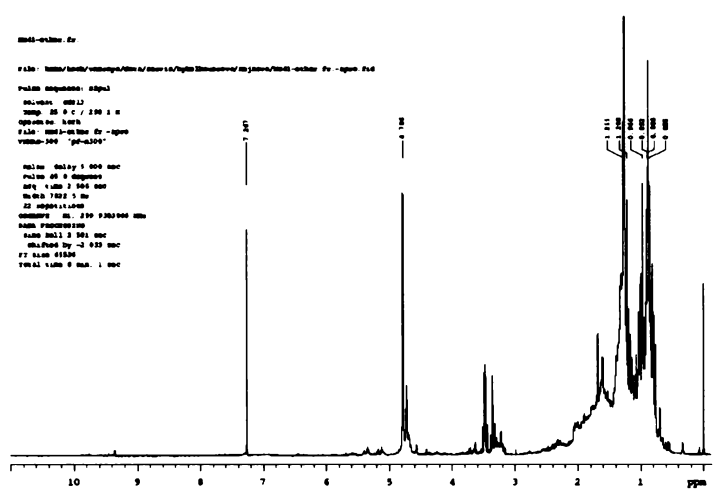
V této frakci byla identifikována převládající látkou **linolová kyselina**



Obr. 11. ^{1}H NMR spektrum frakce 41 – před saponifikací

Frakce 41 – po saponifikaci

Na tomto NMR spektru můžeme pozorovat, že saponifikace byla úspěšná. Signály, které byly vlivem mastné kyseliny potlačeny, jsou na NMR spektru viditelné.



Obr. 12. NMR spektrum frakce 41 – po saponifikaci

4. Závěr a diskuze

V teoretické části bakalářské práce jsem se zaměřila především na důkladné vypracování literární rešerše na téma Izolace pigmentů ze sušené červené papriky. Tímto tématem jsem navázala na bakalářskou práci Mgr. Milady Roštejnské, která se zabývala izolací pigmentů z různých rostlinných materiálů (např. červená a žlutá paprika, rajče, šípek, břečťan a další).

V experimentální části jsem si osvojila a zautomatizovala metodiku separace pigmentů červené papriky. V průběhu práce jsem si vyzkoušela TLC, sloupcovou chromatografii a HPLC.

Extrakcí pomocí směsi acetonu a methanolu jsem získala přibližně 60 g extraktu, z něhož jsem 10 g použila na gradientovou sloupcovou chromatografii. Chromatografií jsem dostala řadu frakcí podle vzrůstající polarity. U všech získaných frakcí bylo proměřeno ^{1}H NMR spektrum.

Z naměřených protonových NMR spekter jsem zjistila, že jednotlivé frakce obsahují převážně mastné kyseliny či jejich estery (např. linolová kyselina, stearová kyselina, glyceryl-trilinolát), proto jsem u vybrané (barevně výrazné) frakce provedla saponifikaci. Z literatury je znám fakt, že saponifikace vzorků je na jednu stranu výhodná, protože výsledkem je méně sloučenin ve směsi a tím i jednodušší chromatogram, ale na druhou stranu může být zpracováváním vzorku ztracena řada údajů.[24] Proto jsem nepoužila tuto techniku už na počátku, abych měla možnost porovnání. Porovnáním saponifikované a nesaponifikované frakce bylo zřetelné, že signál převažující mastné kyseliny potlačuje signály ostatních látek (včetně karotenoidů).

Jelikož bych v diplomové práci ráda navázala na dané téma, vycházela bych v budoucnu z většího množství sušené papriky, protože pro identifikaci pomocí NMR spektroskopie bylo toto množství nedostatečné. Dále bych provedla saponifikaci u celého výchozího extraktu, protože mastné kyseliny přítomné ve frakcích měly výrazný rušivý vliv na stanovení.

5. Seznam použité literatury a internetové odkazy

1. http://www.calantilles.com/capsicum_peppers.htm [cit. 21.7.2008]
2. Hornero-Méndez D., Gómez-Ladrón de Guevara R., Mínguez-Mosquera M. I.: *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 3857
3. Mínguez-Mosquera M. I., Gálvez A. P.: *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, *46*, 566
4. Howard L. R., Talcott S. T., Brenes C. H., Villalon B.: *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 1713
5. Barbero G. F., Liazid A., Palma M., Barroso C. G.: *Talanta*, **2008**, *75*, 1332
6. http://old.af.mendelu.cz/mendelnet2006/articles/tp/supalkova.pdf [cit. 21.7.2008]
7. Vinha C. A., Haas U.: *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 1273
8. Mínguez-Mosquera M. I., Hornero-Méndez D.: *J. Agric. Food Chem.*, **1993**, *41*, 1616
9. http://svp.muni.cz/downloads/rotreklova/Rostlinna_barviva.pdf [cit. 22.7.2008]
10. McNulty H., Jacob R. F., Mason R. P.: *Am. J. Cardiol.*, **2008**, *101*, 20D
11. Vitvarová E.: *Diplomová práce (Přírodní barviva)*, PřF UK, Praha **1970**
12. Kolektiv: *Biochemie – základní kurz*, Karolinum, Praha **1999**
13. Collera-Zúniga O., Jiménez F. G., Gordillo R. M.: *Food Chemistry*, **2005**, *90*, 109
14. Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A.: *J. Sep. Sci.*, **2007**, *30*, 452
15. Deli J., Matus Z., Tóth G.: *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *44*, 711
16. Deli J., Molnár P., Matus Z., Tóth G.: *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 1517
17. http://www.vscht.cz/nmr/vyuka.html [cit. 26.7.2008]
18. Almela L., López-Roca J. M., Candela M. E., Alcázar M. D.: *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, *39*, 1606
19. http://www.sszdra-karvina.cz/bunka/che/met/mlplip.pdf [cit. 27.7.2008]
20. McMurry J.: Organická chemie, Nakladatelství Vutium, Brno 2007
21. Buděšínský M., Pelnař J.: Fyzikálně-chemické metody, ÚOCHB AV ČR, Praha 2000
22. Böhm S., Smrčková-Voltrová S.: Strukturní analýza organických sloučenin, VŠCHT, Praha 1995
23. Spasov S., Kamenov L.:*Jaderná magnetická rezonance v organické chemii*, SNTL, Praha **1981**
24. Ittah Y., Kanner J., Granit R.: *J. Agric. Food Chem.*, **1993**, *41*, 899
25. http://www.lipidlibrary.co.uk/nmr/nmr.html [cit. 2.9.2008]

5.1. Internetové odkazy na převzaté obrázky

Obr. 1.: *Capsicum annuum* 1

www.biolib.cz/IMG/GAL/18592.jpg

[cit. 21.7.2008]

Obr. 2.: *Capsicum baccatum*

www.chileseeds.co.uk/images/very-h45.jpg

[cit. 21.7.2008]

Obr. 3.: *Capsicum chinense*

www.chileseeds.co.uk/.../bhut_jolokia_chilli.jpg

[cit. 21.7.2008]

Obr. 4.: *Capsicum frutescens*

www.exoticsonline.nl/catalog/images/cabe.gif
[cit. 21.7.2008]

Obr. 5.: *Capsicum pubescens*

www.g6csy.net/chile/peppers/pi387838.jpg

[cit. 21.7.2008]

Obr. 6.: *Capsicum annuum* 2

http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Red_capsicum_and_cross_section.jpg

[cit. 22.7.2008]

Poděkování

Na závěr mé bakalářské práce bych ráda poděkovala Mgr. Simoně Hybelbauerové za všestrannou pomoc, trpělivost, lidský přístup a vytvoření velmi příjemné pracovní atmosféry. Mé díky patří také Mgr. Miladě Roštejnské za její čas a cenné rady.

V neposlední řadě děkuji rodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole.