

# Charakteristika lipofilních barviv s antioxidačními účinky v potravinách

Jitka Gajárková

---

Bakalářská práce  
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	<b>Jitka Gajárková</b>
Osobní číslo:	<b>T19101</b>
Studijní program:	<b>B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin</b>
Specializace:	<b>Technologie potravin</b>
Forma studia:	<b>Prezenční</b>
Téma práce:	<b>Charakteristika lipofilních barviv s antioxidačními účinky v potravinách</b>

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část

1. Charakteristika lipofilních barviv s antioxidačními účinky v potravinách.
2. Popis jednotlivých barviv, jejich vlastnosti a využití.
3. Přehled potravin s výskytem lipofilních barviv.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 3. Tábor: OSSIS, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3
- [2] PRUGAR, J. a kol. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Praha: VÚPS, 2008. 327s
- [3] VELÍŠEK, J. The chemistry of food. Chichester, West Sussex, 2014. ISBN 978-1-118-38384-1
- [4] MORTENSEN, A. Carotenoids and other pigments as naturalcolorants. Pure Appl. Chem. 2006, 78, 8, 1477-1491
- [5] KIOKIAS, S., PROESTOS, C., VARZAKAS, T. A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts. Curr. Res. Nutr. Food Sci. 2016, 4, SI 1, 25-37

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Soňa Škrovánková, Ph.D.**  
Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Robert Gál, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 25. února 2022

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Cílem bakalářské práce je charakteristika lipofilních barviv s antioxidačním účinkem. Práce je zaměřená na karotenoidy jako jednu z hlavních skupin lipofilních barviv, jejich rozdělení, strukturu, vlastnosti a výskyt v potravinách. V další části je popsán vznik volných radikálů, jejich přeměna, a nežádoucí účinky. Dále jsou zde charakterizovány karotenoidy jako antioxidanty a jejich antioxidační působení v potravinách. V poslední části práce jsou uvedeny metody stanovení těchto lipofilních barviv.

Klíčová slova: karotenoidy, barviva, antioxidanty, volné radikály, stanovení

## **ABSTRACT**

The aim of this bachelor thesis is lipophilic colorants with antioxidant effect characterization. The work is focused on carotenoids as one of the most important lipophilic colorants, their division, structure, properties and occurrence in food. Formation of free radical, their transformation and negative effects are also described. Characterisation of carotenoids as antioxidants and their antioxidant effect in foods is also given here. The determination of these lipophilic colorants is presented in the last part of the work.

Keywords: carotenoids, colorants, antioxidants, free radicals, determination

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce Ing. Soně Škrovánkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a pomoc při zpracování této práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>1 LIPOFILNÍ BARVIVA</b> .....	<b>10</b>
1.2 BIOSYNTÉZA KAROTENOIDŮ.....	11
1.3 STRUKTURA KAROTENOIDŮ.....	14
1.3.1 Karoteny .....	15
1.3.2 Struktura karotenů .....	15
1.3.3 Xantofyly.....	17
1.4 VÝSKYT KAROTENOIDŮ.....	19
1.4.1 Ovoce a zelenina .....	20
1.4.2 Rostlinné oleje.....	21
1.4.3 Potraviny živočišného původu .....	22
1.4.4 Řasy .....	22
1.4.5 Byliny, koření, květy, plody.....	23
1.4.6 Přírodní rostlinné extrakty.....	24
1.5 VLASTNOSTI KAROTENOIDŮ .....	24
<b>2 OXIDAČNÍ A ANTIOXIDAČNÍ REAKCE KAROTENOIDŮ</b> .....	<b>27</b>
2.2 OXIDAČNÍ, AUTOOXIDAČNÍ REAKCE .....	27
2.3 VLIV OXIDACE NA POTRAVINY S OBSAHEM KAROTENOIDŮ .....	29
2.4 ANTIOXIDANTY .....	29
2.5 ANTIOXIDAČNÍ REAKCE KAROTENOIDŮ .....	30
2.5.1 Zhášení singletového kyslíku karotenoidy .....	32
2.5.2 Působení karotenoidů proti volným radikálům .....	33
<b>3 METODY ANALÝZY KAROTENOIDNÍCH BARVIV</b> .....	<b>37</b>
3.1 SPEKTROMETRIE.....	37
3.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE (HPLC) .....	38
3.3 PAPIŘOVÁ A TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRFIE .....	40
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>42</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>44</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>48</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>50</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>51</b>

## ÚVOD

Lipofilní barviva jsou přírodní izoprenoidní sloučeniny, které jsou syntetizovány rostlinami a mikroorganismy. Lipofilní barviva jsou rozpustné v organických nepolárních rozpouštědlech jako je chloroform, hexan, benzen, aceton. K známým lipofilním barvivům patří chlorofyly a karotenoidy. Z mnoha důvodů důležitými lipofilními barvivy, které se nacházejí v potravinách, jsou karotenoidy, kterých se v přírodě vyskytuje více než 600 různých druhů. Z takového množství vynikají ty karotenoidy, které se vyznačují významnými vlastnostmi, jakými jsou antioxidační účinky kvůli pozitivnímu působení na zdraví člověka, a také jejich působení jako provitaminu vitamínu A, který je pro lidský organizmus esenciální.

Na počátku devatenáctého století byly karotenoidy zjištěny v paprice, šafránu, anattu a mrkvi. Postupem času díky rozvoji analytických metod na zjištění karotenoidů byly karotenoidy identifikovány pomocí kolonové chromatografie i ze zelených listů. Ve 30. letech 20. století Karrer a Khun objasnili struktury dvou významných karotenů,  $\beta$ -karotenu a lykopenu.

Mezi významné karotenoidy patří některé karoteny, konkrétně  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten,  $\gamma$ -karoten, lykopen, a xantofyly, např.  $\beta$ -kryptoxantin, lutein, zeaxantin, astaxantin, neoxantin, violaxantin, kantaxantin a citraxantin. Působí jako antioxidanty proti volným radikálům a singletovému kyslíku za vzniku stabilních nereaktivních produktů, nebo narušením řetězových reakcí volných radikálů.

Struktury karotenoidů jsou velmi podobné, avšak každá molekula působí v jiné oblasti a nachází se v jiných zdrojích, v jiném množství. Společným znakem je rozpustnost v tucích, jako přenašeč jim tedy v organismu slouží molekula lipoproteinu.

Karotenoidy se vyskytují hlavně v rostlinných zdrojích, ovoci a zelenině, květech, bylinách, ale jsou obsaženy i v některých živočišných zdrojích. Tvoří zde hlavní pigmenty zodpovědné za žluté, oranžové a červené zbarvení.



## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 LIPOFILNÍ BARVIVA

Barviva jsou sensoricky aktivní látky nacházející se v potravinách živočišného nebo rostlinného původu, určující jejich charakteristickou barvu. Vyskytují se i jako součást pigmentů řas, hub, lišejníků nebo mikroorganismů. Dělí se na barviva přírodní, syntetická barviva identická s přírodními a syntetická barviva. Přírodní barviva jsou seskupena do několika skupin. Nejdůležitější jsou tetrapyrroly, tetraterpenoidy a flavonoidy. Tetrapyrroly a flavonoidy jsou hydrofilní barviva rozpustné v polárních rozpouštědlech jako je voda nebo etanol. Tetraterpenoidy jsou lipofilní barviva rozpustné v nepolárních rozpouštědlech [1, 2, 3].

Lipofilní barviva patří do skupiny přírodních barviv. Mezi jejich základní vlastnosti patří rozpustnost v tucích. Lipofilní barviva nejsou rozpustné ve vodě, polárních rozpouštědlech, ale v organických nepolárních rozpouštědlech jako je chloroform, hexan, benzen, aceton [1, 3].

K nejznámějším přírodním lipofilním barvivům patří chlorofyly a karotenoidy. K lipofilním barvivům s antioxidačním účinkem nacházejícím se v potravinách patří především karotenoidy [1]. K významným karotenoidům, které se dle struktury dělí na karoteny a xantofyly, se řadí  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten,  $\gamma$ -karoten, lykopen,  $\beta$ -kryptoxantin, lutein, zeaxantin, astaxantin, neoxantin, violaxantin, kantaxantin a citraxantin [4].

### 1.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou přírodní barviva patřící do skupiny tetraterpenoidů. Jejich barevnost a další vlastnosti jsou dány řetězcem konjugovaných dvojných vazeb v jejich molekule. Vyskytují se jako žluté, oranžové a červené pigmenty, rozpustné v tucích, které jsou součástí rostlin, hub, řas, mikroorganismů a některých živočichů [1]. Karoteny jsou z organických nepolárních rozpouštědel lépe rozpustné v petroléteru, hexanu a toluenu. Xantofyly jsou lépe rozpustné v polárnějších rozpouštědlech, metanolu a etanolu [5].

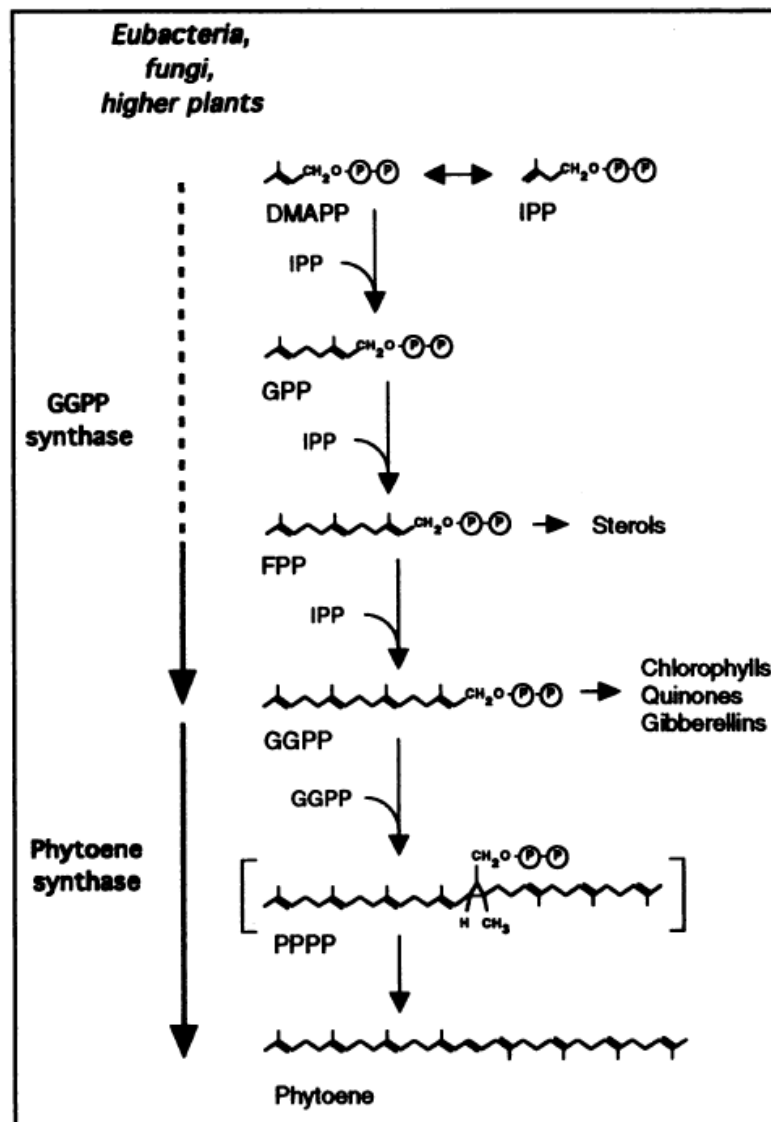
Vytvářeny jsou hlavně v rostlinách a mikroorganismech jako sekundární metabolity lipidů [2, 6]. V rostlinách jsou přítomny v submicelárních organelách (plastidech), které jsou spojeny s proteiny v chloroplastech. Ukládají se v krystalické formě nebo jako olejové kapičky v chromoplastech. Vyskytují se i v tělech živočichů, kteří jsou schopni karotenoidy metabolizovat, ale nevytvářejí je. Hromadí se zde v nezměněné nebo mírně pozměněné



nalezena hlavně v rostlinách. Biosyntéza probíhá v membránách, kde jsou zakódované potřebné proteiny. Tyto proteiny jsou syntetizovány hlavně v cytoplazmě.

Karotenoidy jsou produkovány z prekursoru, který obsahuje 5 uhlíků. Jde o izopentenyl pyrofosfát (IPP). Postupným navázáním konjugovaných dvojných vazeb vzniká prodloužený chromofor [7].

Za první reakci při biosyntéze karotenoidů je považován vznik fytoenu z obecné izoprenoidní biosyntetické dráhy (Obr. č. 3). Molekula fytoenu vzniká kondenzací dvou molekul s 20 uhlíky geranylgeranylpyrofosfátu (GGPP). Reakce je katalyzována fytoensyntázou. Molekula geranylgeranylpyrofosfát (GGPP) vzniká kondenzací čtyř izoprenoidních jednotek s 5 uhlíky, které vznikají z obecné izoprenoidní biosyntetické dráhy. Z aktivní formy kyseliny octové, kterým je tzv. acetylkoenzym A postupně vzniká acetoacetylkoenzym A, kyselina mevalonová a izopentenyl pyrofosfát (IPP), ten představuje tzv. aktivní izoprenoidní jednotku. Izopentenyl pyrofosfát se kondenzuje se svým izomerem dimethylalyl pyrofosfátem (DMAPP) na geranyl pyrofosfát (GPP). Kondenzací tohoto produktu s dalším izopentenyl pyrofosfátem vzniká produkt o 15 uhlících, kterým je farnesylpyrofosfát (FPP). Další kondenzací s izopentenyl pyrofosfátem vzniká geranylgeranylpyrofosfát [6, 8].



Obrázek 3 Vznik fytoenu [8]

Z fytoenu řadou cyklizačních a desaturačních reakcí vznikají ostatní karotenoidy. Tento karoten je bezbarvý a ve své struktuře obsahuje soustavu tří konjugovaných dvojných vazeb. Sérií desaturačních reakcí vždy odstraní dva vodíky ze sousedních pozic a zavedou dvojně vazby na alternativní strany systému konjugovaných dvojných vazeb. První barevný karoten je lykopen, ten vzniká desaturačními reakcemi, při kterých se rozšiřují konjugované dvojně vazby. Desaturace fytoenu na lykopen probíhá dvěma enzymy fytoen desaturázou (PDS) a zeta-karoten desaturázou (ZDS). Z fytoenu tak postupně fytoen desaturázou vzniká fytofluen, poté zeta-karoten. Enzymem zeta-karoten desaturázou vzniká ze zeta-karotenu neurosporen a poté lykopen. Během desaturace probíhá změna izomerie z cis izomeru na all-trans izomer. Lykopen je cyklický karoten, ze kterého cyklizací vzniká  $\alpha$ - a  $\beta$ -karoten.

Cyklizace je zahájena přijmutím protonů koncovými uhlíky a vytvořením šestičlenného kruhu. Cyklizace probíhá na jednom nebo obou koncích acyklického prekurzoru. Dle pozice dvojných vazeb v hexanovém kruhu vznikají tři typy kruhu a to  $\beta$ ,  $\epsilon$  a  $\gamma$ . Lykopenovou  $\beta$ -cyklázou (LCYB) vzniká monocyklický  $\gamma$ -karoten. Cyklizací druhého konce  $\gamma$ -karotenu  $\beta$ -kruhovou cyklázou vzniká bicyklický  $\beta$ -karoten. Lykopenovou  $\epsilon$ -cyklázou (LCYE) vzniká  $\delta$ -karoten. Za přítomnosti LCYB a LCYE vzniká  $\alpha$ -karoten [8].

Ze vzniklých karotenů vznikají hydroxylací xantofyly. Hydroxylace je katalyzována hydroxylázou. Hydroxy skupiny jsou navázány do pozic 3 a 3' uhlíku  $\beta$ - nebo  $\epsilon$ -kruhu. Navázáním hydroxy skupiny  $\beta$ -hydroxylázou (CHYB) v  $\beta$ -karotenu vzniká  $\beta$ -kryptoxantin. Navázáním druhé hydroxylové skupiny vzniká zeaxantin. Navázáním hydroxylové skupiny v  $\alpha$ -karotenu zprostředkované CHYB vzniká  $\alpha$ -kryptoxantin, navázání zprostředkované  $\epsilon$ -hydroxylázou (CHYE) vzniká  $\alpha$ -kryptoxantin, zeinoxantin nebo dihydroxylutein. Oxidací  $\beta$ -karotenu,  $\beta$ -kryptoxantinu, zeaxantinu a luteinu vznikají epoxidy. Navázáním 5,6-epoxy skupiny do 3-hydroxy- $\beta$ -kruhu zeaxantinu vzniká anteraxantin. Oxidace je katalyzována zeaxantin epoxidázou (ZEP). Oxidací druhého kruhu zeaxantinu vzniká violaxantin. Violaxantin je neoxantinsyntázou (NSY) přeměněn na neoxantin [5].

### 1.3 Struktura karotenoidů

Struktura molekul karotenoidů určuje jejich fyzikální a chemické vlastnosti, jejich biologické funkce a účinky. Většina karotenoidů se řadí mezi terpenoidy se 40 uhlíky, které obsahují isopreny. Další společný znak je dlouhý konjugovaný řetězec dvojných vazeb v centrální části molekuly a symetrie kolem centrální dvojně vazby. Tyto základní struktury jsou modifikovány různými způsoby. Tímto způsobem může být vytvořeno až 600 sloučenin, v tomto případě různé karotenoidy. Záleží na celkové molekulární geometrii, která je nutná pro správnou polohu a orientaci, tak aby karotenoid zapadl do buněčných submicelárních struktur a mohl efektivně fungovat. Molekulární geometrie zahrnuje velikost, tvar a přítomnost funkčních skupin. Fotochemické vlastnosti a chemickou reaktivitu určuje systém konjugovaných dvojných vazeb, které pro svou správnou funkci interagují s dalšími molekulami [9].

Většina karotenů se vyskytují ve formě *cis* (Z) a *all-trans* (E) izomerů. *All-E* izomery jsou lineární a *Z*-izomery jsou ohnuté. Jejich schopnost zapadat do struktury a interagovat s enzymy se tedy liší. *Z*-izomery oproti *all-E* izomerům mají nižší bod tání, obtížněji krystalizují, snadněji jsou absorbovány a transportovány [5].

Karotenoidy obsahují 3 až 15 konjugovaných dvojných vazeb. Nejvíce světelného záření absorbují při vlnové délce mezi 400 až 500 nm [8]. Karotenoidy jsou tedy pestrobarevné. Jde o přechod jednoho z vazebných  $\pi$ -elektronů systému konjugované dvojně vazby, který je povýšen na neobsazený antivazebný orbital  $\pi^*$  [9].

Dle struktury se karotenoidy rozdělují na dvě hlavní skupiny. První skupinou jsou karoteny, které ve své struktuře obsahují pouze uhlík a vodík, a druhou jsou xantofyly, obsahující uhlík, vodík a kyslík [2].

### 1.3.1 Karoteny

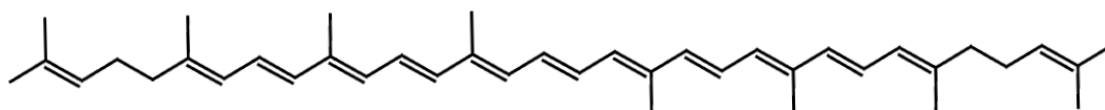
Karoteny jsou obsaženy v rostlinách, řasách a houbách. Hlavními formami karotenů jsou  $\alpha$ - a  $\beta$ -karoteny, mezi další formy karotenů patří fytoen, fytofluen, zeta-karoten,  $\gamma$ -karoten, lykopen, které jsou obsaženy v menším, až nedetekovatelném množství. Fytoen, fytofluen, zeta-karoten,  $\gamma$ -karoten a lykopen slouží hlavně jako prekurzory pro biosyntézu  $\alpha$ - a  $\beta$ -karotenů [2].

### 1.3.2 Struktura karotenů

Nejjednodušším karotenem je acyklický polynenasycený uhlovodík lykopen. Z lykopenu pak vznikají hydroxyderiváty např. 3,4-dehydroxylykopen, neurosporen, zeta-karoten, fytofluen nebo fytoen. Další karoteny vznikají z acyklických  $\psi$ -karotenů a to enzymově katalyzovanou cyklizací. Při katalyzaci vznikají  $\alpha$ - nebo  $\beta$ -jononové struktury. Struktura s  $\alpha$ -jononovým cyklem se nazývá  $\epsilon$ -karoten, a s  $\beta$ -jononovým cyklem jde o  $\beta$ -karoten. Karoteny s  $\beta$ -jononovým cyklem jsou prekurzory retinolu, řadí se tedy mezi retinoidy [1].

### Lykopen

Strukturou patří mezi nenasycené acyklické karotenoidy, který je tvořen 8 izoprenovými jednotkami. Jeho molekula má 40 atomů uhlíku s 11 lineárními konjugovanými a 2 nekonjugovanými dvojnými vazbami (obr. č. 4). Lykopenová struktura je velmi citlivá na vyšší teplotu, oxidační procesy, působení kyselin a kovových iontů [4].



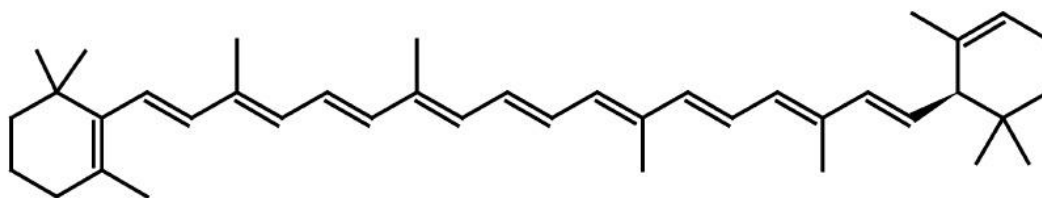
Obrázek 4 Struktura lykopenu [2]

Způsobuje červenou pigmentaci. Červená barva lykopenu je dána dlouhým chromoforem v polyenovém řetězci, ten dokáže absorbovat většinu viditelného světelného záření. Barva také závisí na jeho izomerní formě. All-trans izomery odpovídají červené barvě a tetra-cis izomery odpovídají oranžové barvě [3,4].

Uplatňuje se jako potravinářské barvivo, při výrobě kosmetiky, a zároveň zde plní funkci antioxidantu. Díky biologickým účinkům lykopenu a jeho zapojení při některých onemocněních má dobré předpoklady pro budoucí využití ve zdravotnictví [3, 4].

### $\alpha$ -karoten

Jedná se o bicyklickou molekulu se 40 uhlíky. Na jednom konci je navázán  $\alpha$ -iononový kruh a na druhém konci je  $\beta$ -iononový kruh (obr. č. 5). Z jeho molekuly lze syntetizovat vitamin A. Jako antioxidant působí proti singletovému kyslíku a volným radikálům [5].

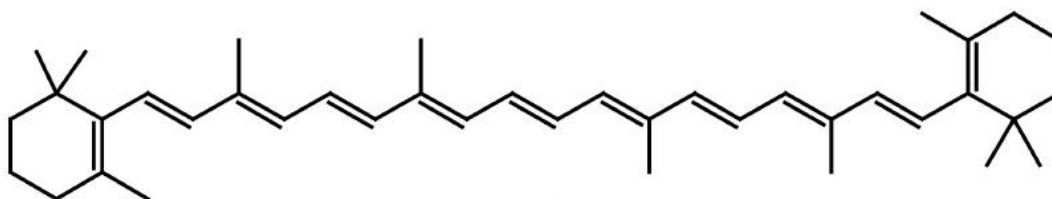


Obrázek 5 Struktura  $\alpha$ -karotenu [2]

### $\beta$ -karoten

Jedná se o v přírodě nejvíce se vyskytující provitamin vitamínu A. Jeho molekula se průběhem metabolických pochodů může rozštěpit na 2 molekuly vitamínu A. Obvykle je doprovázen  $\alpha$ -karotenem a  $\gamma$ -karotenem.

Struktura je tvořena dvěma  $\beta$ -iononovými kruhy, které jsou spojeny čtyřmi izoprenovými jednotkami (obr. č. 6). Nejčastěji se vyskytují jako all-trans izomery, které jsou stářejší. Jako antioxidační činidlo působí proti singletovému kyslíku a peroxidovým radikálům. Pozitivně může ovlivňovat peroxidaci lipidů *in vivo* [4].



Obrázek 6 Struktura  $\beta$ -karotenu [5]



Při experimentálních stanoveních zaměřených na zjišťování antioxidační účinnosti bylo zjištěno, že  $\beta$ -karoten působí proti alkylovým, alkoxylovým a také alkyperoxidovým radikálům [5].

### 1.3.3 Xantofyly

Xantofyly vznikají jako produkty biochemické oxidace karotenů, v jejich struktuře je obsažen kyslík vázaný dvěma jednoduchými kovalentními vazbami. Mezi nejběžnějšími látkami jsou kryptoxantiny, což jsou monohydroxysubstituované deriváty alicyklických karotenů [1]. Nacházejí se v rostlinných pletivech a jedná se především o  $\alpha$ -kryptoxantin odvozený od  $\alpha$ -karotenu a  $\beta$ -kryptoxantin odvozený od  $\beta$ -karotenu.

Mezi další xantofyly patří lutein, bixin, zeaxantin, astaxantin, kapsantin a apokarotenoidy [2].

#### 1.1.1 Struktura xantofylů

Dle struktury se xantofyly dělí dle obsahujících substituentů. Skupiny obsahující kyslík neboli hydroxylové, např.  $\beta$ -kryptoxantin, keto, např. kantaxantin, epoxidové, např. violaxantin a aldehydové, např.  $\beta$ -citraurin. Skupiny obsažené ve struktuře ovlivňují polaritu, rozpustnost a chemické chování xantofylů [5].

#### Astaxantin

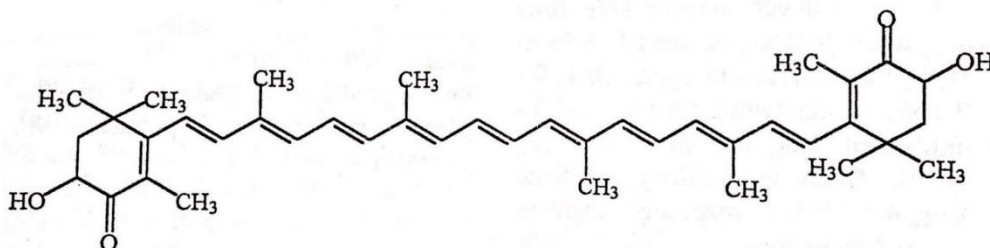
Jde o červený pigment s antioxidačním účinkem. Zachycuje singletový kyslík a volné radikály, které pocházejí z metabolických procesů v buňkách nebo z látek znečišťujících životní prostředí. Vzhledem k obsahu kyslíku v jeho struktuře se nejedná o provitamin vitamínu A. Koncentrace tohoto karotenoidu není v savčích tkáních tak vysoká, aby mohl působit jako antioxidant *in vivo* [6].

V membránách snižuje oxidaci lipidů a tím podporuje stabilitu membrán a zabraňuje tak difúzi a bimolekulárním radikálovým reakcím. Zvyšuje se tak antioxidační účinek. Při zkoumání syntetického astaxantinu, je tato forma schopna chránit DNA před reaktivní formou dusíku. Syntetický astaxantin má silné fotoprotektivní účinky na lidské dermální fibroblasty před středními dávkami UV-A [6].

Struktura je odvozena od  $\beta$ -karotenu a skládá se z polyenového uhlíkatého řetězce s devíti konjugovanými dvojnými vazbami, na jehož obou  $\beta$ -iononových koncích jsou navázané hydroxy a keto skupiny (obr. č. 7). Většina astaxantinu se vyskytuje ve stabilní formě all-

trans izomeru. Díky polární a nepolární části struktury má schopnost prostupovat fosfolipidovou dvouvrstvou, která se nachází v buněčných membránách [7].

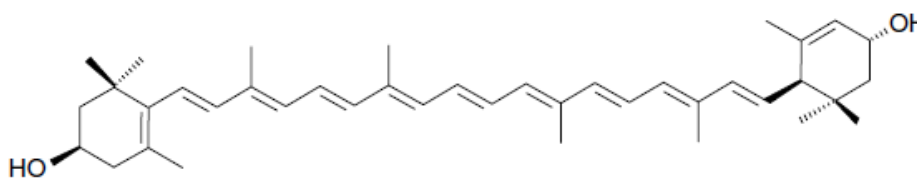
Byl prokázán jeho pozitivní účinek jako prevence proti srdečním chorobám a na ochranu kůže před účinkem UV zářením [7].



Obrázek 7 Strukturální vzorec astaxantinu [1]

### Lutein

Jedná se o žluté rostlinné barvivo. Struktura se skládá z polyenového řetězce s 40 uhlíky tvořený 8 izoprenovými jednotkami. Na jednom konci lineárního řetězce se nachází  $\beta$ -iononový kruh a na druhém konci se nachází  $\epsilon$ -iononový kruh. Lutein je izomerem zeaxantinu, jejich struktura se tak liší pouze umístěním jedné dvojné vazby na jednom iononovém konci (obr. č. 8). Zeaxantin má dvojnou vazbu na 5 uhlíku a lutein na 4 uhlíku. V přírodě se může nacházet až v osmi stereoizomerních formách, a to díky obsahu třech chirálních center. Rostlinné materiály obsahují lutein ve formě all-trans-izomeru. Je přítomen ve dvou formách, a to ve volné formě a ve formě esteru luteinu s masnými kyselinami [10, 11]

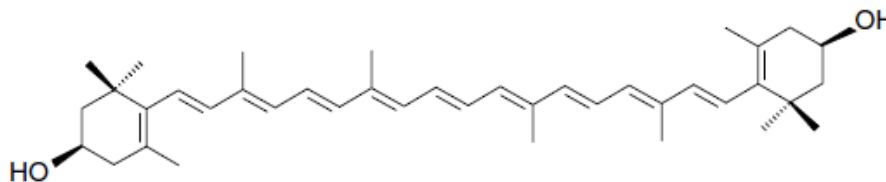


Obrázek 8 Strukturální vzorec luteinu [5]

Patří mezi účinné antioxidanty, působí proti reaktivním formám kyslíku, neutralizuje volné radikály vznikající např. působením ultrafialového záření na oční sítnici a zabraňuje negativním změnám na žluté skvrně, které bývají příčinou oslepnutí. Lutein se využívá i jako potravinářské barvivo a označuje se kódem E161b [10].

### Zeaxantin

Strukturou se jedná o izomer xantofylu luteinu, jejich vzorec se liší umístěním dvojné vazby. Skládá se z polyenového řetězce obsahujícího 40 uhlíků, tvořený 8 izoprenovými jednotkami (obr. č. 9).



Obrázek 9 Strukturální vzorec zeaxantinu [5]

Na obou koncích lineárního řetězce se nacházejí  $\beta$ -iononové kruhy. Obsahuje dvě chirální centra a vyskytuje se ve třech stereoizomerních formách. Jako molekula patřící do xantofylů obsahuje kyslík vázaný dvěma kovalentními vazbami. Jedná se o antioxidant, spolu s luteinem a jejich metabolitem meso-zeaxantinem, jsou koncentrovány v sítnici oka a působí tak jako ochrana před reaktivními formami kyslíku [11, 12].

### Apokarotenoidy

Jedná se o malou skupinu xantofylů, které vznikají štěpením molekul karotenoidů. Ve své molekule obsahují méně než 40 atomů uhlíku. Mezi biologicky aktivní apokarotenoidy patří vitamin A<sub>1</sub> (all-trans-retinol),  $\beta$ -citraurin, který ve své struktuře obsahuje 30 atomů uhlíku, bixin, který ve své struktuře obsahuje 22 atomů uhlíku, nebo krocetin, který ve své struktuře obsahuje 20 atomů uhlíku [10].

## 1.4 Výskyt karotenoidů

Karotenoidy tvoří hlavní barvivo v některých druzích ovoce a zeleniny. Toto barvivo se vyskytuje i v některých živočišných tkáních a řasách. Živočiškové karotenoidy přímo nesyntetizují, přijímají je z potravy. Jejich množství v rostlinách závisí na faktorech jako je sezóna, fáze růstu a stupeň zralosti nebo následně způsob zpracování. Dle obsahu barviva je možno posoudit stupeň zralosti ovoce nebo zeleniny. Množství se také dáno druhem ovoce a zeleniny, mezi druhy se liší až o stovky mikrogramů [1, 2].

Během vývoje zrání plodu dochází k zásadním změnám obsahu karotenoidů. Regulace biosyntézy karotenoidů byla popsána na rajčatech. Na začátku zrání jsou plody zelené a jejich obsah karotenoidů je totožný s karotenoidy obsahujícími v zelených listech této

rostliny, tedy největší zastoupení má  $\beta$ -karoten, poté lutein a violaxantin. Při dozrávání plodů se zvýší obsah lykopenu, a to až 500krát [13].

Některé karotenoidy, jako je např. lykopen se nevyskytuje v potravinách ve větší míře. Barvou se ale jedná o převládající karotenoid.

Nejrozšířenější ze všech karotenoidů je  $\beta$ -karoten, v potravinách je obsažen jako hlavní, nebo vedlejší barvivo. Často je doprovázen  $\alpha$ -karotenem a  $\gamma$ -karotenem. Méně se vyskytuje  $\delta$ -karotenu [5].

#### 1.4.1 Ovoce a zelenina

V ovoci se většinou nachází směs vícero karotenoidů, karotenů i xantofylů, a jsou obsaženy v menší či větší míře. Karotenoidy se nachází hlavně v pomerančích, mangu, papáji, sladkém melounu a meruňkách. V pomerančích je nejvíce zastoupeno množství kryptoxantinu a to do množství  $7,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Ve větší míře se zde nachází i luteoxantin a auroxantin, tedy převážně xantofyly. V mangu, sladkém melounu a meruňkách je nejvíce zastoupen  $\beta$ -karoten a to až  $27 \text{ mg.kg}^{-1}$  v mangu,  $3 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sladkém melounu a  $64 \text{ mg.kg}^{-1}$  v meruňkách. Ostatní karotenoidy jsou zde ve stopovém množství. V papáji se nachází stopové množství  $\alpha$ - a  $\beta$ -karotenu [1, 6].

Rozšířeným karotenoidem je zeta-karoten. Vyskytuje se sice v nízkém množství, ale ve všech zdrojích, které obsahují karotenoidy. Jako hlavní pigment se vyskytuje v exotickém ovoci mučence a karambole. Dalšími rozšířenými a nejvíce vyskytovanými karotenoidy jsou fytoen a fytofluen. Vyskytují se však jako nebarevné látky [5].

V zelenině se nachází více karotenů, v množství větším, nebo stopovém. Mezi hlavními druhy zeleniny, kde se karotenoidy vyskytují patří mrkev, rajčata, listová zelenina a paprika. Mrkev obsahuje jako hlavní karotenoid  $\beta$ -karoten a to až  $120 \text{ mg.kg}^{-1}$  [1]. Doporučená denní dávka  $\beta$ -karotenu není stanovena, běžně se ale udává doporučení ve výši  $2\text{-}4 \text{ mg.den}^{-1}$ . Tato dávka je nezbytná pro dosažení koncentrace  $\beta$ -karotenu v séru ve výši  $0,4 \text{ nmol.l}^{-1}$ . Takové množství snižuje riziko ischemické srdeční choroby (ICHS). Tepelné zpracování potravin zvyšuje využitelnost  $\beta$ -karotenu v organismu [4]. V mrkvi se dále vyskytuje  $\alpha$ -karoten,  $\gamma$ -karoten a lutein [1].

Rajčata jako hlavní karotenoid obsahují lykopen. Lykopen v rajčatech tvoří až 90 % všech karotenoidů. V malém množství se zde vyskytuje zeta-lykopen nebo  $\beta$ -karoten.

V listové zelenině je obsažen  $\beta$ -karoten a směs různých xantofylů. Ve špenátu jako v listové zelenině je kromě  $\beta$ -karotenu, obsažen i lutein, violaxantin nebo neoxantin [1].

V paprice je jako hlavní karotenoid kapsantin a to až  $1200 \text{ mg.kg}^{-1}$ , tvoří zde až polovinu množství karotenoidů. Kapsantin obsahuje oranžovo-červené pigmenty. V menším množství se v paprice nachází kapsorubin, violaxanthin, zeaxanthin,  $\beta$ -kryptoxantin a  $\beta$ -karoten [2]. Podrobný přehled množství karotenoidů ve vybraném druhu ovoce a zeleniny je uvedeno v tabulce č. 1.

Mezi potraviny, ve kterých se zeaxantin vyskytuje patří špenát, kapusta, salát, v brokolici, hrášku nebo zelené petrželi. V živočišných zdrojích se vyskytuje ve vaječném žloutku. Ve vysokém množství se vyskytuje také v kukuřici, nebo tvrdé pšenici [12].

Tabulka 1 Složení a obsah hlavních karotenoidů ovoce a zeleniny [1]

Karotenoidy	Obsah v $\text{mg.kg}^{-1}$						
	meruňka	mango	pomeranč	mrkev	špenát	rajče	paprika
<b>Karoteny</b>							
lykopen	0,1					16-750	
neurosporen						3	
zeta-karoten	0,4	stopy	0,5			8,4	
fytofluen	0,3		1,3			5,1	
fytoen	0,6		0,4			6	
$\beta$ -karoten	64	4,9 - 27	0,1 - 0,4	46 - 103	33 - 89	2,8 - 5,8	51 - 275
$\alpha$ -karoten			0,1 - 0,2	22 - 49	stopy		
$\gamma$ -karoten	0,2			6,3 - 27		0,4 - 1,6	
<b>Xantofyly</b>							
$\beta$ -kryptoxantin			0,1 - 7,1				36 - 79
$\alpha$ -kryptoxantin		0,3 - 1,1					
zeaxantin			0,5				40 - 125
lutein			0,3	1,1 - 5,6	42-81	0,4 - 1,3	
atheraxantin			0,6				33-44
violaxantin		0,7-3,0	0,7		74		53-98
neoxantin					24		174
kapsantin							523 - 1207

#### 1.4.2 Rostlinné oleje

Karotenoidy jsou obsaženy v rostlinných olejích. Nejvyšší obsah karotenoidů z rostlinných olejů má palmový olej, ten se získává ze semene palmy olejně. Důsledkem obsahu  $\alpha$ - a  $\beta$ -karotenu se nerafinovaný olej jeví jako světle oranžový [1].

### 1.4.3 Potraviny živočišného původu

Živočiškové nedokážou karotenoidy syntetizovat, přijímají je tedy potravou. Karotenoidy přítomné v potravinách živočišného původu jsou brány jako sekundární. V tučných ptáků se vyskytuje lutein, zeaxantin a v malém množství  $\beta$ -karoten. Stejně karotenoidy se vyskytují také ve vaječném žloutku. Hlavním pigmentem lososovitých ryb a korýšů, jako jsou krevety, krabi a raci je červený astaxantin [1].

### 1.4.4 Řasy

Řasy jsou fotosyntetizující rostliny s obsahem karotenoidů. Dle barvy se rozdělují na zelené, červené a hnědé. Nejvíce karotenoidů se nachází v hnědých mořských řasách, a to v druzích *Cystoseira hakodatensis*, *Sargassum horneri* (obr. č. 10) a *Undaria pinnatifida*. Obsah karotenoidů v hnědých řasách je uveden v tabulce č. 2. Mezi červené mořské řasy s obsahem karotenoidů patří *Gracilaria vermiculophylla* (obr. č. 11), *Grateloupia asiatica* a *Grateloupia livida*. Obsah karotenoidů v červených řasách je uveden v tabulce č. 3 [14].

Tabulka 2 Obsah karotenoidů v hnědých řasách [14]

Řád	Rod	Druh	Fucoxantin mg.g <sup>-1</sup>
Fucales	<i>Sargassaceae</i>	<i>Sargassum horneri</i>	2,4
		<i>Cystoseira hakodatensis</i>	1,3
Laminariales	<i>Alariaceae</i>	<i>Undaria pinnatifida</i>	2,3

Tabulka 3 Obsah karotenoidů v červených řasách [14]

Řád	Rod	Druh	Fucoxantin $\mu\text{g.g}^{-1}$	Lutein $\mu\text{g.g}^{-1}$	Zeaxantin $\mu\text{g.g}^{-1}$
Gracilaries	<i>Gracilariaceae</i>	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	9,1	ND	80,2
Halymeniales	<i>Halymeniaceae</i>	<i>Grateloupia asiatica</i>	1,5	10,4	1,1
		<i>Grateloupia livida</i>	3,5	9,3	1,0

Obrázek 10 *Sargassum horneri* [15]Obrázek 11 *Gracilaria vermiculophylla* [16]

#### 1.4.5 Byliny, kořeni, květy, plody

Šafrán je zdroj krocínu, ten se jeví jako žlutooranžový pigment. Základem krocínu je krocetin, ten má červenou barvu. Krocín se v šafránu vyskytuje jako ester s gentiobiózou, disacharidem složeným z 2 glukóz. Šafrán se používá jako koření (obr. č. 12).



Obrázek 12 Šafrán [17]

Okvětní lístky měsíčku lékařského obsahují flavoxantin. V šípku je jako hlavní pigment obsažen lykopen, spolu s 3-hydroxy- $\gamma$ -karotenem [1].

Hlavními pigmenty koření červené papriky jsou kapsantin a kapsorubin, které v podobě v oleji rozpustného oleoresinu jsou extrahovány z plodů *Capsicum annuum* nebo *Capsicum frutescens* [5].

Xantofyly a  $\beta$ -karoten se nacházejí také v okvětních lístcích hořce žlutého (*Gentiana lutea*). Hořec žlutý je vytrvalá bylina [18].

#### 1.4.6 Přírodní rostlinné extrakty

Karotenoidy jsou dostupné v produktech i v koncentrované formě. Tyto výrobky se používají jako přírodní barvivo, nebo antioxidační činidla. Legislativou je stanoveno, která přírodní barviva lze využít, a také specifikuje množství, které může být použito. Jako přídatné látky se tyto koncentrované rostlinné extrakty označují E číslem. V rámci EU mají:  $\beta$ -karoten označení E 160a, bixin označení E 160b, extrakt z papriky má označení E 160c, lykopen označení E 160d a lutein označení E 161b [2].

Takovýmto příkladem je přírodní extrakt karotenů, jedná se o produkt získaný z mrkve, a to v podobě extraktu, silice (oleje) a krystalické látky. Hlavní složky těchto produktů tvoří  $\alpha$ - a  $\beta$ -karoteny. Další extrakt se vyrábí z papriky v podobě prášku nebo silice. Hlavní složení tohoto produktu tvoří kapsantinové karotenoidy. Jiným výrobkem je extrakt z rajčat obsahující lykopen. Tento výrobek má průmyslové využití a získává se z odpadu při zpracování rajčat. Z měsíčku lékařského se vyrábí rafinovaný extrakt lykopenu, který se využívá jako přírodní žluté potravinářské barvivo. Ze semene annatto se získávají přípravky používané k obarvení potravin s vyšším obsahem tuku, např. sýry, máslo a margarín. Hlavní složku tvoří xantofyl bixin [6].

### 1.5 Vlastnosti karotenoidů

Karotenoidy mají významnou funkci ve fyziologii rostlinné říše, podílejí se na fotosyntéze a antioxidačních reakcích. U rostlin, ve kterých probíhá fotosyntéza, přispívají k přenosu energie. Přímá funkce však nebyla ještě objasněna. Funkce karotenoidů je do jisté míry ovlivněna strukturou a počtem dvojných vazeb.

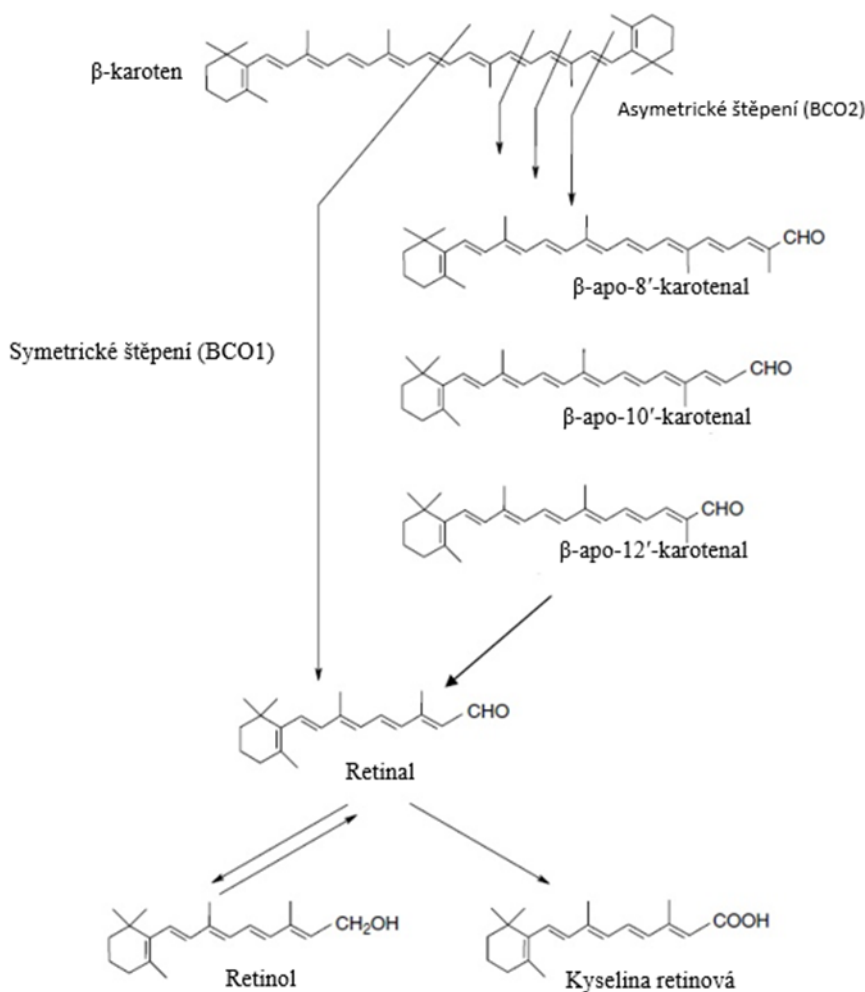
Během fotosyntézy absorbují energii a světlo mezi 400 a 500 nm, a absorbovanou zářivou energii pak přenášejí na molekuly chlorofylu. Poskytují fotooxidační ochranu proti účinkům singletového kyslíku a radikálů chlorofylu [2, 8, 10].



Karotenoidy vzhledem k obsahu konjugovaných dvojných vazeb jsou barevné. Jde o přechod jednoho z vazebných  $\pi$ -elektronů systému konjugované dvojně vazby povýšen na neobsazený antivazebný orbital  $\pi^*$  [9]. Aby karotenoidy měli patrnou barvu je potřeba alespoň 7 konjugovaných dvojných vazeb. Tolik konjugovaných dvojných vazeb má zeta-karoten, který je žlutý. Fytoen obsahuje 3 konjugované dvojně vazby a fytofluen obsahuje 5 konjugovaných dvojných vazeb. Tyto karotenoidy jsou tedy bezbarvé [5].

Mezi významné vlastnosti karotenoidů patří antioxidační účinky, díky kterým se stávají důležitou součástí lidské stravy. Jejich ochranný účinek pozitivně napomáhá proti oxidaci lipidů, a tím i proti vzniku a výskytu některých onemocnění jako kardiovaskulární onemocnění, šedý zákal, rakovina, a zdravotním komplikacím spojeným se stárnutím [6].

Produktem metabolismu některých karotenoidů je vitamin A, označují se tedy jako provitaminy tohoto vitamínu [6]. Mezi provitaminy vitamínu A patří  $\alpha$ - a  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -kryptoxantin, lutein,  $\gamma$ -karoten a zeaxantin [2].



Obrázek 13 Štěpení  $\beta$ -karotenu [5]

Vitamin A vzniká štěpením molekuly karotenoidu. Z jedné molekuly karotenoidu vzniká tedy alespoň jedna molekula retinolu ( $A_1$ ) nebo kyselina retinová. Molekula vitaminu A se skládá z poloviny molekuly  $\beta$ -karotenu a hydroxy skupinou na konci polyenového řetězce. Štěpení nastává ve střevních absorpčních buňkách a probíhá dvěma cestami. Symetrickým a asymetrickým štěpením. Průběh štěpení je na obr. č. 13.

Štěpení  $\beta$ -karotenu probíhá nejčastěji symetrickým štěpením. Molekula  $\beta$ -karotenu se symetricky rozštěpí na centrální 15-15' dvojnou vazbu na dvě molekuly retinalu. Reakce je katalyzována enzymem  $\beta$ -karoten 15,15'-monooxygenáza (BCO1). Retinal se enzymem reduktáza vratně přemění na retinol nebo nevratně oxiduje na kyselinu retinovou enzymem retinol dehydrogenáza. Při asymetrické cestě nastává postupné štěpení od centrální 15-15' dvojnou vazby za vzniku oxidačních produktů apokarotenaly. Reakce jsou katalyzovány enzymem  $\beta$ -karoten 9,10'-dioxigenáza (BCO2). Apokarotenaly vznikají s určitou délkou řetězce, nejprve  $\beta$ -apo-8'-karotenal, poté  $\beta$ -apo-10'-karotenal a  $\beta$ -apo-12'-karotenal. Poté vzniká retinal, který se dále mění na retinol nebo kyselinu retinovou dle symetrického štěpení [5].

Karotenoidy jsou si vzájemně podobné, ale každý z nich specificky působí na určitou tkáň. Při nízkém obsahu kyslíku, působí vyšším antioxidačním účinkem. Karotenoidy působí i proti reaktivnímu singletovému kyslíku  $^1O_2$ . Ten vzniká vybuzením atmosférického kyslíku, který se v běžném stavu nachází jako tripletový kyslík  $^3O_2$ . Singletový kyslík  $^1O_2$  reaguje s dvojnou vazbou nenasycených sloučenin např. lipidů [10].

## 2 OXIDAČNÍ A ANTIOXIDAČNÍ REAKCE KAROTENOIDŮ

Vlivem několika faktorů dochází k oxidaci, degradaci a izomeraci karotenoidů. Mezi tyto faktory patří účinky enzymů ze skupiny oxidoreduktáz, světla, tepla, kyslíku a hydroxoniových iontů. Stabilní jsou karotenoidy ve formě karotenoproteinů. Nestabilní jsou xantofyly obzvláště ve formě epoxidů karotenoidů [1].

### 2.1 Volné radikály

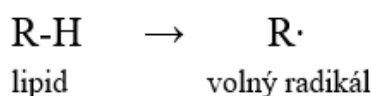
Volné radikály jsou molekuly, atomy a ionty vznikající v organismech při metabolických pochodech. U lidí jsou volné radikály spojeny s příčinou mnoha onemocnění např. onemocnění centrálního nervového systému nebo Parkinsonovu chorobu. Jejich negativní účinky jsou potlačovány působením antioxidantů [19]. V potravinách volné radikály vznikají oxidací lipidů. Ovlivňují chuť, barvu, nutriční hodnotu a trvanlivost potravin. Oxidace se urychluje narušením struktury potravin, a to mletím nebo tepelným zpracováním. [20]

### 2.2 Oxidační, autooxidační reakce

Karotenoidy se zapojují do odstraňování radikálů v lipidech. Volné radikály vznikají oxidací lipidů. Do oxidace je zapojen uhlovodíkový řetězec nasycených a nenasycených mastných kyselin. Oxidační reakce lipidů v potravinách probíhá několika způsoby. Autooxidací vzdušným kyslíkem  $^3\text{O}_2$ , oxidací hydroperoxydu nebo peroxidem vodíku, oxidací singletovým kyslíkem  $^1\text{O}_2$  (fotooxidace), oxidace katalyzovaná enzymy (lipoxygenázami), oxidace těžkými kovy ve vyšší valenci [21].

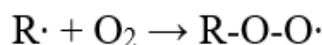
Při autooxidaci se jedná o oxidaci způsobenou zpracováním nebo skladováním potravin. Jedná se o sled radikálových řetězových reakcí, které probíhají ve třech stupních. Iniciační, propagační a terminační reakce. Při iniciačních reakcích je za přísunu energie homolyticky štěpena vazba uhlík - vodík. Štěpením vzniká volný vodíkový radikál ( $\text{H}\cdot$ ) a volný radikál ( $\text{R}\cdot$ ). Štěpení nastává i reakcí s jinými volnými radikály, nebo reakcí s kovy. Dalším stádiem je propagační fáze. Reaktivní volný radikál ( $\text{R}\cdot$ ) reaguje s molekulou kyslíku ( $\text{O}_2$ ) za vzniku velmi reaktivního peroxidového radikálu ( $\text{R-O-O}\cdot$ ). Peroxidový radikál reaguje s uhlovodíkovým řetězcem, kde se odštěpí vodík. Produktem je hydroperoxid ( $\text{R-O-O-H}$ ) a reaktivní volný radikál lipidu ( $\text{R}\cdot$ ). Tvorba peroxidového radikálu a hydroperoxidu se může opakovat. Schéma autooxidační řetězové reakce lipidů je na obr. č. 14.

- Iniciační reakce

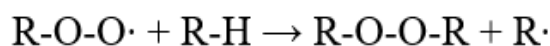


- Propagační reakce

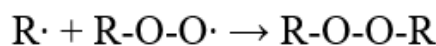
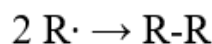
tvorba peroxylového radikálu



tvorba hydroperoxidu



- Terminační reakce



Obrázek 14 Autooxidační reakce lipidů [21]

Rychlost autooxidace udává rychlost vzniku peroxidového radikálu. Reakční řetězec je ukončen vznikem stabilního neradikálového produktu, kdy při vysoké koncentraci reaktivních volných radikálů spolu tyto radikály reagují [21].

Oxidace probíhá radikálovým i neradikálovým mechanismem. Při oxidaci peroxidem vodíku se jedná o neradikálový mechanismus. Peroxid vodíku vzniká v potravinách přirozenými procesy. Reakcí vzniká epoxid, který se hydrolyzuje za vzniku dihydroxyhyderivátu.

Potraviny během skladování a úpravy mohou být oxidovány singletovým kyslíkem ( $^1\text{O}_2$ ), který vzniká vybuzením běžného tripletového kyslíku ( $^3\text{O}_2$ ). Přeměna vzniká za přítomnosti fotosenzibilizátorů a záření. Fotosenzibilizátory přenáší absorbovanou energii na tripletový kyslík a tím vzniká singletový kyslík. Singletový kyslík reaguje s dvojnou vazbou nenasycených lipidů a dalších nenasycených sloučenin. Navázáním na dvojnou vazbu mastných kyselin vzniká nestabilní peroxidová sloučenina nebo šestičlenný kruh. Tyto produkty se rozkládají na hydroperoxydy [21].

Enzymovou oxidaci způsobují lipoxygenázy, ty jsou přítomny ve všech tepelně neupravených potravinách. Tyto enzymy katalyzují oxidaci esenciálních mastných kyselin na hydroperoxydy [21].

### 2.3 Vliv oxidace na potraviny s obsahem karotenoidů

Při degradaci karotenoidů dochází k nežádoucí změně barvy potravin. Mezi ochranné kroky před degradací patří inaktivace enzymů teplem, skladování v inertní atmosféře nebo přítomnost antioxidantů. I přes tato opatření může dojít k degradaci karotenoidů. Do potravin se proto mohou přidávat přírodní syntetické karotenoidy [1].

Rizikovými potravinami, ve kterých nejčastěji dochází k degradaci patří džusy, syrové zeleninové protlaky, tepelně opracovaná zelenina, zahuštěné rajčatové protlaky a skladované potraviny obsahující bixin.

Karoteny jsou stabilní při šetrném tepelném opracování zeleniny, jejich obsah se výrazně nemění. Mírné snížení obsahu nastává u xantofylů a k velkým ztrátám dochází u epoxidů xantofylů, jako je tatraxantin a violaxantin. Po 3-10 min. vaření dochází k 35-100 % ztrátám u taraxantinu a 35-65 % ztrátám u violaxantinu. Po 1 hodině vaření nastává úplná degradace. V syrovém špenátovém protlaku dochází k degradaci karotenoidů již během 20 minut. Ztráta pigmentu se pohybuje až okolo 50 %. Na degradaci se podílejí lypoxygenázy, které lze inaktivovat blanšírováním. Při skladování špenátu v mrazírenských podmínkách se obsah karotenoidů výrazně nezmění [1].

Sušením a mletím paprikových lusků se obsah pigmentů sníží na polovinu. Karotenoidy degradují, zejména nestabilní  $\beta$ -karoten. Kapsantin se výrazně nezmění, při skladování za přístupu vzduchu oxiduje na diketon kapsanton. Kapsanton se dále rozkládá na  $\beta$ -citraurin, dále na 3-oxo- $\beta$ -apo-8'-karoten, až na další nízkomolekulární produkty. Výsledkem rozkladu je změna barvy z červené na hnědou. Podobné reakce nastávají i u sušených a zahuštěných rajčatových výrobků, např. u sušených polévek, protlaků a kečupů. V čerstvých plodech se nachází 5,6-epoxylykopen, v kyselém prostředí nastane otevření epoxidového cyklu a vznikne 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrolykopen.

Skladováním se přírodní bixin za přístupu světla mění na all-trans-bixin, hydrolýzou se mění na all-trans-norbixin. Tento produkt se v sýrech barvených bixinem váže na kaseiny a způsobuje růžové zbarvení. Kromě all-trans-norbixinu vzniká ještě metylester a malé množství aromatických uhlovodíků, např. m-xylen [1].

### 2.4 Antioxidanty

Jako antioxidanty lze označit látky, které likvidují nežádoucí volné radikály. Jedná se především o sekundární metabolity obsažené ve vyšších rostlinách. Přírozenými antioxidanty jsou především některé vitaminy. Mezi antioxidanty patří vitamin C a E,

lipofilní prekurzory vitamínu A (karotenoidy), řada bioflavonoidů, některé enzymy a koenzymy. Antioxidanty mohou společně fungovat jako antioxidační síť. Oxidované formy antioxidantů po reakci s volnými radikály jsou redukovány dalším antioxidantem. Antioxidanty jsou v přírodě obsaženy ve směsích, u některých dochází k synergickému efektu, kdy přítomnost jednoho antioxidantu zvyšuje účinek jiného [19].

## 2.5 Antioxidační reakce karotenoidů

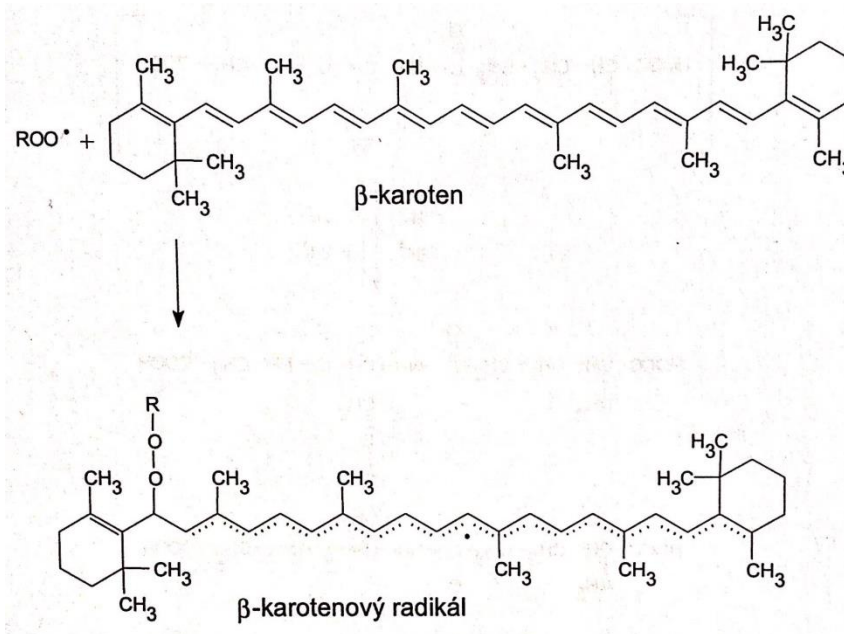
Antioxidanty jsou látky, které významně zpomalují nebo zabraňují oxidaci. Mohou pozitivně prodloužit trvanlivost potravin. Karotenoidy se přidávají do potravin, které obsahují nenasycené mastné kyseliny a jako antioxidační činidla působí při odstraňování radikálů centrovaných na uhlík a peroxidových radikálů v lipidech. Dále působí při zhasení singletového kyslíku [5].

Všechny karotenoidy reagují s oxidačními činidly a volnými radikály. Jejich reaktivita závisí na délce polyenového řetězce a povaze koncových skupin. Elektronová hustota v řetězci není souměrná, proto existují pravděpodobná místa pro reakci s oxidačními činidly a volnými radikály. Karotenoidy působí proti radikálům vznikem neškodných produktů, nebo narušením řetězových reakcí volných radikálů [9].

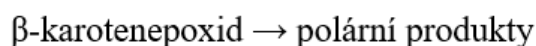
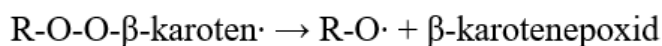
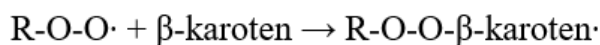
Antioxidační aktivita karotenoidů je ovlivněna strukturou, především velikostí, tvarem, polohou a počtem substitučních skupin a fyzikální formou, především to, jestli se jedná o agregované nebo monomerní cis nebo all-trans konfiguraci. Dále je jejich aktivita ovlivněna umístěním molekuly v buňce, interakce s jinými karotenoidy nebo jinými antioxidanty např. vitamínem C a E, koncentrace karotenoidu a parciální tlak [5].

Účinnost karotenoidů jako antioxidantů se nezjišťuje schopností pohlcovat radikály nebo pořadím jejich oxidačního potenciálu. Výsledky účinnosti se měří v homogenním roztoku a modelech buněčných membrán. Funkce karotenoidů jako antioxidantů může souviset s extrapolací vlastností, ty se stanovují v roztoku na složitějších biochemických systémech, kde se stávají důležitější jiné faktory, jako je prostorové uspořádání nebo interakce mezi antioxidanty. Rozdíly v reaktivitě souvisí i s elektronovou hustotou. Například přítomnost elektronové hustoty na 4 a 4' uhlíku brání izozeaxantinu, astaxantinu a kantaxantinu při abstrakci vodíku v této pozici, jsou méně reaktivní [5].

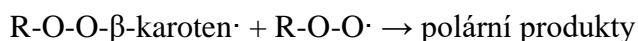
$\beta$ -karoten působí proti hydroperoxidovým radikálům (R-O-O $\cdot$ ). Volný radikál je zachycen konjugovaným polyenovým řetězcem za vzniku stabilního radikálu  $\beta$ -karotenu (obr. č. 15).

Obrázek 15 Reakce  $\beta$ -karotenu s  $\text{R-O-O}\cdot$  [22]

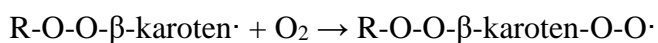
Vzniklý radikál se rozkládá za odštěpení alkoxylového radikálu  $\text{R-O}\cdot$  a stabilizují se za vzniku polárních produktů, jako jsou epoxidy, karboxylové sloučeniny a další produkty. Schéma působení  $\beta$ -karotenu je na obrázku č. 16.

Obrázek 16 Antioxidační působení  $\beta$ -karotenu [23]

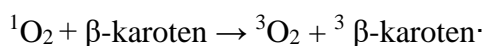
V přítomnosti kyslíku  $\beta$ -karoten reaguje s dalším hydroperoxidovým radikálem za vzniku konečného polárního produktu:



Za vyššího parciálního tlaku kyslíku může vznikat nestálý peroxidový radikál:



Reakcí se singletovým kyslíkem vzniká kyslík v tripletovém stavu a  $\beta$ -karoten v excitovaném stavu  $^3\beta\text{-karoten}\cdot$ :

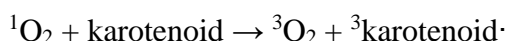


V průběhu působení vzniká degradovaný  $\beta$ -karoten a nízkomolekulární produkty. Mezi nízkomolekulární produkty patří uhlovodíky a kyslíkaté sloučeniny. Tyto produkty tvoří aróma v potravinách [23].

### 2.5.1 Zhášení singletového kyslíku karotenoidy

Do procesu zhášení singletového kyslíku mohou karotenoidy působit dvěma způsoby. Mohou působit jako stabilizátory tripletového kyslíku, zamezí tím vznik singletového kyslíku nebo přeměňují singletový kyslík zpět do jeho základního tripletového stavu [5].

Zhášení nastává fyzikální nebo chemickou cestou. Při fyzikálním zhášení dochází k přenosu excitační energie ze singletového kyslíku na karotenoid. Kyslík se poté vrátí do svého základního stavu a karotenoid je uveden do svého excitovaného tripletového stavu. Vzniklá energie se rozptyluje mezi excitovaným karotenoidem a okolním rozpouštědlem. Důsledkem toho vzniká karotenoid v základním stavu a tepelná energie. Karotenoid se poté může znovu zapojit do zhášení. Cykly zhášení singletového kyslíku:



Schopnost zhášet singletový kyslík se zvyšuje počtem konjugovaných dvojných vazeb ve struktuře karotenoidů [5].

Lykopen působí proti oxidaci proteinů, lipidů a DNA, a je silným antioxidantem. Působí proti kyslíkovému radikálu, a to intenzivněji než ostatní karotenoidy. Silněji působí díky vysokému počtu konjugovaných dvojných vazeb v acyklické struktuře. V systému směsných rozpouštědel byla jeho účinnost zhášet singletový kyslík až dvakrát vyšší než u  $\beta$ -karotenu a 10krát vyšší než u  $\alpha$ -tokoferolu [5].

Zhášení singletového molekulárního kyslíku ( $\text{O}_2$ ) probíhá chemickou nebo fyzikální cestou. Chemická cesta vede k přerušení polyenového řetězce, tím je lykopen degradován. Fyzikální cesta vyvolává přenos excitační energie z  $\text{O}_2$  na molekulu lykopenu, přičemž kyslík přechází do základního stavu a lykopen je excitován do tripletového stavu. Tím je schopen reagovat s dalším  $\text{O}_2$ . Účinek lykopenu je podpořen dalšími karotenoidy jako je  $\beta$ -karoten, fytoen a fytofluen. [3, 4].



### 2.5.2 Působení karotenoidů proti volným radikálům

Karotenoidy svým účinkem vychytávají volné radikály. Tím naruší řetězovou reakci. Dokážou reagovat s radikály peroxidu ( $R-O-O\cdot$ ), tiolu ( $RS\cdot$ ), sulfonu ( $RSO\cdot$ ), oxidu dusného ( $NO_2\cdot$ ) a s elektronicky excitovanými molekulami za vzniku radikálového kationtu [5].

$\beta$ -karoten je schopný vychytávat volné radikály oxidu dusného ( $NO_2\cdot$ ), tiolu ( $RS\cdot$ ), sulfonu ( $RSO\cdot$ ) a inaktivovat elektronicky excitované molekuly. V případě  $\beta$ -karotenu se jedná o inaktivaci singletového molekulárního kyslíku ( $^1O_2$ ). Pomaleji reaguje s peroxylovými radikály, může to naznačovat, že  $\beta$ -karoten je neefektivní přímý lapač peroxylových radikálů. Při srovnání s karotenoidy jako jsou  $\beta$ -kryptoxantin a zeaxantin, které ve své struktuře obsahují stejné množství konjugovaných dvojných vazeb tedy 11 mají větší ochranný účinek než  $\beta$ -karoten. Bylo zjištěno že vychytávání neprobíhá přenosem elektronů, jak je tomu u vychytávání ostatních radikálů, ale nastává tvorbou aduktu nebo abstrakcí vodíku [5]. Mechanismus pro zachycování  $NO_2$  je popsán jako darování elektronů s tvorbou radikálového kationtu  $\beta$ -karotenu. Vychytávání tiolových radikálů zahrnuje vytvoření reakčního radikálového produktu ( $\beta$ -karoten  $RS\cdot$ ). Tyto radikálové kationty a radikály reakčního produktu jsou vysoce stabilní a podléhají pomalému biomolekulárnímu rozpadu [4, 24].

Lykopen patří mezi nejúčinnější antioxidanty působící proti volným radikálům. Při zjišťování byl jeho účinek dvakrát vyšší než u  $\beta$ -karotenu v případě vychytávání radikálů oxidu dusného ( $N_2O$ ) [5].

## 2.6 Stanovení celkové antioxidační kapacity karotenoidů

Antioxidační schopnost je měřena díky kapacitě absorbovat volné radikály. Tato hodnota poukazuje na celkovou antioxidační schopnost potravin.

Pro zjišťování antioxidační aktivity v potravinách bylo vyvinuto několik metod. Metody pro zjišťování antioxidantů se dělí na testy založené na reakci přenosu jednoho elektronu (SET) a testy založené na atomu vodíku (HAT) [25].

Nejpoužívanějšími jsou spektrofotometrická analýza antioxidační kapacity (TEAC - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) vyjádřena pomocí standardu Trolox (TE). Trolox je syntetický antioxidant (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Nejběžnějšími reakčními činidly pro tyto analýzy jsou ABTS (2,2'-azinobis-(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonová) kyselina) a DPPH (2,2-difenyl-1-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Jde o stanovení kde, pokud se v analyzovaném vzorku nachází látka s

antioxidačním účinkem, dojde k obarvení vzorku po reakci s daným činidlem. Další metodou založenou na eliminaci radikálů je metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), kdy se určuje schopnost analyzovaného vzorku eliminovat kyslíkové radikály, které jsou záměrně generovány. Dále se využívá metoda založená na hodnocení redoxních vlastností látek (FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power). Redukční činidla, jako antioxidanty, reagují s oxidanty, a dochází k chemické reakci, redukci, která inaktivuje tyto oxidanty. Tato metoda není vhodná pro potraviny, protože funguje při nízké hodnotě pH [26]

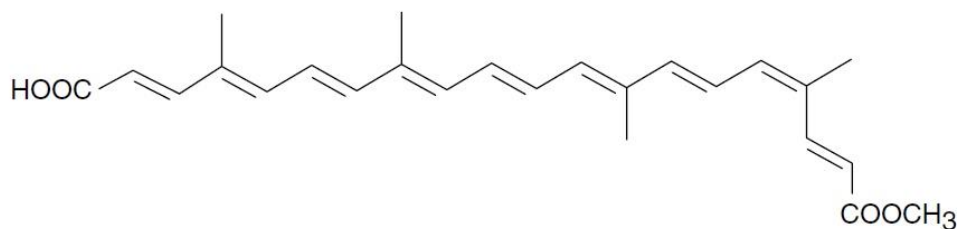
Důležitým prvním krokem při zjišťování množství antioxidantů ve vzorku je extrakce. Zvolením správného rozpouštědla, jeho koncentrace, teploty extrakce, doby extrakce a extrakčního pH se dá ovlivnit i antioxidační kapacita výsledného extraktu.

V článku Müller a kol. [27] byly analyzovány vzorky mrkvové, rajčatové a rakytníkové šťávy. Z výsledků analýzy lze konstatovat, že většina testovaných karotenoidů vykazuje osmkrát vyšší antioxidační aktivitu ve srovnání s  $\alpha$ -tokoferolem. Při použití testu FRAP u karotenoidů vykazoval vysokou hodnotu redukce pouze lykopen. Fytoen, fytofluen a neurosporen nevykazovaly žádnou aktivitu, patrně z důvodu malého počtu uhlíků. Aktivitu nevykazovali také cyklické karotenoidy jako je  $\alpha$ - a  $\beta$ -karoten, z důvodu přítomnosti iononového kruhu, který brání reakci s železitými ionty. Substitucí hydroxylových funkčních skupin na iononový kruh se karotenoidy stávají reaktivními s železitými ionty. Těmito karotenoidy jsou  $\beta$ -kryptoxantin, lutein, zeaxantin, anteraxantin, violaxantin a neoxantin. Nejsilnějším karotenoidem proti železitým iontům je rubixantin, hodnota jeho antioxidační síly je  $3,3 \text{ mol } \alpha\text{-TE}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Strukturou se skládá z acyklického řetězce a hydroxylového  $\beta$ -iononového kruhu [27].

Müller a kol. [27] stanovovali testem ABTS (TEAC) působení karotenoidů proti radikálu 2,2'-azinobis-(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonové) kyselině ( $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ). Nejvyšší účinek proti  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  má lykopen. Bylo zjištěno, že účinnost se zvyšuje počtem konjugovaných dvojných vazeb. Hodnota aktivity  $\alpha$ -karotenu je  $3,9 \text{ mol } \alpha\text{-TE}\cdot\text{mol}^{-1}$  a hodnota aktivity  $\beta$ -karotenu je  $3,1 \text{ mol } \alpha\text{-TE}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Hodnota aktivity astaxantinu je  $0,8 \text{ mol } \alpha\text{-TE}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Aktivita je snížena rozšířením konjugovaného řetězce na 13 uhlíků a obsahem keto skupiny.

Vzhledem k odlišnému mechanismu se stanovení kapacity vychytáváním peroxidových radikálů (PRSC – Peroxyl Radical Scavenging Capacity) provádí za pomoci chemiluminiscenčního testu na bázi luminolu. Karotenoidy s obsahem keto skupin v  $\beta$ -

iononovém kruhu, jako je astaxantin působí jako účinnější antioxidant než  $\beta$ -karoten. Vysokou účinnost prokazoval bixin (obr. č. 17), a to až dvakrát větší než lykopen. Tato reaktivita je dána kombinací dlouhého uhlovodíkového řetězce se systémem odebrání elektronů karboxylové (-COOH) a acylové (-COOCH<sub>3</sub>) skupině, které vedou ke snížení intenzity elektronů v konjugovaném řetězci.



Obrázek 17 Struktura bixinu [5]

Porovnání antioxidační aktivity jednotlivých karotenoidů zjištěné metodami FRAP, ABTS a PRSC je uvedena v tabulce č. 4.

Tabulka 4 Antioxidační aktivita (AA) jednotlivých karotenoidů [27]

Druh karotenoidu	AA		
	FRAP [mol $\alpha$ -TE.mol <sup>-1</sup> ]	ABTS (TEAC) [mol $\alpha$ -TE.mol <sup>-1</sup> ]	PRSC [mol $\alpha$ -TE.mol <sup>-1</sup> ]
$\alpha$ -karoten	0	3,3	19
$\beta$ -karoten	0	3,1	19,1
Lykopen	2,1	3,9	13,3
Neurosporen	0	2,1	0
Fytofluen	0	1	0,1
Fytoen	0,1	1	0,1
Anteraxantin	1,8	2	24,7
Astaxantin	0,5	0,8	26,3
Lutein	2,1	2	19,6
Neoxantin	1,3	1,1	20,6
Rubixantin	3,3	3,3	8,9
Violaxantin	1,5	1,6	22,5
Zeaxantin	2	1,9	20,3

V práci vědců Zanfini a kol. [28] byly zkoumány lipofilní extrakty získané z různých odrůd rajčat, a to typ Cluster, Cherry a Salad. Před stanovením byly vzorky homogenizovány a lyofilizovány po dobu 24 hodin. Karotenoidy byly extrahovány pomocí dichlormetanu. Celková analýza množství karotenoidů byla provedena HPLC metodou za použití směsi mobilní fáze složené z metanolu, acetonitrilu a dichlormetanu v poměru 50:48:2.

Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí metody ABTS. Sledován a vyhodnocován byl účinek lykopenu,  $\beta$ -karotenu a luteinu. Z výsledků je patrné, že nejvyšší obsah karotenoidů a zároveň nejvyšší antioxidační účinek měla Cherry rajčata. Nejvyšší antioxidační účinek je zde spojen s vysokým obsahem lykopenu a to až  $11270 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . Ze stanovené korelace mezi obsahem antioxidantů a antioxidační aktivitou měl také nejvyšší korelační koeficient. Obsah sledovaných karotenoidů v daných odrůdách rajčat je uveden v tabulce č 5.

Tabulka 5 Obsah karotenoidů a AA v různých odrůdách rajčat [28]

Odrůda rajčat:	Sledované karotenoidy			AA
	Lykopen [ $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ]	$\beta$ -karoten [ $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ]	Lutein [ $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ]	ABTS (TEAC) [mmol Trolox. $100\text{g}^{-1}$ ]
Cluster	8470	620	20	0,021
Cherry	11270	710	21	0,028
Salad	850	420	16	0,009

### 3 METODY ANALÝZY KAROTENOIDNÍCH BARVIV

Mezi metody, kterými lze stanovovat karotenoidní barviva patří spektrometrické metody a metody chromatografické, především vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), a také papírová chromatografie (PC) a tenkovrstvá chromatografie (TLC) [2]. Jedná se hlavně o separaci analytů, na základě, kterého lze identifikovat, a stanovit jednotlivé složky [10].

#### 3.1 Spektrometrie

Spektrometricky lze stanovit koncentraci některých látek, např. barviv rozpustných ve vodě i tuku. Koncentrace se stanovuje na základě toho, že daná látka absorbuje viditelné světlo. Při absorpci světla dodá foton energii elektronu z molekulového orbitalu, elektron pak přejde do orbitalu s vyšší potenciální energií. Molekula se pak zbaví přebytečné energie přeměnou na teplo. Absorbovány jsou jen fotony o vlnových délkách odpovídajících konkrétním hodnotám energie. Spektrum je závislost intenzity absorpce na vlnové délce použitého světla. Ve viditelné oblasti má tvar jednoho nebo více vrcholů. Pro stanovení se používá světlo vlnové délky, při které je absorpce největší. Lambert-Beerův zákon popisuje, že množství absorbovaného světla bude tím vyšší, čím vyšší bude koncentrace absorbující látky v roztoku. Měrnou veličinou je absorbance. Stanovení látky ve vzorku se provádí metodou kalibrační přímky. Z čisté látky se připraví sada roztoků o vzrůstající koncentraci. Obsah analytu v neznámém vzorku se určí změřením jeho absorbance a určením koncentrace [29]

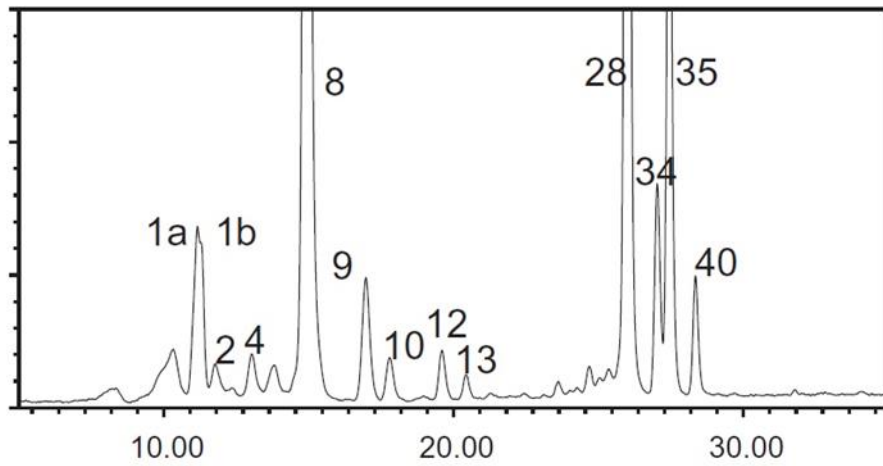
Ve studii Wanga a kol. [30] byly stanovovány karotenoidy obsažené ve sladkovodní řase *Oedogonium intermedium*. Karotenoidy byly extrahovány dichlormetanem a purifikace byla provedena saponifikací. Lyofilizovaný vzorek byl smíchán s vodou, metanolem a dichlormetanem. Po 10 min. inkubaci byla centrifugací oddělena organická vrstva. Extrakce byla opakována třikrát. Rozpouštědlo bylo vysušeno plynným dusíkem a vzniklý extrakt byl rozpuštěn v metanolu. Následné zmýdelnění bylo provedeno roztokem KOH. Suchý extrakt byl rozpuštěn v metanolu a absorbance byla změřena při třech vlnových délkách: 470, 665,2 a 652,4 nm. Obsah barviv ve vzorku byl následně vypočítán dle Lichtenthalerovy rovnice. Spektrofotometricky byl zjištěn obsah karotenoidů v hodnotě 2929,6  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . V této studii byl obsah karotenoidů zároveň zjišťován pomocí metody HPLC. Touto metodou byl určen obsah karotenoidů na hodnotu 2257  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Tento rozdíl může být dán obsahem nečistot, které vzorek obsahoval. Jedná se o produkty degradace karotenoidů a chlorofylu. Spektrometrickou metodou zjištěna vyšší hodnota tak může být méně přesná [30].

### 3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

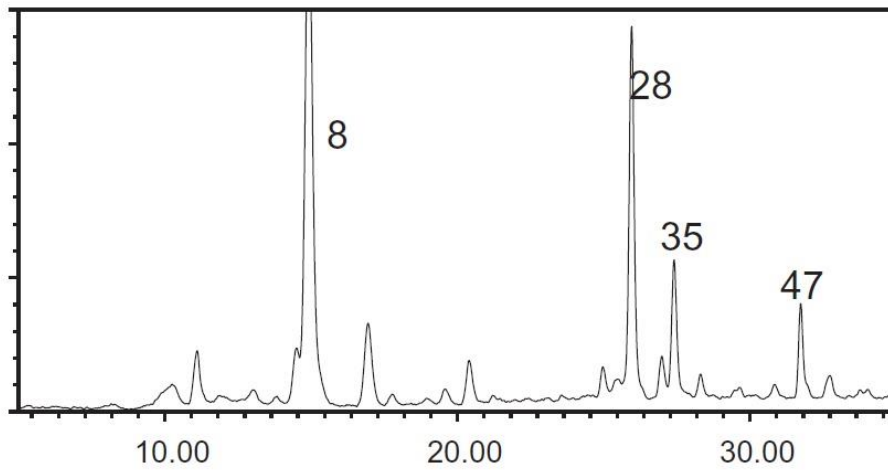
Obsah lipofilních barviv v potravinách lze stanovit pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Jedná se o separační metodu, která odděluje analyt na základě distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Mobilní fáze je vždy kapalná, s různým složením, a průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem. Stacionární fáze je zakotvená v chromatografické koloně a je složena z malých částic pravidelného tvaru, které homogenně vyplňují kolonu. Čím jsou částice menší, tím je separace účinnější [31].

Většina karotenoidů se v přírodních produktech vyskytují jako složité směsi a obsahují značný počet jednotlivých frakcí s různou adsorpční kapacitou a lipofilitou. Tato vlastnost stěžuje separaci, pro přesné výsledky se používá vícestupňová gradientová vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) [14].

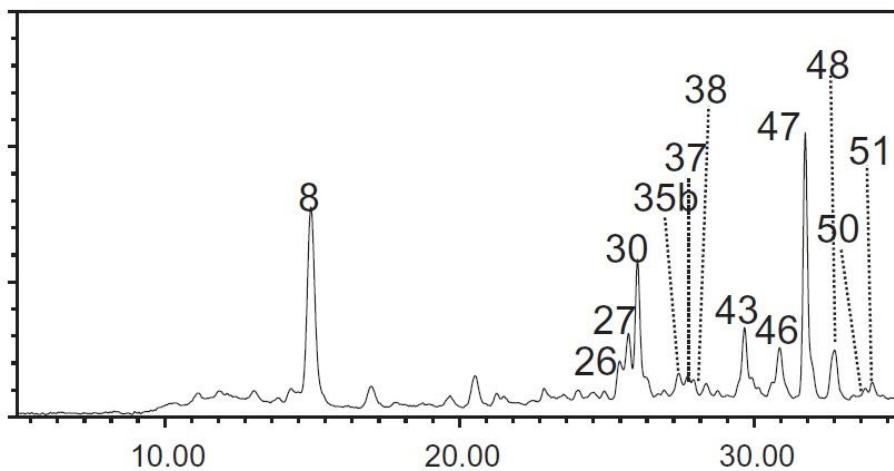
Ve studii Carvalho a kol. [32] bylo popsáno zastoupení karotenoidů ve vzorku červených malin odrůdy Tulamen, v různých stupních zrání od nezralých zelených plodů po zralé plně vybarvené plody (1, 3 a 5). Analýza byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem fotodiodového pole (HPLC-PDA) z nezmýdelněného vzorku. Lyofilizované vzorky malin byly extrahovány v roztocích rozpouštědel, metanol, kyselina chlorovodíková, pufr s chloridem sodným a chloroformem. Po odstředění vzniklá vodná fáze byla dále extrahována chloroformem. Chloroformový extrakt byl vysušen na odparce. Před analýzou byly vzorky rozpuštěny etylacetátu. Při této analýze byla zvolena gradientová eluce, kdy se obsah mobilní fáze mění v čase. Mobilní fáze obsahovala metanol, směs vody a metanolu s octanem amonným a terc-metylbutyléterem. Na obrázcích č. 18, 19, a 20 jsou zobrazeny profily karotenoidů a dalších látek zjištěných ve vzorcích červených malin odrůdy Tulameen ve třech fázích zrání (obr. č. 18-20). Pod číslem 1b byl identifikován neoxantin, pod číslem 8 lutein, pod číslem 9 zeaxantin a pod číslem 35  $\beta$ -karoten. Ostatní píky zobrazují obsah tokoferolů. Hlavními karotenoidy v malinách jsou tedy lutein a jeho estery. V průběhu zrání se obsah esterifikovaných luteinů zvyšuje a obsah luteinu se snižuje [32].



Obrázek 18 Obsah látek malin ve fázi zrání 1 [32]



Obrázek 19 Obsah látek malin ve fázi zrání 3 [32]



Obrázek 20 Obsah látek malin ve fázi zrání 5 [32]

### 3.3 Papírová a tenkovrstvá chromatografie

Papírová chromatografie (PC) patří mezi starší a jednoduché metody. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je také jednodušší a levnou metodou používanou pro stanovení některých složek v potravinách, jako jsou i karotenoidy.

Skládají se ze stacionární a mobilní fáze. Stacionární fáze u PC je v podobě speciálního papíru umístěna v ploše, Pro nepolární látky, jakými jsou karotenoidy, se používá papír impregnovaný parafínovým olejem, a vodné roztoky jako mobilní fáze. U TLC je stacionární fází tuhá látka, která je nanášena v tenké vrstvě na vhodnou desku. Mobilní fáze se skládá většinou ze směsi rozpouštědel s přísadami kyselin, zásad a tlumivých roztoků. Jejich složení závisí na struktuře analyzovaných látek. Mobilní fáze unáší analyt, který je zadržován stacionární fází. Hnací silou pohybu mobilní fáze jsou kapilární síly. Analýza se ukončí před dosažením mobilní fáze do konce stacionární fáze. Na detekci se používá přirozené zabarvení, skvrny zviditelněné vhodným činidlem, nebo UV zářením a porovnáním retardačního faktoru zjištěného na základě vzdálenosti skvrny od startu a vzdálenosti, kterou urazila mobilní fáze od startu do cíle.

Kapilární síly, kterými je v případě PC a TLC, unášena mobilní fáze s analytem, nejsou konstantní, proto se častěji používá přesnější metoda stanovení karotenoidů s nuceným konstantním průtokem mobilní fáze, kterou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie [31].

Jak zjistil Oliver a kol. [33], před samotným stanovováním karotenoidů se vzorek musí upravit extrakcí s odstraněním nežádoucích látek a zmýdlením. Při extrakci karotenoidů se používají směsi nepolárních rozpouštědel. Nejčastěji se používají metanol s roztokem tetrahydrofuranu (THF) v poměru 1:1, metanol a dietyler nebo metanol a aceton-hexan. Při analýze karotenoidů v mrkvi je účinná směs roztoků hexan, aceton, metanol a toluen v poměru 10:7:6:7 objemově. Nežádoucí látky jako jsou bílkoviny se ze vzorku odstraňují pomocí srážení s etanolem. Připravené vzorky se mohou pak sušit a mrazit. Karotenoidy v potravinách jsou esterifikovány mastnými kyselinami, odstranění se provádí zmýdlením. Zmýdlením se provádí v roztoku s hydroxidem draselným (KOH) ve vodném, etanolovém nebo metanolovém roztoku. Koncentrace se pohybují od 10 do 60 % (w/v) [33].

TLC metoda se používá k izolaci a čištění jednotlivých karotenoidů. Touto metodou bylo izolováno přes 50 karotenoidů v pomerančovém džusu. Kolonou naplněnou oxidem hořečnatým se vzorek rozdělil na tři frakce obsahující karotenoidy, na mono-oly, dioly a



polyoly. Z jednotlivých frakcí byly izolovány různými adsorbenty a rozpouštědly jednotlivé karotenoidy metodou TLC. Karoteny byly rozděleny směsí petroléru a benzenu v poměru 98:2 na deskách hydroxidu vápenatého ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) a silikagelu G v poměru 6:1. Monokarotenoidy byly separovány na oxidu hlinitém s acetonem a petrolérem v poměru 5:95. Dioly a polyoly byly separovány na silikagelu se systémem rozpouštědel různé polarity: acetonem s petrolérem v poměru 20:80, petrolérem, etylacetátem a izopropanolem v poměru 85:10:5 nebo metylchloridem a etylacetátem v poměru 80:20. Kvantitativní analýzy byly následně provedeny spektrometricky. Bylo zjištěno, že převládajícími karotenoidy v pomerančové šťávě jsou dioly a polyoly [34].

## ZÁVĚR

Vlastnosti karotenoidů závisí především na jejich struktuře. Karotenoidy vznikají řadou cyklizačních reakcí, které přeměňují fytoen na cyklické karoteny. Postupným navázáním konjugovaných dvojných vazeb vzniká prodloužený chromofor. Jako barevné se projevují ty karotenoidy, které mají více než 7 konjugovaných dvojných vazeb.

Některé karotenoidy působí jako provitaminy vitamínu A. Mezi tyto provitaminy patří  $\alpha$ - a  $\beta$ -karoten,  $\beta$ -kryptoxantin, lutein,  $\gamma$ -karoten a zeaxantin. Vitamin A vzniká štěpením molekuly karotenoidu. Při štěpení molekuly  $\beta$ -karotenu symetrickým štěpením vznikají dvě molekuly vitamínu A.

Důležitou vlastností mnoha karotenoidů je jejich antioxidační účinek. Antioxidační aktivita je ovlivněna strukturou, velikostí a tvarem molekuly, dále pak počtem substitučních skupin, konfigurací cis nebo all-trans. Účinným antioxidantem ze skupiny karotenů působícím proti volným radikálům je lykopen, a to díky jeho acyklické struktuře s konjugovanými dvojnými vazbami. Nejintenzivněji působí proti kyslíkovému radikálu, zabraňuje oxidaci lipidů, proteinů a DNA. Jeho účinek proti volným radikálům oxidu dusného je až dvakrát vyšší než u  $\beta$ -karotenu. Jeho antioxidační působení je podpořeno i účinky dalších karotenoidů jako je  $\beta$ -karoten, fytoen a fytofluen.  $\beta$ -karoten působí proti volným radikálům oxidu dusného ( $\text{NO}_2\cdot$ ), tiolu ( $\text{RS}\cdot$ ), sulfonu ( $\text{RSO}\cdot$ ) a inaktivuje singletový kyslík. Zeaxantin spolu s luteinem a jejich metabolitem meso-zeaxantinem jsou koncentrovány v sítnici oka a působí tak jako ochrana před reaktivními formami kyslíku.

Karotenoidy se vyskytují v mnoha druzích ovoce a zeleniny, dále pak v některých živočišných tkáních, rostlinných olejích a řasách. Rajčata jsou zdrojem nejúčinnějšího karotenoidu lykopenu. Nejvyšší obsah a nejvyšší antioxidační účinek mají rajčata odrůdy Cherry. Největší množství  $\beta$ -karotenu se nachází v mrkvi a v červené paprice. V paprice se nachází i velké množství xantofylů jako je kapsantin. V potravinách živočišného původu se vyskytují karotenoidy jako hlavní pigmenty v tkáních lososovitých ryb a korýšů, kde je přítomen astaxantin.

Karotenoidy se v potravinách stanovují několika metodami, spektrometricky, vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), papírovou chromatografií (PC) a tenkovrstvou chromatografií (TLC). Mezi neefektivnější patří HPLC metoda. Tato metoda umožňuje separovat složité směsi karotenoidů a s vysokou přesností určit jejich obsah.

Karotenoidy díky svým vlastnostem mohou pozitivně působit na zdraví člověka. K takovým účinkům se řadí prevence srdečních chorob, dále působí při ochraně kůže před účinky UV záření, a lykopen zabraňuje negativním změnám na žluté skvrně, které bývají příčinou oslepnutí.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. Tábor: OSSIS, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.
- [2] MORTENSEN, A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure Appl. Chem.* 2006, 78, 8, 1477-1491.
- [3] STRATIL, Pavel. *ABC zdravé výživy*. Brno: Pavel Stratil, 1993. ISBN 80-900029-8-6.
- [4] HLÚBIK, Pavol a Libuše OPLTOVÁ, 2004. *Vitaminy*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0373-4.
- [5] RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B., 2016. *Food carotenoids: chemistry, biology and technology*. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell. IFT Press series. ISBN 978-1-118-73330-1.
- [6] KIOKIAS, S., PROESTOS, C., VARZAKAS, T. A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* 2016, 4, SI 1, 25-37.
- [7] SATHASIVAM, Ramaraj et al., 2021. An update on biosynthesis and regulation of carotenoids in plants. *South African Journal of Botany*. 140, 290-302. ISSN 02546299. Dostupné z: doi:10.1016/j.sajb.2020.05.015
- [8] ARMSTRONG GA, HEARST JE. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 1996 Feb;10(2):228-37. doi: 10.1096/fasebj.10.2.8641556. PMID: 8641556.
- [9] BRITTON G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 1995 Dec;9(15):1551-8. PMID: 8529834.
- [10] ŠIVEL, Miroslav et al. Lutein-významný karotenoid ve výživě člověka. *Chemické Listy*. Zlín, 2013(107), 456-463.
- [11] SEABRA, Larissa Mont'Alverne Jucá a Lucia Fátima Campos PEDROSA, 2010. Astaxanthin: structural and functional aspects. *Revista de Nutrição*. 23(6), 1041-1050. ISSN 1415-5273. Dostupné z: doi:10.1590/S1415-52732010000600010

- [12] ABDEL-AAL, El-Sayed et al., 2013. Dietary Sources of Lutein and Zeaxanthin Carotenoids and Their Role in Eye Health. *Nutrients*. 5(4), 1169-1185. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu5041169
- [13] RONEN G., CARMEL-GOREN L., ZAMIR D., HIRSCHBERG J. 2000. An alternative pathway to  $\beta$ -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 11102–11107.
- [14] TERASAKI, Masaru NARAYAN, Bhaskar, KAMOGAWA, Hiroyuki et al., 2012. Carotenoid Profile of Edible Japanese Seaweeds: An Improved HPLC Method for Separation of Major Carotenoids. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 21(5), 468-479. ISSN 1049-8850. Dostupné z: doi:10.1080/10498850.2011.610025
- [15] Obrázek: *INaturalist* [online]. Dostupné z: [https://www.inaturalist.org/guide\\_taxa/765867](https://www.inaturalist.org/guide_taxa/765867)
- [16] Obrázek *Biopix* [online]. Dostupné z: <http://www.biopix.com/zoom.aspx?photoid=107181>
- [17] Obrázek: *Tadeášovo koření* [online]. Dostupné z: <http://www.tadeasovokoreni.cz/koreni-jednodruhove/safran/>
- [18] ZHU, Changfu et al., 2010. The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 504(1), 132-141. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2010.07.028
- [19] PRUGAR, J. a kol. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Praha: VÚPS, 2008. 327s. ISBN 978-80-86576-28-2.
- [20] ALAMED, Jean et al., 2009. Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(7), 2969-2976. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf803436c
- [21] VELÍŠEK, Jan, 1999. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS. ISBN 80-902-3913-7.
- [22] ŠTÍPEK, Stanislav, 2000. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha: Grada. ISBN 80-716-9704-4.

- [23] VELÍŠEK, Jan, 1999. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS. ISBN 80-902-3914-5.
- [24] MILLER, Nicholas J. et al., 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*. 384(3), 240-242. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(96)00323-7
- [25] XU, Dong-Ping et al., 2017. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(1). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18010096
- [26] CHRPOVA, D., KOUŘIMSKÁ, L., GORDON, M. H., HEŘMANOVÁ, V., ROUBÍČKOVÁ, I., & PANEK, J. (2010). Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(4), 317-325.
- [27] MÜLLER, Lars, Kati FRÖHLICH a Volker BÖHM, 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*. 129(1), 139-148. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.045
- [28] ZANFINI, Assunta et al., 2010. Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol in synthetic mixtures. *LWT - Food Science and Technology*. 43(1), 67-72. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2009.06.011
- [29] VONDRUŠKA, Milan, 2004. *Analytická chemie*. Ve Zlíně: Univerzita Tomáše Bati. ISBN 80-731-8212-2.
- [30] WANG, Na, MANABE, Yuki, SUGAWARA, Tatsuya et al., 2018. Identification and biological activities of carotenoids from the freshwater alga *Oedogonium intermedium*. *Food Chemistry*. 242, 247-255. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.09.075
- [31] ŠTULÍK, Karel a Libuše OPLTOVÁ, 2004. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0852-9.

[32] CARVALHO, Elisabete, PAUL D. FRASER a Stefan MARTENS. Carotenoids and tocopherols in yellow and red raspberries. *Food Chemistry*. 2013, 139(1-4), 744-752. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2012.12.047

[33] OLIVER, Jordi a Andreu PALOU, 2000. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*. 881(1-2), 543-555. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)00329-0

[34] MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, Antonio J., Isabel M. VICARIO a Francisco J. HEREDIA, 2007. Review: Analysis of carotenoids in orange juice. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20(7), 638-649. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2007.04.006

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

AA	Antioxidační aktivita
ABTS	2,2'-azinobis-(3- etylbenzotiazolin-6-sulfonová) kyselina
BCO1	$\beta$ -karoten 15,15'-monooxygenáza
BCO2	$\beta$ -karoten 9,10'-dioxigenáza
DMAPP	Dimethylalyl pyrofosfát
DPPH	2,2-difenyl-1-(2,4,6-trinitrofenyl)
FPP	Farnesylpyrofosfát
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GGPP	Geranylgeranylpyrofosfátu
GPP	Geranyl pyrofosfát
HAT	Hydrogen atom transfer (jednovodíkový přenos)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHYB	$\beta$ -hydroxyláza
CHYE	$\epsilon$ -hydroxyláza
ICHS	Ischemické srdeční choroby
IPP	Izopentenyl pyrofosfát
LCYB	Lykopenová $\beta$ -cykláza
LCYE	Lykopenová $\epsilon$ -cykláza
NSY	Neoxantinsyntázou
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PC	Papírová chromatografie
PDA	Detektor diodového pole
PDS	Fytoen desaturáza
PSC	Peroxyl Radical Scavenging Capacity
RP	Reverzní fáze
SET	Single-electron transfer (jednoelektronový přenos)
TE	Trolex
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
THF	Tetrahydrofuran



TLC	Tenkvrstvá chromatografie
ZDS	Zeta-karoten desaturáza
ZEP	Zeaxantin epoxydáza

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Struktura fytoenu [5] .....	11
Obrázek 2 Struktura $\gamma$ -karotenu [5] .....	11
Obrázek 3 Vznik fytoenu [8] .....	13
Obrázek 4 Struktura lykopenu [2] .....	15
Obrázek 5 Struktura $\alpha$ -karotenu [2] .....	16
Obrázek 6 Struktura $\beta$ -karotenu [5] .....	16
Obrázek 7 Strukturální vzorec astaxantinu [1] .....	18
Obrázek 8 Strukturální vzorec luteinu [5] .....	18
Obrázek 9 Strukturální vzorec zeaxantinu [5] .....	19
Obrázek 10 <i>Sargassum horneri</i> [15].....	23
Obrázek 11 <i>Gracilaria vermiculophylla</i> [16] .....	23
Obrázek 12 Šafrán [17].....	23
Obrázek 13 Štěpení $\beta$ -karotenu [5] .....	25
Obrázek 14 Autooxidační reakce lipidů [21].....	28
Obrázek 15 Reakce $\beta$ -karotenu s R-O-O $\cdot$ [22] .....	31
Obrázek 16 Antioxidační působení $\beta$ -karotenu [23].....	31
Obrázek 17 Struktura bixinu [5] .....	35
Obrázek 18 Obsah látek malin ve fázi zrání 1 [32] .....	39
Obrázek 19 Obsah látek malin ve fázi zrání 3 [32] .....	39
Obrázek 20 Obsah látek malin ve fázi zrání 5 [32] .....	39

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Složení a obsah hlavních karotenoidů ovoce a zeleniny [1].....	21
Tabulka 2 Obsah karotenoidů v hnědých řasách [14].....	22
Tabulka 3 Obsah karotenoidů v červených řasách [14].....	22
Tabulka 4 Antioxidační aktivita (AA) jednotlivých karotenoidů [27] .....	35
Tabulka 5 Obsah karotenoidů a AA v různých odrůdách rajčat [28] .....	36

