

Analýza potravinářsky významných barviv ze sladkovodních řas metodou HPLC

Ing. Jiří KOPECKÝ, Ing. Miroslav KAJAN, RNDr. Vladimír TICHÝ,
Mikrobiologický ústav ČSAV, Oddělení autotrofních mikroorganismů, Třeboň

Klíčová slova: potravinářská barviva, řasy, extrakce, *Chlorella vulgaris*, HPLC

579 663

ÚVOD

S rostoucím tlakem veřejnosti proti používání syntetických barviv v potravinářství se stává stále aktuálnější

otázka hledání nových, ekonomicky zajímavých zdrojů přírodních barviv. Jako jeden z perspektivních se jeví biomasa fotoautotrofních mikroorganismů, řas a sinic [1]. Pro perspektivu jejich použití hovoří několik skutečností.

Řasy a sinice představují skupinu organismů, čítající několik desítek tisíc druhů, které obsahují ve své biomase pestrou paletu barviv, od žlutých a oranžových xantofylů, přes červené karoteny a fytoerytryny, modré fytoxyaniny až po zelené chlorofyly [2]. Krátká generační doba těchto mikroorganismů umožňuje, ve srovnání s vyššími rostlinami poměrně rychle připravovat genetickými manipulacemi mutanty se změněným poměrem a množstvím barviv v biomase [3]. Za desetiletí výzkumu fotosyntézy, kdy řasy sloužily jako modelové organismy, je poměrně dobře zpracovaná metodika jejich kultivace, genetiky a analýzy jednotlivých složek biomasy, mezi nimi i vlastních pigmentů.

Klasickou metodou analýzy pigmentů je spektrofotometrické stanovení celkového obsahu pigmentů za použití empirických rovnic sestavených různými autory [4,5]. Tato metoda je zatím nejrozšířenější pro svou rychlost a jednoduchost, neposkytuje však naprosto žádné informace o zastoupení jednotlivých pigmentů. Pomineme-li takové metody, jakými jsou tenkovrstvá [6] a kolonová chromatografie [7,8], jež buď neumožňují kvantitativní stanovení nebo jsou zdlouhavé, což zvyšuje riziko rozkladu jednotlivých pigmentů, je jedinou vhodnou metodou, splňující všechny požadavky na rychlost a kvantitativní analýzu, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Moderní HPLC systémy nabízejí řadu předností ve srovnání s uvedenými metodami, avšak ani pomocí této metody není jednoduché separovat a stanovit všechny pigmenty vyskytující se v autotrofních řasách. Příčinou tohoto stavu je na jedné straně velký rozsah polarit fotosyntetických pigmentů a na straně druhé omezená selektivita chromatografických kolon.

V literatuře existuje řada údajů o separaci fotosyntetických pigmentů na normálních fázích jako je silikagel [9,10,11] Al_2O_3 [12] nebo MgO [13].

Vedle normálních fází našly velmi široké uplatnění při separaci fotosyntetických pigmentů tzv. reverzní fáze, především silikagel s chemicky vázanými oktadecylovými zbytky. Kolony s takto modifikovaným povrchem mají opačnou polaritu a tedy i jednotlivé pigmenty se eluují v obráceném pořadí než na normálních fázích. Vedle určitých nevýhod, mezi něž patří relativně malá retenční aktivita pro polární xantofyly a naopak značná pro nepolární karoteny, jsou tyto kolony schopny uspokojit separační nároky pro prakticky všechny fotosyntetické pigmenty vyskytující se v autotrofních řasách [14-21].

MATERIÁL A METODY

1. Kultivace

Pro analýzy byla použita biomasa sladkovodních mikroskopických řas rodu *Chlorella vulgaris* kmen 109 ze sbírek Oddělení autotrofních mikroorganismů MBÚ ČSAV v Třeboni. Biomasa byla kultivována na venkovních otevřených kultivačních zařízeních [22] v minerálním médiu tohoto složení:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.00 g.l⁻¹; KNO_3 , 1.25 g.l⁻¹; Mg_2PO_4 , 1.25 g.l⁻¹; $CaCl_2$, 0.084 g.l⁻¹; H_3BO_3 , 0.114 g.l⁻¹; $ZnSO_4 \cdot H_2O$, 0.088 g.l⁻¹; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.050 g.l⁻¹; $MnCl_2 \cdot H_2O$, 0.014 g.l⁻¹; $(NH_4)_2MoO_4$, 0.007 g.l⁻¹; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.016 g.l⁻¹; $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, 0.005 g.l⁻¹. Jako zdroj uhlíku sloužil

technický CO_2 z tlakových láhví. Průměrná denní produkce při střední ozářenosti 3 500 Wh.m⁻² byla 15 g.m⁻².den⁻¹.

2. Extrakce

Pro extrakci fotosyntetických pigmentů z řasové biomasy byla použita modifikovaná metoda podle [23]. 10 ml řasové suspenze o koncentraci 1 - 5 g sušiny na litr se centrifuguje při 5 000 x g po dobu 5 min, sediment se dezintegruje skleněnými kuličkami č.3 o průměru 0,3 mm v přítomnosti 0,5 ml fosfátového pufru o pH 7,7 po dobu 3 minut. Následným krokem je inaktivace chlorofylasy, která se provádí přidávkem 1 ml izopropanolu. Vlastní extrakce se provádí 90% acetonem třikrát po sobě, extrakty se spojí a po doplnění na přesný objem se přímo nanášejí na analytickou kolonu.

3. Přístrojové vybavení

HPLC analýzy byly prováděny na kapalinovém chromatografu Beckman, sestávajícího ze dvou vysokotlakých čerpadel (model 114M) a kontroleru gradientu. Pro detekci chromatografických pík bylo použito detektoru diodového pole (Waters, model 991), připojeného k počítači NEC APC IV s firemním programem pro sběr a zpracování chromatografických dat a spekter.

Pro stanovení obsahu celkových xantofylů a karotenů v acetonovém extraktu byl použit dvoupaprskový spektrofotometr Shimadzu UV 2000 a výpočet koncentrace byl prováděn podle UNESCO-SCOR.

4. Chromatografické podmínky

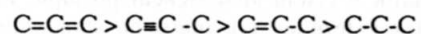
Pro separaci pigmentů v acetonovém extraktu řas byla použita kolona Ultrasphere ODS (Altech) 250 x 4,6 mm, naplněná silikagelem s chemicky vázanými oktadecylovými skupinami o zrnění 5 μm. Mobilní fáze A sestávala ze směsi acetonitril: methanol: 0.2 mol/l Tris pufr pH 7, 74:6:1 (obj.), mobilní fáze B ze směsi methanol:hexan, 5:1 (obj.). Gradient: 0-4 min.100%A, pak lineární gradient z 0% na 100% během 2 min, následuje 10 min izokraticky 100% B a pak zpět lineárním gradientem na 100% A během 2 min. Mezi jednotlivými nástřiky je nutno 4 min ekvilibrovat kolonu mobilní fází A, průtok 2 ml/min.

Všechny použité chemikálie a rozpouštědla byly p.a. čistoty. Standardy pigmentů chlorofyl a, chlorofyl b, α-karoten, β-karoten byly od firmy Sigma, zeaxantin od firmy Hoffman La Roche. Veškeré operace byly prováděny za chladu, tlumeného světla a pokud možno v atmosféře dusíku.

5. Identifikace jednotlivých pigmentů

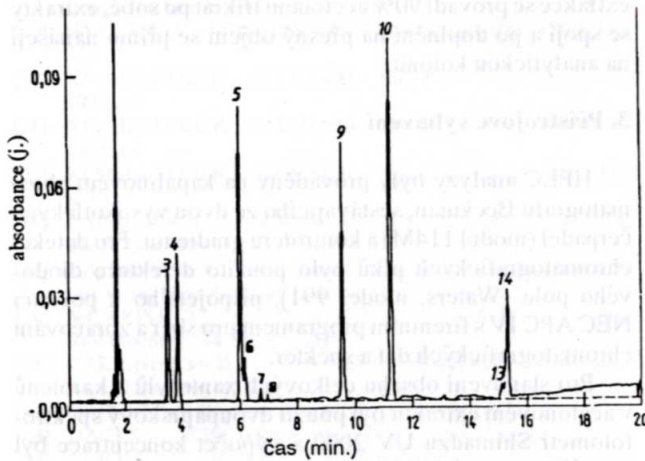
Identifikaci jednotlivých pigmentů jsme prováděli na základě elučního pořadí v reverzním systému a na základě absorpčních spekter. Obecně lze eluční pořadí v reverzním systému stanovit následujícím způsobem podle klesající polarit [2]:

- vliv stupně nenasycenosti:

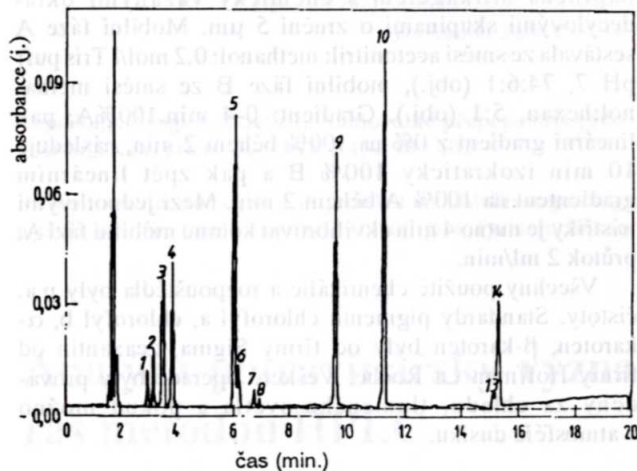


- vliv koncových skupin:
 $\psi > \gamma > \varepsilon > \beta$
- vliv oxoskupin:
-COOH > -OH > =C=O > -OR

Eluční pořadí stanovené na základě chromatografického chování v reverzním systému jsme korelovali s absorpčními spektry jednotlivých píků, jak na základě literárních dat, tak i s dostupnými standardy. Konfiguraci cis izomerů jsme určili na základě hodnoty D_B/D_H [24], která udává poměr absorpčního maxima cis píku v oblasti 300 - 350 nm a prostředního hlavního absorpčního pásu.



Obr.1 Separace fotosyntetických pigmentů extrahovaných z řasy *Chlorella vulgaris* za dodržení všech podmínek správně vedené extrakce (osa x - doba analýzy [min]; osa y - absorbance detektoru při 440 nm [j.])



Obr.2 Separace fotosyntetických pigmentů extrahovaných z řasy *Chlorella vulgaris* bez inaktivace chlorofylázy. (osa x - doba analýzy [min]; osa y - absorbance detektoru při 440 nm [j.])

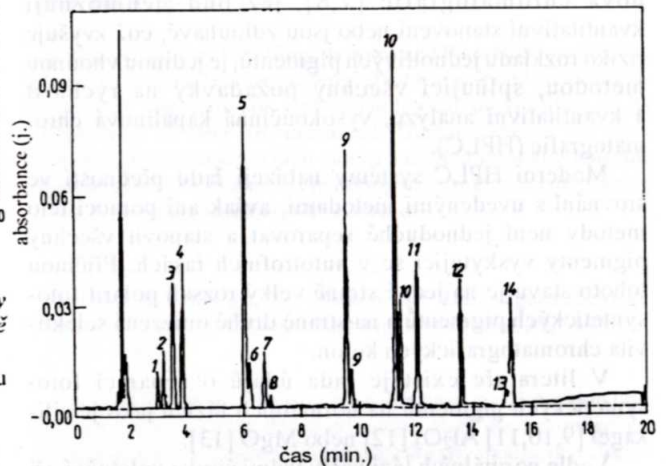
6. Kvantitativní stanovení jednotlivých pigmentů

Kvantitativní stanovení karotenoidů pomocí HPLC je kritický krok v celém analytickém postupu. Používá se metody jak externího, tak interního standardu. Metoda

externí kalibrace vyžaduje mít k dispozici standardy všech pigmentů, jež se vyskytují v analyzovaném vzorku. Tato metoda je zatížena značnou chybou vlivem rozdílného postupu přípravy vzorků standardů a vlastního extraktu z biologického materiálu. Tento nedostatek sice odstraňuje metoda vnitřního standardu, avšak vzhledem k tomu, že se značně liší absorpční koeficienty a tím i odezva detektoru na jednotlivé karotenoidy, je i v tomto případě nutno mít k dispozici standardy jednotlivých karotenoidů a stanovit tzv. odezvový faktor.

Z uvedených důvodů jsme pro kvantitativní stanovení jednotlivých pigmentů zvolili metodu přímého výpočtu absolutního počtu molů, prošlých měřicí celou detektoru, na základě Lambert-Beerova zákona a chromatografických dat [25]. Tato metoda dovoluje výpočet počtu molů analytu (N_0) z ploch píků (A_i), průtoku mobilní fáze (F), optické délky měřicí cely detektoru (l) a hodnoty molárních absorpčních koeficientů (ε), jež jsou pro většinu pigmentů tabelovány, podle rovnice:

$$A_i \cdot F = 10^3 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot N_0$$



Obr.3 Separace fotosyntetických pigmentů extrahovaných z řasy *Chlorella vulgaris* bez inaktivace chlorofylázy současně bez stabilizace pH fosfátovým pufrům. (osa x - doba analýzy, [min]; osa y - absorbance detektoru při 440 nm, [j.])

Celková suma karotenoidů a chlorofylů vypočtená podle výše uvedené rovnice, byla porovnána s hodnotami stanovenými klasickým způsobem pomocí spektroskopie.

VÝSLEDKY

Vzhledem k tomu, že řasy obsahují široké spektrum pigmentů od polárních xantofylů, přes chlorofyly až po nepolární karoteny, je použití gradientové eluce nezbytné pro dosažení potřebného rozdělení v přijatelném čase analýzy. Separační účinnost předkládaného systému a vliv různých podmínek extrakce jsou ilustrovány na třech chromatogramech, (obr. 1, 2 a 3). Na obr. 1 je uveden příklad separace acetonového extraktu z řasy *Chlorella vulgaris*, extrahované za dodržení všech podmínek správně vedené extrakce. Naproti tomu obr. 2 demonstruje extrakční postup bez kroku inaktivace chlorofylázy. Na uvedeném chromatogramu se objevují píky 1 a 2, jež reprezentují

chlorofylidy *a* a *b*, vzniklé odtržením fytoového řetězce působením uvedeného enzymu. Odtržením nepolárního fytoového řetězce se výrazně změní polarita takto vzniklých chlorofylidů, a této skutečnosti naprosto přesně odpovídá i jejich chromatografické chování, kdy se eluují v reverzním systému ještě před polárními xantofyly.

Tab. I. Eluční pořadí jednotlivých pigmentů

Pík č.	Název	tR [min.]	D _B / D _H
1	Chlorofylid b	3,01	-
2	Chlorofylid a	3,12	-
3	Neoxantin	3,49	0,10
4	Violaxantin	4,02	0,12
5	<i>all-trans</i> -Lutein	6,05	0,17
6	<i>all-trans</i> -Zeaxantin	6,15	0,19
7	<i>13-cis</i> -Lutein	6,75	0,54
8	<i>13-cis</i> -Zeaxantin	6,95	0,51
9	Chlorofyl b	9,54	-
9'	Chlorofyl b, alomer	10,03	-
10	Chlorofyl a	11,27	-
10'	Chlorofyl a, alomer	11,32	-
11	Feofytin b	12,03	-
12	Feofytin a	13,68	-
13	α -karoten	15,22	0,16
14	β -karoten	15,34	0,09

Tab. II. Obsah jednotlivých pigmentů v biomase řas (% vztažena na sušinu řasové biomasy)

Pík č.	Název	[mg/l]	%
1	Chlorofylid b	-	-
2	Chlorofylid a	-	-
3	Neoxantin	0,85	0,043
4	Violaxantin	0,93	0,048
5	<i>all-trans</i> -Lutein	4,55	0,240
6	<i>all-trans</i> -Zeaxantin	0,22	0,015
7	<i>13-cis</i> -Lutein	0,20	0,015
8	<i>13-cis</i> -Zeaxantin	0,02	0,002
9	Chlorofyl b	15,00	0,750
9'	Chlorofyl b, alomer	-	-
10	Chlorofyl a	53,10	2,650
10'	Chlorofyl a, alomer	-	-
11	Feofytin b	-	-
12	Feofytin a	-	-
13	α -karoten	0,10	0,007
14	β -karoten	0,68	0,030
	Σ Xantofylů a karotenů	7,55	0,400
	Σ Chlorofylů	68,10	3,400
	Σ Pigmentů	75,65	3,800

Na obr. 3 je případ zcela nevhodně vedené extrakce, jak bez inaktivace chlorofylasy, tak bez stabilizace fosfátovým pufrům za současného působení světla. Na tomto chromatogramu se objevují jak píky 1 a 2, odpovídající výše diskutovaným chlorofylidům, tak především další píky 9 a 10, jež reprezentují alomery chlorofylů, a dále píky 11 a 12, jež představují feofytiny *b* a *a*. Oba uvedené typy degradačních produktů vznikají vlivem oxyselení vzorku

během dezintegrace buněk bez stabilizace pH fosfátovým pufrům, kdy dochází k uvolnění kyselého buněčného obsahu. Na tomto chromatogramu je též patrný vzrůstající obsah píků 7 a 8, jež byly identifikovány na základě D_B/D_H hodnot, které udávají poměr absorpčního maxima *cis* píku v oblasti 300 - 350 nm a prostředního hlavního absorpčního pásu jako *cis* izomery luteinu a zeaxantinu.

Píky chlorofylidů a chlorofylů byly identifikovány na základě srovnání získaných absorpčních spekter se spektry čistých standardů. Píky jednotlivých xantofylů odpovídají svým polárním charakterem obecnému pořadí v reverzním systému, a též i jejich spektra s dobře vyvinutou jemnou strukturou jsou v souladu s literárními údaji. Eluční pořadí jednotlivých pigmentů je shrnuto v tab. I a koncentrace jednotlivých pigmentů v tab. II.

LITERATURA

- [1] FRANCIS F.J.: Food Technol., 41, 1987, s. 62
- [2] DAVIES B.I.: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, 2, 1976, s. 54
- [3] POWLS R., BRITTON G.: Arch. Microbiol., 113, 1977, s. 275
- [4] ARNON D.I.: Plant. Physiol., 24, 1979, s. 1
- [5] LICHTENTHALER H.K., WELLBURN A.R.: Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extract in different solvents. In Abstracts of the 6th International Congress on Photosynthesis, Brussels, 1983, s. 415
- [6] JEFFREY S.W.: Limnol. Oceanogr., 26, 1981, s. 191
- [7] BEECHER G.R., KHACHIK F.: J. Natl. Cancer Inst., 73, 1984, s. 1397
- [8] AOAC, Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 14th ed.: 1984, s. 738
- [9] THOMPSON J.N., HATINA G., MAXWELL W.B., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63, 1980, s. 894
- [10] FERNANDEZ-LOPEZ J.A., ALMELA L., LOPEZ-ROCA J.M.: Photosynthetica, 25, 1991, s. 81
- [11] CANJURA F.L., SCHWARTZ S.J.: J. Agric. Food Chem., 39, 1991, s. 1102
- [12] KAMEL B.S., BUENO M.: Lebensm.-Wiss. Technol., 13, 1980, s. 134
- [13] STEWART I.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 60, 1977, s. 132
- [14] WELLBURN A.R., ROBINSON D.C., WELLBURN F.A.M.: Planta, 154, 1982, s. 259
- [15] RUDDAT M., WIL O.H.: Meth. Enzym., 111, 1985, s. 189
- [16] SIEFERMANN-HARMS D.: J. Chromatogr., 448, 1988, s. 411
- [17] DE LAS RIVAS J., ABADIA A., ABADIA J.: Plant. Physiol., 91, 1989, s. 190
- [18] GILMORE A.M., YAMAMOTO H.Y.: J. Chromatogr., 543, 1991, s. 137
- [19] NELIS H.J.C.F., DE LEENHERR A.P.: Anal. Chem., 55, 1983, s. 270
- [20] LAUREN D.R., McNAUGHTON D.E., AGNEW M.P.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70, 1987, s. 428
- [21] THAYER S.S., BJORKMANO.: Photosynth. Res., 23, 1990, s. 331
- [22] ŠETLÍK I., ŠUSTV., MÁLEK I.: Algol. Stud. Třeboň, 1, 1970, s. 111
- [23] HAGER A., STRANSKY H.: Arch. Microbiol., 71, 1970, s. 132
- [24] LJAANEN-JENSEN S.: K. Nor. Vidensk. Selsk. Skr., 8, 1962, s. 1
- [25] TORSI G. a kol.: J. Chromatogr., 492, 1989, s. 207

Lektoroval Ing. Vladimír Kellner, CSc.
Do redakce došlo 10. 10. 1992

Kopecký, J. - Kajan, M. - Tichý, V.: Analýza potravinářsky významných barviv ze sladkovodních řas metodou HPLC. Kvas. prům., 39, 1993, č. 4, s. 102 - 106

V práci je prezentována metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy potravinářsky zajímavých barviv v biomase sladkovodní řasy *Chlorella vulgaris*. Metoda umožňuje stanovení chlorofylů včetně jejich degradačních produktů, xantofylů a karotenů pomocí gradientové vysokoučinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi. Identifikace jednotlivých pigmentů a jejich degradačních produktů byla prováděna porovnáním spekter získaných pomocí detektoru diodového pole s údaji publikovanými v literatuře. Současně je dokumentován vliv extrakčních podmínek na kvalitu analýzy a tvorbu degradačních produktů pigmentů.

Копецки, И. - Каян, М. - Тихи, В.: Анализ значительных продовольственных красящих веществ из пресноводных водорослей методом HPLC. Квас. прум., 39, 1993, № 4, стр. 102 - 106

Представляются методы качественного и количественного анализа красящих веществ, интересных с точки зрения своего применения в пищевом производстве, в биомассе пресноводной водоросли.

Метод позволяет определение хлорофиллов, включая продукты их деградации, ксантофиллов и каротиенов при помощи градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии на реверсивной фазе. Идентификация отдельных пигментов и продуктов их деградации проводилась сопоставлением спектров, полученных с помощью детектора диодного поля с данными, опубликованными в литературе. Одновременно документируется влияние условий экстрагирования на качество анализа и образование продуктов деградации пигментов.

Kopecký, J. - Kajan, M. - Tichý, V.: Analysis of Alimentary Dyes from Fresh-Water Algae by HPLC Method. Kvas. prům. 39, 1993, No. 4, pp 102 - 106

The method of the qualitative and quantitative analysis of alimentary dyes in a biomass of the fresh-water algae *Chlorella vulgaris* is described. The method permits the determination of chlorophylls including their degradation products, xanthophylls and carotenoids using the gradient HPLC on the reverse phase. An identification of the individual pigments and their degradation products was performed by a comparison of the spectrum obtained with the detector of diode field with the data published in a literature. Further, the effect of extraction conditions on the quality of analysis and the formation of pigment degradation products is discussed.

Kopecký, J. - Kajan, M. - Tichý, V.: Analyse der für die Lebensmittelindustrie wichtigen Farbstoffe aus den Süßwasser-Algen mittels der HPLC-Methode. Kvas. prům. 39, 1993, Nr. 4, S. 102 - 106

Vorgestellt wird die Methode der qualitativen und quantitativen Analyse der vom Standpunkt der Lebensmittelindustrie interessanten Farbstoffe in der Biomasse der Süßwasser-Alge *Chlorella vulgaris*. Die Methode ermöglicht die Bestimmung der Chlorophylle samt ihrer Degradationsprodukte, der Xantophylle und Karotene durch die hochwirksame Gradienten-Flüssigkeitschromatographie auf der Reversphase. Die Identifikation der einzelnen Pigmente und ihrer Degradationsprodukte wurde auf Grund des Vergleichs der mittels des Detektors des Dioden-Feldes gewonnenen Spektre mit den Angaben aus der Literatur durchgeführt. Gleichzeitig wird der Einfluß der Extraktionsbedingungen auf die Qualität der Analyse und die Bildung der Degradationsprodukte der Pigmente dokumentiert.