

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE BETALAINOVÝCH BARVIV

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Soňa Kozáková

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce

doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Olomouc 2012

Shrnutí:

Předložená práce se zabývá hmotnostní spektrometrií betalainových barviv. Teoretická část se zabývá obecně betalainy, jejich vlastnostmi, výskytem a také různými způsoby separace a identifikace těchto přírodních pigmentů. Experimentální část práce je věnována identifikaci betalainů pomocí hmotnostní spektrometrie (QqTOF systém) s ionizací MALDI, ESI (přímá infúze) a spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s ionizací ESI v různých modifikacích (C18, HILIC s využitím silikagelu, HILIC s využitím fáze TSKgel Amide) v rostlinných extraktech (červená řepa, opuncie, pitaya). Při MALDI experimentech byl nalezen a měřením přesné a správné hmotnosti iontů a kolizními experimenty jednoznačně identifikován betanin. Přímá infúze extraktů do elektrospreje umožnila identifikaci betaninu, phyllocactinu a amaranthinu, resp. gomphreninu III. Ze studovaných chromatografických systémů poskytuje nejlepší výsledky spojení UPLC-ESI-MS provedené v systému reverzních fází (C18), při kterém byl v potravinovém doplňku obsahujícím extrakt z červené řepy identifikován betanin, hylocerenin a phyllocactin.

Klíčová slova: betalainy, betanin, barviva, betakyaniny, betaxanthiny, UPLC, ESI, MS, MALDI, QqTOF

Summary:

Presented thesis deals with mass spectrometry of betalain dyes. Theoretical part deals with betalains, their properties, presence and different approaches for separation and identification of these natural pigments. The experimental part is dedicated to identification of betalains by mass spectrometry with MALDI ionization, electrospray (direct infusion) and liquid chromatography coupled with mass spectrometry with ESI ionization in different modifications (C18, HILIC based on silicagel stationary phase, HILIC based TSKgel Amide stationary phase) in plant extracts (i.e. Beta Vulgaris, Opuntia, Pitaya). During MALDI experiments betanin was found and unambiguously confirmed by exact mass measurement and MS/MS experiments. Direct infusion of plant extracts into ESI allowed to identify betanin, phyllocactin and amaranthin or gomphrenin III. Among the studied chromatographic systems the best results are provided by UPLC-ESI-MS system performed in reverse phase (C18) mode. This system allowed identification of betanin, hylocerenin and phyllocactin in a food supplement containing extract from beet-root.

Keywords: betalains, betanine, dyes, betacyanins, betaxanthins, UPLC, ESI, MS, MALDI, QqTOF

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké katedry, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....
Kozáková Soňa

Chtěla bych velice poděkovat doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi po celou dobu ochotně poskytoval a pomohl mi tak dovést diplomovou práci ke zdárnému konci.

Obsah:

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 INSTRUMENTÁLNÍ METODY	2
2.1.1 <i>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)</i>	2
2.1.1.1 Typy separačních systémů	2
2.1.1.1.1. Systém s reverzními fázemi (RP-HPLC)	3
2.1.1.1.2 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC).....	4
2.1.2 <i>Hmotnostní spektrometrie (MS)</i>	5
2.1.2.1 Iontové zdroje	6
2.1.2.2 Hmotnostní analyzátory	8
2.1.2.3 Hmotnostní detektory	9
2.2 BETALAINY	11
2.2.1 <i>Výskyt betalainů</i>	12
2.2.2 <i>Vlastnosti betalainů</i>	12
2.2.3 <i>Betakyaniny</i>	13
2.2.3.1 Betanin.....	16
2.2.4 <i>Betaxanthiny</i>	17
2.2.5 <i>Extrakce betalainů</i>	19
2.2.6 <i>Identifikace a chromatografická separace betalainů</i>	20
2.2.7 <i>Hmotnostní spektrometrie betalainů</i>	22
3. CÍLE PRÁCE.....	25
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1 CHEMIKÁLIE A STUDOVANÉ ROSTLINNÉ MATERIÁLY	26
4.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ	26
4.2.1 <i>Příprava vzorků pro MALDI-MS měření</i>	26
4.2.2 <i>Příprava vzorků pro ionizaci ESI a UPLC na koloně C18</i>	27
4.2.3 <i>Příprava vzorků pro ionizaci ESI a UPLC na koloně HILIC</i>	27
4.2.4 <i>Příprava vzorků pro ionizaci ESI a UPLC na koloně HILIC - TSKgel Amide</i>	27
4.3 INSTRUMENTACE	28

4.3.1 Použité přístroje	28
4.3.2 Použité SPE a UPLC kolony	28
4.3.3 Parametry iontových zdrojů	28
4.3.3.1 Parametry MALDI ve spojení s Q-TOF Premier	28
4.3.3.2 Parametry ESI-Q-TOF	29
4.4 PODMÍNKY ANALÝZ	29
4.4.1 SPE extrakce.....	29
4.4.2 Analýza MALDI-Q-TOF.....	30
4.4.3 UPLC-ESI-Q-TOF.....	30
4.4.3.1 UPLC na koloně C18.....	30
4.4.3.2 Chromatografická analýza na koloně HILIC.....	30
4.4.3.3 Chromatografie na koloně HILIC TSKgel Amide	31
4.4.4 Přímý nástřik do ESI-Q-TOF	31
5. DISKUZE A VÝSLEDKY	32
5.1 MALDI-Q-TOF	32
5.2 UPLC-ESI-Q-TOF	35
5.2.1 UPLC na koloně C18.....	35
5.2.2 Chromatografie v HILIC systému	38
5.2.3 Chromatografie na koloně HILIC TSKgel Amide	39
5.2.4 Přímý nástřik do ESI-Q-TOF	41
6. ZÁVĚR	46
LITERATURA	47
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	50

1. Úvod

Betalainy jsou ve vodě rozpustné rostlinné pigmenty, které poskytují zbarvení od světle žluté do tmavě fialové barvy. Dělí se do dvou skupin na červeno-fialové betacyaniny a žluto-oranžové betaxanthiny. Betalainy vykazují antioxidační účinky a jsou tedy příznivé pro lidské zdraví. Díky těmto vlastnostem a přírodnímu původu těchto pigmentů o ně vzrostl zájem. V potravinářském průmyslu jsou zatím používány pouze betalainy, které jsou obsažené v červené řepě (*Beta vulgaris*). Ty jsou využívány jako přírodní potravinářská barviva, v České republice pod označením E 162. Vzhledem k vysokému zájmu o tato barviva se hledají i alternativní použitelné zdroje. K separaci a identifikaci se převážně používá spojení hmotnostní spektrometrie a spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií v různých modifikacích. Na tyto techniky jsem se zaměřila v této práci.

2. Teoretická část

2.1 Instrumentální metody

2.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC (high performance liquid chromatography) je separační technika používaná ke kvalitativní a kvantitativní analýze látek převážně organického charakteru. Separace látek je založena na rozdílné interakci látek se stacionární a mobilní fází. Vzhledem k různé retenci opouštějí jednotlivé složky vzorku systém v různých časech (tzv. eluční časy), díky nimž je možné látky identifikovat.

Stacionární fází je sorbent, který může být uspořádán plošně nebo v koloně (sloupci). V kolonovém uspořádání jde o sloupcovou chromatografii, která je dnes využívána převážně k čištění a izolaci látek a o vysokoúčinnou, resp. ultraúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC, resp. UHPLC). Vysoké účinnosti a rychlosti (U)HPLC se dosahuje použitím kolon naplněných velmi malými částicemi 1,5 až 5 μm a poměrně velkými průtoky mobilní fáze.^{1,2} Pro moderní vysokoúčinnou a zejména ultraúčinnou kapalinovou chromatografii je nezbytné použití kvalitních chromatografických čerpadel umožňujících dlouhodobě stabilní práci za vysokých tlaků. Klíčovou součástí moderního kapalinového chromatografu je detektor. V současné analytické praxi je používána celá řada různých detektorů využívajících různých fyzikálně chemických vlastností analyzovaných látek. S ohledem na zaměření této práce bude v následujících kapitolách věnována pozornost spojení chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

2.1.1.1 Typy separačních systémů

Při chromatografických separacích se využívá různých kombinací vlastností stacionární a mobilní fáze. Běžně jsou používány systémy normálních fází, reverzních (obrácených) fází a dále hydrofilní interakční chromatografie, iontově výměnná chromatografie, chromatografie iontových párů a gelová permeační chromatografie.

V systému normálních fází (NP) je interakce analytu se stacionární fází založena na adsorpci. V tomto uspořádání je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní.³

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) vychází ze systému normálních fází, ale na rozdíl od systému normálních fází se do mobilní fáze přidává voda v množství jednotek až desítek procent.^{4,5} Voda způsobí tvorbu tenkého filmu na povrchu stacionární fáze.

Principem separace je rozdělování analytu mezi mobilní fázi a tenký film na povrchu stacionární fáze.³ Vzhledem k využití HILIC v praktické části této práce je tomuto systému věnována samostatná kapitola.

Chromatografie v systémech reverzních fází (obrácených fází, RP) se v současné době využívají nejčastěji, protože umožňují separovat analyty obsahující nepolární, středně polární i polární a často i iontové látky.⁴ Retence analytů je založena na rozdělování mezi stacionární a mobilní fázi. Základním znakem chromatografie na reverzních fázích je, že mobilní fáze je polárnější, než fáze stacionární.^{3,5} Stejně jako u systému HILIC byl tento systém použit v experimentální části této práce a bude podrobněji popsán v samostatné kapitole.

Iontově výměnná chromatografie (IEC) je založena na interakci iontové (nebo ionizované) části analytu s měniči iontů (ionexy), které jsou chemicky navázané na povrchu stacionární fáze.³ Stacionární fáze je nejčastěji makromolekulární matrice obsahující kyselou nebo bazickou funkční skupinu. Katexy jsou iontoměníče s kyselou funkční skupinou (SO_3^- , COO^-) nesoucí záporný náboj a anexy nesou bazickou funkční skupinu (NH_3^+ , NR_3^+) a jsou nositeli kladného náboje.⁵ K separaci dochází na základě rozdílných elektrostatických interakcí složek vzorků se stacionární fází.

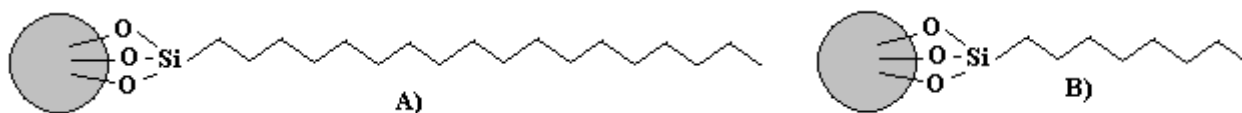
Chromatografie iontových párů (IPC) je metoda umožňující separaci sloučenin iontového charakteru.⁵ Stacionární fáze je nepolární (obvykle jde o reverzní fázi) a polární mobilní fáze obsahuje ionpárovací činidlo, které s analytem vytvoří iontový asociál mající oproti samotnému analytu nižší polaritu a vyšší afinitu ke stacionární fází.

Gelová permeační chromatografie (GPC) je založena na separaci analytu podle velikosti molekul.³ Stacionární fází je chemicky či fyzikálně vytvořený gel o definované velikosti a distribuci pórů. Velké molekuly eluují jako první, protože nemohou proniknout do těchto pórů. Z toho plyne, že eluční čas roste se zmenšující se velikostí molekul. Praktické využití gelové permeační chromatografie je v oblasti separace proteinů a dalších makromolekul.⁵

2.1.1.1.1. Systém s reverzními fázemi (RP-HPLC)

Reverzní fáze jsou v současné době ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii využívány asi v 80 až 90 % aplikací. Chromatografie s reverzními fázemi je charakteristická uspořádáním, při kterém má mobilní fáze vyšší polaritu, než fáze stacionární.⁵ Jako stacionární fáze se obvykle používá silikagel chemicky modifikovaný nepolárními uhlovodíkovými zbytky. Nejčastěji jde o řetězce oktadecylové (C18 kolony – viz obr. č. 1),

oktylové (C8 kolony – viz obr. č. 1) a jiné alkylové nebo aromatické řetězce a substituenty.⁵ Vhodné polarity mobilní fáze je dosaženo použitím směsi rozpouštědel. Většinou se jedná o vodu v kombinaci s acetonitrilem nebo methanolem, ale používají se i jiná rozpouštědla např. propanol, tetrahydrofuran nebo dioxan.



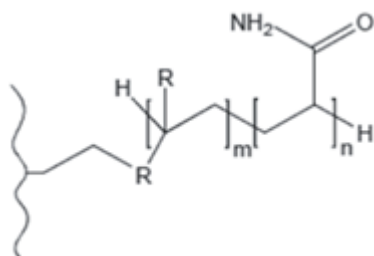
Obr. č. 1: Příklad stacionární fáze: A) C18, B) C8

Mechanismus retence v těchto systémech není dosud zcela jednoznačně objasněn. Předpokládá se, že se nejvýrazněji uplatňuje tzv. solvofobní efekt.^{1,2} Ten si představíme tak, že je analyt rozpuštěn v polární mobilní fázi, která analyt solvatuje a uspořádá se kolem něj. Pokud analyt interaguje se stacionární fází, jsou solvatující složky mobilní fáze uvolněny. Tím se zvýší entropie systému a toto zvýšení je hnací silou vytěsňování látek z mobilní fáze do fáze stacionární. Látky jsou tím více zadržovány, čím nižší je jejich polarita a čím polárnější je mobilní fáze.^{1,2}

2.1.1.1.2 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) probíhá, jak již bylo naznačeno, na kolonách s polárními stacionárními fázemi (podobně jako u chromatografie v systému normálních fází), ale fáze mobilní obsahuje vodu, která se váže na fázi stacionární. Tím se vytváří tenký stacionární film vody na povrchu sorbentu. Principem separace je rozdělování analytů mezi mobilní fází a vrstvičku vody. HILIC je velmi vhodnou technikou pro analýzu polárních látek. HILIC technika našla nejprve uplatnění při separacích sacharidů, aminokyselin a peptidů.⁶ Jako stacionární fáze se u HILIC separací nejčastěji používá nemodifikovaný silikagel se sníženou koncentrací povrchových silanolových skupin.⁷ Dále se užívají stacionární fáze s chemicky navázanými skupinami aminopropylovými, karbamátovými, amidovými (viz obr. č. 2), nitrilovými atd.⁸ Mobilní fáze jsou obvykle tvořeny acetonitrilem s malým přídatkem vody resp. vhodného pufru.^{5,9}

Hlavní hnací silou retence jsou hydrofilní interakce jak s povrchem stacionární fáze, tak i s kapalinou na povrchu stacionární fáze. Polární látky jsou zadržovány silněji než látky nepolární. Retence klesá s rostoucí koncentrací vodné složky v mobilních fázích.¹⁰

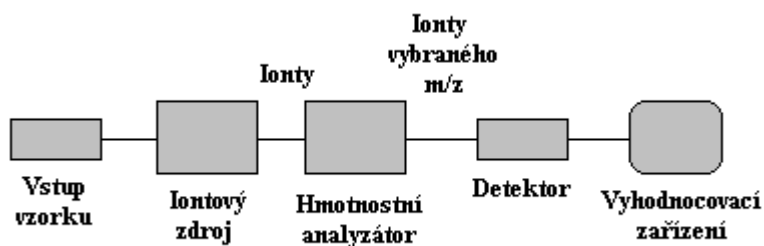


Obr. č. 2: Struktura stacionární fáze HILIC – TSKgel Amide 80 (cit.¹⁰)

2.1.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která umožňuje zjistit hodnotu poměru hmotnosti a náboje iontů analyzovaných látek.¹¹ Principem je ionizace analytu ve vhodném iontovém zdroji, následná separace iontů podle hodnoty m/z a detekce prošlých iontů analyzátozem.¹¹ Je to metoda destruktivní, ale k analýze je potřeba pouze malé množství vzorku. Výsledkem je hmotnostní spektrum.

Hmotnostní spektrometr je složen z iontového zdroje, kde dochází k ionizaci vzorku, dále je zařazen hmotnostní analyzátozem, kde dochází k separaci iontů podle hodnoty m/z (poměr hmotnosti a náboje iontu), dále detektor, kde dochází k detekci a vyhodnocovací zařízení (viz obr. č. 3). Pro efektivní transfer iontů hmotnostním spektrometrem je nezbytné pracovat za sníženého tlaku. Separace a detekce iontů probíhá ve vakuu, proto je součástí přístroje i výkonný (obvykle vícestupňový) vakuový systém.¹¹



Obr. č. 3: Schéma hmotnostního spektrometru

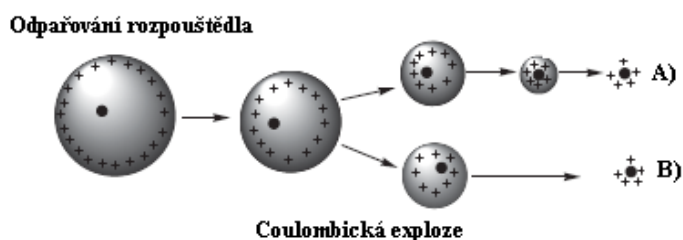
2.1.2.1 Iontové zdroje

Účelem iontového zdroje je převedení analytu na ionty, které jsou dále separovány a detekovány.¹¹ Podle množství energie dodané při ionizaci dělíme ionizační techniky na měkké a tvrdé. Při tvrdé ionizaci vzniká velké množství fragmentů, na rozdíl od ionizace měkké, kdy vzniká převážně ionizovaná molekula analytu.

Mezi měkké ionizační techniky patří skupina technik pracujících za atmosférického tlaku (API). Tyto ionizační techniky nepotřebují vakuum ani vzorek v plynném stavu a proto se hodí k on-line spojení HPLC-MS. Mezi tyto techniky patří chemická ionizace za atmosférického tlaku, fotoionizace za atmosférického tlaku, termosprej a elektrosprej.¹² Principem chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) je zmlžení analytu, odpaření rozpouštědla a vzorku v proudu plynu a následná ionizace pomocí výboje na jehle, kdy dojde k ionizaci rozpouštědla a předání náboje analytu.^{11,12} Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) je založena na sprejování analytu s dopantem, který je ionizován zářením, a svůj náboj následně předá analytu.^{11,12} Při použití termospreje (TSP) vznikají ionty odpařováním rozpouštědla z rozprašovaných kapek za zvýšené teploty.^{11,13}

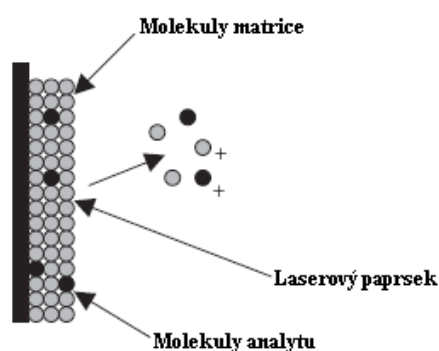
Ionizace elektrosprejem je jednou z nejšetrnějších metod ionizace a patří mezi nejpoužívanější ionizaci ve spojení s kapalinovou chromatografií.¹⁴ Selektivitu ionizace je možné ovlivňovat volbou mobilní fáze, změnou parametrů kapiláry, mezi které patří teplota, napětí a rychlost průtoku pomocných kapalin a plynů. Výhodou je, že poskytuje vícekrát nabité ionty, čehož lze využít při analýze velkých molekul, typicky např. proteinů.¹² Principem ionizace elektrosprejem je přívod roztoku vzorku (eluátu z kolony) nabitou kapilárou, na jejímž koci se odtrhávají nabité kapičky. Pro zajištění stabilního procesu ionizace může být tvorba nabitého aerosolu podporována průtokem zmlžovacího plynu (případně také pomocné kapaliny), kolem sprejovací kapiláry. Z nabitých kapiček je odpařováno rozpouštědlo, tím roste hustota povrchového náboje, až do okamžiku, kdy je překročena kritická hranice hustoty povrchového náboje a dojde k tzv. coulombické explozi. Potom se kapka rozpadne na několik menších a tento proces se opakuje až do vzniku plynných iontů analytu. Ionty mohou vznikat dvojím způsobem, prvním je model zbytkového náboje, kdy v kapce zůstane jediný ion spolu s malým množstvím rozpouštědla, které je odpařeno a vznikne ion v plynné fázi. Druhým způsobem je model iontového vypařování, při kterém dochází ke zmenšování poloměru kapky pod určitou kritickou hranici, pod kterou

již dochází k přímému odpařování plynných iontů.¹² Tyto principy jsou zobrazeny na obr. č. 4. Vzniklé ionty jsou dále vedeny iontovou optikou do hmotnostního analyzátoru.^{11,15,16}



Obr. č. 4: Mechanismus ionizace elektrosprejem: A) model zbytkového náboje, B) model iontového vypařování¹¹

V moderní analýze je často vedle analýzy roztoků potřebné studovat složení povrchů různých materiálů, případně směsí na povrch deponovaných. Pro tento účel byla v minulosti testována celá řada ionizačních technik, z nichž největší popularitě se těší postupy založené na desorpci/ionizaci laserem (LDI). Principem metody MALDI (matricí asistované ionizace/desorpce laserem) je ionizace matrice laserem a následné předání náboje a energie matrice analytu (viz. obr. č. 5). Klíčová je příprava vzorku. Nejprve je roztok analytu smíchán s matricí a vzniklý roztok je nanesen na destičku z nerezové oceli (MALDI plate). Tato směs se nechá odpařit do sucha. Vedle toho se uplatňuje řada jiných postupů, například nanesení vzorku a jeho následné překrytí matricí atp.^{11,12} Tato ionizace může probíhat za atmosférického tlaku nebo za vakua.



Obr. č. 5: Mechanismus ionizace MALDI¹¹

Nevýhodou této metody ionizace je nemožnost on-line spojení se separačními technikami, tedy i s kapalinovou chromatografií. Výhodou je naopak, že lze analyzovat i vzorky zasolené, obsahující stopy pufrů, denaturačních činidel a není tedy nutná složitá

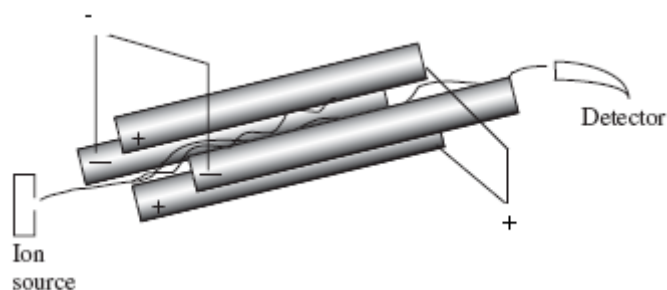
úprava vzorku. Na rozdíl od elektrospreje dochází v MALDI k ionizaci analytu pouze jedenkrát (vznikají jednou nabité ionty). MALDI se využívá pro široký rozsah molekulových hmotností analytů.¹² Jako analyzátor se ve spojení s MALDI nejčastěji využívá analyzátor doby letu (TOF).¹¹

Nano-asistovaná ionizace laserem (NALDI) je ionizace, při které dochází k ozáření analytu laserem na speciální podložce z nanomateriálu, který umožní přenos energie laseru ve formě náboje na analyt.

2.1.2.2 Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení vzniklých iontů z ionizátoru podle jejich poměru m/z a tyto separované ionty transportuje do detektoru. Liší se principem separace iontů a také analytickými parametry analyzátoru, mezi které patří správnost, přesnost, rozlišení a rychlost skenování. Mezi analyzátor patří sektorové analyzátor, kvadrupólový analyzátor, iontová past, iontová cyklotronová rezonance, orbitální past, analyzátor doby letu nebo se používá tandemové spojení více analyzátorů. Blíže zde bude popsán kvadrupólový analyzátor, analyzátor doby letu a hybridní analyzátor vycházející ze spojení kvadrupólu a detektoru doby letu (QqTOF), který byl použit v této práci.

Kvadrupólový analyzátor (Q, obr. č. 6) se skládá ze čtyř kovových tyčí na které je vloženo stejnosměrné a střídavé napětí. Ionty, které vlétnou do prostoru mezi tyčemi, začnou oscilovat a při vhodně zvolených hodnotách stejnosměrného a střídavého napětí projdou kvadrupólem jen ionty o určitém m/z . Postupnou změnou střídavého a stejnosměrného napětí jsou postupně detekovány všechny ionty ve zvoleném skenovacím rozsahu. Ostatní ionty analyzátozem neprojdou, zachytí se na tyčích.¹¹

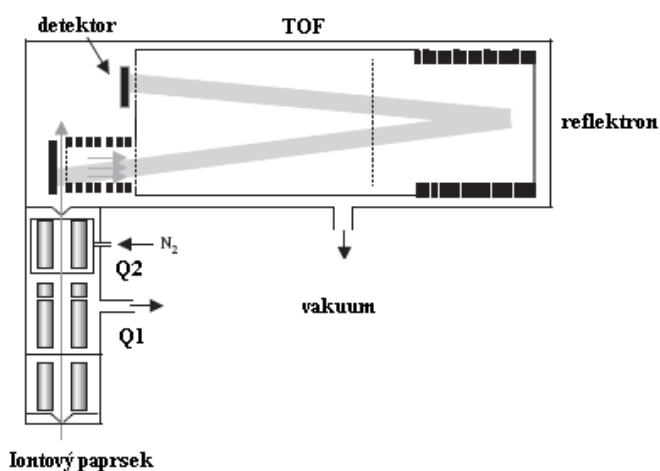


Obr. č. 6: Schéma kvadrupólového analyzátoru¹¹

Analyzátor doby letu (TOF) je založen na rozdělení iontů na základě doby letu. Principem je urychlení všech iontů shodnou energií na začátku dráhy, která se projeví různou

rychlostí iontů podle jejich m/z . Ionty dopadající v různých časech na detektor jsou poté zaznamenány.¹¹ Ionty s vyšší molekulovou hmotností dopadnou na detektor později než ionty s nižší molekulovou hmotností. Pro zpřesnění měření a zvýšení rozlišení se používá tzv. reflektron, který fokusuje ionty o shodném m/z a různé rychlosti.¹¹

Hybridní analyzátor Q-TOF se skládá ze dvou kvadrupólových analyzátorů a analyzátoru doby letu (obr. č. 7). První kvadrupól slouží jako akumulční zařízení pro výběr iontu určitého m/z , do druhého kvadrupólu se přivádí pod vhodným tlakem inertní plyn a ten slouží jako kolizní cela pro řízenou fragmentaci iontů. V průletovém hmotnostním analyzátoru se vzniklé ionty o stejné kinetické energii rozdělí podle doby letu.¹¹



Obr. č. 7: Schéma Q-TOF¹¹

2.1.2.3 Hmotnostní detektory

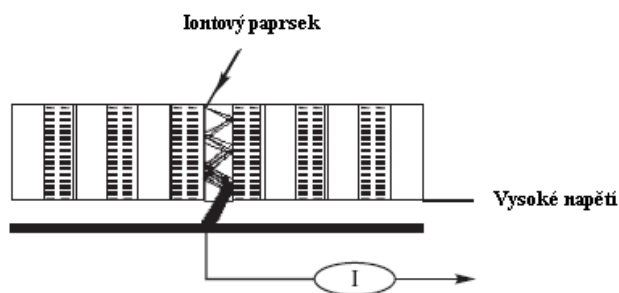
Hmotnostní detektory slouží k převodu iontů vycházejících z analyzátoru na elektrický signál. Hmotnostní detekce se dělí na detekci přímou a detekci po zesílení signálu. Přímá detekce se používá pro určení přesného izotopového zastoupení prvků (např. Faradayova klec).

Detekce po zesílení signálu je častěji využívanou detekcí hmotnostní spektrometrie. Mezi detektory patří elektronásobiče a fotonásobiče. Elektronový násobič je zařízení obsahující sérii dynod se vzrůstajícím potenciálem. Ionty narážejí na povrch dynody, dojde k sekundární emisi. Emitované částice jsou přitahovány další dynodou, na které dojde k vícenásobné emisi částic. Kaskádovitým efektem tak vznikne velké množství elektronů, které jsou detekovány. Fotonásobič je citlivý detektor elektro-magnetického záření v UV, VIS a IR oblasti. Ionty se detekují tak, že se před fotonásobič umístí fosforová destička. Na ní dopadají částice z konverzní dynody a dochází k emisi fotonů. Ty dopadají

na fotokatodu, kde fotoelektrickým jevem dojde k emisi elektronů. Ty jsou dále zmnoženy stejně jako v elektronovém násobiči.

Elektronásobiče produkují měřitelný proud. Patří mezi ně destičkové dynody, dynody kontinuální a mikrokanálová destička.¹¹ Destičkové dynody se skládají ze série kovových elektricky propojených dynod, mezi první a poslední dynodu je vloženo napětí. Po dopadu iontu na první konverzní dynodu jsou vyraženy elektrony, jejichž počet se dopadem na další dynody znásobí a nakonec jsou zachyceny kolektorem.¹¹ Dynody kontinuální jsou tvořeny zakřivenou trubicí z olovnatého skla s velkým elektrickým odporem, na kterou je vloženo vysoké napětí. Stěna trubice je pokryta vrstvou oxidu berylnatého nebo hlinitého. Ionty dopadají na takto pokrytou stěnu trubice, čímž vyrážejí elektrony a jejich opakovaným nárazem na stěny se jejich počet násobí.¹¹

Mikrokanálová destička (microchannel plate, MCP) je zařízení, které rovněž zesiluje elektronový signál. MCP má několik milionů nezávislých kanálů a každý kanál pracuje jako nezávislý elektronový násobič (obr. č. 8). Obsahuje dvoudimenzionální periodické pole tvořené z tenkých skleněných kapilár (kanálků) stavených dohromady a rozřezaných na tenké plátky. Jednotlivá dopadající částice (v případě hmotnostní spektrometrie ion) vstupuje do kanálku a emituje elektron ze stěny kanálku. Sekundární elektrony jsou urychleny elektrickým polem vloženým přes oba konce MCP. Tyto elektrony potom putují kanálkem po parabolických trajektoriích do doby, než narazí na povrch kanálku a vyrazí z něj více sekundárních elektronů. Tento proces se mnohokrát opakuje a výsledkem této kaskády je oblak několika tisíc elektronů, které vystupují na zadní straně MCP. Protože jednotlivé kanály omezují (ohraničují) puls, prostorový profil pulsů elektronů na zadní straně destičky zachovávají profil (obraz) částic dopadajících na přední povrch MCP. Výstupní signály jsou nejčastěji sbírány kovovými nebo polymetalickými anodami, odporovou anodou, výstupem se zpožďovací linkou nebo fosforovou mřížkou deponovanou na vláknové optice. Toto zařízení se používá nejčastěji pro TOF analyzátory.¹¹

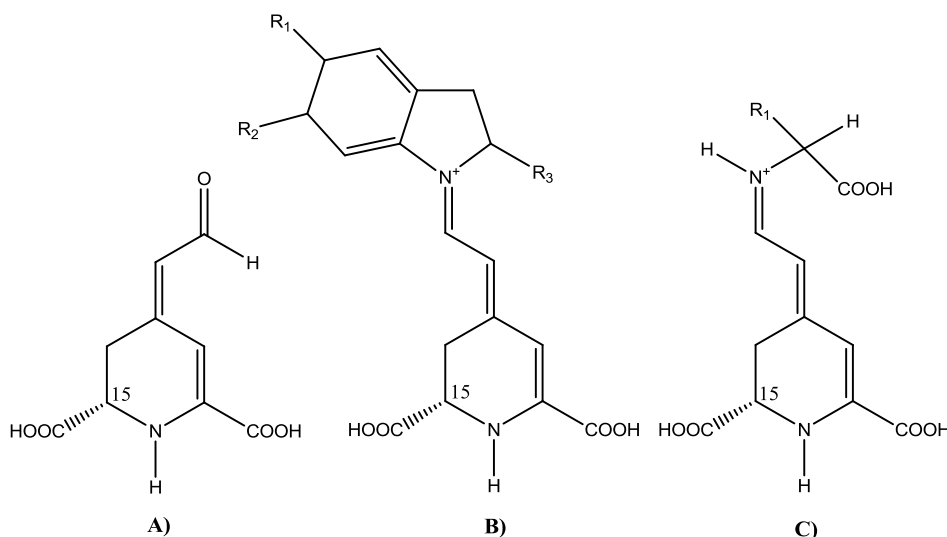


Obr. č. 8: Schéma mikrokanálové destičky¹¹

2.2 Betalainy

Betalainy jsou skupinou asi 70 ve vodě rozpustných indolových barviv. Nacházejí se ve vakuolách rostlinných buněk, především v květech a plodech rostlin, ale je možné je nalézt i v jiných částech rostlin. Rostlinným pletivům poskytují charakteristické spektrum barev od tmavě fialových až po světle žluté odstíny, převážně jsou ale červené.^{17,18}

Betalainy se dělí na dvě podskupiny - betakyaniny (červené až fialové pigmenty) a betaxanthiny (žluté až oranžové pigmenty), struktury viz obr. č. 9. Společným chromoforem pro všechny betalainy je betalamová kyselina (viz obr. č. 9). Klasifikaci betalainů do skupiny betakyaninů nebo betaxanthinů určuje navázaný zbytek.¹⁹ V přírodě bylo identifikováno asi 50 betakyaninů a 20 betaxanthinů.²⁰ Základní kostra betalainů je opticky aktivní díky přítomnosti chirálního centra na uhlíku C-15.²¹



Obr. č. 9: Strukturální vzorce (s vyznačením uhlíku C15): A) betalamové kyseliny, B) betakyaninů, C) betaxanthinů

Betalainy jsou široce využívány jako přírodní aditiva v potravinářském průmyslu díky jejich výrazným barvicím vlastnostem a netoxicitě.^{17,22,23} Také nejsou zjištěny případy alergických reakcí po požití, což je jejich výhodou oproti syntetickým barvivům.²⁴ Jediným komerčním zdrojem betalainů pro barvení potravin je prozatím červená řepa (*Beta vulgaris*), ale hledají se i jiné vhodné alternativy.^{20,25} Pouze v Číně je možné používat jako potravinová aditiva i betalainy z amaranthu, která se zde používají pro barvení alkoholických nápojů a kukuřičného těsta.²⁶ Žluté pigmenty (betaxanthiny) jsou v potravinářství vzácné kvůli jejich omezeným zdrojům a velmi nízké stabilitě.²⁰ Betakyaniny, především betanin se tedy

používají především při barvení masa, uzenin, barvení zmrzliny, cukrovinek a nealkoholických nápojů v prášku.

Velmi často jsou betalainy srovnávány s anthokyaniny, které nahradily v několika druzích vyšších rostlin řádu hvozdíkotvarých (Caryophyllales) a to v čeledi hvozdíkovitých (Caryophyllaceae) a Molluginaceae.²⁷ Rostlině poskytují stejná zbarvení jako anthokyaniny. I anthokyaniny se stejně jako betalainy využívají v potravinářství jako náhrada za syntetická barviva. Mají také antioxidační vlastnosti a schopnost zhaset volné radikály.^{19,28} Zajímavé je, že nikdy nebyly anthokyaniny spolu s betalainy nalezeny společně v téže rostlině.^{29,30}

2.2.1 Výskyt betalainů

Betalainy se vyskytují v rostlinách řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales, Centrospermae) a v některých vyšších houbách.^{22,23,31} Dále se nacházejí především v plodech kaktusu opuncie (*Opuntia ficus-indica*, *Opuntia stricta*, *Opuntia undulata*), které patří do čeledi kaktusovité (Cactaceae), v bulvách červené, žluté, bílé řepy (*Beta vulgaris*), v plodech kaktusu pitaya (*Hylocereus polyrhizus*), v listech a řapících laskavce (*Amaranthus*), v řapících mangoldu (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla*), v květech Nocenky jalapenské (*Mirabilis jalapa*), v květech kaktusu *Gymnocalycium mihanovichii*, v plodech Bazely (*Basella alba*, *Basella rubra*), v plodech Líčidla amerického (*Phytolacca americana*), v květech Vánočního kaktusu (*Schlumbergera*), v květech Kosmatcovníku velkokvětého (*Carpobrotus acinaciformis*), ve stoncích a květech Šruchy velkokvěté (*Portulaca grandiflora*), v květenstvích Chvastounu (*Celosia cristata* *Celosia argentea*) v listenech Bugévillei (*Bougainvillea glabra*), v květenstvích Pestrovky kulovité (*Gomphrena globosa*) a v kloboucích Muchomůrky červené (*Amanita muscaria*).

2.2.2 Vlastnosti betalainů

Betalainy vykazují antioxidační^{9,32,33}, antimikrobiální³⁴, antivirovou³⁴ aktivitu a mají schopnost zhaset volné radikály^{17,23}. Sleduje se i jejich protirakovinová aktivita^{35,36}. Schopnost zhaset volné radikály je u betakyaninů větší než u betaxanthinů.³⁷ Antioxidační účinky snižují oxidativní procesy in vivo a tím snižují riziko vzniku některých kardiovaskulárních³⁸ a nádorových³⁹ onemocnění. Antioxidační aktivita betalainů byla hodnocena pomocí DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) metody²⁰ nebo pomocí metody ABTS⁴⁰. Je to metoda využívající zhasení radikálového kationtu ABTS⁺ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)).³⁷ Pro vyjádření antioxidační aktivity se využívá metoda

TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), kdy se antioxidační aktivita vzorku vztahuje ke standardní látce (Trolox).^{40,41} Antioxidační aktivita betaninu je $20,0 \pm 0,5 \mu\text{mol TE/g}$ a indicaxanthinu $1,76 \pm 0,1 \mu\text{mol TE/g}$.⁴⁰

Nevýhodou betalainů je jejich nízká stabilita.¹⁹ Jsou citlivé na zvýšenou teplotu. Ve vodných roztocích jsou nejstabilnější při teplotě $\leq 14 \text{ }^\circ\text{C}$. Vysušené pigmenty jsou nejvíce stabilní při $25 \text{ }^\circ\text{C}$. V roztocích jsou nejstabilnější při pH 5,6, ale relativně stabilní jsou v rozmezí pH 3-7.²⁰ Barva betalainů závisí na pH, mezi hodnotou 4,5 až 5 je barva světle namodralá až červená, modro-fialová je pokud se pH zvyšuje a při vysoké hodnotě pH se barva změní na žluto-hnědou.^{30,42} Degradaci betalainů urychluje i přítomnost některých kovových kationtů, mezi které patří Fe^{2+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} a Pb^{2+} . Betalainy reagují i s molekulárním kyslíkem a jsou ovlivněny intenzitou světla, které urychluje jejich degradaci a proto je vhodné skladování ve tmě a bez přítomnosti vzduchu.^{19,21,43}

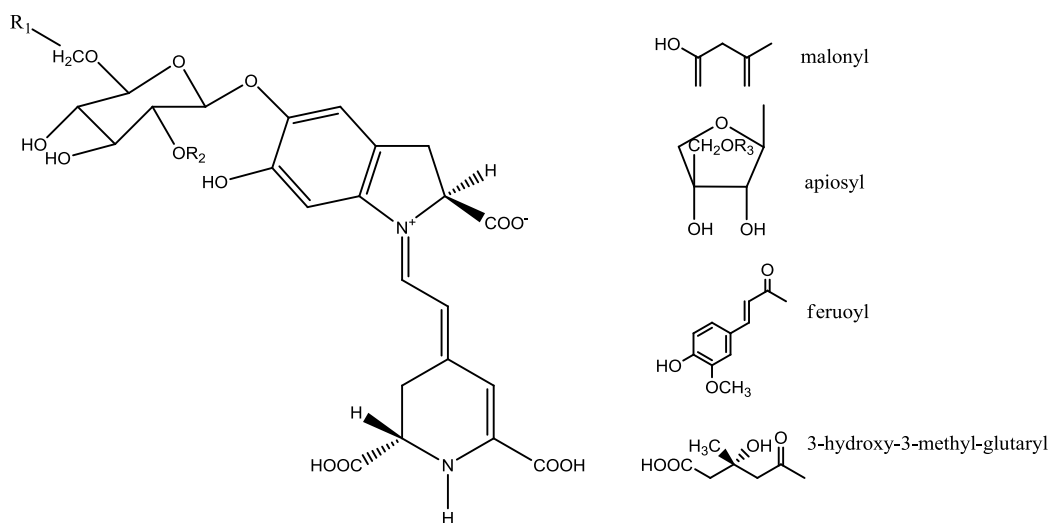
2.2.3 Betakyaniny

Betakyaniny jsou kondenzační produkty betalamové kyseliny s cyclo-Dopa (cyklo-3,4-dihydroxyphenylalanin) nebo její O-glykosylované (většinou 5-O-glykosylované nebo 6-O-glykosylované) deriváty.^{3,23} Není popsána možná substituce obou pozic zároveň. Hlavním aglykonem většiny betakyanů je betanidin. Jak již bylo zmíněno betakyaniny existují ve dvou diastereomerních formách lišících se konfigurací na uhlíku C15.⁴⁴ Nejvíce zastoupeným betakyaninem je betanin (betanidin-5-O-glykosid), který reprezentuje většinu obsahu betakyaninů v červené řepě. Betakyaniny mají dvě absorpční maxima, první mezi 270-280 nm, díky cyklo-Dopa struktuře a druhé maximum je mezi 535-540 nm.^{19,29,45}

Betakyaniny se dělí do 4 skupin na betaninovou skupinu, amaranthinovou skupinu, gomphreninovou skupinu a 2-deskarboxy-betaninovou skupinu.^{20,27}

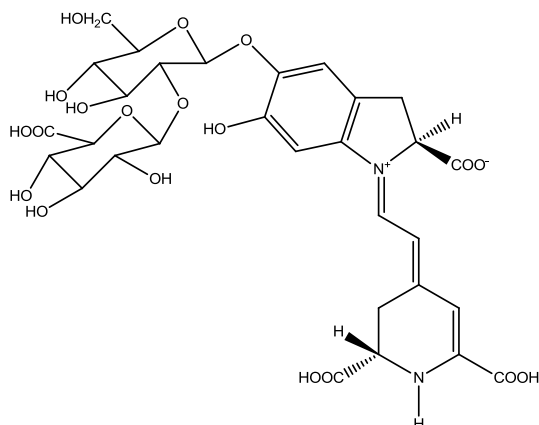
Betaninová skupina obsahuje *phyllocactin*, *2'-O-Apiosyl-phyllocactin*, *2'-(5''-O-E-Feruoylapiosyl)-betanin*, *2'-(5''-O-E-Feruoylapiosyl)-phyllocactin*, *hylocerenin* a *betanin* (obr. č. 10). Phyllocactin je betakyanin (6'-O-malonyl-betanin). Je to charakteristický pigment v květech a plodech čeledi kaktusovitě. Vazba malonylové skupiny ve phyllocactinu je v poloze 6-O na glukose. 2'-Apiosyl-phyllocactin je betakyanin izolovaný z květů Vánočního kaktusu. 2'-(5''-O-E-Feruoylapiosyl)-betanin je obsažen v plodech Líčidla amerického spolu s prebetaninem, gomphreninem I a lamphrantinem II. Hylocerenin

byl nalezen v plodech kaktusu pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) spolu s betaninem a phylloactinem.^{27,46}



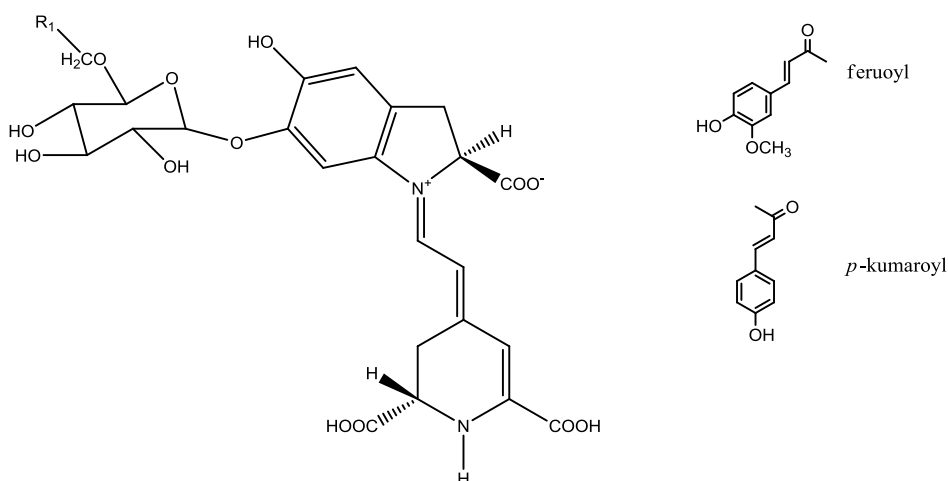
Obr. č. 10: Struktura betaninové skupiny betakyaninů: *betanin* ($R_1 = R_2 = H$), *isobetainin* (C_{15} epimer); *phylloactin* ($R_1 = \text{malonyl}$, $R_2 = H$), *isophylloactin* (C_{15} epimer); *hylocerenin* ($R_1 = \text{3-hydroxy-3-methyl-glutaryl}$, $R_2 = H$), *isohylocerenin* (C_{15} epimer); *2'-O-Apiosyl-phylloactin* ($R_1 = \text{malonyl}$, $R_2 = \text{apiosyl}$, $R_3 = H$), *2'-(5''-O-E-Feruoylapiosyl)-betainin* ($R_1 = H$, $R_2 = \text{apiosyl}$, $R_3 = \text{feruoyl}$), *2'-(5''-O-E-Feruoylapiosyl)-phylloactin* ($R_1 = \text{malonyl}$, $R_2 = \text{apiosyl}$, $R_3 = \text{feruoyl}$)

Amaranthinová skupina obsahuje *amaranthin* (obr. č. 11), který je obsažen v laskavci (*Amaranthus*). Další pigmenty obsažené v různých druzích amaranthu jsou iresinin I, celosian I a celosian II.^{27,47}



Obr. č. 11: Struktura amaranthinové skupiny betakyaninů: *amaranthin*, *isoamaranthin* (C_{15} epimer)

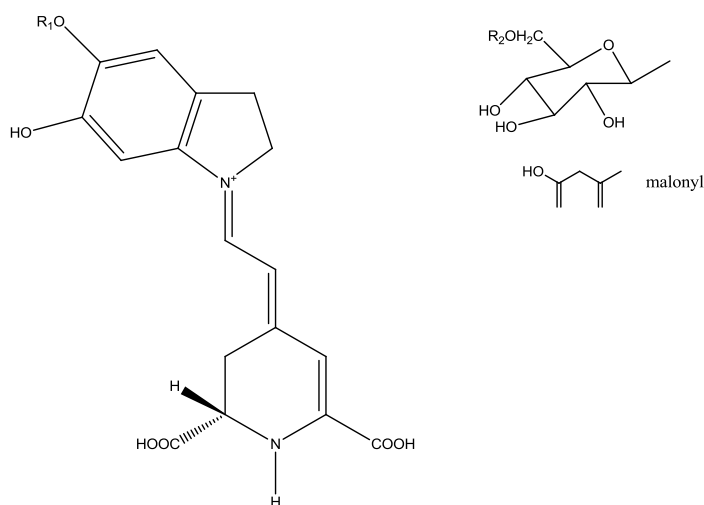
Do gomphreninové skupiny patří *gomphrenin I*, *gomphrenin II*, *gompherin III* (obr. č. 12) a *deriváty betanidinu 6-O-(6-O-hydroxy-cinnamoyl)-β-glukopyranosyl-glukosid*. Gomphrenin I, II a III jsou skupina podobných betakyaninů. Jsou hlavními pigmenty v květenstvích Pestrovky kulovité (*Gomphrena globosa*) a dále se nacházejí v plodech Bazely (*Basella rubra*), v laskavci (*Amaranthus*) a v Bugénavilei (*Bougainvillea*). Jsou to strukturní izomery betaninu. Deriváty betanidinu 6-O-(6-O-hydroxy-cinnamoyl)-β-glukopyranosyl-glukosid jsou obsaženy v listenech Bugénavilei (*Bougainvillea glabra*), která obsahuje nejsložitější vzor betakyaninů, obsahuje víc než 30 struktur. Mezi tyto struktury patří např. betanidin 6-O-β-glukopyranosyl-glukosid, betanidin 6-O-(6''-O-E-kaffeoyl)-β-glukopyranosyl-glukosid, betanidin 6-O-(6''-O-E-4-kumaroyl)-β-glukopyranosyl-glukosid, betanidin 6-O-{2''-O-β-glukopyranosyl-glukosyl [(6'-O-E-kaffeoyl)-(6''-O-E-4-kumaroyl)]}-β-glukopyranosyl-glukosid, betanidin 6-O-[(2''-O-β-glukosyl) (6',6''-di-O-E-4-kumaroyl)]-β-glukopyranosyl-glukosid, betanidin 6-O-(6', 6''-di-O-E-4-coumaroyl)-β-glukopyranosyl-glukosid.^{27,48}





Obr. č. 12: Struktura gomphreninové skupiny betakyaninů: *gomphrenin I* ($R_1 = H$), *isogomphrenin I* (C_{15} epimer); *gomphrenin II* ($R_1 = p$ -kumaroyl), *isogomphrenin II* (C_{15} epimer); *gomphrenin III* ($R_1 =$ feruoyl), *isogomphrenin III* (C_{15} epimer)

Betaninová skupina se ztrátou karboxylové skupiny v poloze 2 na struktuře indolu (názvoslovně uváděno jako předpona *deskarboxy*) obsahuje *2-deskarboxy-betanidin* ((E)-2-karboxy-1-((E)-2-((S)-2,6-dikarboxy-2,3-dihydropyridin-4(1H)-yliden)ethyliden)-5,6-dihydroxyindolinium), *2-deskarboxy-betanin* ((E)-1-((E)-2-((R)-2,6-dikarboxy-2,3-dihydropyridin-4(1H)-yliden)ethyliden)-6-hydroxy-5-((2R,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-

methoxytetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)indolinium) a 6'-malonyl-2-deskarboxy-betanin ((E)-5-((2R,3R,4S,5S,6S)-6-(3-karboxy-2-oxopropoxy)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-1-((E)-2-((R)-2,6-dikarboxy-2,3-dihydropyridin-4(1H)-yliden)ethyliden)-6-hydroxyindolinium) (viz obr. č. 13). Betakyaniny jsou obvykle derivovány z cyklo-dopa s výjimkou betakyaninu derivovaného z dopaminu, kterým je 2-deskarboxy-betanidin. Je obsažen v květech Kosmatcovníku velkokvětého (*Carpobrotus acinaciformis*) a také ve žluté řepě (*Beta vulgaris*). 2-deskarboxy-betanin a 6'-malonyl-2-deskarboxy-betanin jsou také obsaženy ve velmi malém množství ve žluté řepě (*Beta Vulgaris*).^{27,49}

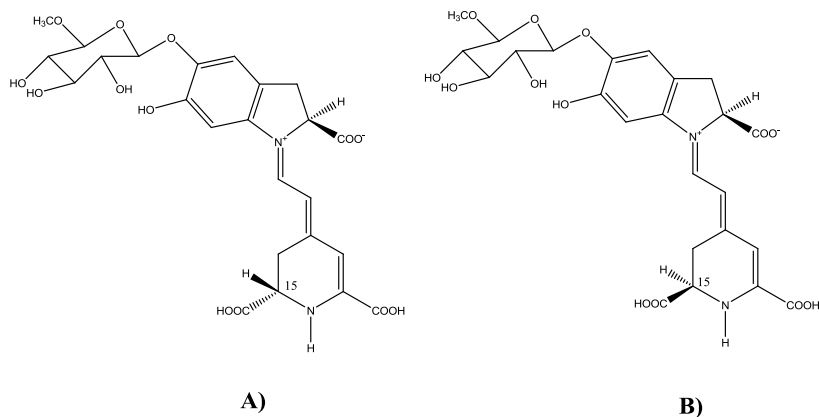


Obr. č. 13: Struktura 2-deskarboxy-betaninové skupiny betalainů: 2-deskarboxy-betanidin

($R_1 = H$), 2-deskarboxy-betanin ($R_1 =$ , $R_2 = H$), 6-O-malonyl-2-deskarboxy-betanin ($R_1 =$ , $R_2 = \text{malonyl}$)

2.2.3.1 Betanin

Betanin je 5-O-glykosylovaný betakyanin (obr. č. 14), který se vyskytuje jako 15-S-betanin (betanin) a 15-R-betanin (isobetanin).^{42,44}



Obr. č. 14: Struktury A) betanin, B) isobetanin

Betanin slouží jako potravinářské aditivum, jehož označení je E162 (betalainová červeně), která patří do skupiny barviv E 100- E 182 a používá se k barvení mléčných výrobků, zmrzlin, masných výrobků a bonbónů. Je charakterizován jako bezpečné barvivo bez nežádoucích účinků.

Je obvykle získávaný z extraktu šťávy červené řepy, koncentrace v červené řepě může dosáhnout 300-600 mg/kg. Jinými zdroji jsou např. plody kaktusu opuncie, mangold nebo listy některých druhů aramanthu.

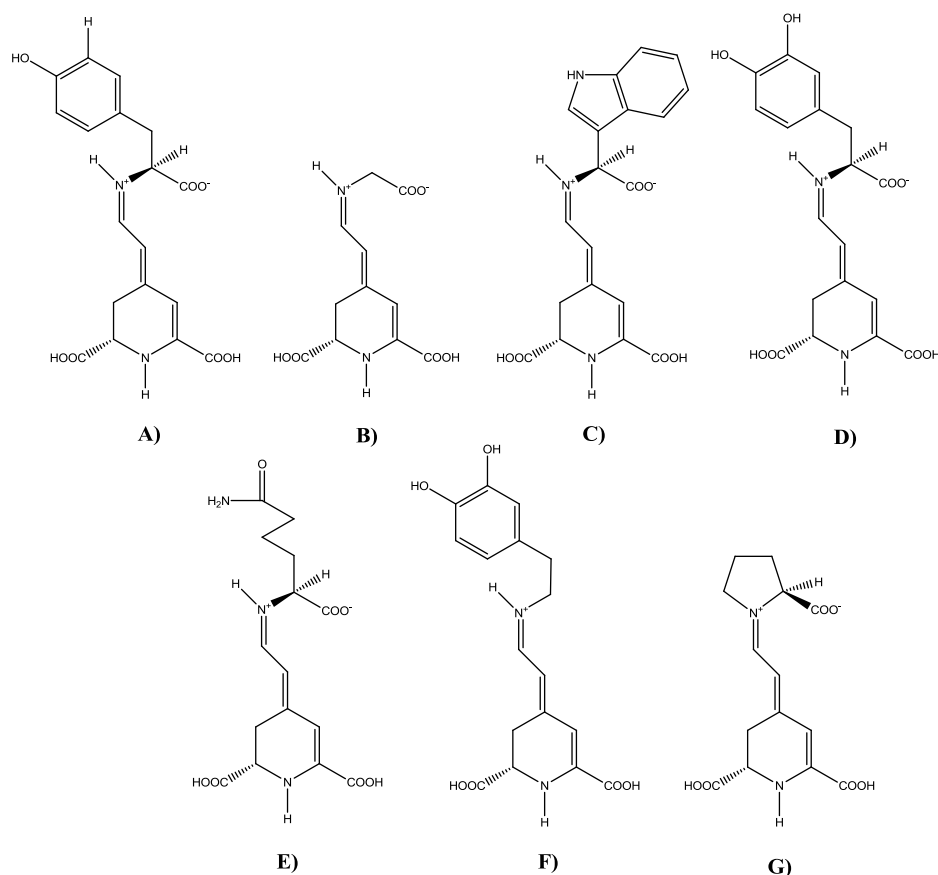
2.2.4 Betaxanthiny

Betaxanthiny jsou dihydropyridinové deriváty, produkty kondenzace betalainové kyseliny s aminokyselinami nebo biogenními aminy.²³ Mezi nejvíce zastoupené betaxanthiny patří indicaxanthin⁴⁵, vulgaxanthin I²² a vulgaxanthin II²². Absorpční maximum ve viditelné oblasti spektra je 480 nm.¹⁹

Betaxanthiny se dělí do 2 skupin na konjugáty odvozené od aminokyselin a konjugáty odvozené od aminů.²⁷

Do skupiny konjugátů odvozených od aminokyselin patří *portulacaxanthin II* (tyrosin-betaxanthin), *portulacaxanthin III* (glycin-betaxanthin) a *tryptofan-betaxanthin*, *dopaxanthin*, *vulgaxanthinem I* (glutamin-betaxanthin), *miraxanthinem V* (dopamin-betaxanthin), *indicaxanthin* (prolin-betaxanthin) (obr. č. 15). Portulacaxanthin II je hlavní betaxanthin akumulovaný ve stoncích a květech Šruchy velkokvěté (*Portulaca grandiflora*).

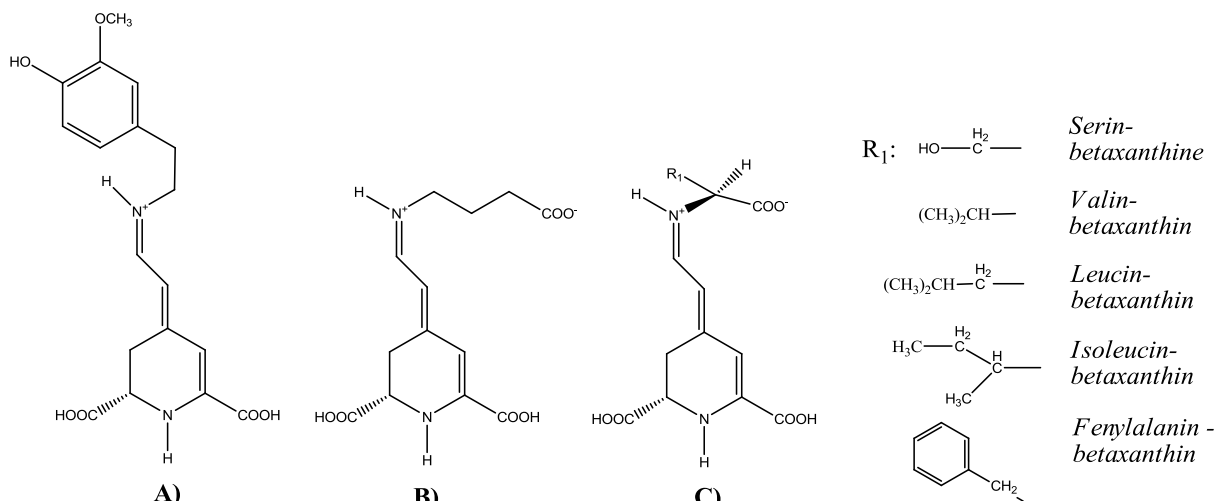
Portulacaxathin II je betaxanthin obsahující hydroxyprolin, který se vyskytuje hlavně v žlutých květech spolu s vulgaxanthinem I, vulgaxanthinem II, dopaxanthinem a miraxanthinem V. Vulgaxanthin I a II, dopaxanthin a miraxanthin V jsou také obsaženy v oranžových bulvách řepy (*Beta vulgaris*). Portulacaxanthin III je minoritní pigment obsažený také v žlutých květech Šruchy velkokvěté. Tryptofan-betaxanthin se vyskytuje v čeledi řádu Laskavcovité, je to žlutě až oranžově zbarvený pigment.^{27,47}



Obr. č. 15: Struktury betaxanthinů: A) *portulacaxanthin II*, B) *portulacaxanthin III*, C) *tryptofan-betaxanthin*, D) *dopaxanthin*, E) *vulgaxanthin I*, F) *miraxanthin V*, G) *indicaxanthin*

Mezi konjugáty odvozené od aminů patří *3-methoxytyramin-betaxanthin* a *betaxanthiny* obsažené v kaktusu opuncie a v žluté řepě (obr. č. 16). 3-methoxytyramin-betaxanthin je pigment nacházející se ve žlutých a oranžových květenstvích chvastounu (*Celosia cristata*, *Celosia argentea*). V plodech opuncie (*Opuntia ficus-indica*) je obsaženo 7 betaxanthinů, kromě indicaxanthinu jsou to ještě γ -aminomáselná kyselina-betaxanthin, serin-betaxanthin, valin-betaxanthin, leucin-betaxanthin, isoleucin-betaxanthin a fenylalanin-

betaxathin. Stejné betaxanthiny jsou také obsaženy v poddélžném článku klíčící rostliny (hypokotylu) žluté řepy.^{27,47,49,50}



Obr. č. 16: Struktury betaxanhinů: A) 3-methoxytyramin-betaxanthin, B) γ -aminobutyric acid-betaxanthin, C) ostatní betaxanthiny obsažené v kaktusu opuncie a v žluté řepě

2.2.5 Extrakce betalainů

Extrakce betalainů z rostlinných tkání je převážně prováděna vodou, roztoky methanolu nebo ethanolu.^{19,27,51} Extrakce vodou je jednoduchá izolační metoda, která ale vede k menším výtěžkům. Selektivita extrakce je malá a proto je po extrakci vodou třeba separovat betalainy od velkého množství ve vodě rozpustných bílkovin.²⁰ Oproti tomu extrakce methanolem umožňuje výrazně lepší oddělení od bílkovin.²⁰

Na izolaci barviv z rostlinného materiálu extrakcí často navazuje prekoncentrační a purifikační krok. Ten lze provést s využitím aniontově-výměnné kolonové chromatografie na stacionární fázi Dowex 1X8, s gradientem vodné kyseliny mravenčí. Avšak při této extrakci dochází k naprosté degradaci nestabilních betakyaninových konjugátů.²⁷ Pokud je třeba izolovat tyto konjugáty, je ionexová chromatografie nahrazována gelovou filtrací na Sephadexu LH-20.^{27,42}

Dále lze využít separace na Sephadexu G-25. Na tento sorbent jsou dávkovány methanolvé extrakty a barviva jsou následně vymývána 1 % kyselinou octovou.^{37,40,42} Extrakce může být provedena i difúzní extrakcí, reverzní osmózou a ultrafiltrací.¹⁹

2.2.6 Identifikace a chromatografická separace betalainů

Prvním způsobem identifikace betalainů byla UV-Vis spektroskopie, která se obvykle používá ke kvantifikaci betalainů pomocí molárních absorpčních koeficientů betaninu a vulgaxanthinu I nebo indicaxanthinu, hlavních zástupců betakyaninů a betaxanthinů.²⁴ Betakyaniny absorbují při $\lambda_{\max} = 540$ nm a betaxanthiny při $\lambda_{\max} = 480$ nm.¹⁹ Tyto postupy však dovolují analyzovat betalainy pouze v sumě. V komplexních matricích logicky k absorpenci přispívají i další barevné složky.

Proto byly pro věrohodnější a podrobnější analýzy navrženy chromatografické metody. Zejména populární je HPLC s UV/VIS detektorem, detektorem s diodovým polem (DAD), a její kombinace s hmotnostní spektrometrií (MS) a nukleární magnetickou rezonancí (NMR), které jsou schopny poskytnout strukturní informace o jednotlivých betalainech.^{17,25,52,53}

Kapalinová chromatografie umožňuje rychlou separaci, kvantifikaci a identifikaci betalainů. Spojení kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole a hmotnostní spektrometrií (HPLC-DAD/MS) je vhodné pro identifikaci složek ve složitých směsích.⁵¹ Běžnou praxí je použití reverzních fází (zejm. C-18).^{17,54,55}

Nejčastěji používané složení mobilní fáze jsou okyselené směsi voda - acetonitril nebo voda - methanol v různých modifikacích.⁵¹ Ve většině případů se využívá gradientu, pouze ojediněle je využívána izokratická eluce. V následující tabulce jsou shrnuty nejběžnější složení mobilních fází, jejich průtoky, používané gradienty, kolony, rozměry kolon a typ reverzní fáze.

Tab. č. I: Shrnutí použitých podmínek kapalinové chromatografie

Kolona	Typ reverzní fáze	Rozměry kolony	Složení mobilní fáze	Gradient	Průtok mobilní fáze
C18 (cit. ⁵⁴)	Kromasil 100	250 x 34.6 mm; 5 μ m	A: 1 % CH ₃ COOH v H ₂ O B: 1 % CH ₃ COOH v ACN	gradient 30 min: 100-88 % A, 0-12 % B	1 ml/min
C18	Varian	250 x 10 mm;	A: 1 % CH ₃ COOH v H ₂ O	gradient 20 min:	2 ml/min

(cit. ⁴⁰)	Microsorb	5 µm	B: 1 % CH ₃ COOH v ACN	100-80 % A 0-20 % B	
C18 (cit. ^{47,56})	Ultrasep ⁵⁶ Nucleosil ⁴⁷	100 x 1 mm; 4µm 250 x 4 mm; 5 µm	A: 0,02 % CH ₃ COOH v H ₂ O B: 0,02 % CH ₃ COOH v ACN	gradient 10 min: 90-50 % A 10-50 % B	70 µl/min
C18 (cit. ⁵⁷)	Luna	250 x 3 mm; 5 µm	A: 2 % HCOOH v H ₂ O B: ACN	gradient 55 min: 97- 64 % A 3-36 % B	0,5 ml/min
C18 (cit. ⁵⁸)	Luna	250 x 3 mm; 5 µm	A: 2 % HCOOH v H ₂ O B: ACN	gradient 35 min: 95-85 % A 5-15 % B	0,5 ml/min
C18 (cit. ⁵²)	Luna	250 x 3 mm; 5 µm	A: 0,05 % HCOOH v H ₂ O B: ACN/H ₂ O; 80/20; v/v	gradient 30 min: 95-91 % A 5-9 % B	1 ml/min
C18 (cit. ²⁵)	LiChrocart	250 x 4 mm; 5 µm	A: ACN B:HCOOH:H ₂ O; 0,4:99,6; v/v	gradient 35 min: 0- 5 min 100 % B 0- 13 % A	1 ml/min
C18 (cit. ^{59,60})	Atlantis ⁵⁹ Synergi- HydroRP ⁶⁰	250 x 4,6 mm; 5 µm 250 x 2,1 mm; 4 µm	A: 1 % HCOOH v H ₂ O B: ACN:H ₂ O; 80:20; v/v	izokraticky 2 min: 100 % A, 60 min gradient: 0-20 % B, gradient 5 min 20- 100 % B	1 ml/min
C18 (cit. ³⁴)	Symmetry	150 x 4,6 mm; 3,5 µm	A: 1 % HCOOH v H ₂ O B: MeOH	gradient 20 min: 100-90 % A 0-10 % B, 10 min 10-30 % B a 5 min 30-100 % B	1 ml/min
C18 (cit. ^{17,31})	Teknokrom ¹⁷ Luna ³¹	250 x 4,6 mm; 5µm 250 x 4,6 mm; 5 µm	A: 0,05 % TFA v H ₂ O B: 0,05 % TFA v ACN	gradient 25 min: 100-65 % A 0-35 % B	1 ml/min
C18 (cit. ⁴²)	Luna	150 x 4,6 mm; 5 µm	A: 0,1 % TFA v H ₂ O B: 0,1 % TFA v ACN	gradient 20 min: 95-5 % A 5-95 % B	1 ml/min
C18 (cit. ^{46,61})	LiChrospher 60(cit. ⁴⁶) LiChrospher 100(cit. ⁶¹)	250 x 10 mm; 10 µm 250 x 4 mm; 5 µm	A: 0,5 % TFA v H ₂ O B: ACN	izokraticky 35 min: 90 % A 10 % B	0,5 ml/min
C18 (cit. ⁵³)	Nucleosil	100 x 2 mm; 5 µm	A: 0,1 % TFA v H ₂ O B: 0,1 % TFA v MeOH	gradient 25 min:	200 µl/min

				85-30 % A 15-70 % B	
C18 (cit. ⁵⁰)	Luna	250 x 3 mm; 5 µm	A: 0,2 % TFA v H ₂ O:10 % HCOOH v H ₂ O; 65:35; v/v B: 10 % HCOOH v H ₂ O:ACN; 20:80; v/v	izokraticky 15 min: 100 % A, gradient 60 min 0-20 % B	1 ml/min
C18 (cit. ⁶²)	Spheri-5	220 x 4,6 mm; 5µm	A: 1,5 % H ₃ PO ₄ v H ₂ O B: ACN	gradient 40 min: 100-76 % A 0-24 % B	1 ml/min

Betalainy byly také úspěšně separovány pomocí ion-párové vysoko-rychlostní proti-proudé chromatografie (IP-HSCCC). Po provedení IP-HSCCC byly následně HSCCC frakce identifikovány pomocí HPLC-DAD a HPLC-DAD-ESI-MS/MS.^{21,36,57}

Identifikace byla provedena i pomocí tenkovrstevné chromatografie a papírové elektroforézy.⁶³

Pomocí nukleární magnetické rezonance (¹³C-NMR a ¹H-NMR)^{25,52,53} byly úspěšně identifikovány stereoisomery indicaxanthinu (prolin-betaxanthin) a miraxanthinu (dopamine-betaxanthin).⁶⁴

Byly studovány i fluorescenční vlastnosti betalainů a betaxanthinů po chromatografické separaci. Excitace betalainů byla provedena při 460 nm a následně bylo měřeno emisní záření při 510 nm.¹⁷

Dalším způsobem separace a stanovení betalainů je kapilární zónová elektroforéza. Tento způsob byl úspěšný při stanovení betaninu a isobetaninu v červené řepě. Optimální separace bylo dosaženo použitím běžné nepokryté křemenné kapiláry.⁶⁵

2.2.7 Hmotnostní spektrometrie betalainů

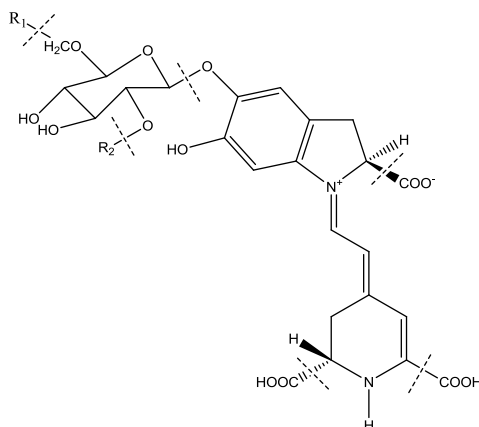
Při identifikaci pomocí MS je používán výhradně iontový zdroj ESI v pozitivním módu.^{30,31,55} Tento iontový zdroj se využívá ve spojení s kvadrupólovým analyzátozem, iontovou pastí, analyzátozem doby letu a hybridním analyzátozem Q-qTOF.^{34,51,55} Častěji se však využívá spojení HPLC/MS.^{42,66}

Dále lze použít spojení MALDI-QIT-TOF-MS (maldi - kvadrupól - iontová past - analyzátor doby letu - MS) v pozitivním módu. Jde o metodu umožňující velmi rychlou předběžnou identifikaci betalainů. Jako matrice se používá 2,5-dihydroxybenzoová kyselina.⁶³

Metoda je vhodná pro předběžný screening surových vzorků. Oporou je tandemová spektrometrie (MS^n) umožňující identifikaci.⁶³

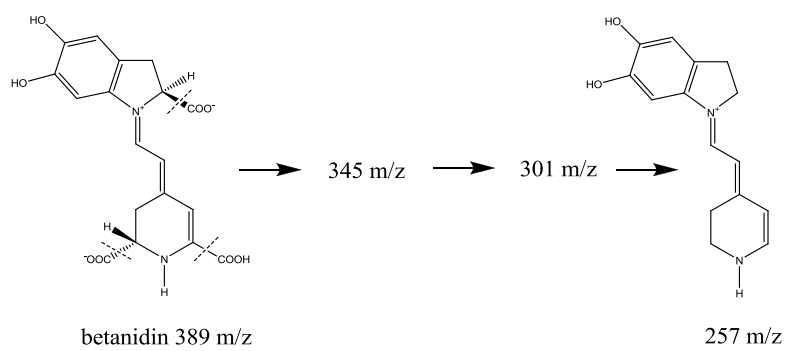
Dále je možné využít hmotnostní spektrometrii s iontovou cyklotronovou rezonancí s využitím Fourierovy transformace (FT-ICR-MS), která dává vysoké rozlišení a tím je užitečná k objasnění struktur betalainů.²⁷

Pro jednoznačnou identifikaci betalainů v reálných vzorcích je důležité znát fragmentační schémata betalainů. Řada fragmentačních pochodů je pro betalainy charakteristická. Jak již bylo uvedeno, využívá se hmotnostní spektrometrie výhradně s ionizací kladnými potenciály. V těchto případech vznikají molekulární ionty $[M + H]^+$. Pro fragmentaci molekulárních iontů $[M + H]^+$ derivátů betaninu (m/z 551) je charakteristická ztráta glukosy $[M + H]^+ - 162$, za vzniku aglykonu (m/z 389).^{27,31,66} Tento aglykon je charakteristickým fragmentem většiny betakyaninů. Mezi nejběžnější fragmentační pochody probíhající na aglykonu patří ztráta m/z 44 (CO_2), ztráta m/z 86 (malonyl), m/z 144 (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl), m/z 146 (p-coumaroyl) a m/z 176 (feruoyl).⁶³ Fragmentace betaxathinů není v literatuře popsána.



Obr. č. 17: Struktura betakyaninů – přerušované čáry odpovídají popsané fragmentaci

Fragmentace betakyaninů je zobrazena na obr. č. 17. Dochází k odštěpení R_1 a R_2 zbytků a odštěpení glukosy, čímž vznikne aglykon betakyaninů nazývaný betanidin. Dále dochází k postupnému odštěpování karboxylových skupin (ztráta CO_2). Toto štěpení od aglykonu je znázorněno na obr. č. 18.⁶³



Obr. č. 18: Postupné odštěpování karboxylových skupin z aglykonu (betanidinu)

3. CÍLE PRÁCE

Mezi cíle práce patří:

1. prostudovat možnosti analýzy betaninových barviv hmotnostní spektrometrií
2. prostudovat fragmentační mechanismy identifikovaných betalainů
3. navrhnout nejvhodnější metodu pro LC/MS analýzu rostlinných extraktů bohatých na betalainová barviva

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie a studované rostlinné materiály

Redestilovaná voda (deionizační stanice Milipore, Molsheim, Francie), methanol (Biosolve, pro LC-MS), acetonitril (Baker, pro HPLC), kyselina mravenčí (Lachema, Brno, ČR, p.a.), kyselina trifluoroctová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR, p.a.), 2',4',6'-trihydroxyacetofenon (Fluka, Buchs, Švýcarsko, p.a.), kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, p.a.), leucin-enkefalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, p.a.), hydroxid amonný (Lach-Ner, Neratovice, ČR, p.a.), kyselina octová (Penta, Chrudim, ČR, p.a.), octan amonný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Pitaya (původ Vietnam), červená řepa (původ Česká republika), opuncie (původ Vietnam), Betavital (extrakt z červené řepy, Bakerol s.r.o., ČR)

4.2 Příprava vzorků

4.2.1 Příprava vzorků pro MALDI-MS měření

Vzorky pitayi a červené řepy byly oloupany a slupky i dužiny byly homogenizovány. Bylo odváženo 50 g vzorku pitayi a červené řepy. Tyto vzorky byly lyofilizovány a následovala MALDI analýza:

I. měření: Z každého zlyofilizovaného vzorku bylo odváženo 200 mg a extrahováno v 10 ml 80 % methanolu 20 minut. Poté byly vzorky vloženy na 10 minut do ultrazvukové lázně a přefiltrovány přes nylonový filtr (0,45 μm).

II. měření: Po lyofilizaci bylo odváženo 20 mg každého vzorku a extrahováno 1 ml 80 % methanolu po dobu 20 minut. Pro zakoncentrování byly vzorky odfoukány dusíkem. Následně byly zakoncentrované vzorky zředěny 200 μl 80 % methanolu.

III. měření: Zlyofilizované vzorek dužiny z červené řepy byl odvážen 200 mg a poté rozpuštěn v 10 ml 80 % methanolu. Poté byl vzorek dán do ultrazvuku na 10 minut a zfiltrován přes nylonový filtr (0,45 μm). Dále byl vzorek přečištěn přes SPE kolonu (MCX), detailní postup je uveden v dalším textu. Odebraná frakce byla zakoncentrována odfoukáním pod proudem dusíku.

4.2.2 Příprava vzorků pro ionizaci ESI a UPLC na koloně C18

Vzorky dužiny červené řepy a dužiny opuncie byly zhomogenizovány. Byly odebrány 2 g vzorku červené řepy, vzorku opuncie a vzorku betavitalu k lyofilizaci. Z lyofilizátů bylo odváženo 50 mg vzorků k následné extrakci v 5 ml 80 % methanolu, v/v (20 minut). Po extrakci byly vzorky zfiltrány přes nylonový filtr (0,45 µm) a rozpouštědlo odpařeno pod proudem dusíku. Zakoncentrované vzorky byly rozpuštěny ve 2,5 ml okyselené vody (0,1 % CH₃COOH v H₂O, v/v).

4.2.3 Příprava vzorků pro ionizaci ESI a UPLC na koloně HILIC

Byly odváženy tři vzorky extraktu betavitalu po 100 mg, které byly použity bez jakékoliv předchozí úpravy. Tyto vzorky byly smíchány s použitými mobilními fázemi a homogenizovány ultrazvukem za laboratorní teploty. Následně byl každý vzorek naředěn 2 x a zfiltrován.

4.2.4 Příprava vzorků pro ionizaci ESI a UPLC na koloně HILIC - TSKgel Amide

I. měření: Byly odváženy tři vzorky extraktu betavitalu po 100 mg, které byly použity bez předchozí úpravy. Tyto vzorky byly smíchány s použitými mobilními fázemi a homogenizovány ultrazvukem za laboratorní teploty.

II. měření: Bylo odváženo 100 mg vzorku extraktu betavitalu a smícháno s 10 ml pufru 10 mM octanu amonného o pH=5, vzorek byl následně přečištěn přes SPE kolonku SAX/RP, postup přečištění je uveden dále v textu. Extrakt byl odpařen odfoukáním dusíkem a smíchán s použitou mobilní fází a přefiltrován přes membránový mikrofiltr.

III. měření: Bylo odváženo 100 mg vzorku extraktu betavitalu a následně smícháno s 10 ml 0,1 % mravenčí kyseliny ve vodě. Tento roztok vzorku byl přečištěn přes SPE kolonku AG 50W, detailní postup je uveden v dalším textu. Extrahovaný roztok byl odpařen pod proudem dusíku, odparek byl smíchán s použitou mobilní fází a přefiltrován přes membránový mikrofiltr.

4.3 Instrumentace

4.3.1 Použité přístroje

Byl použit kapalinový chromatograf Acquity UPLC (Waters, Milford, USA), který je modulárně uspořádaný a obsahuje Acquity PDA Detector, Acquity Column Manager, Acquity Sample Manager (autosampler) a Acquity Binary Solvent Manager.

Pro MS detekci byl použit hmotnostní spektrometr Q-TOF Premier (Waters, USA) vybavený iontovým zdrojem ESI s využitím Z-Spray technologie a systémem LockSpray a s ortogonálním uspořádáním analyzátoru typu QqTOF a iontové optiky T-Wave. Přístroj umožňuje pořízení tandemových spekter a měření přesné a správné hmotnosti iontů. Hmotnostní spektrometr umožňuje výměnu iontového zdroje za zdroj typu vakuového MALDI s dusíkovým laserem ($\lambda = 337 \text{ nm}$).

Dále byl použit softwarový balík HighChem Mass Frontier 5.0 (Thermo Electron Corporation) pro interpretaci MS spekter.

4.3.2 Použité SPE a UPLC kolony

- SPE kolonka Oasis MCX, (Waters, USA), 60 mg
- SPE kolonka Strata Screen-A, (Phenomenex, USA), 200 mg/3ml
- SPE kolonka AG 50 W, (Bio-rad, ČR)
- kolona Acquity UPLC BEH C18, 100 x 2,1 mm, $d_p = 1,7 \mu\text{m}$ (Waters, USA)
- kolona KINETEX HILIC 100A, 100 x 2,1 mm, $d_p = 2,6 \mu\text{m}$ (Phenomenex, USA)
- kolona TSKgel Amide 80, 150 x 2 mm, $d_p = 3 \mu\text{m}$ (Tosoh Bioscience, Německo)

4.3.3 Parametry iontových zdrojů

4.3.3.1 Parametry MALDI ve spojení s Q-TOF Premier

- Polarita: +
- Frekvence laseru: 20 Hz
- Energie laseru (laser energy): 250-400 μJ , podle typu experimentu
- Chladicí plyn (cooling gas): 10 l/hod
- Kolizní energie (collision energy): 10-60 eV, podle typu experimentu

4.3.3.2 Parametry ESI-Q-TOF

- Polarita: + nebo -, podle typu experimentu
- Napětí na sprejovací kapiláře: + 3,2 kV, - 3,2 kV
- Teplota iontového zdroje: 120 °C
- Teplota desolvatačního plynu: 150 °C
- Průtok plynů: (zmlžovací 450 l/hod; cone gas flow 30 l/hod)
- Kolizní energie: v rozsahu 5-70 eV, podle typu experimentu
- Doba skenu: v rozsahu 0,2 s (interscan delay 0,02 s)
- V systému LockMass (referenční elektrosprej) byl použit jako standard leucin-enkefalin

4.4 Podmínky analýz

4.4.1 SPE extrakce

Kolonka *Oasis MCX* byla promyta 2 ml methanolu a poté 2 ml pufru o pH = 2 (roztok pufru byl připraven rozpuštěním 4,9 g H₃PO₄ v 900 ml vody a byl titrován NaOH na pH = 2, potom byl doplněn v odměrné baňce vodou na 1 litr). Na kolonku byl nanesen 1 ml vzorku a promyt byl 2 ml 2 % kyseliny mravenčí a 2 ml methanolu. Poté byla barevná frakce eluována 2 ml 5 % amoniaku v 50 % roztoku methanol:acetonitril, 1:1 (v/v).

Kolonka *Strata Screen-A* byla promývána 2 ml methanolu a 2 ml 10 mM octanu amonného o pH=5 (10 mM octan amonný byl titrován kyselinou octovou). Poté bylo na kolonku nanesen 5 ml vzorku. Následovalo promytí kolonky postupně 2 ml deionizované vody a 2 ml methanolu. Zadržaná barevná frakce byla vymyta z kolonky 2 ml 1 % chlorovodíkové kyseliny ve 20 % roztoku metanol:acetonitril, 1:1 (v/v). Vzniklý roztok byl odpařen do sucha pod proudem dusíku.

Kolonka *AG 50W* byla promyta postupně 10 ml 0,1 % mravenčí kyseliny ve vodě, 10 ml 0,1 % mravenčí kyseliny v methanolu a 10 ml 0,1 % mravenčí kyseliny ve vodě. Následně bylo na kolonku nanesen 10 ml vzorku. Promytí bylo provedeno 10 ml 0,1 % mravenčí kyseliny ve vodě a následovala eluce 10 ml 0,1 % kyseliny mravenčí v methanolu. Eluát byl potom odpařen v proudu dusíku.

4.4.2 Analýza MALDI-Q-TOF

Všechny vzorky byly připraveny následujícím postupem. Z každého vzorku bylo odebráno 100 μ l a smícháno se 100 μ l matrice v poměru 1:1 (v/v). Použité matrice byly DHB (2,5-dihydroxybenzoová kyselina) a THAP (2',4',6'-trihydroxyacetofenon). Ze vzniklých roztoků byly odebrány 2 μ l a dávkovány na MALDI destičku. Roztoky matric byly připravovány rozpuštěním 10 mg THAP nebo 10 mg DHB v 1 ml směsi voda:acetonitril, 1:1 (v/v).

4.4.3 UPLC-ESI-Q-TOF

4.4.3.1 UPLC na koloně C18

Při separaci byl použit kapalinový chromatogram Acquity UPLC ve spojení s hmotnostním spektrometrem Q-TOF Premier. Jako mobilní fáze byly použity:

I. mobilní fáze A 0,1 % octová kyselina ve vodě (v/v) a fáze B 0,1 % octová kyselina v acetonitrilu (v/v).

II. mobilní fáze A 0,05 % trifluoroctová kyselina ve vodě (v/v) a fáze B byla 0,05 % trifluoroctová kyselina v acetonitrilu (v/v).

Vzorky byly centrifugovány, supernatanty přefiltrovány přes PTFE filtr a vloženy do autosampleru. Dávkován byl objem 3 μ l (částečné plnění smyčky o objemu 20 μ l). Průtok byl nastaven na 0,4 ml/min. Při separaci byla použita gradientová eluce s parametry: 0 – 6 minut 5 % B, 6 – 8 minut 35 % B, 8 – 9 minut 85 % B a 9 – 10 minut 5 % B.

4.4.3.2 Chromatografická analýza na koloně HILIC

Analýza byla provedena na koloně Kinetex HILIC. Připravené vzorky byly centrifugovány, supernatanty přefiltrovány přes PTFE filtr a dávkovány autosamplerem (objem 5 μ l). Byla provedena 30 minutová izokratická eluce s průtokem mobilní fáze 0,3 ml/min. Byly použity mobilní fáze o složení:

I. 0,1 % mravenčí kyselina ve směsi acetonitril:voda; 95:5; (v/v)

II. 0,1 % mravenčí kyselina ve směsi acetonitril:voda; 97,5:2,5; (v/v)

III. směs 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 5:95; (v/v); pH = 5

IV. směs 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 2,5:97,5; (v/v); pH = 5

4.4.3.3 Chromatografie na koloně HILIC TSKgel Amide

Další experimenty byly prováděny na koloně HILIC TSKgel Amide 80. Jak již bylo uvedeno vzorky byly opět centrifugovány, zfiltrvány a dávkovány autosamplerem o objemu 5 μ l. Opět byla použita izokratická eluce s průtokem mobilní fáze 0,3 ml/min. Mobilní fáze:

- I. 0,1 % mravenčí kyselina ve směsi acetonitril:voda; 97,5:2,5; (v/v)
- II. směs 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 5:95; (v/v); pH = 5
- III. směs 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 2,5:97,5; (v/v); pH = 5

Měření bylo provedeno v pozitivním i negativním módu (ionizace kladnými i zápornými potenciály).

4.4.4 Přímý nástřik do ESI-Q-TOF

Vzorek byl bez dalších úprav nástřikován. Průtok činil 5 μ l/min. Přímá infuze do iontového zdroje ESI byla provedena v pozitivním i negativním módu. Pro přímý nástřik byl použit vzorek přečištěný přes SPE kolonku SAX/RP, odpařený proudem dusíku a rozpuštěný ve směsi 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 2,5:97,5; (v/v); upraveno na pH = 5.

5. DISKUZE A VÝSLEDKY

V první fázi experimentů byly proměřeny všechny připravené vzorky a hledány ionty betakyaninů, případně betaxanthinů, které jsou shrnuty v tabulce č. II. V následujících kapitolách budou diskutovány možnosti jednotlivých technik tyto látky identifikovat.

Tab. č. II: Nejběžnější betakyaniny

Betakyaniny	[M + H] ⁺	Předpokládané fragmenty
amaranthin/isoamarathin	727,1828	683,639,595,551,389,345,301,257
betanin/isobetanin	551,1507	507,463,389,345,301,257
phyllocactin/isophyllocactin	637,1511	593,551,549,505,389,345,301,257
hylocerenin/isohylocerenin	695,1930	651,607,563,551,389,345,301
gomphrenin I/isogomphrenin I	551,1507	507,463,389,345,301,257
gomphrenin II/isogomphrenin II	697,1875	653,609,565,551,389,345,301,257
gomphrenin III/isogomphrenin III	727,1981	683,639,595,551,389,345,301,257

5.1 MALDI-Q-TOF

Při přímé analýze extraktů nebyly ionty betalainů pozorovány. Proto byly vzorky před analýzou zakoncentrovány (odpařením pod proudem dusíku). Nastavení hmotnostního spektrometru bylo dále optimalizováno na vzorcích červené řepy, které obsahují větší množství betakyaninů než ostatní materiály. Vzhledem k tomu, že jedním z nejvýznamnějších betalainů je betanin, byly v průběhu optimalizace sledovány změny jeho intenzit. V následující tabulce jsou shrnuty optimální podmínky spolu s intenzitou píku betaninu m/z 551.

Tab. č. III: Optimalizace parametrů MALDI

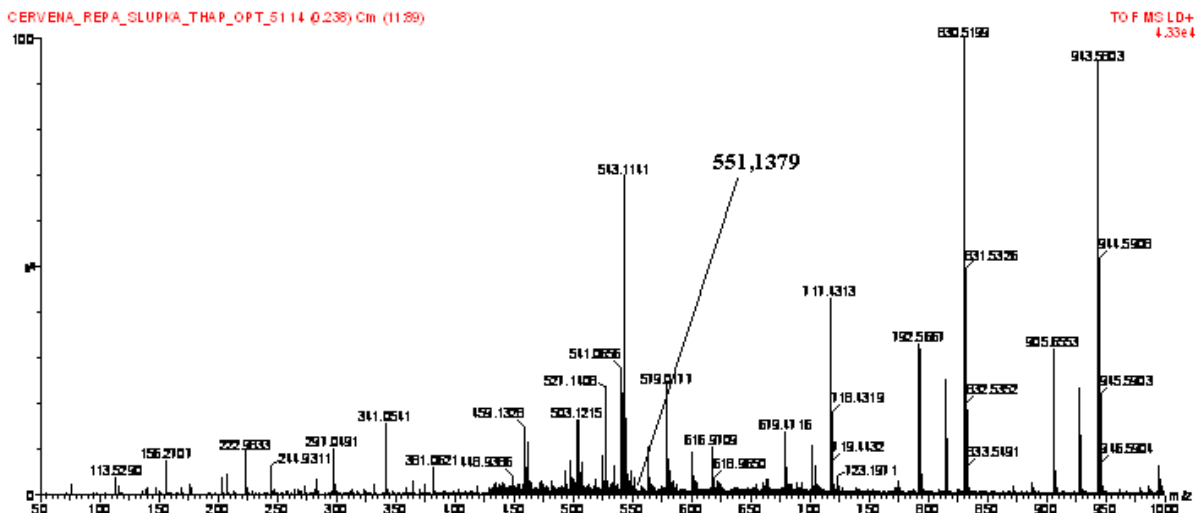
	Nastavované parametry	Hodnoty	Intenzita betaninu
RF nastavení:	Manual Profile	(100,4,1) (900,95) (900)	12
	Manual Fixed	551	112
	Auto Profile	-	101
	Auto Fixed	-	38
MALDI +:	Sample plate:	0,0	457
		2,4	452
		100	33

		150	26
		200	33
Extraction (V):		0	-
		10	329
		45	41
		70	73
		100	25
Hexapole:		0	276
		10	341
		20	148
		35	77
		50	53
Aperature:		0	238
		2,5	181
		5	175
		7,5	237
		10	175
Ion guide (V):		0	64
		1,5	62
		2	142
		3,5	84
		5	48
Cooling gas:		1	40
		5	130
		10	174
Collision energy (eV):		0	17
		5	14
		10	126
		12	88
		15	118
Laser energy (μJ):		250	118
		300	141
		350	129
		400	122
Collision cell gas flow (l/min):		0,3	157
		0,6	143
		0,9	102

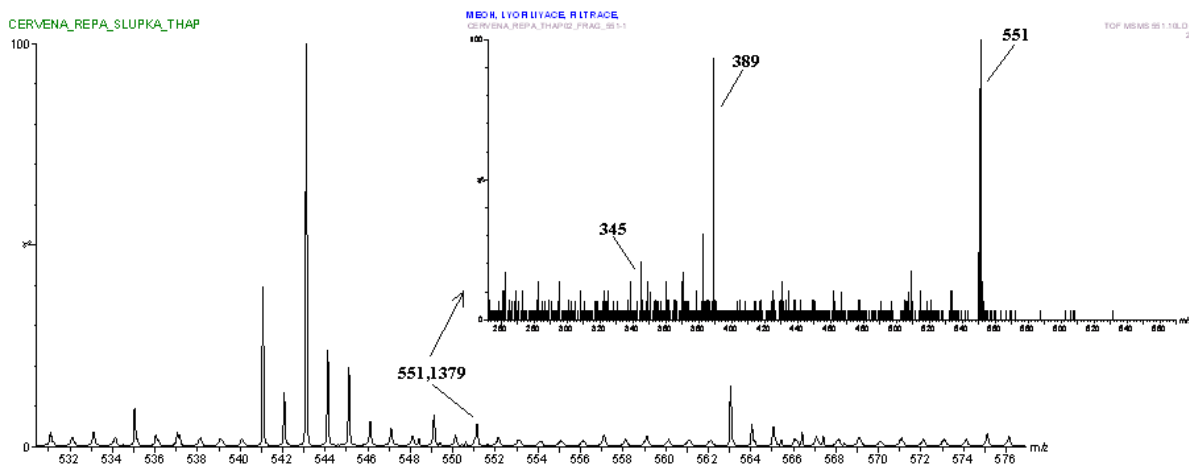
Optimalizace vyšla ze standardního nastavení přístroje a parametry byly měněny v pořadí, v kterém jsou uvedeny v tabulce. Po nalezení optima daného parametru bylo toto optimum měření použito pro optimalizaci dalšího parametru (optimalizace krok po kroku).

Z tabulky je patrné, že jednotlivé parametry iontového zdroje i iontové optiky mají zásadní vliv na odezvu betaninu. Obr. č. 19 ukazuje spektrum extraktu červené řepy po optimalizaci. Při přiblížení spektra je signál betaninu (m/z 551,1379) jednoznačně patrný

(obr. č. 20). Odchylka měření od teoretické hodnoty odpovídá -13.4 mDa (-24.3 ppm). Kolizní spektrum při použité kolizní energii 10 eV (vložené spektrum v obr. č. 20) identifikaci podporuje - ve spektru je jednoznačně patrný signál aglykonu (m/z 389). Také jsme se zaměřili na srovnání matric DHB a THAP. Při použití matrice THAP byl ve spektru pozorován betanin. Při použití matrice DHB u stejného vzorku při stejných podmínkách identifikován nebyl. Proto byla všechna další měření prováděna s matricí THAP.



Obr. č. 19: Spektrum extraktu červené řepy s identifikací betaninu

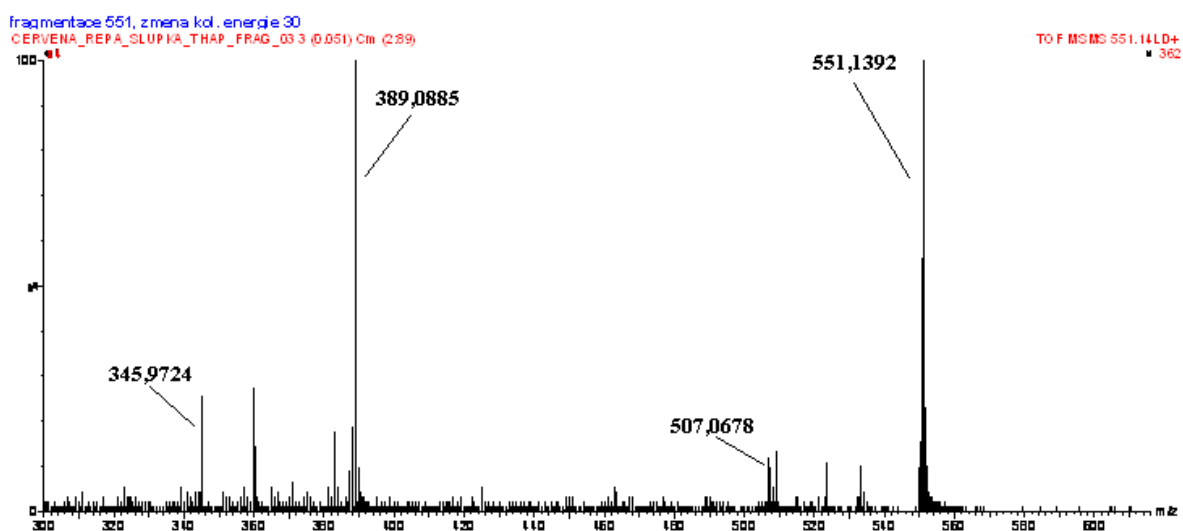


Obr. č. 20: Identifikace betaninu v extraktu červené řepy a jeho kolizní spektrum

Pro optimalizaci fragmentace iontu m/z 551 (betanin) byl sledován vliv kolizní energie v rozmezí 10-60 eV. Srovnání použitých kolizních energií se vzniklými fragmenty i jejich intenzitami jsou uvedeny v tabulce č. IV. Spektrum s optimální kolizní energií 30 je uvedeno na obr. č. 21.

Tab. č. IV: Shrnutí fragmentů vzniklých fragmentací se zvolenou kolizní energií

Kolizní energie	Fragmenty (intenzita)
10	551,1379 (397); 507,0262 (6); 389,0885 (16); 345,9279 (7)
20	551,1392 (536); 507,1011 (7); 389,0885 (20); 345,8935 (9)
30	551,1392 (158); 507,0678 (11); 389,0885 (362); 345,9724 (23)
40	551,1553 (8); 389,0885 (242); 345,1029 (5)
50	551,1508 (2); 389,0885 (65); 345,0822 (8)
60	389,0958 (5)



Obr. č. 21: Fragmentační spektrum betaninu při kolizní energii 30

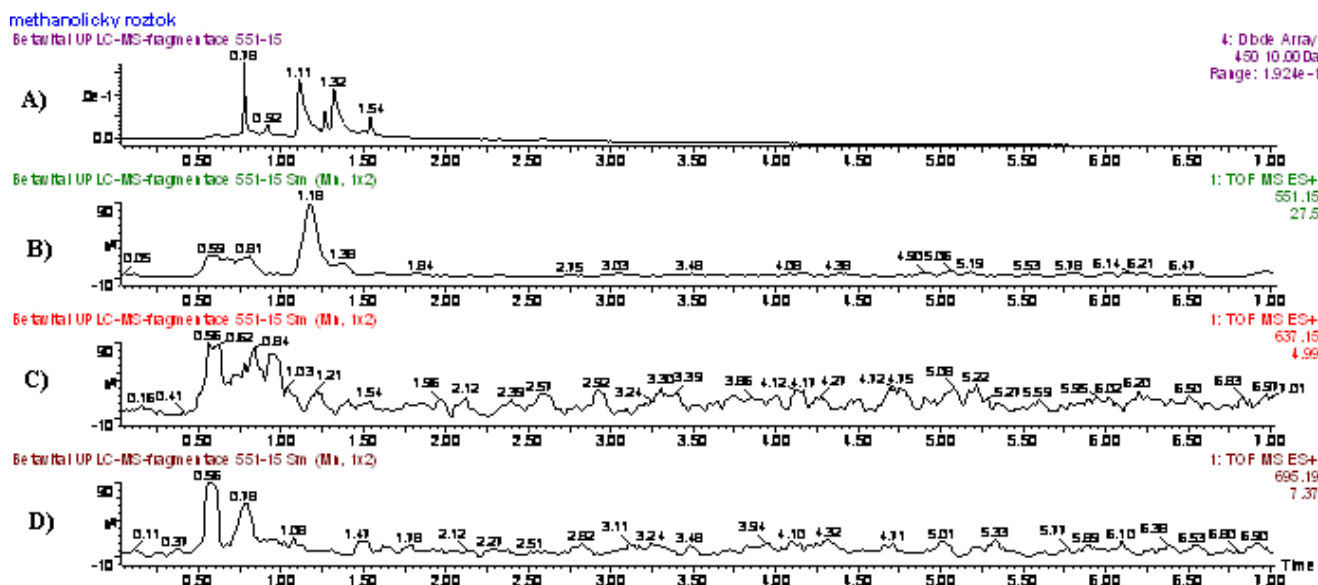
Při MS² betaninu (m/z 551) jsme získali fragmenty o m/z 507 (551-44), což odpovídá odštěpení CO₂, m/z 389 (551-162), který odpovídá odštěpení glukosy a m/z 345 (551-162-44) odpovídá odštěpení glukosy a CO₂.

5.2 UPLC-ESI-Q-TOF

5.2.1 UPLC na koloně C18

Pro analýzu betakyaninů na koloně C18 byla použita generická mobilní fáze se složením MF A 0,1 % octová kyselina ve vodě a MF B 0,1 % kyselina octová v acetonitrilu. V extraktu červené řepy ani opuncie nebyly nalezeny ionty m/z 551 ani jiný známý betakyanin. Ve vzorku betavitalu byly nalezeny betanin a pravděpodobně hylocerenin a phyllocactin. Přítomnost betaninu byla potvrzena jeho fragmentací. Na obrázku č. 22 jsou rekonstruované chromatogramy betaninu m/z 551,15, hylocereninu m/z 695,19

a phyllocactinu m/z 637,15. Metodu je tedy pro předběžnou analýzu betaninu možno použít. Nevýhodou tohoto chromatografického uspořádání je relativně malá retence, která může být příčinou nedostatečné separace od balastních složek vzorku a následně iontovou supresí v elektrospreji.

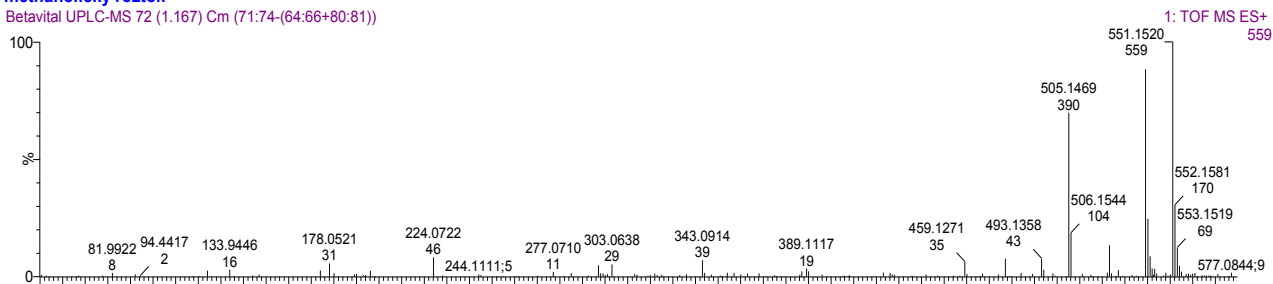


Obr. č. 22: Rekonstruované chromatogramy: A) chromatogram při 450 nm, B) pro betanin m/z 551,15, C) pro phyllocactin m/z 637,15, D) pro hylocerenin m/z 695,19

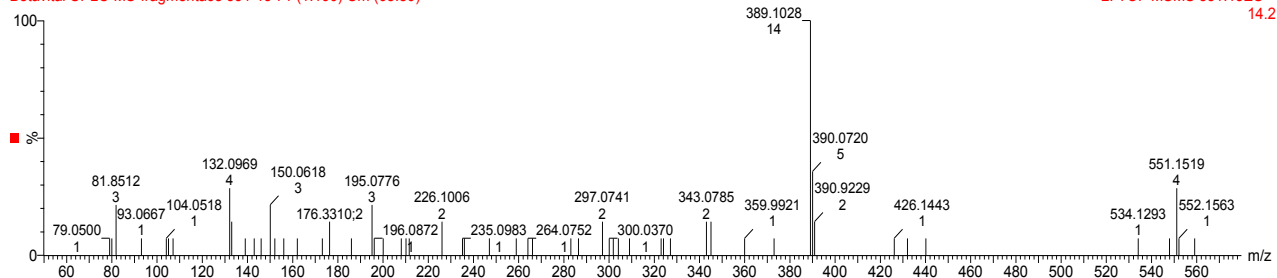
Obrázek č. 22 ukazuje rekonstruované chromatogramy pro hodnoty m/z 551,15, m/z 637,15 a m/z 695,19. Jednoznačně je patrný pík betaninu, který eluoval při 1,18 min. Píky ostatních dvou látek phyllocactinu a hylocereninu jsou na úrovni limitu detekce. Obrázek č. 23 ukazuje MS a MS/MS spektra získaná průměrováním dat přes chromatografický pík betaninu a odečtením pozadí (baseline subtraction). Spektrum v horní části obrázku č. 23 ukazuje MS spektrum betaninu. Rodičovký ion m/z 551,1520 ve spektru dominuje (odchylka od teoretické hodnoty 0,7 mDa, 1,3 ppm). Spektrum ve spodní části ukazuje MS/MS spektrum získané po izolaci rodičovského iontu na kvadrupólu a jeho fragmentaci v kolizní cele. Jednoznačně je patrný iont m/z 389,1028, který odpovídá odštěpení dehydratované hexosy. Obě spektra tedy potvrzují identitu betaninu.

methanolycký roztok

Betavital UPLC-MS 72 (1.167) Cm (71:74-(64:66+80:81))



Betavital UPLC-MS-fragmentace 551-15 71 (1.160) Cm (68:80)



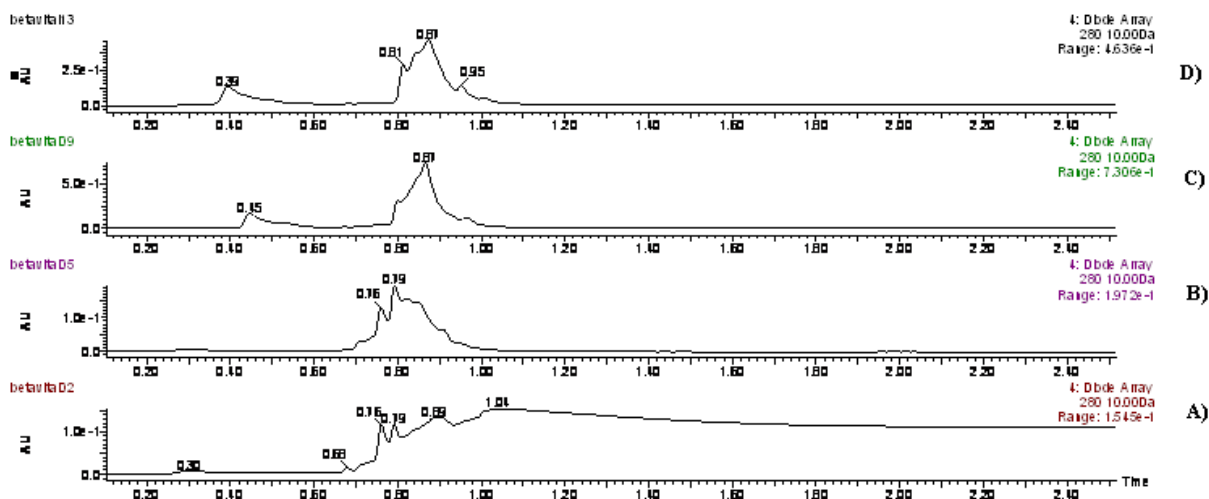
Obr. č. 23: Spektrum v horní části obrázku zobrazuje MS spektrum betaninu, ve spodní části obrázku je MS/MS spektrum betaninu

Pro srovnání byla provedena analýza betacyaninů ve vzorku betavitalu na koloně C18 s mobilní fází A 0,05 % trifluoroctová kyselina ve vodě a B 0,05 % kyselina trifluoroctová v acetonitrilu. Ve srovnání s výše uvedenou mobilní fází byl ve spektru nalezen pouze betanin (m/z 551) s intenzitou 296 a retenčním časem 1,52 minut. Tento výsledek se dá vysvětlit tvorbou iontových párů trifluoroacetátu s kationtem betaninu. Tvorba iontového páru v kapalně fázi (při chromatografii) způsobuje mírné avšak jednoznačně prokazatelné prodloužení retenčního času betacyaninu. Na druhou stranu tvorba iontových párů v plynné fázi (v iontovém zdroji hmotnostního spektrometr) vede k snížení výtěžku iontů analytů a tím ke zhoršení odezvy. S ohledem na odezvu je vhodnější použít mobilní fází o složení A 0,1 % octová kyselina ve vodě a B 0,1 % octová kyselina v acetonitrilu.

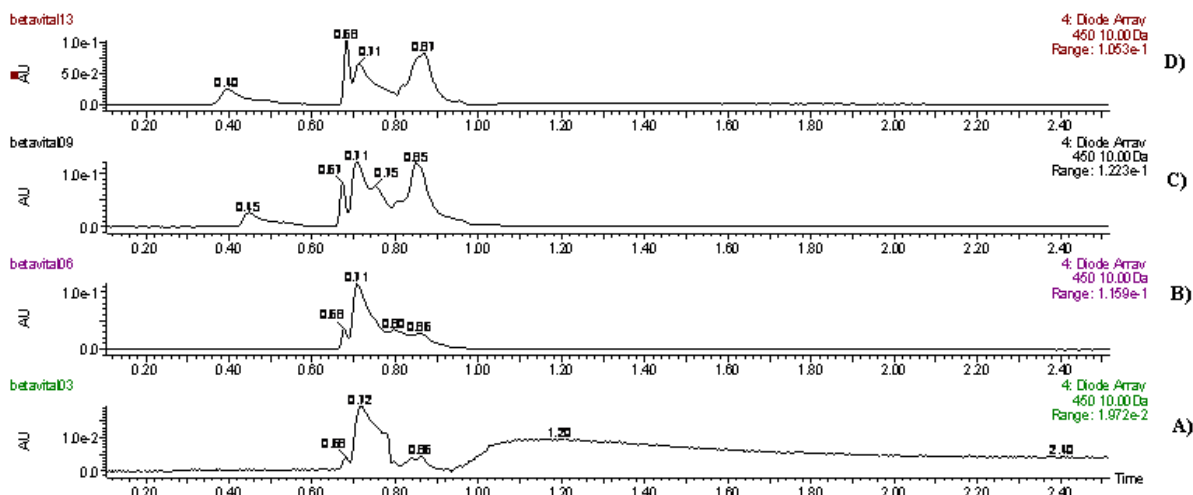
5.2.2 Chromatografie v HILIC systému

Testování vzorku betavitalu na koloně Kinetex HILIC bylo provedeno pomocí čtyř mobilních fází o rozdílném složení. Byly testovány následující mobilní fáze: A) 0,1 % mravenčí kyselina ve směsi acetonitril:voda; 95:5; (v/v), B) mobilní fáze o složení 0,1 % mravenčí kyselina ve směsi acetonitril:voda; 97,5:2,5; (v/v), C) mobilní fáze směsi 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 5:95; (v/v) a D) mobilní fáze směsi 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 2,5:97,5; (v/v). Výsledky ukazují, že ani jeden z uvedených systémů neposkytuje analyticky využitelný signál betaninů.

Při použití výše uvedených mobilních fází nedocházelo ani k účinné separaci ostatních složek betavitalu. Srovnání separací na chromatografické koloně při 280 nm a 450 nm při použití těchto směsí mobilních fází je uvedeno na obr. č. 24 a 25.



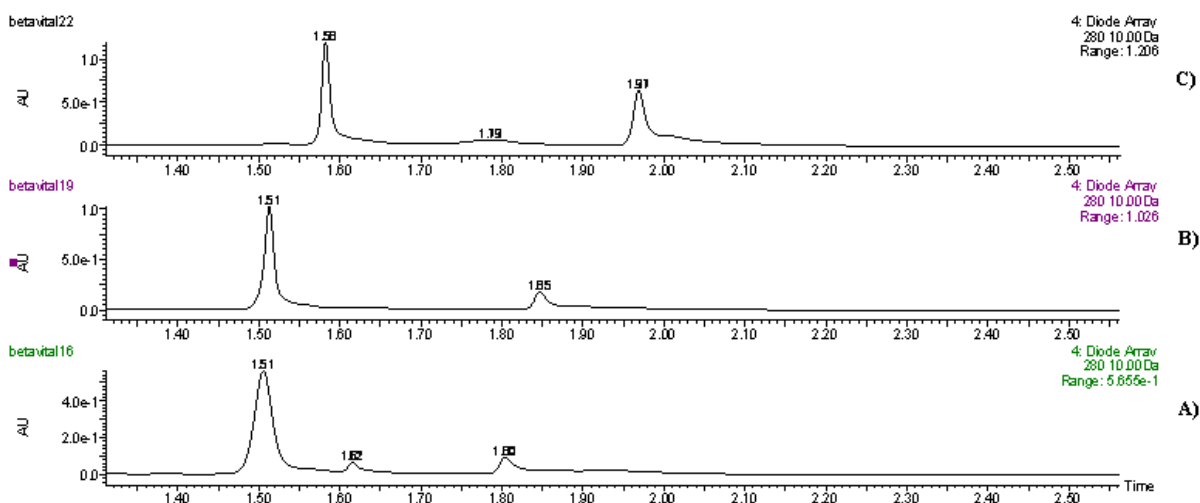
Obr. č. 24: Chromatografické separace na koloně HILIC při 280 nm při použití mobilní fáze o složení: A) 0,1 % mravenčí kyselina ve směsi acetonitril:voda; 95:5; (v/v); B) 0,1 % mravenčí kyselina ve směsi acetonitril:voda; 97,5:2,5; (v/v); C) směs 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 5:95; (v/v); D) směs 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 2,5:97,5; (v/v)



Obr. č. 25: Chromatografické separace na koloně HILIC při 450 nm při použití mobilní fáze o složení: A) 0,1 % mravenčí kyselina ve směsi acetonitril:voda; 95:5; (v/v); B) 0,1 % mravenčí kyselina ve směsi acetonitril:voda; 97,5:2,5; (v/v); C) směs 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 5:95; (v/v); D) směs 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 2,5:97,5; (v/v)

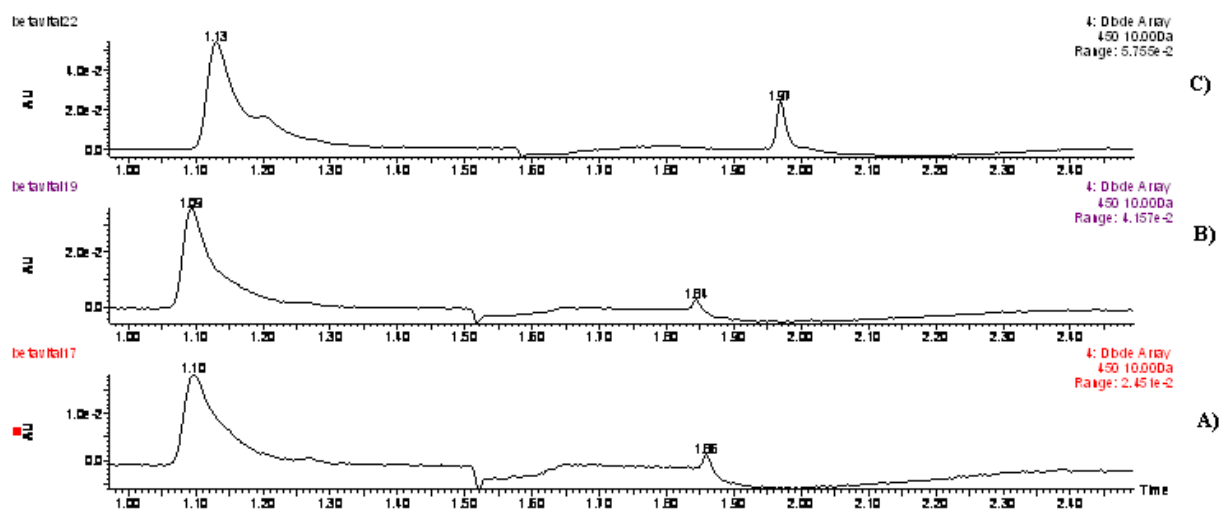
5.2.3 Chromatografie na koloně HILIC TSKgel Amide

Při použití kolony HILIC TSKgel Amide byl rovněž analyzován vzorek betavitalu. Obr. č. 26 a 27 ukazují chromatogram získaný při nástřiku betavitalu.



Obr. č. 26: Chromatografické separace na koloně HILIC při 280 nm při použití mobilní fáze o složení: A) 0,1 % mravenčí kyselina ve směsi acetonitril:voda; 97,5:2,5; (v/v); B) směs

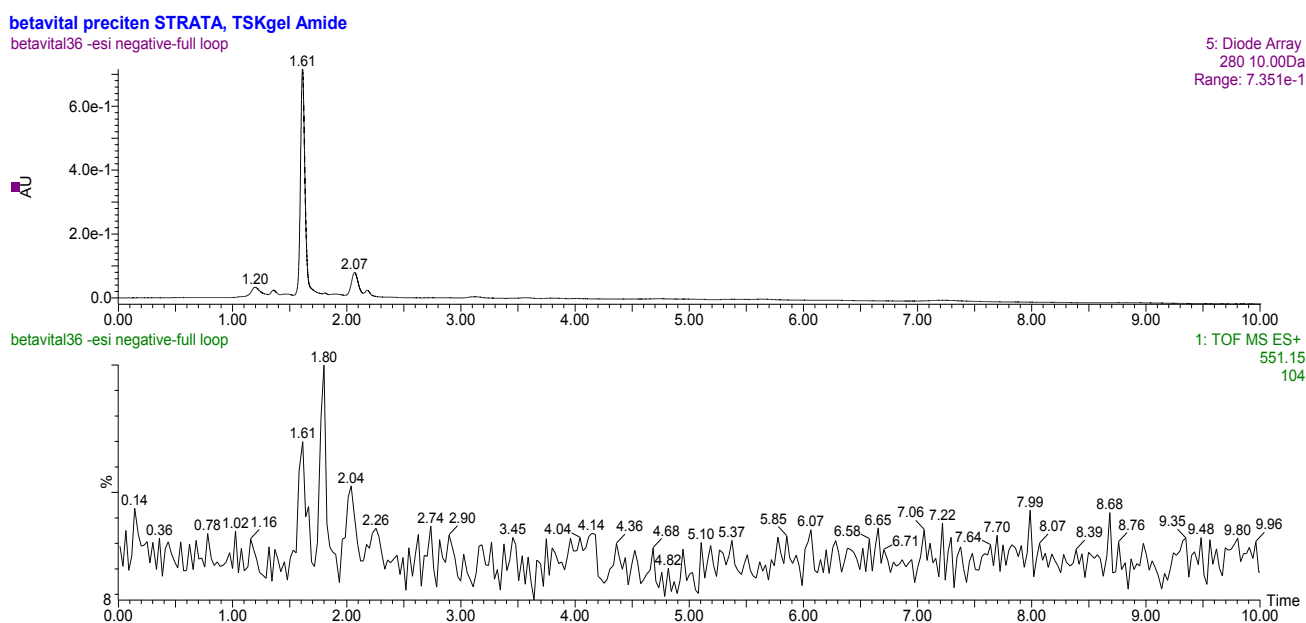
10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 5:95; (v/v); upraveno pH = 5; C) směs 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 2,5:97,5; (v/v); upraveno na pH = 5



Obr. č. 27: Chromatografické separace na koloně HILIC při 450 nm při použití mobilní fáze o složení: A) 0,1 % mravenčí kyselina ve směsi acetonitril:voda; 97,5:2,5; (v/v); B) směs 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 5:95; (v/v); upraveno pH = 5; C) směs 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu; 2,5:97,5; (v/v); upraveno na pH = 5

Majoritní látky separované v přečištěném extraktu betavitalu mají největší retenci ve směsi octanu amonného ve vodě a acetonitrilu, 2,5:97,5, (v/v), upraveno na pH = 5. V tomto systému nebyl ion 551 detekován. Při změně způsobu přečištění, použití SPE kolonky SAX/RP, byl identifikován slabý signál iontu betaninu. Při použití SPE kolonky AG 50W nebyl betanin nalezen.

Obrázek č. 28 ukazuje chromatogram vzorku betavitalu přečištěný na SPE kolonce SAX/RP získaný při analýze na koloně TSKgel Amide 80 v systému 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu, 2,5:97,5, (v/v), upraveno na pH = 5. Horní chromatogram ukazuje, že došlo k přečištění s vysokou selektivitou (malý počet píků na UV chromatogramu). Spodní obrázek ukazuje chromatogram rekonstruovaný pro ionty s m/z 551,15 (izolační šířka 1 Da). Signál iontu betaninu je zde poměrně slabý a změnou experimentálních parametrů se nepodařilo intenzitu těchto iontů zvýšit. Analýza vzorku betavitalu přečištěného přes SPE kolonku. Je nicméně patrné, že retence v tomto chromatografickém uspořádání není lepší než při použití reverzní fáze (reteční čas 1,61 min na UV záznamu).



Obr. č. 28: Chromatogramy přečištěného (SAX/RP) vzorku betaninu: horní chromatogram zobrazuje chromatografickou separaci při 280 nm, spodní chromatogram je chromatogram rekonstruovaný pro ionty m/z 551,15

Ani stacionární fáze modifikovaná karbamoylem neposkytuje ve studované HILIC uspořádání vhodné podmínky pro analýzu betaninu. Reverzní fáze tedy zůstává mezi studovanými chromatografickými systémy nejlepší volbou.

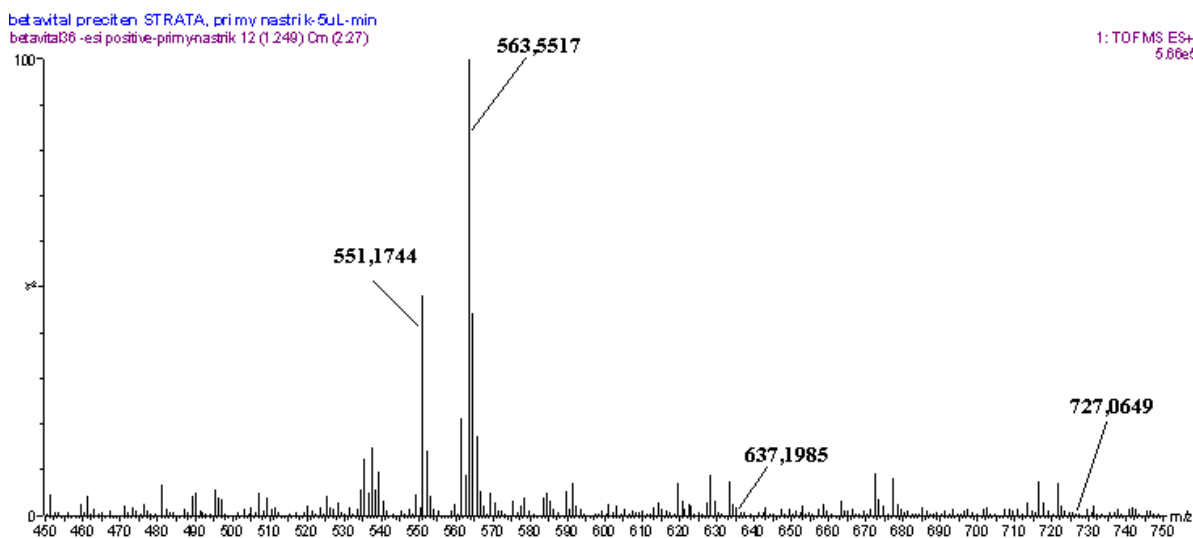
5.2.4 Přímý nástrik do ESI-Q-TOF

Jako další způsob identifikace betakyaninů ve vzorku betavitalu přečištěném extrakcí tuhou fází jsme použili přímou infúzi do ESI-Q-TOF. Byla provedena v pozitivním i negativním módu. V negativním módu nebyly ionty betakyaninů zachyceny. V pozitivním módu byl ve vzorku nalezen betanin (m/z 551), phyllocactin (m/z 637) a amaranthin nebo gomphrenin III (m/z 727) což je zobrazeno na obr. č. 29. V tabulce č. V. jsou shrnuty pozorované ionty s jejich intenzitami a jejich fragmenty.

Tab. č. V.: Shrnutí identifikovaných iontů a jejich fragmentů

Pozorované hmoty	Intenzita	Fragmenty (intenzita)
551,1747	262973	389,0988 (523); 345,0682 (85); 132,0508 (3345)
727,0649	1352	595,1015 (2273); 551,1765 (471715); 389,1244 (30814);

		345,0597 (23426); 301,1397 (86107); 257,2800 (187495); 241,2165 (2406); 225,0268 (3219)
637,1985	3510	505,1469 (15886); 551,1765 (960157); 507,1968 (49004); 345,0597 (23426); 301,1397 (86107)



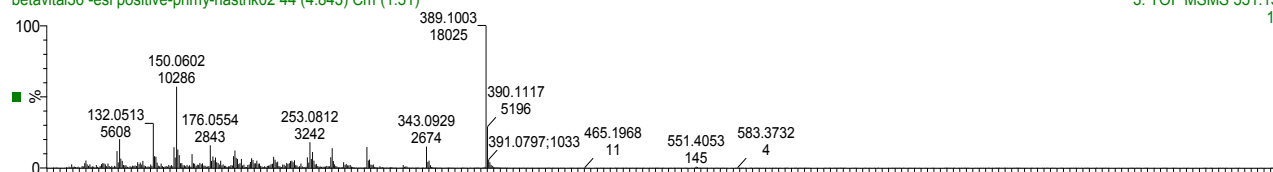
Obr. č. 29: Spektrum betavitalu po přímém nástřiku do ESI-Q-TOF

Obrázek č. 30 ukazuje MS/MS spektra iontů m/z 551,15, m/z 637,15 a m/z 727,19, která je možno připsat betaninu, phyllocactinu a amaranthinu nebo gomphreninu III. Kolizní spektrum betaninu jednoznačně potvrzuje identitu této látky. U spekter ostatních je ve srovnání s betaninem patrný malý výtěžek odpovídajícího aglykonu (tedy iontu m/z 389). To lze vysvětlit tím, že při izolaci iontů na kvadrupólu s izolační šířkou 1 Da, nedošlo k dostatečné separaci balastních iontů s blízkou hodnotou m/z . Kolizní spektra tedy obsahují směs fragmentů od různých rodičovských iontů a mezi nimi je aglykon (betanidin) fragmentem minoritním (obr. č. 31). Nicméně jeho přítomnost ve spektru je jednoznačná a identitu phyllocactinu a amarathinu nebo gomphreninu III potvrzuje.

betavital preciten STRATA, primy nastrik-5uL-min

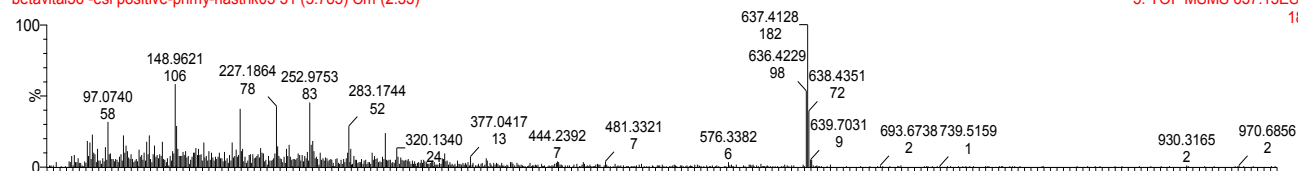
betavital36 -esi positive-primy-nastrik02 44 (4.843) Cm (1:51)

3: TOF MSMS 551.15E+
1.80e4



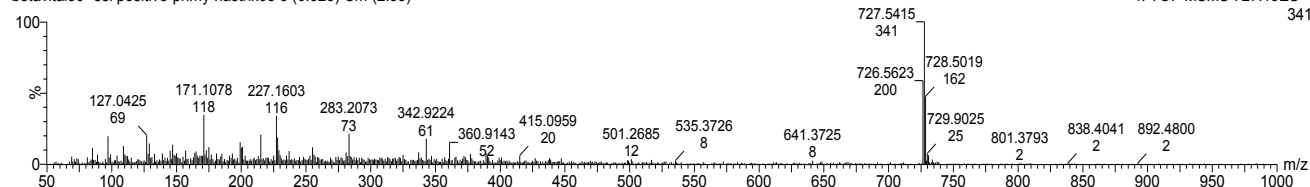
betavital36 -esi positive-primy-nastrik03 31 (5.785) Cm (2:33)

5: TOF MSMS 637.15E+
182



betavital36 -esi positive-primy-nastrik03 3 (0.523) Cm (2:33)

4: TOF MSMS 727.19E+
341

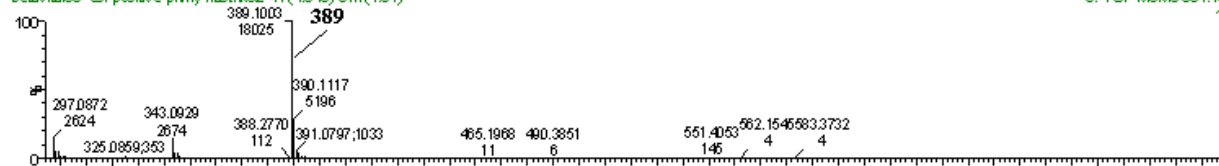


Obr. č. 30: MS/MS spektra iontů (od shora) m/z 551,15, m/z 637,15 a m/z 727,19

betavital preciten STRATA, primy nastrik-5uL-min frag-697.19,727.19,637.15

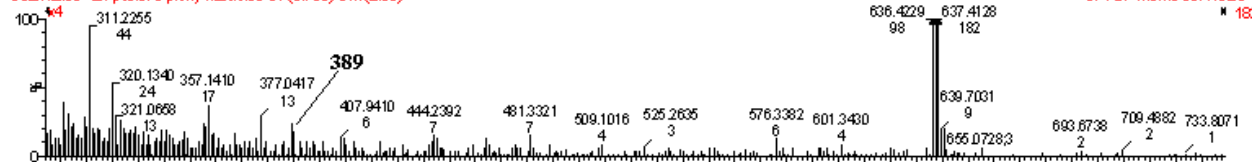
betavital36 -esi positive-primy-nastrik02 44 (4.843) Cm (1:51)

3: TOF MSMS 551.15E+
1.80e4



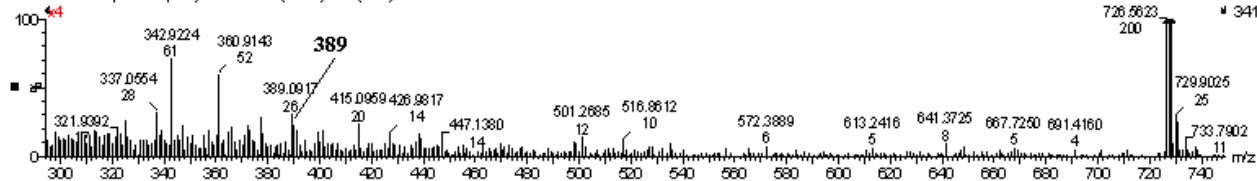
betavital36 -esi positive-primy-nastrik03 31 (5.785) Cm (2:33)

5: TOF MSMS 637.15E+
182



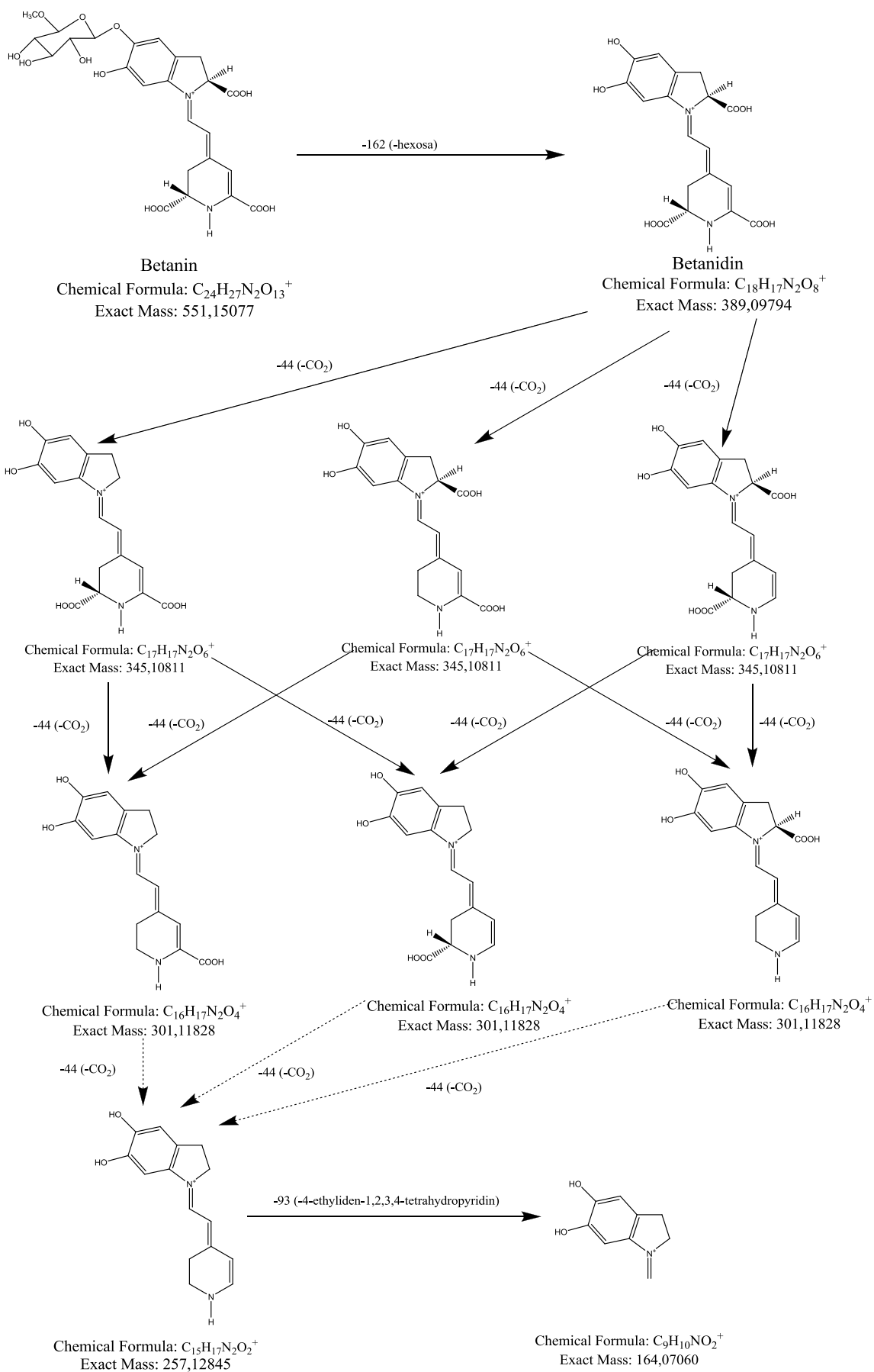
betavital36 -esi positive-primy-nastrik03 3 (0.523) Cm (2:33)

4: TOF MSMS 727.19E+
341



Obr. č. 31: MS/MS spektra iontů s viditelným fragmentem m/z 389,09 aglykonu (od shora) m/z 551,15, m/z 637,15 a m/z 727,19

Na obr. č. 32 je zobrazeno fragmentační schéma betaninu sestavené z pozorovaných fragmentů v reálných spektrech potvrzené softwarem HighChem Mass Frontier 5.0.



Obr. č. 32: Návrh fragmentace betaninu: plná šipka odpovídá fragmentaci v reálných vzorcích potvrzené programem HighChem Mass Frontier 5.0, přerušovaná odpovídá strukturám nalezeným v reálných vzorcích, které nebyly softwarem potvrzeny

6. ZÁVĚR

Pro úspěšnou analýzu extraktů na iontovém zdroji MALDI byly vzorky zakoncentrovány a nastavení hmotnostního spektrometru bylo optimalizováno. Měření byla prováděna s použitím matrice THAP. Ve vzorku extraktu červené řepy byl signál betaninu (m/z 551,1378) patrný s odchylkou od teoretické hodnoty -13,4 mDa (-24,3 ppm). Jeho identifikaci jsme potvrdili jednoznačně patrným signálem aglykonu (m/z 389) získaným v kolizním spektru při použití kolizní energie 10 eV. Při optimalizaci fragmentace iontu m/z 551 bylo zjištěno, že optimální kolizní energie k jeho fragmentaci je 30 eV.

Při použití spojení UPLC-ESI-Q-TOF na koloně C18 byly ve vzorku betavitalu nalezeny betanin a pravděpodobně hylocerenin a phyllocactin. Pík betaninu m/z 551,1550 v MS spektru dominoval (s odchylkou od teoretické hodnoty 0,7 mDa, 1,3 ppm) a jeho přítomnost byla potvrzena jeho fragmentací, při níž vznikl výrazný ion aglykonu m/z 389 (betanidin). Nevýhodou tohoto chromatografického uspořádání je relativně malá retence. Mezi testovanými systémy je vhodnější mobilní fáze A 0,1 % octová kyselina ve vodě a B 0,1 % octová kyselina v acetonitrilu.

Chromatografická analýza vzorku betavitalu na koloně Kinetex HILIC s použitím námi vybraných mobilních fází není vhodná k analýze betalainů. Hmoty betalainů nebyly nalezeny a nedocházelo ani k účinné separaci ostatních složek betavitalu.

Při použití kolony HILIC TSKgel Amide byl rovněž analyzován vzorek betavitalu. Signál betaninu i retence byla při použití této kolony slabá. Mezi studovanými chromatografickými systémy se jako nejvhodnější jeví použití reverzní fáze (Acquity C18).

Jako další způsob identifikace betalainů ve vzorku betavitalu byla použita přímá infúze do systému ESI-Q-TOF. Ve vzorku byl nalezen betanin (m/z 551), phyllocactin (m/z 637) a amaranthin nebo gomphrenin III (m/z 727). Kolizní spektrum betaninu jednoznačně potvrdilo identitu této látky. U spekter ostatních sledovaných látek je rovněž patrný ion aglykonu (tedy iontu m/z 389), i když s podstatně nižší intenzitou oproti betaninu.

LITERATURA

- 1 - Churáček J., a kol.: *Analytická separace látek*. SNTL, Praha 1990.
- 2 - Churáček J., Jandera P.: *Separace látek*. SNTL, Praha 1986.
- 3 - Pacáková V., Štulík K.: *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*. Státní Pedagogické nakladatelství, Praha 1986.
- 4 - Kolářová L.: *HPLC/MS Výšemolekulárních látek*. Doktorská disertační práce, Univerzita Pardubice, Pardubice 2004.
- 5 - Meyer V. R.: *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, Chichester 2010.
- 6 - Strege M. A., : *Anal. Chem.* **70**, 2439 (1998).
- 7 - McCalley D. V.: *J. Chromatogr. A* **1171**, 46 (2007).
- 8 - Risley D. S., Strege M. A.: *Anal. Chem.* **72**, 1736 (2000).
- 9 - Yang Y., Boysen R. I.: *J. Chromatogr. A* **1216**, 5518 (2009).
- 10 - Jandera P.: *Chemag.* **2**, 8 (2011).
- 11 - Dass Ch.: *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*, John Wiley & Sons Inc., Hoboken 2007.
- 12 - de Hoffmann E., Stroobant V.: *Mass spectrometry, Principles and applications*. John Wiley & Sons, Chippingham 2007.
- 13 - Hunt D. F.: *Int. J. Mass Spectrom.* **45**, 111 (1982).
- 14 - Cody R. B., Tamura J., Musselman B. D.: *Anal. Chem.* **64**, 1561 (1992).
- 15 - Ho C.S., Lam C.W.K., Cham M.H.M., Cheung R.C.K., Law L.K., Lit L.C.W., Ng K.F., Suen M.W.M., Tai H.L.: *Clin Biochem* **24**, 3 (2003).
- 16 - Cody R. B.: *Applied electrospray mass spectrometry*. Taylor & Francis, 2002.
- 17 - Gandía-Herrero F., García-Carmona F., Escribano J.: *J. Chromatogr. A* **1078**, 83 (2005).
- 18 - Stafford H. A.: *Plant Sci.* **101**, 91 (1994).
- 19 - Azeredo H. M. C.: *Trends Food Sci. Technol.* **44**, 2365 (2009).
- 20 - Cai Y.-Z., Sun M., Corke H.: *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 370 (2005).
- 21 - Jerz G., Skotzki T., Fiege K., Winterhalter P., Wybraniec S.: *J. Chromatogr. A* **1190**, 63 (2008).
- 22 - Frank T., Stintzing F. C., Carle R., Bitsch I., Quaas D., Straß G., Bitssch R., Netzel M.: *Pharmacol. Res.* **52**, 290 (2005).

- 23 - Gandía-Herrero F., Escribano J., García-Carmona F.: *Plant Physiol.* **138**, 421 (2005).
- 24 - Stintzing F. C., Schieber A., Carle R.: *Eur. Food Res. Technol.* **216**, 303 (2003).
- 25 - Kujala T. S., Vienola M. S., Klik K. D., Loponen J. M., Pihlaja K.: *Eur. Food Res. Technol.* **214**, 505 (2002).
- 26 - Stintzing F. C., Schieber A., Carle R.: *Eur. Food Res. Technol.* **212**, 369 (2001).
- 27 - Strack D., Vogt T., Schielmann W.: *Phytochemistry* **62**, 247 (2003).
- 28 - Kurka O., Myjavcová R., Bednář P.: *Chem. Listy* **105**, 37 (2011).
- 29 - Stintzing F. C., Carle R.: *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 19 (2004).
- 30 - Stintzing F. C., Trichterborn J., Carle R.: *Food Chem.* **94**, 269 (2006).
- 31 - Gandía-Herrero F., Escribano J., García-Carmona F.: *Planta* **232**, 449 (2010).
- 32 - Allegra M., Furtmüller P. G., Jantschko W., Zederbauer M., Tesoriere L., Livrea M. A., Obinger Ch.: *Biochem. Bioph. Res. Co.* **332**, 837 (2005).
- 33 - Tesoriere L., Butera D., Pintaudi A. M., Allegra M., Livrea M. A.: *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 391 (2004).
- 34 - Castellanos-Santiago E., Yahia E. M.: *J. Agric. Food Chem.* **56**, 5758 (2008).
- 35 - Nováček F.: *Fytochemické základy botaniky*. Fontána, Olomouc 1990.
- 36 - Wybraniec S., Stalica P., Jerz G., Klose B., Gebers N., Winterhalter P., Spórna A., Szaleniec M., Mizrahi Y.: *J. Chromatogr. A* **1216**, 6890 (2009).
- 37 - Escribano J., Pedreño M. A., García-Carmona F., Muñoz R.: *Phytochem. anal.* **9**, 124 (1998).
- 38 - Cai Y., Sun M., Corke H.: *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2288 (2003).
- 39 - Kanner J., Harel S., Granit R.: *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5178 (2001).
- 40 - Butera D., Tesoriere L., Di Gaudio F., Bongiorno A., Allegra M., Pintaudi A. M., Kohen R., Livrea M. A.: *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6895 (2002).
- 41 - Serris G. S., Biliaderis C. G.: *J. Sci. Food Agric.* **81**, 691 (2001).
- 42 - Goncalves L. Ch. P., Trassi M. A. de S., Lopes N. B., Dörr F. A., Santos M. T., Baader W. J., Oliveira Jr. V. X., Bastos E. L.: *Food Chem.* **131**, 231 (2012).
- 43 - Stintzing F. C., Carle R.: *Trends Food Sci. Technol.* **18**, 514 (2007).
- 44 - Wybraniec S.: *J. Chromatogr. A* **861**, 40 (2008).
- 45 - Zhang D., Lanier S. M., Downing J. A., Avent J. L., Lum J., McHale J. L.: *J. Photoch. Photobio A* **195**, 72 (2008).

- 46 - Wybraniec S., Platzner I., Geresh S., Gottlieb H. E., Haimberg M., Mogilnitzki M., Mizrahi Y.: *Phytochemistry* **58**, 1209 (2001).
- 47 - Schliemann W., Cai Y., Degenkolb T., Schmidt J., Corke H.: *Phytochemistry* **58**, 159 (2001).
- 48 - Heuer S., Richter S., Metzger J. W., Wray V., Nimtz M., Strack D.: *Phytochemistry* **37**, 761 (1994).
- 49 - Schliemann W., Kobayashi N., Strack D.: *Plant Physiol.* **119**, 1217 (1999).
- 50 - Stintzing F. C., Schieber A., Carle R.: *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2302 (2002).
- 51 - Fernández-López J. A., Castellar R., Obón J. M., Almela L.: *Chromatographia* **56**, 591 (2002).
- 52 - Stintzing F. C., Schieber A., Carle R.: *Food Chem.* **77**, 101 (2002).
- 53 - Schliemann W., Joy IV R. W., Komamine A., Metzger J. W., Nimtz M., Wray V., Strack D.: *Phytochemistry* **42**, 1039 (1996).
- 54 - Fernández-López J. A., Almela L.: *J. Chromatogr. A* **913**, 415 (2001).
- 55 - Kugler F., Stintzing F. C., Carle R.: *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 637 (2007).
- 56 - Kobayashi N., Schmidt J., Nimtz M., Wray V., Schliemann W.: *Phytochemistry* **54**, 419 (2000).
- 57 - Wybraniec S., Jerz G., Gebers N., Winterhalter P.: *J. Chromatogr. B* **878**, 538 (2010).
- 58 - Wybraniec S., Stalica P., Spórna A., Mizrahi Y.: *J. Agric. Food Chem.* **58**, 5357 (2010).
- 59 - Kugler F., Stintzing F. C., Carle R.: *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2975 (2004).
- 60 - Svenson J., Smallfield B. M., Joyce N. I., Sansom C. E., Perry N. B.: *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7730 (2008).
- 61 - Wybraniec S., Mizrahi Y.: *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6086 (2002).
- 62 - Sánchez F. D., López E. M. S., Kerstupp S. F., Ibarra R. V., Scheinvar L.: *Electron. J. Agric. Food Chem.* **5**, 1330 (2006).
- 63 - Cai Y.-Z., Xing J., Sun M., Corke H.: *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6520 (2006).
- 64 - Stintzing F. C., Kugler F., Carle R., Conrad J.: *Helv. Chim. Acta* **89**, 1008 (2006).
- 65 - Stuppner H., Egger R.: *J. Chromatogr. A* **735**, 409 (1996).
- 66 - Glässgen W. E., Metzger J. W., Heuer S., Strack D.: *Phytochemistry* **33**, 1525 (1993).

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS - Metoda využívající zhášení radikálového kationtu ABTS⁺

APCI – Chemická ionizace za atmosférického tlaku

API – Ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku

APPI – Fotoionizace za atmosférického tlaku

DAD – detektor diodového pole

ESI – Elektrosprej

FT – Fourierova transformace

GPC – Gelová permeační chromatografie

HILIC – Hydrofilní interakční chromatografie

HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie

IEC – Iontově výměnná chromatografie

ICR – Iontová cyklotronová rezonance

IPC – Chromatografie iontových párů

IP-HSCCC – Ion-párová vysoko-rychlostní proti-proudá chromatografie

LDI – Ionizační techniky založené na desorpci/ionizaci laserem

MALDI – Matricí asistovaná ionizace/desorpce laserem

MCP – Mikrokanálová destička

MS – Hmotnostní spektrometrie

NALDI – Nano-asistovaná ionizace/desorpce laserem

NMR – Nukleární magnetická rezonance

NP – Normální fáze

Q – Kvadrupól

QqTOF – Spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu

RP – Obrácené fáze

SPE – Extrakce tuhou fází

TEAC – Metoda využívající se k vyjádření antioxidační aktivity (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

TOF – Analyzátor doby letu

TSP – Termosprej

UHPLC – Ultraúčinná kapalinová chromatografie

UPLC – Ultraúčinná kapalinová chromatografie