

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Kontrola potravin kapalinovou chromatografií
a hmotnostní spektrometrií**

Bakalářská práce

Autor práce:

Eva Tedová

Studijní obor:

Aplikovaná chemie

Vedoucí práce:

Andreea Maria Iordache, Ph.D.

Olomouc 2013

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci na téma Kontrola potravin kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií vypracovala sama a uvedla jsem všechny použité prameny, které cituji a uvádím v přiloženém seznamu.

Souhlasím s tím, že je tato práce prezenčně přístupná v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne:

Podpis:

Děkuji slečně Andreei Marii Iordache, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za ochotu a čas, který mi věnovala při pomoci s experimentální částí. Rovněž děkuji prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D. za konzultace, připomínky a cenné rady.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Eva Tedová
Název práce:	Kontrola potravin kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií
Typ práce:	bakalářská
Pracoviště:	katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	Andreea Maria Iordache, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2013
Abstrakt:	<p>V teoretické části této bakalářské práce je uvedena základní orientace v analytických technikách, které se využívají při analýze potravin a jejich kontrole. Další velkou část tvoří rešerše zabývající se přehledem vybraných prací, které souvisí s metodami HPLC/MS v této oblasti. Experimentální část se zabývá ionizací monosacharidů včetně využití jejich reakce s kyselinou boritou a analýzou karamelu prováděnými na hmotnostním spektrometru a v případě karamelu i pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie (systém hydrofilní interakční chromatografie) ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Ukazuje se, že využití kyseliny borité může napomoci k odlišení monosacharidů (konkrétně v této práci glukosy a fruktosy) a že lze v práci testovanou metodou sledovat markery přítomnosti karamelu.</p>
Klíčová slova:	kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, glukosa, fruktosa, karamel
Počet stran:	41
Počet stran příloh:	13
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Eva Tedová

Title: Food control by liquid chromatography and mass spectrometry

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: Andreea Maria Iordache, Ph.D.

The year of presentation: 2013

Abstract: The theoretical part introduces the basic information of analytical techniques that are used in food analysis and control. Another part is the literature work which dealing with an overview of selected works related to HPLC/MS. The experimental part deals with ionization of monosaccharides including their reaction with boric acid and analysis of caramel. The experiments were carried out with the mass spectrometer and in case of caramel also with ultra performance liquid chromatograph with mass spectrometer. It appears that the use of boric acid may help to distinguish monosaccharides (specifically glucose and fructose) and that can be found markers of caramel by this testing method.

Key words: liquid chromatography, mass spectrometry, glucose, fructose, caramel

Number of pages: 41

Number of pages of appendices: 13

Language: Czech

OBSAH

1.	ÚVOD.....	8
2.	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Kontrola potravin.....	9
2.1.1	System kontroly v České republice.....	9
2.1.2	Důvody kontroly.....	10
2.2	Analytické metody využívané v kontrole potravin.....	10
2.2.1	Metody klasické analýzy – gravimetrie, titrace.....	10
2.2.2	Separční metody – chromatografie, elektroforéza.....	11
2.2.3	Spektrální a optické metody.....	12
2.3	Spojení vysokoúčinné chromatografie a hmotnostní spektrometrie.....	13
2.4	Příklady aplikací kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií využívaných při analýze potravin.....	14
2.4.1	Toxické látky.....	14
2.4.2	Látky s nutriční hodnotou.....	16
2.4.3	Antioxidanty.....	19
2.5	Monosacharidy.....	20
2.6	Karamel.....	21
3.	PRAKTICKÁ ČÁST.....	22
3.1	Přístroje, pomůcky a chemikálie.....	22
3.2	Pracovní postup.....	23
3.3	Výsledky a diskuze.....	24
4.	ZÁVĚR.....	34
5.	SUMMARY.....	35

6.	LITERATURA.....	36
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	38
8.	SEZNAM OBRÁZKŮ	40
9.	SEZNAM TABULEK.....	41
10.	PŘÍLOHY	42
11.	SEZNAM PŘÍLOH	54

1. ÚVOD

Potrava je soubor látek nutných k udržení základních fyziologických funkcí. Během života dochází k opotřebování buněk, tkání a orgánů. Lidé vyvíjí mnoho činností, při kterých potřebují velké množství energie. A proto přijímají potravu, která je zdrojem jak energie (cukry a tuky), tak zdrojem stavebních látek (bílkoviny). Potrava je však velmi složitým chemickým materiálem. Podle hrubých odhadů se v čerstvých potravinách vyskytuje asi půl milionu různých chemických sloučenin. Mnohem větší množství sloučenin dále vzniká enzymovými a neenzymovými reakcemi při skladování potravin.

Nejdůležitější složkou potravin jsou živiny, které určují jejich výživovou a energetickou hodnotu. Hlavní živiny jsou bílkoviny, tuky, cukry, vitaminy, minerální látky a voda. Další složkou potravin jsou sensorické látky, které potravinám dodávají aroma, chuť, barvu a konzistenci. A kromě přirozených látek se v potravinách vyskytují také látky s negativním vlivem na výživu člověka. Do této skupiny patří toxické látky, karcinogeny a kontaminanty. [1, 2]

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kontrola potravin

Pojmem potrava se rozumí veškeré materiály sloužící k výživě organismů. Potravou, která slouží výživě lidského organismu, jsou poživatiny. Poživatiny se dělí na potraviny a pochutiny. Hlavní funkcí potravin je dodávání živin a energie organismu. Mají tedy výživovou neboli nutriční hodnotu, která je dána obsahem živin a jejich energetickou hodnotou. Energetická hodnota souvisí především s obsahem tuků ($37 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$, $9 \text{ kcal}\cdot\text{g}^{-1}$), cukrů ($17 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$, $4 \text{ kcal}\cdot\text{g}^{-1}$) a bílkovin ($17 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$, $4 \text{ kcal}\cdot\text{g}^{-1}$). Energetickou hodnotu má i ethanol ($29 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$, $7 \text{ kcal}\cdot\text{g}^{-1}$), některé organické kyseliny, např. kyselina citrónová ($13 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$, $3 \text{ kcal}\cdot\text{g}^{-1}$), cukerné alkoholy, jako je D-glucitol ($10 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$, $2,4 \text{ kcal}\cdot\text{g}^{-1}$). Pochutiny jsou poživatiny, které mají malou nebo žádnou výživovou hodnotu. Mají však senzoryckou hodnotu (např. koření) nebo osvěžující a povzbuzující účinky (káva, čaj). [1]

Analýza potravin, včetně surovin potřebných k jejich výrobě, je nedílnou součástí posouzení kvality potravinářských produktů. V současnosti zahrnuje analýzu cizorodých látek významných z hlediska toxicity, ale i stanovení hlavních složek potravin důležitých z hlediska jejich nutriční hodnoty a související kontrolu dodržování zákonných norem. Moderní analytické metody umožňují získat celou řadu informací, které charakterizují potraviny nejen na základě jejich složení, tj. obsahu živin jako jsou bílkoviny, sacharidy, tuky, minerály, senzorycky a biologicky aktivní látky, kontaminanty, aditivní látky a látky endogenní, ale i jejich fyzikálně-chemických vlastností. [3]

2.1.1 Systém kontroly v České republice

Kontrolu potravin v České republice realizuje Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) a Státní veterinární správa (SVS).

SZPI je organizační složka státu, která je přímo podřízená ministerstvu zemědělství. Pojetí a uskutečnění kontroly potravin vychází z nové právní úpravy (ze zákona č. 110/97 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, z novely zákona č. 146/2002 Sb., o SZPI nebo zákona č. 552/91 Sb., o státní kontrole) a odpovídá principům kontroly potravin uplatňovaným

ve státech Evropské unie. SZPI kontroluje potraviny, suroviny potřebné pro jejich výrobu, zemědělské a tabákové výrobky. Toto oprávnění se vztahuje na výrobu, skladování, přepravu, prodej a dovozu potravin. [4]

SVS ČR je orgánem státní správy ministerstva zemědělství a je řízena podle zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů. Jejím úkolem je ochrana spotřebitelů před případnými zdravotně závadnými produkty živočišného původu, monitorování a udržování příznivé nakažové situace zvířat, veterinární ochrana státního území České republiky a ochrana zvířat před týráním. [5]

2.1.2 Důvody kontroly

Kontrola potravin je cílený proces, jehož účelem je ochrana ekonomických zájmů občanů i státu. Chrání nás před zdravotně závadnými potravinami, před potravinami, které jsou klamavě označené, dále s prošlým datem použitelnosti nebo neznámého původu. Důležitou součástí kontroly je kontrola výrobních podmínek a prodeje. [4]

Pod pojmem kontrola zdravotní nezávadnosti je zahrnuta kontrola mikrobiologických požadavků a cizorodých látek (např. chemických prvků, aditiv, reziduí pesticidů atd.). Zjišťuje se přítomnost toxických látek vstupujících do potravin z okolního prostředí, obalů nebo vznikajících při výrobě potravin. [4]

Pojmem kontrola jakosti rozumíme kontrolu analytických znaků (např. obsah tuku, obsah cukru, vlhkosti apod.) a kontrolu sensorických znaků. Dále se kontroluje složení potravin a potravinových doplňků vzhledem k informacím uvedeným na obalu (např. přídavek levnější ingredience) nebo ověření deklarovaného geografického původu. [4]

2.2 Analytické metody využívané v kontrole potravin

2.2.1 Metody klasické analýzy – gravimetrie, titrace

Gravimetrie – analyt ve vzorku se srážením s vhodným činidlem kvantitativně převede na málo rozpustnou sloučeninu o přesně definovaném složení. Obsah analytu se stanoví z její hmotnosti zjištěné vážením. Touto jednoduchou metodou lze určit např. obsah

síranů, sulfidů, hydroxidů, oxidů, halogenidů, chromanů, fosforečnanů, šťavelanů, fosforu, vápníku a škrobu. [6, 7]

Titrace – množství analyzované látky se určí z množství odměrného roztoku, který se spotřebuje při reakci s analytem. Výpočet látkového množství analytu ze spotřeby odměrného roztoku vychází ze stechiometrických vztahů mezi reagujícími komponentami. Titračními metodami se určí např. množství anorganických i organických kyselin, hydroxidů, siřičitanů, síranů, uhličitanů, halogenidů, amoniaku, mědi, vápníku a železa. [7]

2.2.2 Separační metody – chromatografie, elektroforéza

Chromatografie – chromatografie je separační metoda, při které se oddělují složky obsažené ve vzorku. Vzorek se vnáší mezi dvě fáze. Jedna je nepohyblivá – stacionární fáze a přes ni se pohybuje druhá – mobilní fáze. Pohybem mobilní fáze je vzorek touto soustavou unášen. Doba, po kterou molekuly určité složky setrvávají ve stacionární fázi, závisí na velikosti interakce mezi složkou a stacionární fází a určuje pořadí, v jakém složky vycházejí. Čím silnější je interakce, tím později je složka evaluována. Rozdělování se děje na základě fyzikálně-chemických interakcí, jako jsou adsorpce, iontová výměna apod. [8, 9, 10]

- a) Plynová chromatografie – mobilní fází je plyn. Hlavními výhodami této metody jsou jednoduché a rychlé provedení analýzy, malé množství vzorku potřebné k analýze a vysoká účinnost separace. Plynová chromatografie (GC) má výsadní postavení v analýze těkavých látek. Využívá se např. pro stanovení obsahu methanolu v ovocných destilátech.[11]
- b) Kapalinová chromatografie – Mobilní fází je kapalina. Tato metoda se vyznačuje vysokou citlivostí a robustností a umožňuje analyzovat prakticky veškeré organické látky ve velkém rozpětí relativních molekulových hmotností. Kapalinová chromatografie (LC) se využívá pro stanovení sacharidů, škrobu, konzervačních látek, vitaminů, organických kyselin, alkoholů a dalších pomocných potravinářských látek.[12, 13]

Elektroforéza – elektroforéza se řadí mezi elektromigrační metody a slouží k separaci nabitých částic účinkem elektrického pole. K separaci využívá rozdílných pohyblivostí látek ve stejnosměrném elektrickém poli. Elektrické pole je vytvořeno vložením konstantního

napětí mezi dvě elektrody. Elektroforéza má využití například při analýze bílkovin a charakterizaci povrchů organismů, jako jsou viry a bakterie. [9, 14]

2.2.3 Spektrální a optické metody

Metody založené na interakci vzorku s elektromagnetickým zářením nebo na vyzařování elektromagnetického záření vzorkem.

- a) Nespektrální metody – metody, u kterých se sledují změny elektromagnetického záření (např. změny rychlosti záření, rozptyl záření a otáčení roviny polarizovaného světla).
 - Refraktometrie – principem refraktometrie je měření indexu lomu. V praxi se využívá k ověřování čistoty látek.
 - Polarimetrie – tato metoda využívá schopnosti opticky aktivních látek stáčet rovinu polarizovaného světla. Polarimetrie se používá pro stanovení sacharidů.
- b) Spektrální metody – metody, založené na výměně energie mezi látkou a zářením.
 - Atomová emisní spektrometrie (AAS) – analytická technika, která spočívá ve sledování emise elektromagnetického záření volnými atomy látek v plynném stavu. Excitované elektrony při přechodu na základní hladiny emitují záření, vytváří se spektrální čáry, charakteristické pro každý prvek. AES se používá pro kvantitativní stanovení minerálních prvků (sodík, vápník, draslík, hořčík, železo, jod, zinek, apod.) v potravinách.
 - Atomová absorpční spektrometrie (AES) – principem je absorpce elektromagnetického záření volnými atomy v plynném stavu. Jako zdroj záření se používá prvek, který chceme stanovovat. Ten emisí záření bude poskytovat požadované vlnové délky, které odpovídají rezonančním čárám stanovovaného prvku. Pomocí metody AAS se dá stanovit 60 prvků periodické tabulky.
 - Ultrafialová a viditelná spektrometrie (UV-VIS) – podstatou je absorpce ultrafialového a viditelného záření zředěnými roztoky molekul. V potravinářském průmyslu se UV-VIS používá pro kvalitativní i kvantitativní stanovení zejména organických látek.
 - Infračervená spektrometrie (IR) – principem je absorpce infračerveného záření molekulami látek. IR je v analýze potravin využívána v blízké (0,8-2,5 μm) a střední (2,5-15 μm) infračervené oblasti pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. Střední infračervená oblast se používá pro stanovení funkčních skupin v látkách.

- Nukleární magnetická rezonance (NMR) – je metoda, která využívá interakce atomových jader majících nenulový spin s magnetickým polem. Absorpcí elektromagnetického záření v oblasti krátkých rádiových vln dochází k přechodu jádra na vyšší energetické hladiny. NMR spektroskopie se používá k identifikaci a strukturní analýze organických látek. [9, 13]

Hmotnostní spektrometrie – hmotnostní spektrometrie je separační metoda, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu hmotnosti a náboje (m/z). Při vhodné interpretaci výsledků měření má tato technika velmi dobrou vypovídací schopnost o struktuře analyzovaných látek.

Tato metoda zahrnuje pět základních kroků:

- Odpaření vzorku
- Ionizace
- Akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru
- Separace iontů hmotnostním analyzátozem
- Detekce iontů

V analýze potravin slouží hmotností spektrometrie jako efektivní nástroj pro stanovení přítomnosti toxických látek, které do potravin vstupují z obalů, z výroby, z dovozu a ze skladování. [9, 13, 15]

2.3 Spojení vysokoúčinné chromatografie a hmotnostní spektrometrie

V posledních letech byl zaznamenán velký pokrok v oblasti přímého spojení separačních a spektrálních technik. V prvním kroku se směs látek rozdělí separační technikou, ve druhém kroku se pomocí spektrální metody získají strukturní informace o jednotlivých sloučeninách.

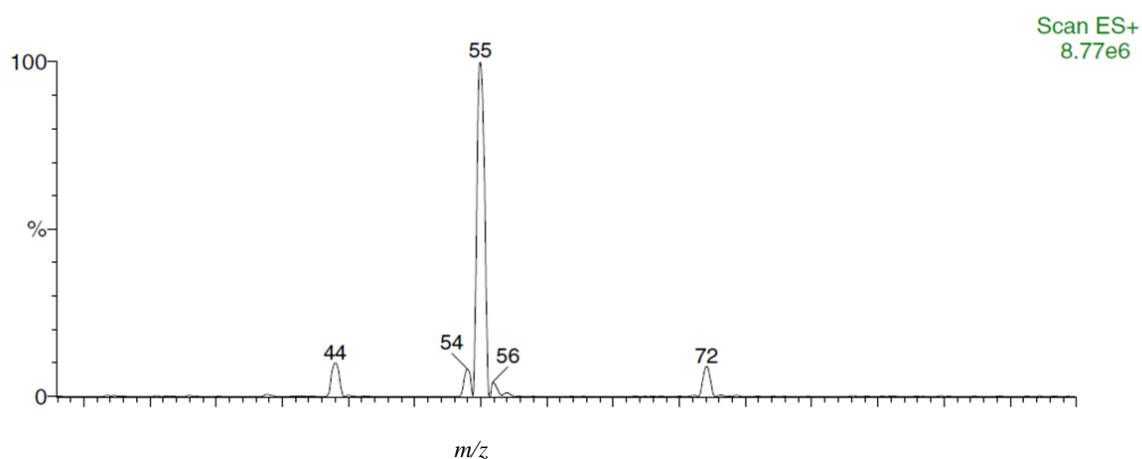
Základním předpokladem úspěšného spojení vysokoúčinné chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS) je účinné odstranění složek mobilní fáze před vlastní separací iontů. V dnešní době se pro spojení HPLC/MS využívají výhradně ionizace za atmosférického tlaku (API), mezi které patří ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI).

Použití hmotnostního spektrometru jako detektoru nijak nezužuje výběr typu stacionární fáze. Nejčastěji se používá chromatografie v systémech s obrácenými fázemi, kde se jako stacionární fáze využívají kolony s chemicky vázanou stacionární fází C8 nebo C18. Určitá omezení jsou kladena na volbu mobilní fáze, zejména z hlediska průtoku mobilní fáze a těkavosti složek. [16]

2.4 Příklady aplikací kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií využívaných při analýze potravin

2.4.1 Toxické látky

Akrylamid je karcinogen, který vzniká při výrobě potravin a zpracování potravin (např. při smažení). Byla vyvinuta LC-MS/MS metoda pro stanovení akrylamidu v potravinách. Jako vnitřní standard byl použit $^{13}\text{C}_3$ -akrylamid. Homogenizované vzorky byly extrahovány vodou a centrifugovány. Poté byl přidán 1 ml d_5 -3-chloropropandiolu. kvůli Přídavek d_5 -3-chloropropandiolu měl za následek minimalizování vlivů matrice vzorku a zvýšení kvality analýzy Extrakt byl analyzován přímo pomocí LC-MS/MS bez derivatizace. Jako nejspolehlivější pro identifikaci a kvantifikaci akrylamidu byly iontové přechody 72-55 m/z, pro $^{13}\text{C}_3$ -akrylamid 75-58 m/z a pro d_5 -3-chloropropandiol 116-98 m/z. Tato metoda může být používána ke kvantifikaci akrylamidu při výrobě potravin. [17]



Obr. 1. ESI + hmotnostní spektrum akrylamidu. Převzato z literatury [17]

Průměrná hodnota denního příjmu akrylamidu u dospělých ve Švédsku se odhaduje přibližně okolo 100 µg. Protože tento příjem by mohl být spojen s rizikem rakoviny, bylo důležité určit jeho původ. Akrylamidu, vznikající při ohřevu různých potravin, byl analyzován metodou GC/MS a LC/MS s použitím MS/MS módu. Mez detekce akrylamidu byla metodou GC/MS 5 µg/kg, metodou LC-MS/MS 10 µg/kg. Metoda LC-MS/MS je výhodnější pro většinu běžných analýz. Studie prokázala teplotní závislost pro vznik akrylamidu. Střední množství akrylamidu (5-50 µg/kg) vznikalo při ohřevu látek bohatých na bílkoviny, vysoké množství akrylamidu (150-4000 µg/kg) vznikalo při ohřevu látek bohatých na sacharidy, jako jsou např. smažené brambory, červená řepa a suchary. Akrylamid nebyl detekován v neohříváných nebo vařených potravinách (< 5 µg/kg). [18]

Ochratoxin A (OTA) je mykotoxin produkovaný *Aspergillus ochraceus* a *Penicillium verrucosum*. Vzhledem ke své toxicitě mají některé evropské země vlastní předpisy pro obsah OTA v nápojích a potravinách. Byla popsána metoda pro stanovení OTA v pivu. Analýza byla provedena pomocí metody LC-MS/MS. Tato metoda byla srovnána se standardními validovanými metodami. Vzhledem k její dobré reprodukovatelnosti, opakovatelnosti a robustnosti je tato metoda perspektivní alternativou k metodě kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (LC-FD). [19]

Byla vyvinuta a validována metoda LC-MS/MS pro simultánní stanovení šesti hlavních námelových alkaloidů v potravinách – ergometrinu, ergosinu, ergotaminu, ergocorninu, ergokryptinu a ergocristinu, včetně jejich odpovídajících epimerů. Metoda zahrnovala extrakci za alkalických podmínek a následné čištění za použití jednoduché a rychlé extrakce kapalina-kapalina. Poté proběhla analýza LC-MS/MS. Dle hodnocení metoda vykazovala dobrou linearitu, přesnost a správnost. Meze stanovitelnosti se pohybovaly od 0,1 do 1 µg/kg v závislosti na analytu a matrici. Tato metoda byla úspěšně aplikována na stanovení námelových alkaloidů v některých belgických potravinách. Námelové alkaloidy byly nalezeny ve 104 ze 122 zkoumaných vzorků. Nejčastěji se vyskytoval alkaloid ergosin. Celkový obsah alkaloidů u pozitivních vzorků se pohyboval od 1 do 1145 µg/kg. [20]

2.4.2 Látky s nutriční hodnotou

Kvalitní vína hrají důležitou roli na světovém trhu. To podnítilo výzkum k potvrzení jejich pravosti a ochraně spotřebitelů proti podvodům. Použita byla metoda HPLC-MS. Byl vyvinut postup za použití kyseliny trifluoroctové, která slouží jako kyselý modifikátor v mobilní fázi. Metoda může být použita jako rutinní s MS detekcí a umožňuje simultánní analýzu strukturálních rysů antokyaninů. V devatenácti různých vzorcích extraktů hroznů a vína bylo detekováno dvacet různých antokyaninů. Poprvé byly touto metodou zjištěny cis a trans izomery derivátů p-coumarylu. Dále byly zjištěny důležité kvalitativní i kvantitativní rozdíly mezi odrůdami. [21]

Člověk rozlišuje základní chutě – slané, sladké, kyselé a hořké. Výraz *kokumi* se používá, když chuť nelze specifikovat. Bylo provedeno stanovení *kokumi* peptidu, γ -glutamyl-valyl-glycinu v syrových mušlích a jejich zpracovaných produktů pomocí HPLC/MS. Stanovení γ -Glu-Val-Gly bylo dosaženo použitím metody monitorování více reakcí (MRM). Optimalizované podmínky umožnily přesné stanovení γ -Glu-Val-Gly. Syrové mušle obsahovaly 0,08 $\mu\text{g/g}$ γ -Glu-Val-Gly. Produkty, jako jsou sušené mušle nebo extrakt z mušlí, obsahovaly od 0,64 do 0,77 $\mu\text{g/g}$ γ -Glu-Val-Gly. Tato studie poprvé prokázala existenci γ -Glu-Val-Gly v potravinách. [22]

V poslední době je věnována velká pozornost metodám pro identifikaci biologicky aktivních látek v dietních doplňcích stravy. *Euterpeoleracea* (açaí) je látka bohatá na zdraví prospěšné složky. Autorky vyvinuly metodu LC/MS k identifikaci mastných kyselin, athokyaninů a dalších polyfenolů. Analyzovaly látky, které se používají pro přípravu dietních doplňků stravy. Pro LC/MS analýzu byly vzorky açaí postupně extrahovány. Nejdříve dichlormethanem, poté methanolem. Separace mastných kyselin, polyfenolů a antokyanů v açaí produktech byla provedena na koloně C18. Ionizace byla provedena elektrosprejem. LC/MS analýza extraktů stanovila obsah mastných kyselin, γ -linolenové kyseliny, linolové kyseliny, palmitové a olejové kyseliny. Výsledky této studie mohou být užitečné pro prověřování a hodnocení açaí dietních doplňků stravy. [23]

Foláty patří do skupiny vitaminů B a mají být konzumovány každý den. Zde autoři popsali přesnou metodu pro detekci a kvantifikaci syntetických (kyselina listová) a přirozeně se vyskytujících folátů v potravinách. Autoři vyvinuli systém, který je schopný analyzovat během 20 minut pomocí LC-MS/MS pět nejčastěji se vyskytujících folátů. Kvantifikace

folátů byla provedena pomocí stabilního izotopu ^{13}C . Tato poměrně rychlá LC-MS/MS metoda je vhodná pro kvantitativní analýzu různých forem folátů v potravinách i přes jejich rozmanitost a nestabilitu. [24]

Amarant je obilovina, která obsahuje nejvíce proteinů ze všech obilovin. Byla vyvinuta metoda pro stanovení volných aminokyselin v zrnech amarantu pomocí LC-MS/MS. Doposud známé, spolehlivé a reprodukovatelné metody pro identifikaci a kvantifikaci aminokyselin vyžadovaly derivatizaci. Avšak technika LC-MS/MS může pro toto stanovení derivatizaci obejít. Tato analýza odhalila vyšší koncentraci esenciálních aminokyselin, zejména threonin a tryptofan, než aminokyselin neesenciálních. Studie představovala první zprávu o použití metody LC-MS/MS pro analýzu volných aminokyselin v zrnech amarantu. [25]

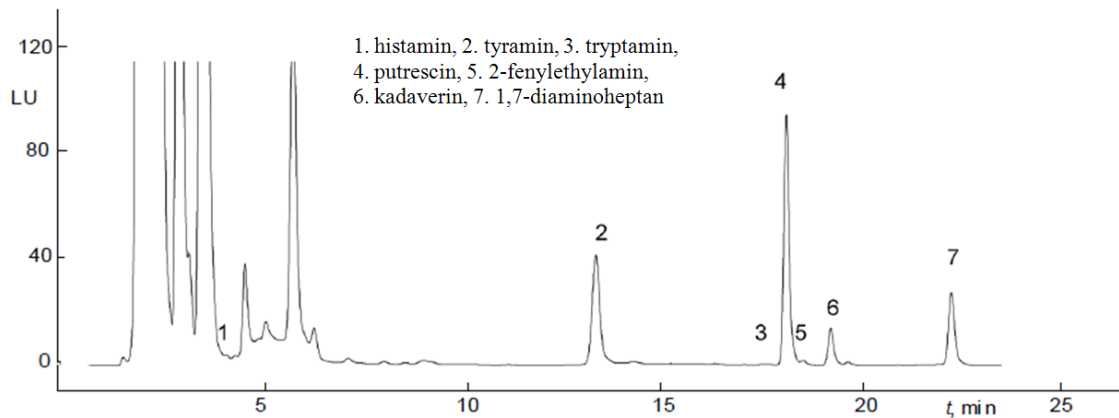
Zázvor je koření získávané z oddenků stejnojmenné rostliny. Zejména v asijských zemích má velké využití při přípravě omáček, nakládané zeleniny a tradičních kulinářských výrobků. Pro stanovení [λ -8(17),12-dien-15,16 dialu], jako antituberkulózní látky, byla vyvinuta metoda HPLC-MS na reverzní fázi při průtoku 1 ml/min. Mobilní fáze byla složena z kyseliny octové (0,5%) a acetonitrilu v poměru 25:75. Metoda vykazovala dobrou linearitu, vysokou správnost i přesnost. Je vhodná pro stanovení [λ -8(17),12-dien-15,16 dialu] v zázvoru. Metoda byla přezkoumána na vzorcích z různých geografických lokalit. [26]

S cílem získat nové vědomosti o vitamínu D, byla upravena a vylepšena metoda pro kvantifikaci vitamínu D_3 a 25-hydroxivitamínu D_3 v potravinách. Vitamin D_3 byl kvantifikován pomocí LC na reverzní fázi s UV-DAD detekcí, $25(\text{OH})\text{D}_3$ pomocí APCI MS/MS. Kvantifikace byla pomocí vnitřních standardů – vitamin D_2 a $25(\text{OH})\text{D}_2$. Pro ověření kvality byl použit certifikovaný referenční materiál (CRM-421 obsahující vitamin D_3) a kontrolní vzorek (mleté vepřové maso obsahující oba vitamíny). Limity detekce obou látek byly $0,04 \mu\text{g}/100 \text{ g}$. Správnost stanovení vitamínu D_3 v CRM-421 byla 99 %. Pomocí této metody byla získána data o vitamínu D_3 a 25-hydroxivitamínu D_3 v různých potravinách, jako jsou vepřové, hovězí, drůbeží a rybí maso a ve vejcích. [27]

Autoři Lída a Holčapek optimalizovali metodu HPLC s obrácenými fázemi a mobilní fází acetonitril-propan-2-ol pro analýzu přírodních směsí triacylglycerolů (TG) s použitím dvou chromatografických kolon Nova-Pak C18 v sérii při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Tato metoda poskytuje dobré rozlišení TG v rámci jedné skupiny. Byla použita pro analýzu deseti

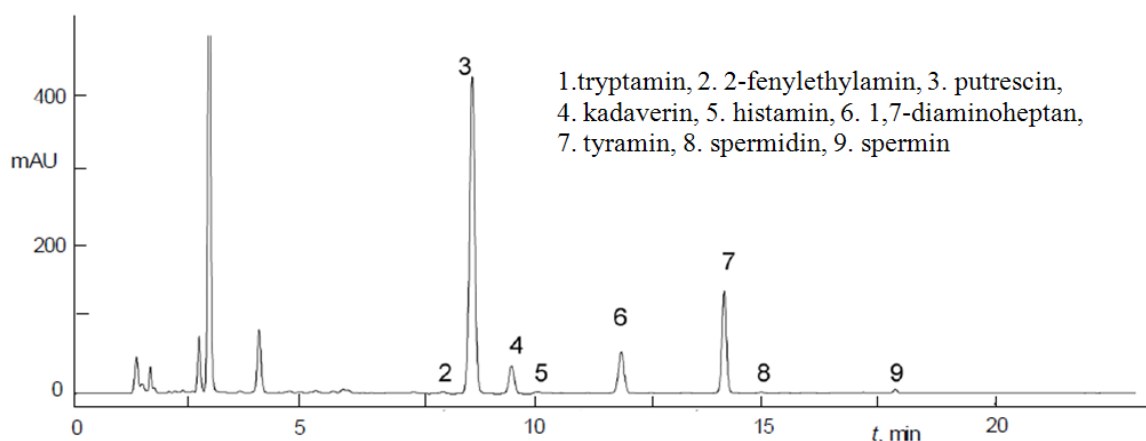
rostlinných olejů (olej z lískových ořechů, vlašských ořechů, kešu ořechů, mandlí, máku tmavého, pečiček žlutého melounu, šípků, fíků, datlí a černého rybízu). Celkem bylo v rostlinných olejích identifikováno 130 TG složených z 22 mastných kyselin obsahujících 8 až 24 uhlíků a 0 až 4 dvojně vazby. U identifikovaných TG byla na základě poměrů intenzit určena převládající kyselina v poloze *sn*-2. Přednostně jsou v této poloze zastoupeny nenasycené MK (převážně kyselina linolová). [28]

Byly porovnány dvě chromatografické metody stanovení biogenních aminů po jejich derivatizaci ftaldehydem a dansylchloridem. Obě metody byly použity pro kontrolu jejich obsahu v masných výrobcích. U obou metod byly získány uspokojivé výsledky z hlediska rozsahu linearity, detekčních limitů a opakovatelnosti. Sekundární aminy (spermin a spermidin) nereagují s ftaldehydem, proto je možné jejich stanovení pouze po derivatizaci dansylchloridem. V případě procesu zrání a skladování salámů zůstává obsah sekundárních aminů konstantní nebo se naopak snižuje, proto není nutné sledovat během procesu jejich obsah. Příprava vzorků pro chromatografické stanovení aminů po derivatizaci ftaldehydem je výrazně jednodušší a vyžaduje podstatně méně času. [29]



Obr. 2. HPLC chromatogram biogenních aminů extraktu salámu po derivatizaci.

Převzato z literatury [29]



Obr. 3. HPLC chromatogram dansylderivátů biogenních aminů extraktu salámu.

Převzato z literatury [29]

2.4.3 Antioxidanty

Autoři se pokusili identifikovat a kvantifikovat různé složky (zejména fenoly) z jablečných džusů a kvantitativně porovnat celkové antioxidační kapacity šťáv získaných z jablečných odrůd pěstovaných v Turecku. Experimentální studie byly provedeny na základě stanovení celkové antioxidační kapacity pomocí dvou spektrofotometrických metod – CUPRAC (využití měďnatého iontu ke snížení antioxidační kapacity) a ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)). Identifikace a kvantifikace hlavních antioxidačních složek byla pomocí HPLC. Celková antioxidační kapacita kvantifikovaných sloučenin byla v rozmezí od 40,0 % do 70,6 %. [30]

Granátová jablka se pěstují v subtropických a tropických oblastech po celém světě. Předmětem byla identifikace a kvantifikace látek v granátovém jablku. Fenolické sloučeniny byly extrahovány z jeho slupek a dužin. Extrakty byly analyzovány metodou HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. Bylo identifikováno celkem 48 sloučenin. Pět látek bylo v granátovém jablku identifikováno poprvé. Převládající fenolickou látkou ve všech vzorcích byl punicalagin. V sušině se vyskytoval v rozmezí od 11 do 20 g/kg, v džusu od 4 – 565 mg/l. Tuto metodu výrazně ovlivňuje výběr surovin a tlak, proto je nutné optimalizovat parametry pro získání přesných výsledků. [31]

Byl vyvinut jednoduchý a rychlý způsob stanovení volné α -lipoové kyseliny v matricích různých potravin (vejce, sušený vaječný prášek, majonéza, hrášek a brambory).

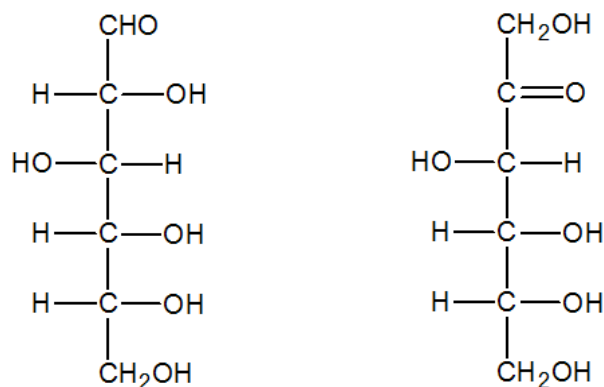
Je založený na ultrazvukové extrakci α -lipoové kyseliny s 0,5% kyselinou octovou v methanolu. Kvantitativní analýza extraktu byla provedena izokratickou RP-HPLC (směs acetonitril/methanol/50 mM pufr dihydrogenfosforečnanu draselného v poměru 350/65/585 se upraví kyselinou fosforečnou na pH = 3) při průtoku 0,45 ml/min. Detekce byla coulometrická při potenciálu mezi +300 a +700 mV. Kvalitativní analýza byla provedena pomocí LC-ESI-MS. Obsah volné α -lipoové kyseliny v potravinách byl v rozmezí 0,1 do 4,2 $\mu\text{g/g}$. Limity kvantifikace byly mezi 0,1 a 0,3 $\mu\text{g/g}$. Tato nově vyvinutá metoda může být použita pro určení obsahu volné α -lipoové kyseliny v různých potravinách. [32]

Byla provedena metoda HPLC/TOF-MS pro identifikaci a kvantifikaci jedenácti syntetických antioxidantů a konzervačních látek ve vzorcích jedlých rostlinných olejů. Všechny 11 vzorků vykazovalo v koncentračním rozmezí od 0,05 do 5,00 mg/kg lineární závislost s korelačním koeficientem $> 0,997$. Tato metoda je vhodná pro běžné kvalitativní a kvantitativní analýzy syntetických antioxidantů a konzervačních látek v jedlých rostlinných olejích. [33]

Deoxynivalenol (DON) je mykotoxin produkovaný plísněmi rodu *Fusarium*. Byla vyvinuta a zavedena metodika pro extrakci a stanovení deoxynivalenolu v obilovinách. K extrakci DON z rostlinného materiálu byla vybrána selektivní kolona Envicarb. K vlastnímu stanovení byl použit kapalinový chromatogram s hmotnostní detekcí. Limit detekce pro vzorky ječmene byl roven 25 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a limit kvantifikace 83 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Limit detekce pro vzorky sladu byl 30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a limit kvantifikace 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Doba analýzy byla 15 min, což tuto metodiku předurčuje jako vhodné řešení pro větší série analýz. Vyvinutá metoda je relativně rychlá, levná a má dostatečnou citlivost. Aplikací tohoto postupu byly získány hodnoty obsahu DON ve vzorcích ječmene a z něj vyprodukovaného sladu. Naměřené hodnoty DON ve všech analyzovaných vzorcích byl pod maximálním povoleným limitem daným legislativou. [34]

2.5 Monosacharidy

Monosacharidy jsou jednoduché cukry, jejichž molekula je složena ze tří až sedmi atomů uhlíku, obsahuje hydroxylovou skupinu a jednu skupinu aldehydovou nebo ketonovou. Podle toho se rozdělují na aldosity (glukosa) a ketosity (fruktosa). [2]



Obr. 4. Strukturální vzorce glukosy a fruktosy

Monosacharidy jsou běžnou složkou téměř všech potravin, ale jejich obsah je proměnlivý. V relativně velkém množství jsou zastoupeny v ovoci, kde se jejich obsah zvyšuje během zrání. Obsah glukosy v ovoci se pohybuje v rozmezí 0,5-32 %, fruktosy 0,4-24 %. Dále se tyto monosacharidy vyskytují v medu. Zde je průměrný obsah glukosy 31,3 % a fruktosy 38,2 %. Glukosa a fruktosa jsou hlavními monosacharidy zelenin, luštěnin, jsou stavebními jednotkami mnoha oligosacharidů, polysacharidů a heteroglykosidů. [1]

2.6 Karamel

Karamel je látka hnědé barvy, která se běžně používá jako potravinářské barvivo, prodávané pod názvem E150.

Vytváří se při zahřívání různých druhů cukrů. Je prokázáno, že karamel, který vznikl zahříváním standardu glukosy, je transformován do několika tisíců reakčních produktů. Tyto produkty obsahují oligomery až se šesti sacharidovými jednotkami propojenými glykosidickou vazbou. Dále obsahují dehydratační produkty oligomerů až do ztráty osmi molekul vody a hydratační produkty. [35]

Používá se k barvení nápojů, čokolád, sirupů, bonbónů, piva, červeného vína, rumu a celozrnného pečiva. Například u pečiva může jít o snahu výrobce vylepšit barvu a případně navodit dojem, že se jedná o celozrnné pečivo. V této souvislosti byly dále testovány možnosti hmotnostní spektrometrie a jejího spojení s kapalinovou chromatografií při prokazování přítomnosti karamelu. [35, 36]

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Přístroje, pomůcky a chemikálie

Ionizace monosacharidů byla provedena na hmotnostním spektrometru LCQ Deca (Thermo Finnigan, San Jose, USA) s ionizací elektrosprejem (ESI) a s integrovanou lineární pumpou. Pro studii fragmentace fruktosy byla použita metoda ESI-MS/MS. Měření bylo provedeno na hmotnostním spektrometru Q-TOF Premier (Waters, Milford, USA). Analýza karamelu byla provedena na ultra-účinném kapalinovém chromatografu Acquity (Waters, Milford, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Q-TOF Premier. Byla použita chromatografická kolona Luna 3 μm HILIC 150 \times 2 mm (Phenomenex, Torrance, USA).

Pro experiment byly použity standardy glukosy a fruktosy (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika) a kyselina boritá p.a. (Fluka, Buchs, Švýcarsko). Úprava pH byla provedena hydroxidem sodným p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika). Dále byl použit methanol HPLC, acetonitril HPLC (oba Lab-Scan, Gliwice, Polsko) a deionizovaná voda, vyráběna stanicí pro přípravu ultračisté vody (Direct-Q UV Millipore, Billerica, USA). Pro analýzu karamelu byl použit cukr krystal Korunní (Hrušovany nad Jevišovkou, Česká republika).



Obr. 5. Hmotnostní spektrometr LCQ Deca



Obr. 6. Kapalinový chromatogram ve spojení s hmotnostním spektrometrem

3.2 Pracovní postup

Byl připraven 1mmol/l roztok kyseliny borité navážením 15,45 mg do 250ml odměrné baňky. Pomocí 0,2 mol/l hydroxidu sodného, připraveného navážením 0,4 g do 100 ml, bylo upraveno jeho pH na 9,25.

18 mg glukosy a 18 mg fruktosy bylo rozpuštěno v připravené 1mmol/l kyselině borité. Výsledná koncentrace standardů byla tedy 10 mmol/l.

Všechna měření byla prováděna v negativním módu při průtoku 5 μ l/min. Nejdříve byly změřeny slepé vzorky roztoku kyseliny borité, poté zfiltrovaný vzorek daného monosacharidu. Filtrace byla provedena, aby nedošlo k zanesení vstupní kapiláry. Byly testovány různé podmínky pro dosažení vyšší intenzity, a to změnami průtoku zmlžujícího plynu, sprejovacího napětí a teploty vstupní kapiláry.

Pro studii fragmentace bylo rozpuštěno 10 mg fruktosy ve 100 ml roztoku metanol:voda (1:1). Výsledná koncentrace roztoku byla 100 mg/l. Při měření byla provedena optimalizace kolizní energie v rozmezí 4-20 eV.

Karamel byl připraven v sušičce z 1 g cukru při teplotě 180 °C po dobu dvou hodin. Zkaramelizovaný vzorek byl uchováván při pokojové teplotě.

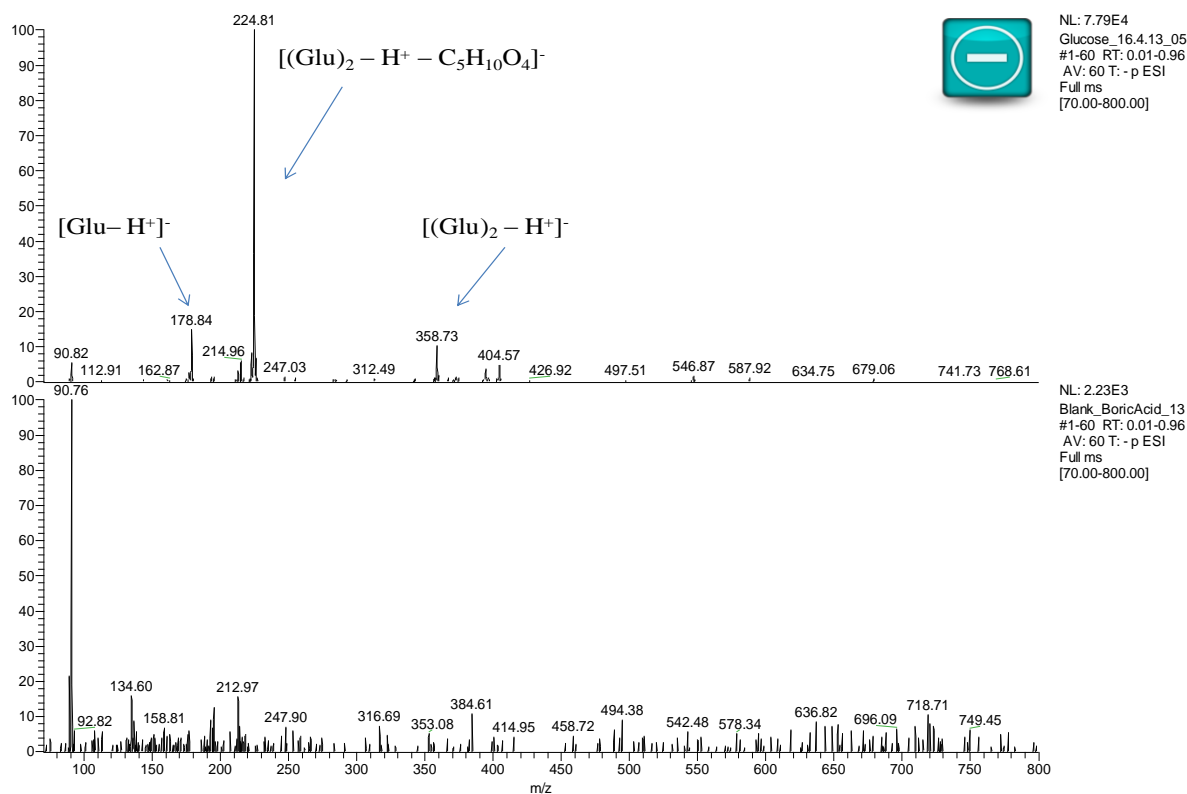
K analýze karamelu byl připraven roztok karamelu v metanolu o koncentraci 1 mg/ml, roztok karamelu v methanol:voda (1:1) o koncentraci 1 mg·ml⁻¹ a 10mmol/l roztok karamelu v roztoku kyseliny borité. V tomto experimentu byla pozorována ionizace s přímým zaváděním roztoku karamelu v methanolu, v roztoku metanol:voda (1:1) s ionizací karamelu za přítomnosti kyseliny borité. ESI byl provozován v záporném módu ionizace a průtok byl 5 µl/min.

3.3 Výsledky a diskuze

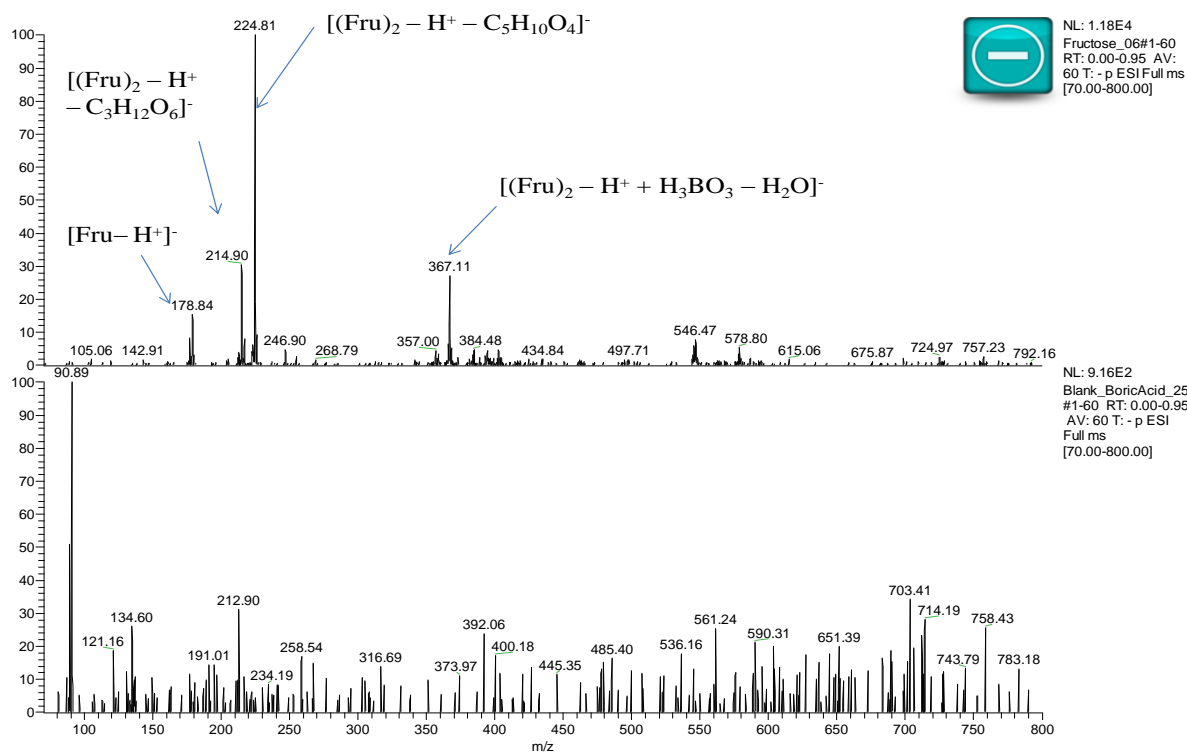
Cílem bylo testovat metodu pro ionizaci glukosy a fruktosy a dosáhnout co nejvyšší intenzity. Zvolené přístrojové parametry jsou shrnuty v tabulce I.

Tab. I: Zvolené parametry pro ionizaci monosacharidů

	glukosa	fruktosa	fruktosa
průtok zmlžujícího plynu (arb)	70	70	85
sprejovací napětí (kV)	5	5	5
teplota vstupní kapiláry (°C)	200	200	200
napětí vstupní kapiláry (V)	-15	-15	-15

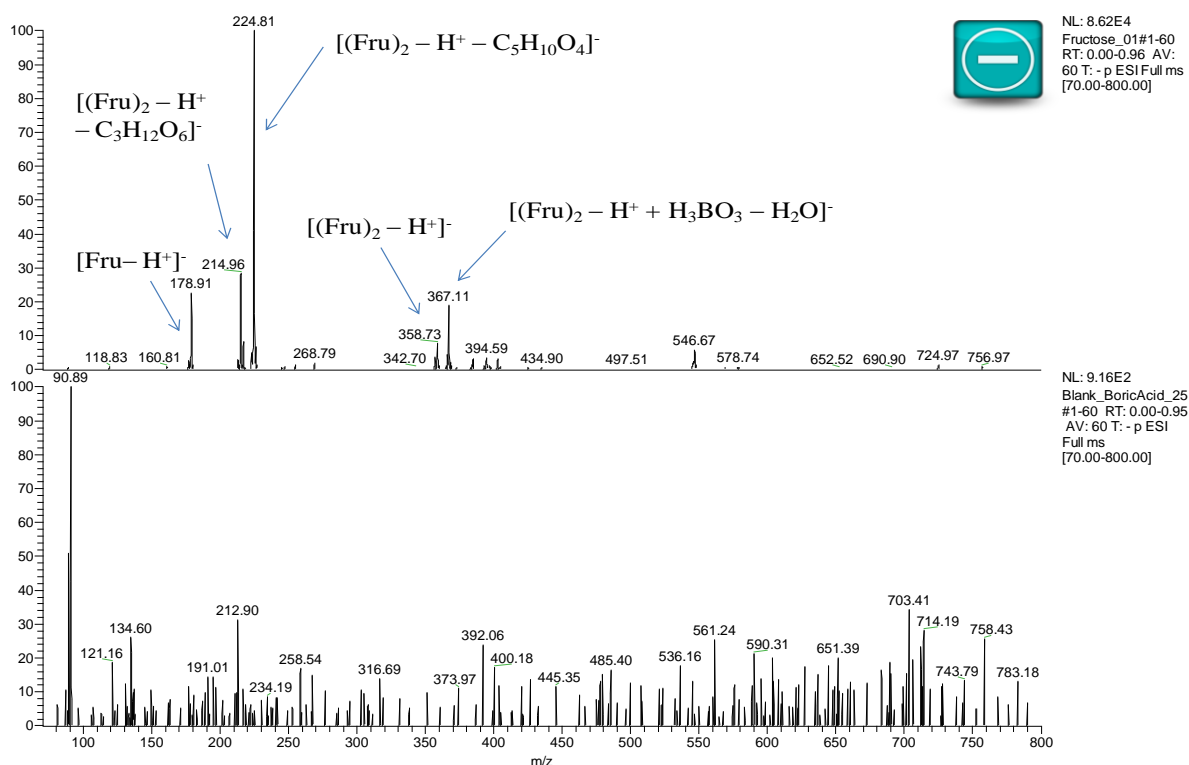


Obr. 7: Hmotnostní spektrum glukosy 10 mmol/l v prostředí H_3BO_3 /slepý pokus



Obr. 8: Hmotnostní spektrum glukosy 10 mmol/l v prostředí H_3BO_3 /slepý pokus.

Průtok zmlžujícího plynu 70 arb



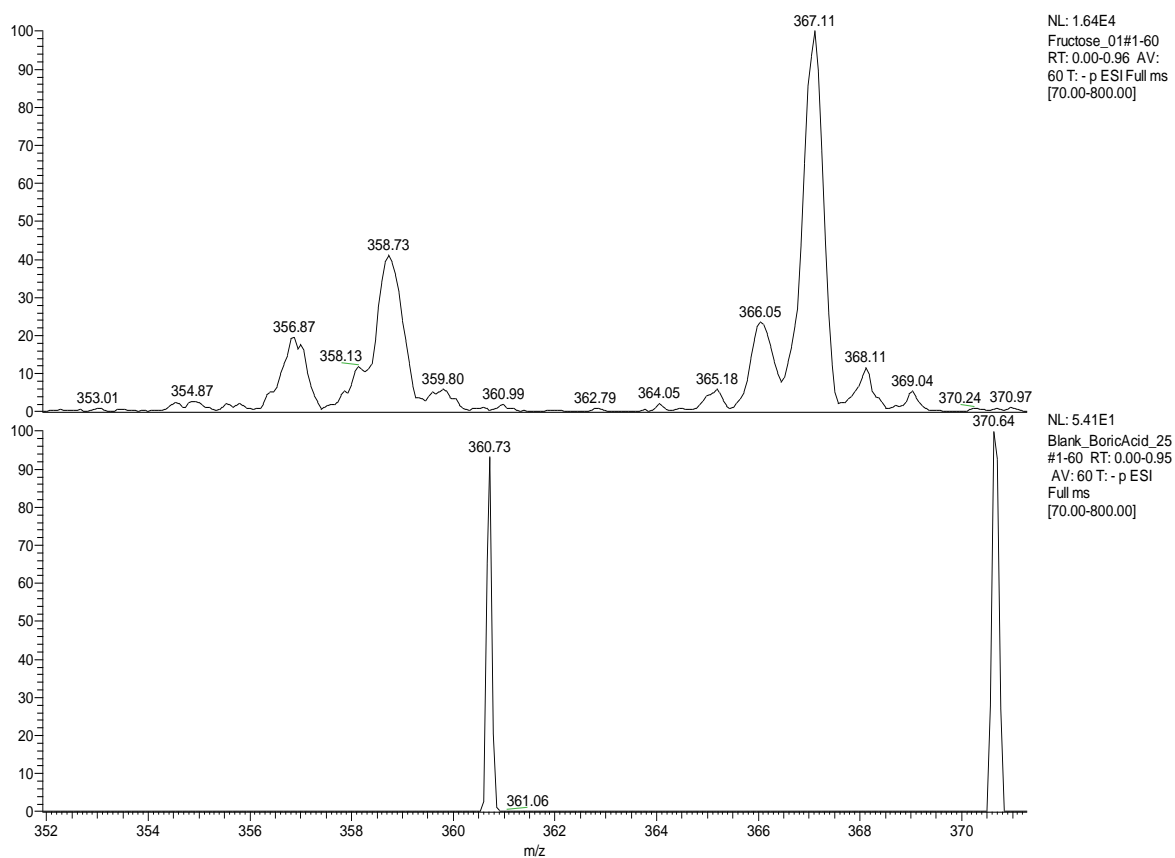
Obr. 9: Hmotnostní spektrum glukosy 10 mmol/l v prostředí H_3BO_3 /slepý pokus.

Průtok zmlžujícího plynu 85 arb

Jako příklad zde byla uvedena spektra, kde byla absolutní intenzita základního iontu nejvyšší (obr. 7, obr. 9). Obě obsahují základní ion 224,8. Spektrum glukosy má intenzivnější píky při m/z 178,8 a 358,7, zatímco spektrum fruktosy píky při 178,9, 214,9 a pík 367,1, který jako jediný odpovídá reakci s kyselinou boritou. To je potvrzeno přítomností izotopického píku ve spektru (intenzita 20 %) $\Delta m/z = 1$ (obr. 10). Pro porovnání byla uvedena také spektra glukosy a fruktosy, která jsou naměřena za stejných podmínek (obr. 7, obr. 8). Absolutní intenzita základního iontu ve spektru fruktosy zde byla nižší. Předpokládané složení zmíněných iontů je patrné z jejich popisu v obrázcích. Ztráty $C_5H_{10}O_4$ a $C_3H_{12}O_6$ mohou nastávat postupně opakovanou eliminací CH_2O a H_2O , ale i odštěpením větší části molekuly.

Dále zde bylo uvedeno spektrum fruktosy (obr. 11) naměřené při podmínkách uvedených v tabulce II. Zajímavostí je, že za těchto podmínek se zvýšila relativní intenzita píku 367,1. Tato skutečnost naznačuje možný vliv přístrojových parametrů na relativní zastoupení iontů, které by mohlo být charakteristické pro určitý cukr, ale s podmínkou měření při definovaných parametrech přístroje.

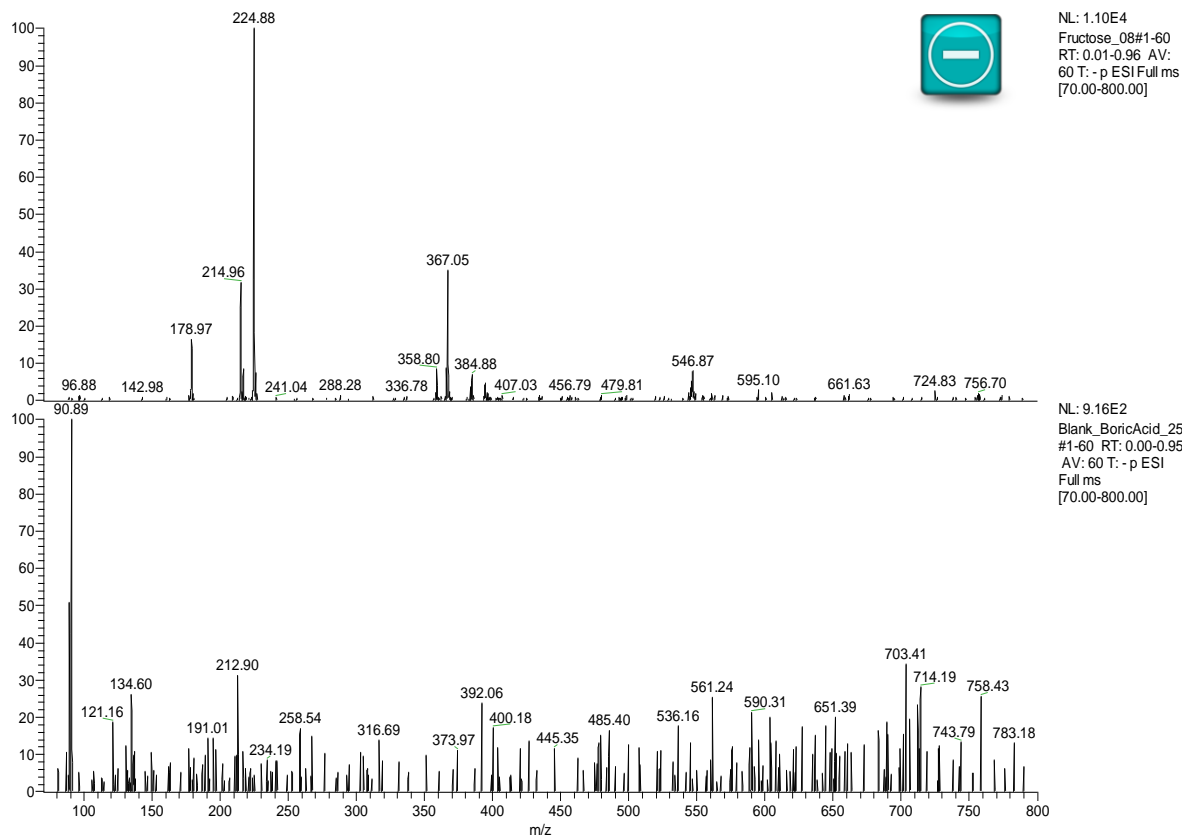
Při testování bylo zjištěno, že při snižování sprejovacího napětí a teploty vstupní kapiláry se absolutní intenzita signálu snižovala.



Obr. 10. Detail spektra z obr. 9 v okolí iontu m/z 367/slepý pokus

Tab. II: Parametry pro ionizaci fruktosy

	fruktosa
průtok zmlžujícího plynu (arb)	80
sprejovací napětí (kV)	3,5
teplota vstupní kapiláry (°C)	200
napětí vstupní kapiláry (V)	-15



Obr. 11. Hmotnostní spektrum fruktosy 10 mmol/l v prostředí H_3BO_3 /slepý pokus.

Podmínky viz tabulka II

Fragmentace fruktosy byla studována na přístroji Q-TOF Premier. Byly testovány různé podmínky měření – různé kolizní energie. Zvolené parametry jsou shrnuty v tabulce III.

Tab. III: Parametry pro fragmentaci fruktosy

sprejovací napětí (kV)	3
napětí na vstupním konusu (V)	14
extrakční napětí (V)	5
kolizní energie (eV)	8
teplota zdroje (°C)	80
teplota desolvatačního plynu (°C)	250
průtok plynu vstupním konusem (l/hod)	33
průtok desolvatačního plynu (l/hod)	250

Při studiu fragmentace fruktosy bylo zjištěno, že dochází ke ztrátám vody a skupiny CH_2O . Byly vyzorovány ztráty dvou molekul vody a jedné molekuly CH_2O , vedoucí k píku 113 a ztrátu molekuly vody a tří molekul CH_2O , což odpovídá píku 71. Uvedené neutrální ztráty jsou v souladu s literárními daty. [37]

Po zkušenostech získaných s analýzou cukrů bylo přikročeno k analýze karamelu na přístroji Q-TOF s ionizací elektrosprejem. Analyzován byl vzorek karamelu v metanolu o koncentraci 1 mg/ml a v prostředí kyseliny borité o koncentraci 10 mmol/l. Po testování různého nastavení byly pro další analýzy zvoleny parametry uvedené v tabulce IV. Kritériem bylo dosažení nejvyšší absolutní intenzity základního iontu.

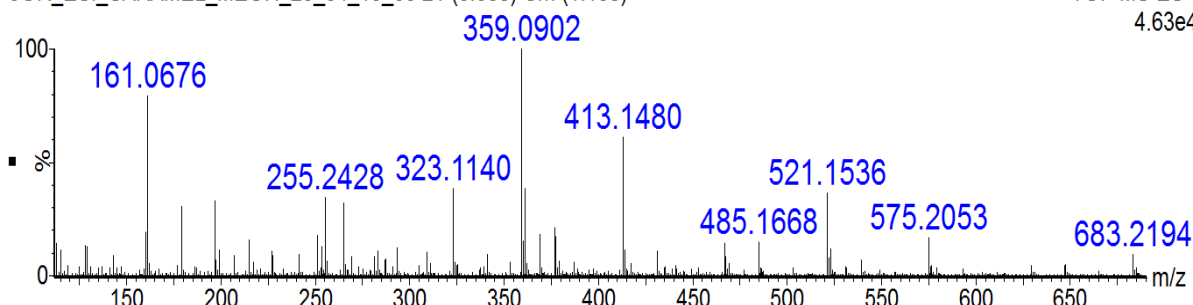
Tab. IV: Přístrojové parametry ESI-Q-TOF pro analýzu karamelu

vzorek	v methanolu	za přítomnosti kys. borité
sprejovací napětí (kV)	3	1,67
napětí na vstupním konusu (V)	14	30
extrakční napětí (V)	6	6
teplota zdroje (°C)	120	120
teplota desolvatačního plynu (°C)	250	250

caramel in MEOH 100%

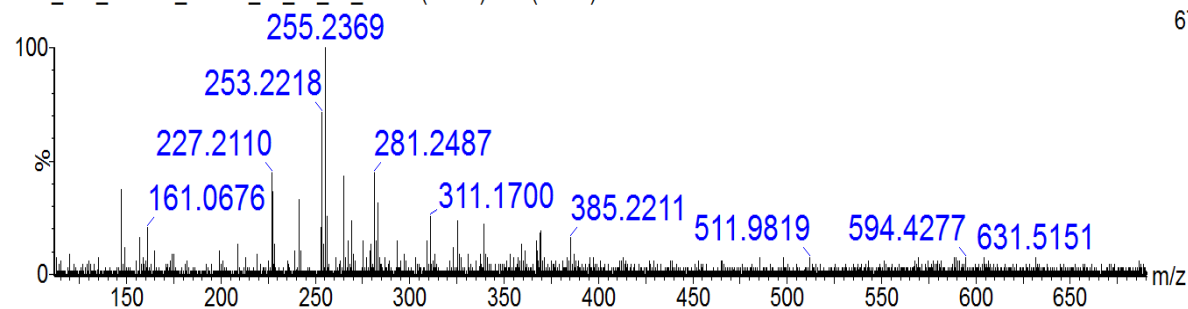
JOR_ESI_CAMEL_MEOH_23_04_13_06 21 (0.388) Cm (1:108)

TOF MS ES-
4.63e4

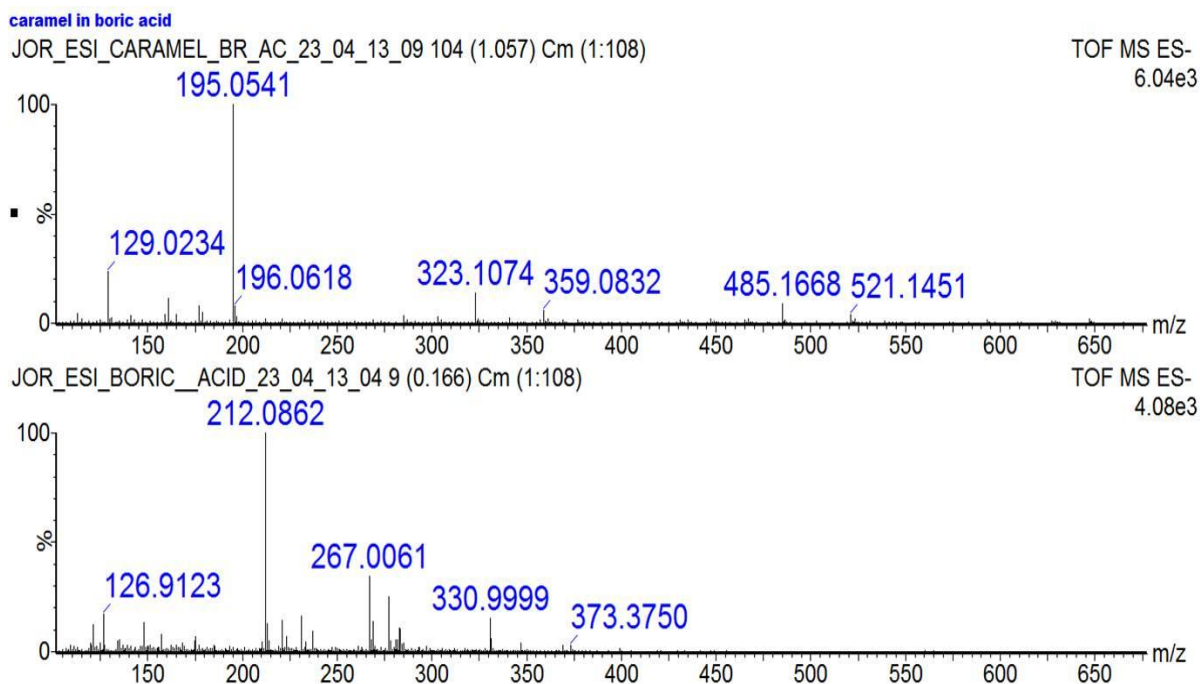


JOR_ESI_BLANK_MEOH_23_04_13_03 84 (1.554) Cm (1:108)

TOF MS ES-
67



Obr. 12. Hmotnostní spektrum karamelu v methanolu/slepý pokus



Obr. 13. Hmotnostní spektrum karamelu v prostředí H_3BO_3 /slepý pokus

Po srovnání spekter bylo určeno jako vhodnější použití methanolu. Ve spektru při jeho použití byl přiřazen sumární vzorec sedmi iontům, za přítomnosti kyseliny borité nebyl identifikován žádný ion. Absolutní intenzita signálu iontů složek karamelu v methanolu byla také vyšší. Použití kyseliny borité při těchto analýzách nepřineslo oproti použití methanolu žádné další informace, a proto další experimenty s karamelu byly prováděny bez přídavku kyseliny borité. Diskutované ionty by mohly být využity jako markery přítomnosti karamelu. Vzhledem k možné složitosti reálných vzorků byl karamel dále analyzován i s využitím chromatografické separace.

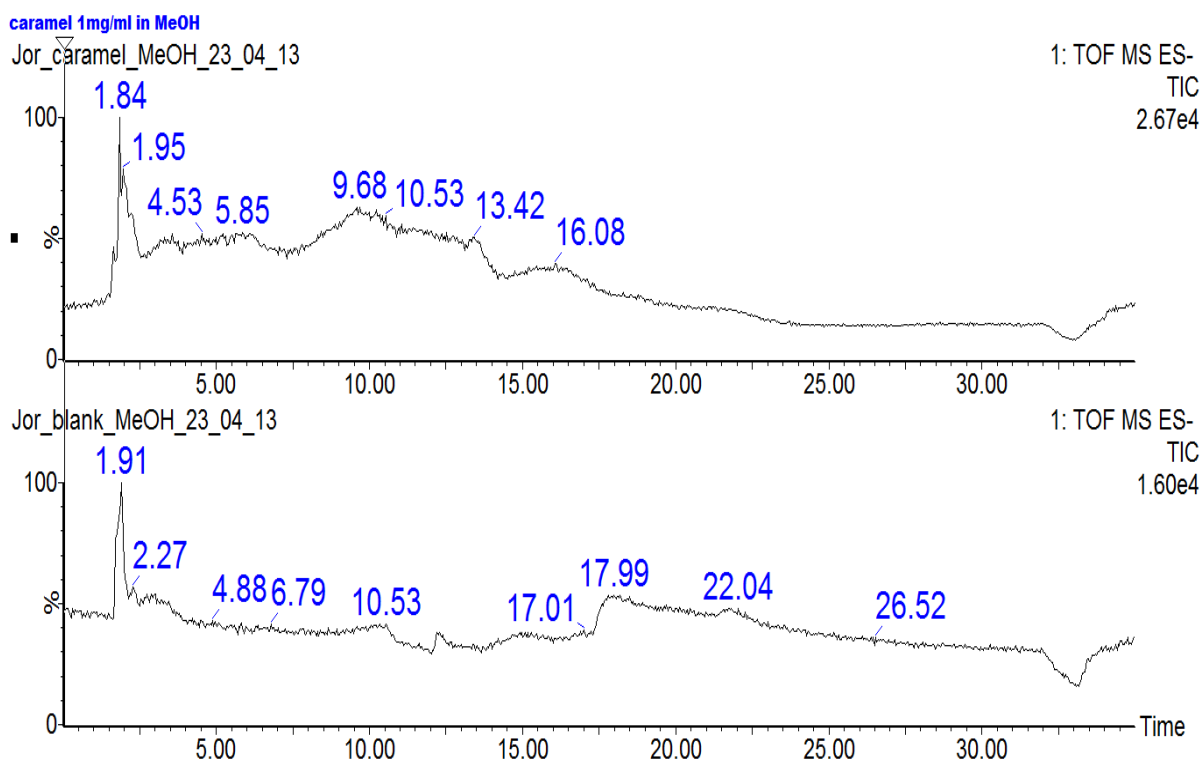
Tab. V: Hmotnostně spektrometrická data pro karamel při použití metanolu. Navržené sumární vzorce vycházejí ze srovnání naměřených dat a dat publikovaných v literatuře [35]

pík	název	sumární vzorec	m/z [M - H] ⁺			chyba (ppm)
			změřená hodnota	korigovaná hodnota na glukosu	teoretická hodnota	
1		C ₄ H ₈ O ₄	119,0409	119,0340	119,0344	3,5
2	Glukosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	179,0660	179,0556	179,0556	0,0
3		C ₁₅ H ₂₂ O ₄	265,1616	265,1462	265,1440	8,3
4		C ₁₈ H ₃₆ O ₂	283,2789	283,2625	283,2637	4,4
5		(Glu) ₂ - 3H ₂ O	C ₁₂ H ₁₆ O ₈	287,0920	287,0753	287,0767
6	(Glu) ₂ - H ₂ O	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₀	323,1140	323,0952	323,0978	7,9
7	(Glu) ₃ - 3H ₂ O	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₃	449,1509	449,1248	449,1295	10,4

V metodě UPLC/MS bylo pracováno v systému HILIC a s časově proměnným složením mobilní fáze (s gradientovou elucí). Mobilní fázi tvořil A: acetonitril, B: voda. Složení mobilní fáze se měnilo podle tabulky VI.

Tab. VI: Složení mobilní fáze

t (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
5	95	5
20	70	30
30	70	30
35	95	5



Obr. 14. Chromatogramy pro celkový iontový proud získané pomocí UPLC/MS – karamel/slepý pokus

Tab. VII: Hmotnostně spektrometrická data pro karamel při použití metanol:voda (1:1). Navržené sumární vzorce vycházejí ze srovnání naměřených dat a dat publikovaných v literatuře [35]

pík	název	sumární vzorec	m/z [M - H] ⁻			chyba (ppm)
			změřená hodnota	korigovaná hodnota na glukosu	teoretická hodnota	
1	Glukosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	179,0586	179,0556	179,0556	0
2	(Glu) ₂ - H ₂ O	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₀	323,1036	323,0982	323,0978	1,2
3	(Glu) ₂	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341,1139	341,1082	341,1084	0,6
4	(Glu) ₃ - H ₂ O	C ₁₈ H ₃₀ O ₁₅	485,1548	485,1467	485,1506	8,1
5	(Glu) ₃	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	503,1714	503,1630	503,1612	3,5
6	(Glu) ₄ - H ₂ O	C ₂₄ H ₄₀ O ₂₀	647,2131	647,2023	647,2035	1,9
7	(Glu) ₄	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	665,2263	665,2152	665,2140	1,7
8	(Glu) ₅ - 4H ₂ O	C ₃₀ H ₄₄ O ₂₂	755,2427	755,2300	755,2246	7,2
9	(Glu) ₅	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	827,2803	827,2664	857,2669	0,6
10	(Glu) ₆ - H ₂ O	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	971,3243	971,3080	971,3091	1,1

Je zřejmé, že celkový iontový proud (obr. 14) sice naznačuje rozdíly mezi vzorky, ale neposkytuje žádnou přímo využitelnou informaci. Proto byla zkoumána detailněji. Vyhodnocování spekter probíhalo minutu po minutě a byly v nich hledány píky, které odpovídají iontům uvedených v literatuře [35]. Bylo detekováno 10 píků, tedy více než při použití přímého zavádění vzorku do iontového zdroje, a navíc s nižší chybou. Tato metoda je vhodná pro identifikaci karamelu. Je zřejmé, že metoda založená na UPLC/MS, kdy je využito chromatografie hydrofilních interakcí, dovoluje sledovat řadu markerů karamelu.

4. ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byly shrnuty analytické metody využívané při analýze potravin a byla vypracovaná rešerše týkající se metody HPLC/MS pro tuto problematiku.

Experimenty potvrdily možnost uplatnění ionizace elektrosprejem v záporném módu pro analýzu cukrů hmotnostní spektrometrií. Doplnění postupu o reakci sledovaných cukrů s kyselinou boritou poskytuje možnosti pro odlišení různých monosacharidů. U glukosy nebyly produkty reakce pozorovány, zatímco u fruktosy ano a cukry, které mají stejnou molekulovou hmotnost tak lze odlišit. Experimenty ale také ukázaly, že při změně přístrojových parametrů se mění relativní zastoupení iontů. Má-li být toto zastoupení využito k odlišení některých cukrů, je nutné měření různých vzorků provádět za stanovených podmínek.

Sledování fragmentace fruktosy ověřilo soulad těchto procesů s literaturou, kdy byly pozorovány typické ztráty molekul H_2O a CH_2O .

Při analýze karamelu se jako nejlepší metoda jevila metoda UPLC/MS. Pomocí této metody bylo detekováno nejvíce píků s nejmenšími chybami v ppm. Výhodnější bylo u obou metod použití metanolu před prostředím kyseliny borité, které v případě analýzy karamelu nepřineslo žádnou výhodu. Je zřejmé, že metodou UPLC/MS lze ve vzorcích hledat markery přítomnosti karamelu. Testovaný postup by mohl být základem metody odhalující například přibarvování pečiva karamellem, které může být využíváno k navození dojmu celozrnného pečiva. Pro ověření metody by bylo vhodné připravit pečivo s definovanou příměsí karamelu a zhodnotit meze jeho detekce.

5. SUMMARY

In the theoretical part of the thesis there were summarized analytical methods used in food analysis. There were also literature work dealing with HPLC/MS.

Experiments confirmed the possibility of applying electrospray ionization in negative mode for analysis of sugars by mass spectrometry. Reaction with boric acid provides the possibility to distinguish different monosaccharides. The glucose reaction products weren't observed whereas fructose were. Sugars that have the same molecular weight can be distinguished. Experiments also showed that changing of the instrument parameters change relative representation of ions. If this representation be used to distinguish some sugars, it is necessary to carry out measurements of different samples under specified conditions.

Monitoring fragmentation of fructose checked compliance of these processes with the literature. There were observed typical losses of molecules H_2O and CH_2O .

The best method for analysis of caramel were UPLC/MS. Using this method, there were detected the most of the peaks with the smallest errors in ppm. For both methods were better to use methanol. It is clear that using UPLC/MS method can be found markers of caramel in the sample. The test procedure could be the basis of method for revealing coloring of bread by caramel. For verification of this method should be prepared bread with a defined addition of caramel and evaluate the limits of detection.

6. LITERATURA

- [1] Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin I*. OSSIS. Tábor (2009).
- [2] Odstrčil J., Odtrčilová M.: *Chemie potravin*. NCO NZO. Brno (2006).
- [3] <http://eso.vscht.cz/cachedata/1293/www.vscht.cz/anl/pan2/i/Synopse132009.pdf> (citováno 20.5.2012).
- [4] <http://www.szpi.gov.cz> (citováno 13.5.2012).
- [5] <http://www.svscr.cz> (citováno 13.5.2012).
- [6] Opekar F., a kol.: *Základní analytická chemie*. Karolinum. Praha (2003).
- [7] <http://web.vscht.cz/koplikr/%C4%8C%C3%A1st%20A3.pdf> (citováno 29.6.2012).
- [8] Kolektiv autorů: *Instrumentální analýza*. SNTL. Praha (1986).
- [9] Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda. Ostrava (2003).
- [10] Poušek L., a kol.: *Přehled biochemie člověka*. Praha (2008).
- [11] http://cheminfo.chemi.munu.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf (citováno 30.6.2012).
- [12] http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/HPLC/HPLC_podzim2009.pdf (citováno 30.6.2012).
- [13] Nielsen S.: *Food Analysis*. Springer. (2010).
- [14] Dolník V.: *Úvod do kapilární elektroforézy*. Brno (1994).
- [15] Štulík K., a kol.: *Analytické separační metody*. Karolinum. Praha (2005).
- [16] Holčápek M.: *Spojení vysokoučinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie*. Pardubice (2001).
- [17] Kim Ch., Hwang E., Lee H.: *Food Chemistry*, 101, 401-409 (2007).
- [18] Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4998-5006 (2002).
- [19] Reinsch M., Töpfer A., Lehmann A.: *Food Chemistry*, 100, 312-317 (2007).

- [20] Mavungu J., Malysheva S., Sanders M., Larionova D.: *Food Chemistry*, xxx, xxx-xxx (2012).
- [21] García-Beneytez E., Cabello F., Revilla E.: *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5622-5629 (2003).
- [22] Kuroda M., Kato Y., Yamazaki J.: *Food Chemistry*, 134, 1640-1644 (2012).
- [23] Mulabagal V., Calderón A.: *Food Chemistry*, 134, 1156-1164 (2012).
- [24] Vishnumohan S., Arcot J., Pickford R.: *Food Chemistry*, 125, 736-742 (2011).
- [25] Nimalkar M., Pai S., Pawar N.: *Food Chemistry*, 134, 2565-2569 (2012).
- [26] Singh S., Singh R., Banerjee S.: *Food Chemistry*, 131, 375-379 (2012).
- [27] Bilodeau L., Dufresne G., Deeks J., Clément G.: *J. Food Compos. Analysis*, 24, 441-448 (2011).
- [28] Lísa M., Holčapek M.: *Chem. Listy*, 99, 195-199 (2005).
- [29] Smělá D., Pechová P., Komprda T.: *Chem. Listy*, 98, 432-437 (2005).
- [30] Karaman S., Tütem E., Apak R.: *Food Chemistry*, 120, 1201-1209 (2010).
- [31] Fischer U., Carle R., Kammerer D.: *Food Chemistry*, 127, 807-821 (2011).
- [32] Durrani A., Schwartz H., Nagl M.: *Food Chemistry*, 120, 1143-1148 (2010).
- [33] Xiu-Qin L., Chao J., Yan-Yan S., Min-Li Y.: *Food Chemistry*, 113, 692-700 (2009).
- [34] Ježková A., Žďárová Karasová J., Dohnal V.: *Chem. Listy*, 103, 679-683 (2009).
- [35] Golon A., Kuhnert N.: *J. Agric. Food Chem.*, 60, 3266-3274 (2012).
- [36] <http://www.emulgatory.cz> (citováno 10.4.2013).
- [37] Taylor V., March R., Longerich H., Stadey Ch.: *International Journal of MS*, 243, 71-84 (2005).

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonát
ACPI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
AES	Atomová emisní spektrometrie
API	Ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
CI	Chemická ionizace
CUPRAC	Měďnatý ion redukující antioxidační kapacitu
DON	Deoxynivalenol
EI	Elektronová ionizace
ESI	Ionizace elektrosprejem
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IR	Infračervená spektrometrie
LC	Kapalinová chromatografie
LC-FD	Kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí
MRM	Monitorování více reakcí
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OTA	Ochratoxin A
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích
SVS ČR	Státní veterinární správa České republiky
SPE	Extrakce na tuhé fázi

SZPI	Státní zemědělská potravinářská inspekce
TOF	Průletový analyzátor
TG	Triacylglycerol
UV-DAD	Ultrafialová spektrometrie s detekcí diodového pole
UV-VIS	Ultrafialová a viditelná spektrometrie
γ -Glu-Val-Gly	γ -Glutamyl-valyl-glycin
25(OH)D ₃	25-hydroxivitamin D ₃

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: ESI + hmotnostní spektrum akrylamidu

Obr. 2: HPLC chromatogram biogenních aminů extraktu salámu po derivatizaci

Obr. 3: HPLC chromatogram dansylderivátů biogenních aminů extraktu salámu

Obr. 4: Strukturální vzorce glukosy a fruktosy

Obr. 5: Hmotnostní spektrometr LCQ Deca

Obr. 6: Kapalinový chromatogram ve spojení s hmotnostním spektrometrem

Obr. 7: Hmotnostní spektrum glukosy 10 mmol/l v prostředí H_3BO_3 /slepý pokus

Obr. 8: Hmotnostní spektrum fruktosy 10 mmol/l v prostředí H_3BO_3 /slepý pokus. Průtok zmlžujícího plynu 70 arb

Obr. 9: Hmotnostní spektrum fruktosy 10 mmol/l v prostředí H_3BO_3 /slepý pokus. Průtok zmlžujícího plynu 85 arb

Obr. 10: Detail spektra z obr. 9 v okolí iontu m/z 367/slepý pokus

Obr. 11: Hmotnostní spektrum fruktosy 10 mmol/l v prostředí H_3BO_3 /slepý pokus.

Podmínky viz tabulka II

Obr. 12: Hmotnostní spektrum karamelu v metanolu/slepý pokus

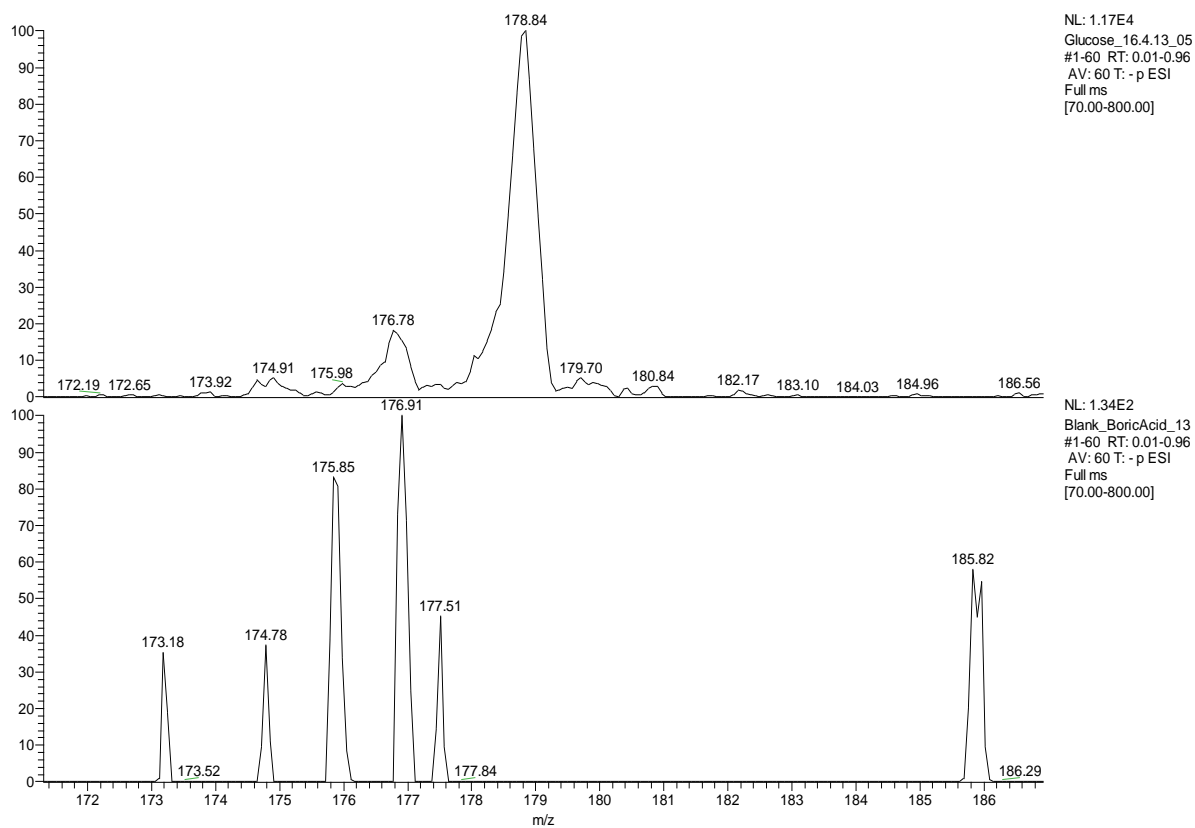
Obr. 13: Hmotnostní spektrum karamelu v prostředí H_3BO_3 /slepý pokus

Obr. 14: Chromatogramy pro celkový iontový proud získané pomocí UPLC/MS – karamel/slepý pokus

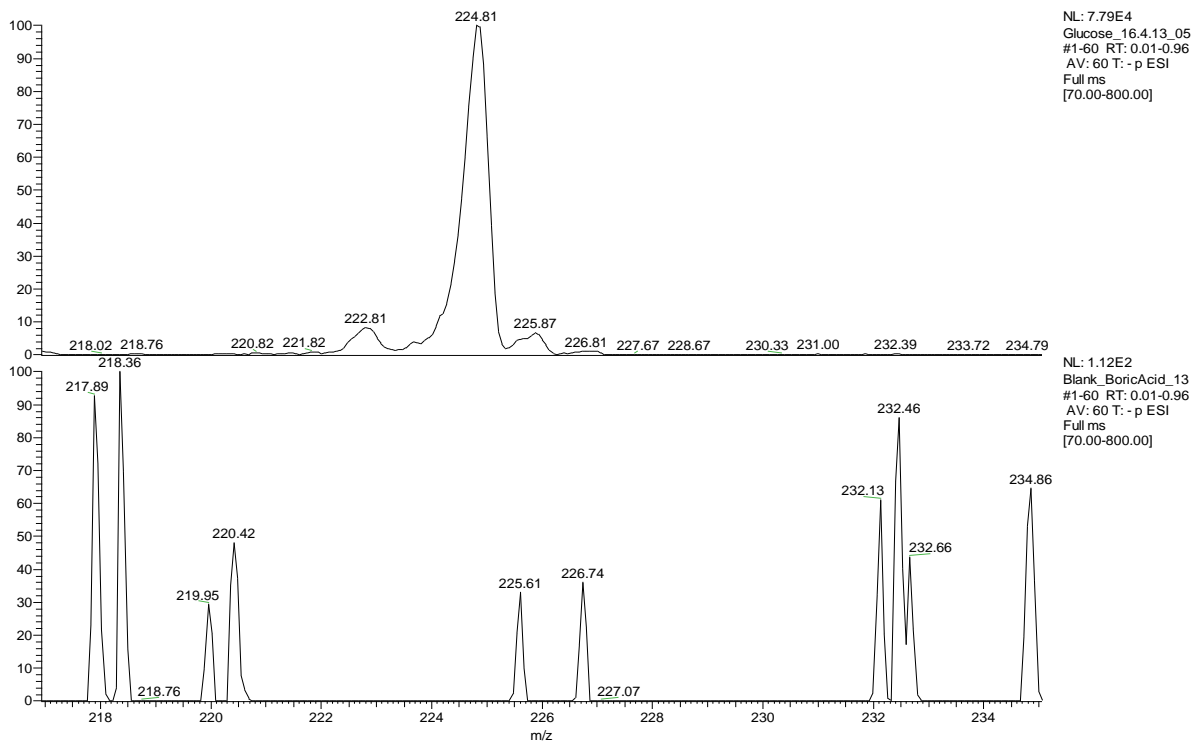
9. SEZNAM TABULEK

- Tab. I: Zvolené parametry pro ionizaci monosacharidů
- Tab. II: Parametry pro ionizaci fruktosy
- Tab. III: Parametry pro fragmentaci fruktosy
- Tab. IV: Přístrojové parametry ESI-Q-TOF pro analýzu karamelu
- Tab. V: Hmotnostně spektrometrická data pro karamel při použití metanolu. Navržené sumární vzorce vycházejí ze srovnání naměřených dat a dat publikovaných v literatuře
- Tab. VI: Složení mobilní fáze
- Tab. VII: Hmotnostně spektrometrická data pro karamel při použití metanol:voda (1:1). Navržené sumární vzorce vycházejí ze srovnání naměřených dat a dat publikovaných v literatuře

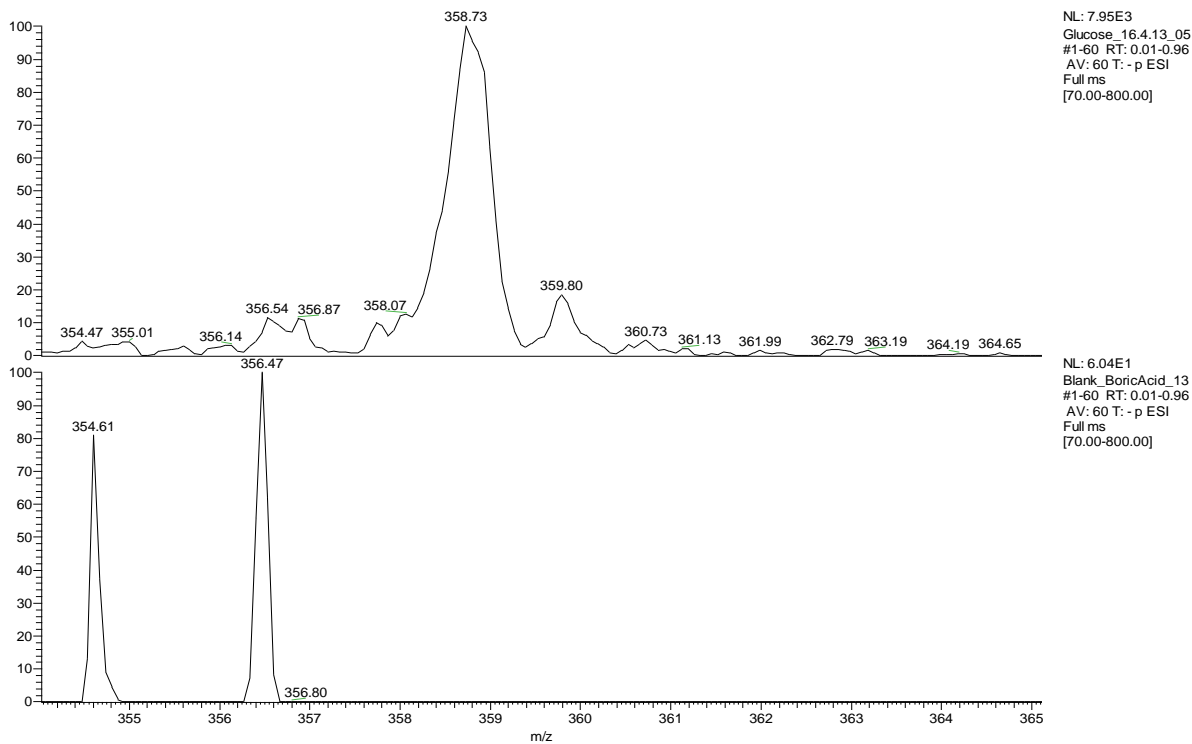
10. PŘÍLOHY



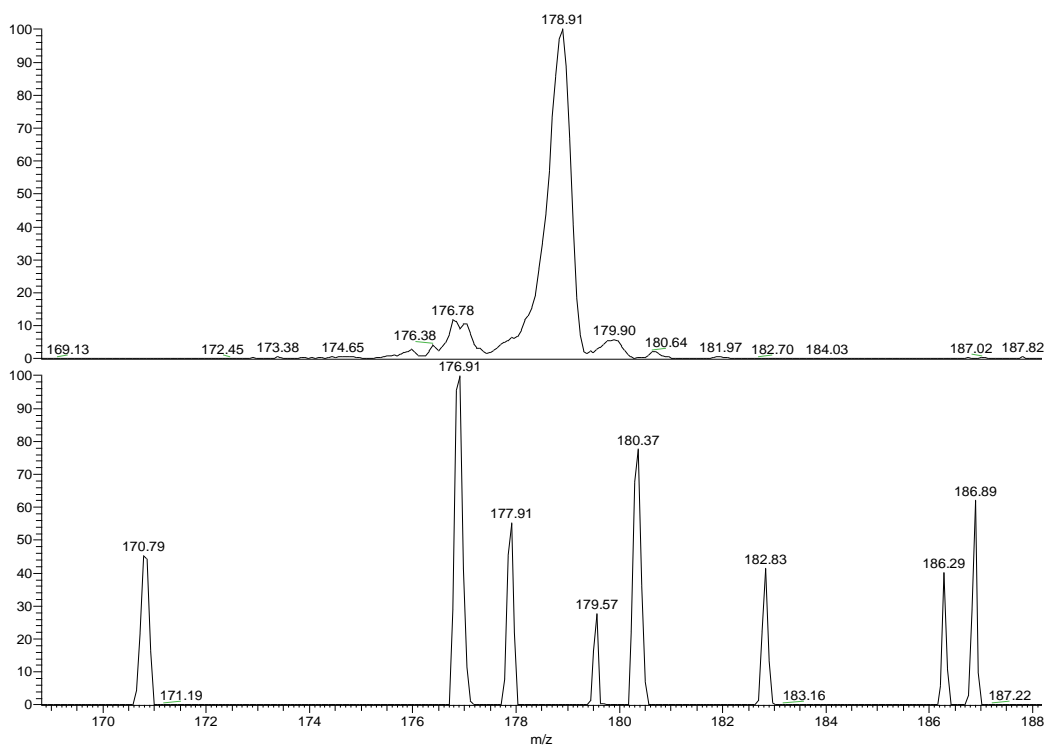
Příloha 1: Detail spektra glukosy v okolí iontu m/z 178/slepý pokus



Příloha 2: Detail spektra glukosy v okolí iontu m/z 224/slepý pokus



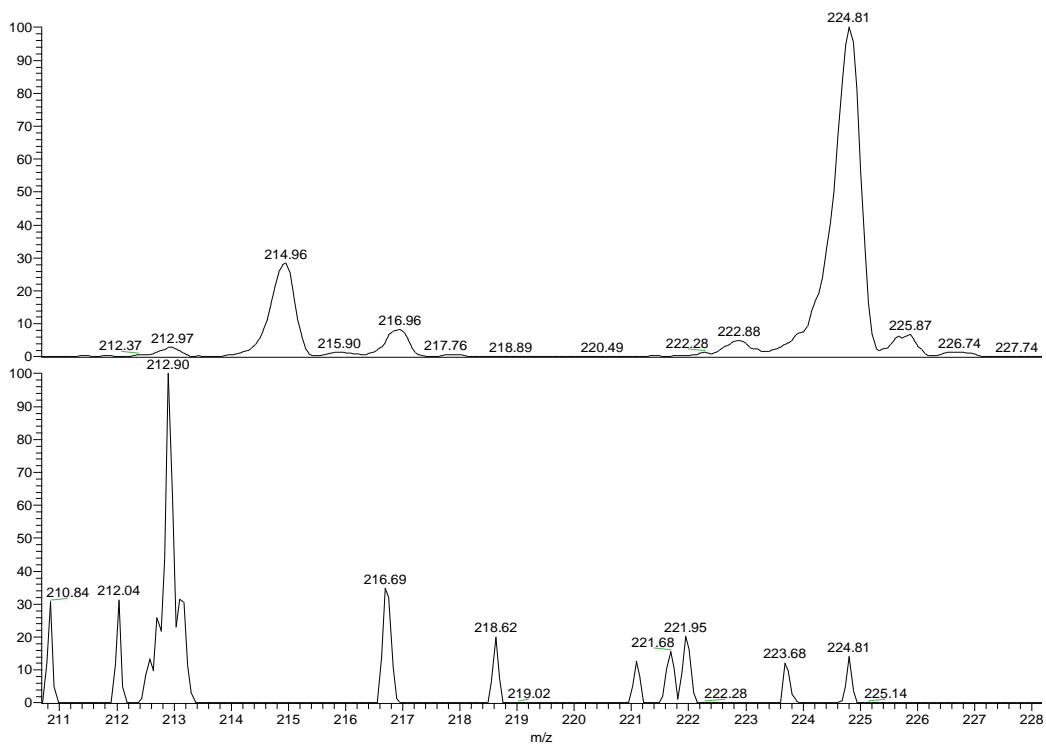
Příloha 3: Detail spektra glukosy v okolí iontu m/z 358/slepý pokus



NL: 1.94E4
Fructose_01#1-60
RT: 0.00-0.96 AV:
60 T: - p ESI Full ms
[70.00-800.00]

NL: 1.06E2
Blank_BoricAcid_25
#1-60 RT: 0.00-0.95
AV: 60 T: - p ESI
Full ms
[70.00-800.00]

Příloha 4: Detail spektra fruktosy v okolí iontu m/z 178/slepý pokus



NL: 8.62E4
Fructose_01#1-60
RT: 0.00-0.96 AV:
60 T: - p ESI Full ms
[70.00-800.00]

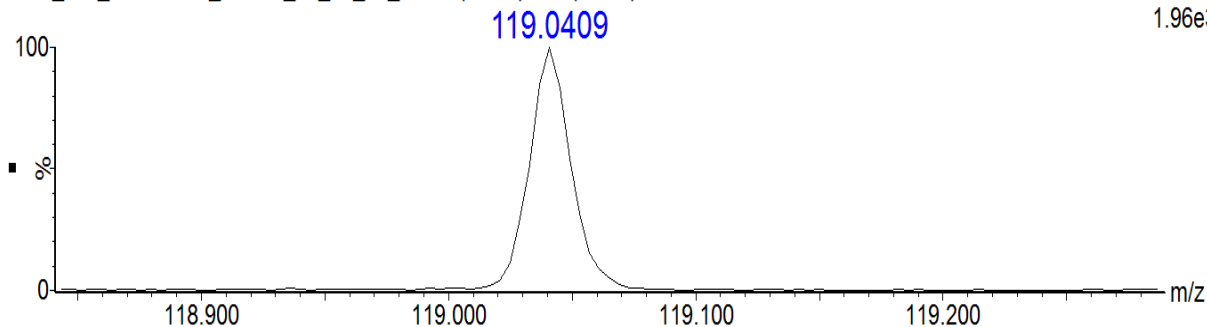
NL: 2.86E2
Blank_BoricAcid_25
#1-60 RT: 0.00-0.95
AV: 60 T: - p ESI
Full ms
[70.00-800.00]

Příloha 5: Detail spektra fruktosy v okolí iontu m/z 224/slepý pokus

caramel in MEOH 100%

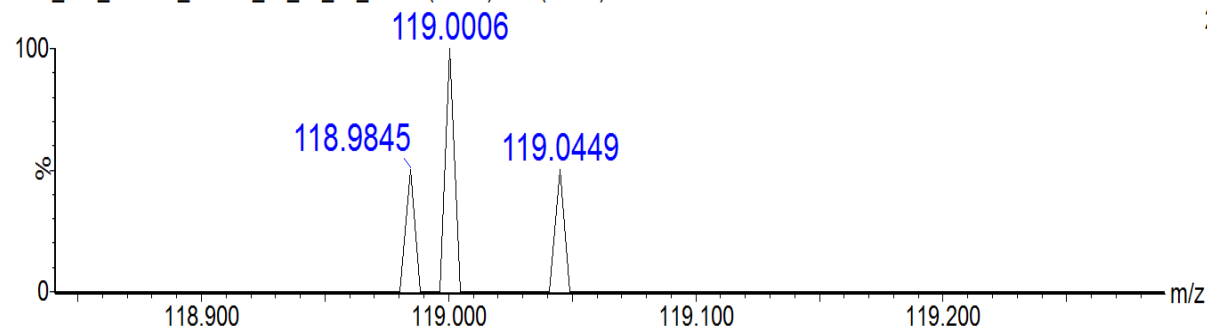
JOR_ESI_CAMEL_MEOH_23_04_13_06 21 (0.388) Cm (1:108)

TOF MS ES-
1.96e3



JOR_ESI_BLANK_MEOH_23_04_13_03 84 (1.554) Cm (1:108)

TOF MS ES-
2

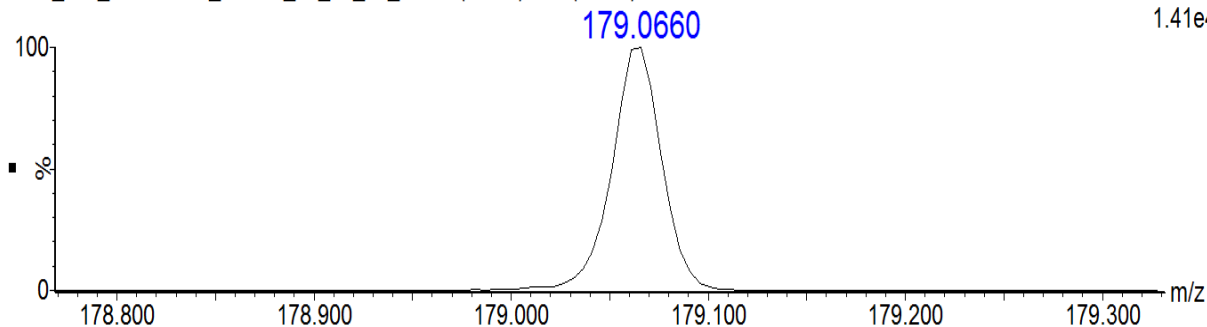


Příloha 6: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 119/slepý pokus

caramel in MEOH 100%

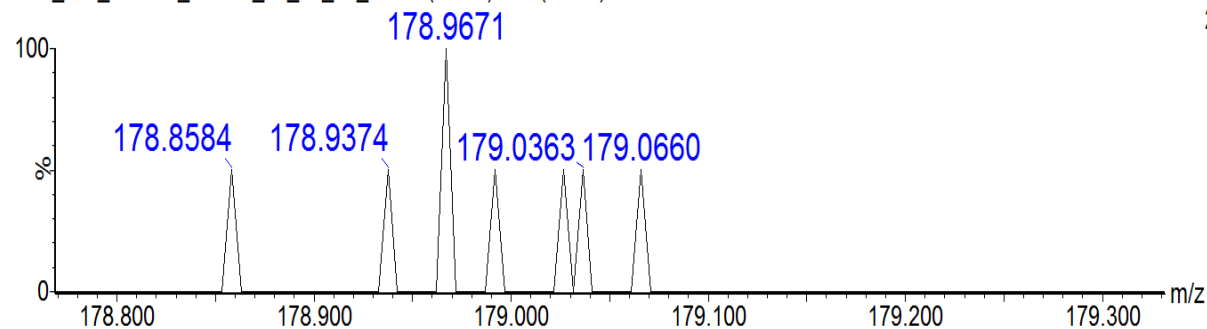
JOR_ESI_CAMEL_MEOH_23_04_13_06 21 (0.388) Cm (1:108)

TOF MS ES-
1.41e4



JOR_ESI_BLANK_MEOH_23_04_13_03 84 (1.554) Cm (1:108)

TOF MS ES-
2

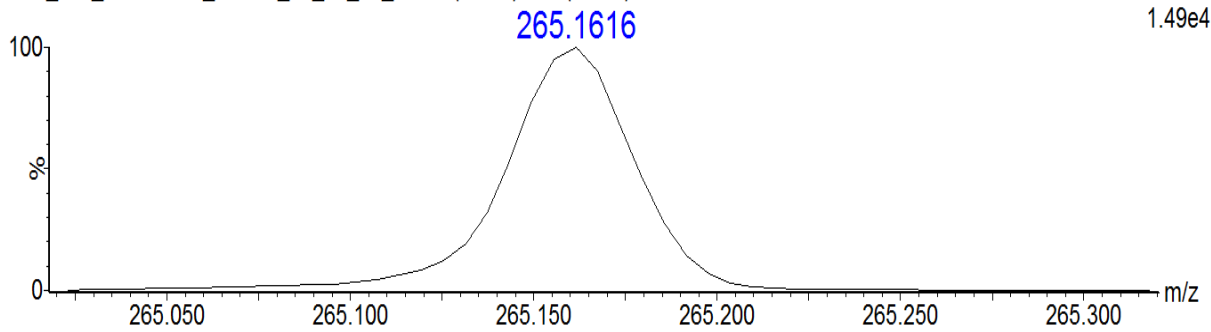


Příloha 7: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 179/slepý pokus

Blank MeOH 100%

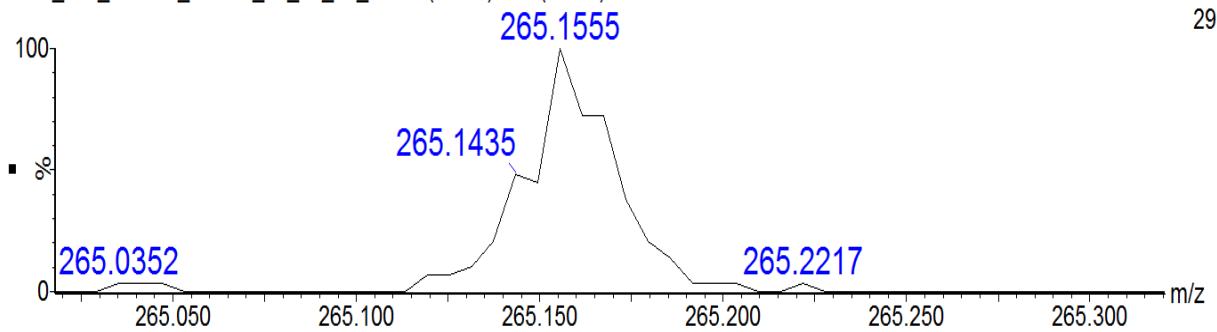
JOR_ESI_CAMEL_MECH_23_04_13_06 21 (0.388) Cm (1:108)

TOF MS ES-
1.49e4



JOR_ESI_BLANK_MECH_23_04_13_03 84 (1.554) Cm (1:108)

TOF MS ES-
29

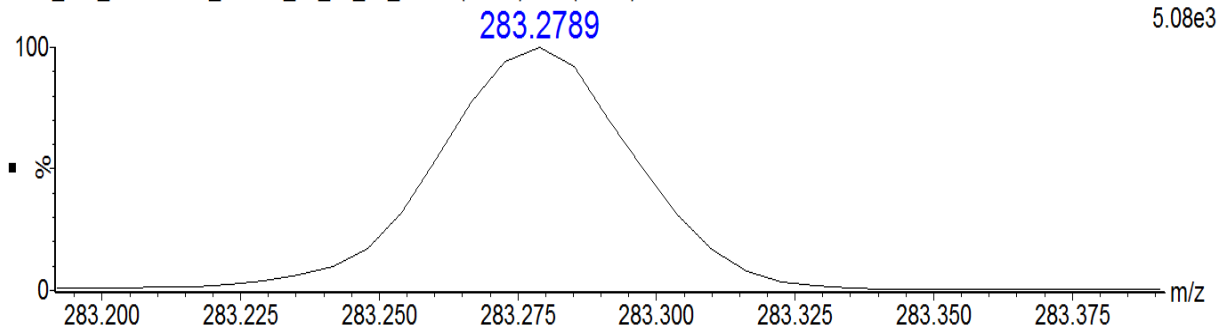


Příloha 8: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 265/slepý pokus

caramel in MeOH 100%

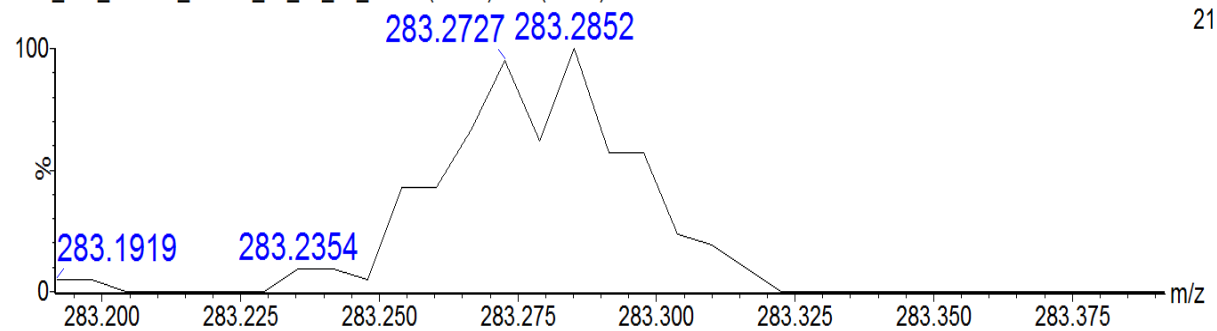
JOR_ESI_CAMEL_MECH_23_04_13_06 21 (0.388) Cm (1:108)

TOF MS ES-
5.08e3



JOR_ESI_BLANK_MECH_23_04_13_03 84 (1.554) Cm (1:108)

TOF MS ES-
21

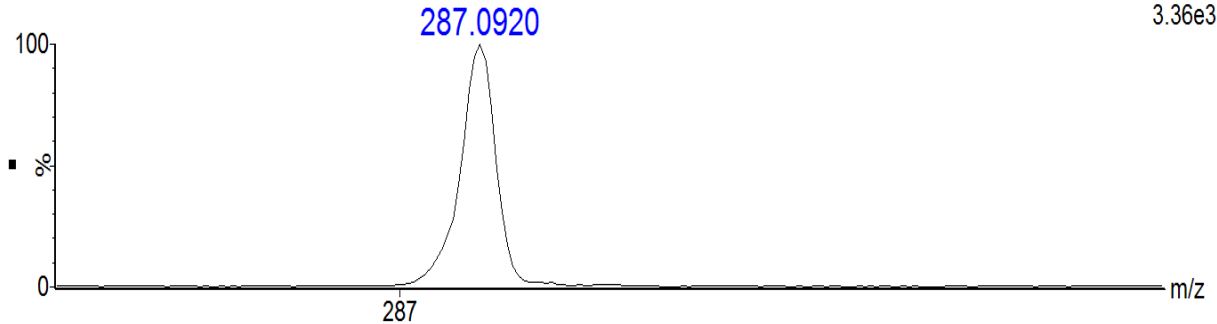


Příloha 9: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 283/slepý pokus

caramel in MEOH 100%

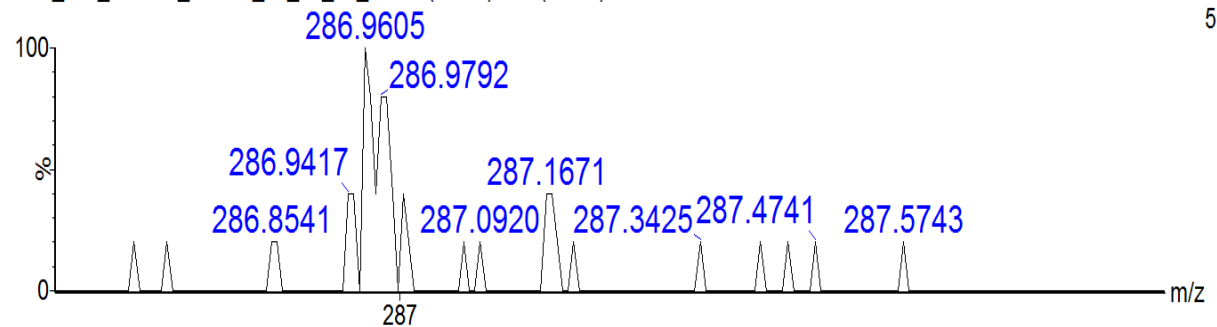
JOR_ESI_CAMEL_MEOH_23_04_13_06 21 (0.388) Cm (1:108)

TOF MS ES-
3.36e3



JOR_ESI_BLANK_MEOH_23_04_13_03 84 (1.554) Cm (1:108)

TOF MS ES-
5

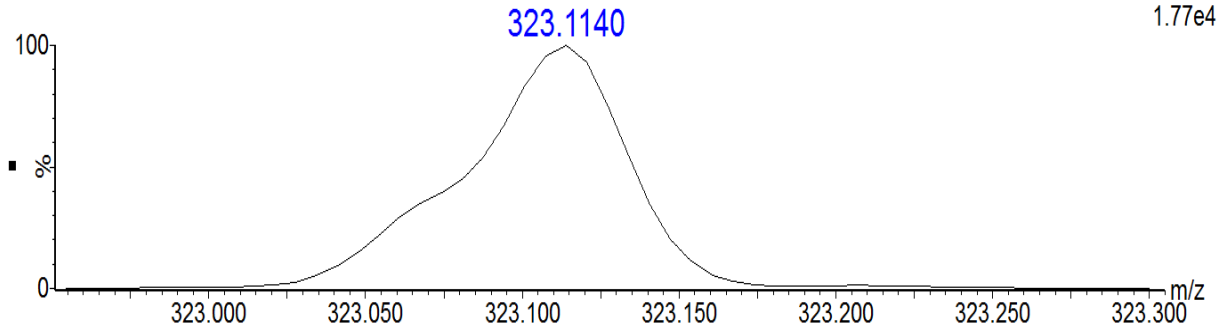


Příloha 10: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 287/slepý pokus

caramel in MEOH 100%

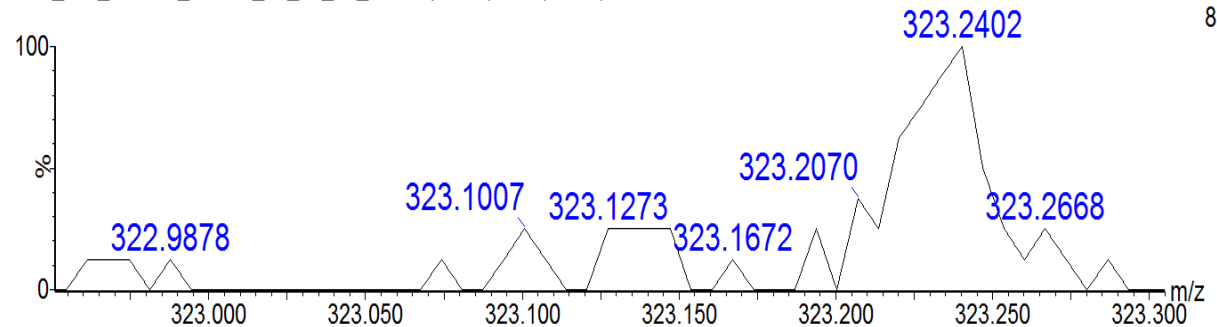
JOR_ESI_CAMEL_MEOH_23_04_13_06 21 (0.388) Cm (1:108)

TOF MS ES-
1.77e4



JOR_ESI_BLANK_MEOH_23_04_13_03 84 (1.554) Cm (1:108)

TOF MS ES-
8

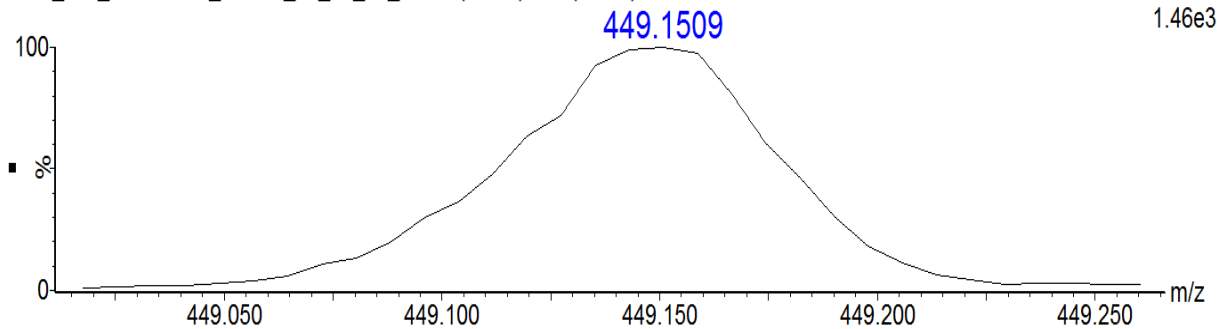


Příloha 11: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 323/slepý pokus

caramel in MEOH 100%

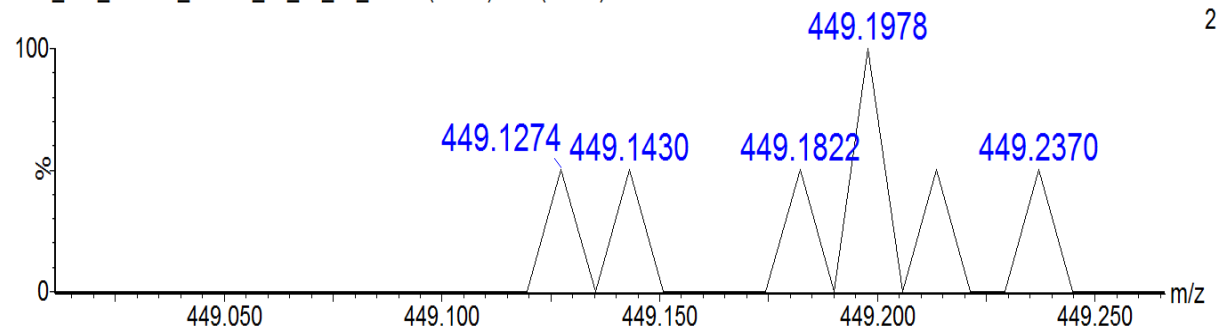
JOR_ESI_CAMEL_MEOH_23_04_13_06 21 (0.388) Cm (1:108)

TOF MS ES-
1.46e3



JOR_ESI_BLANK_MEOH_23_04_13_03 84 (1.554) Cm (1:108)

TOF MS ES-
2

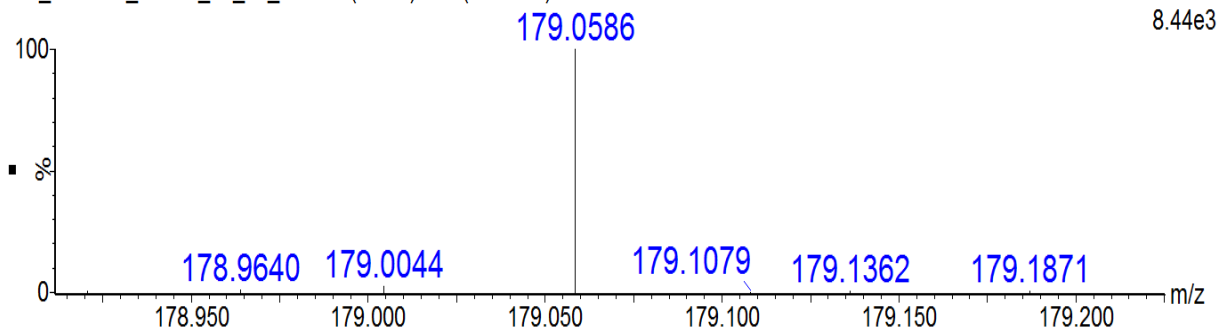


Příloha 12: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 449/slepý pokus

caramel 1mg/ml in MeOH

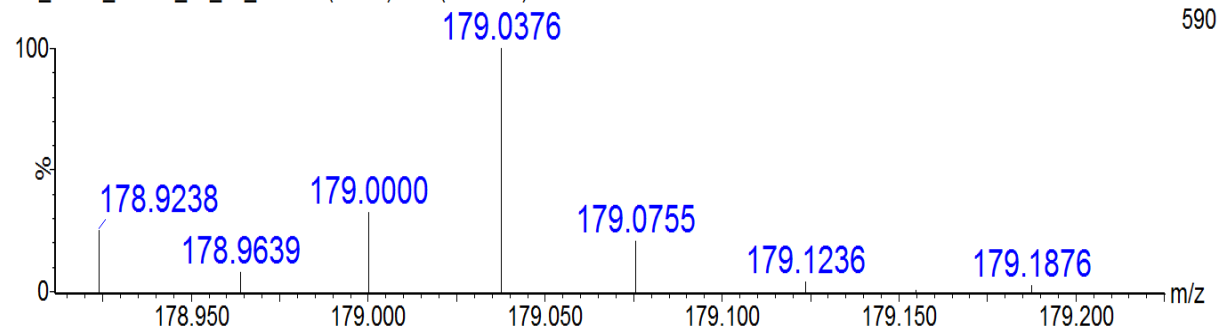
Jor_caramel_MeOH_23_04_13_248 (9.677) Cm (129:256)

1: TOF MS ES-
8.44e3



Jor_blank_MeOH_23_04_13_130 (5.070) Cm (129:256)

1: TOF MS ES-
590

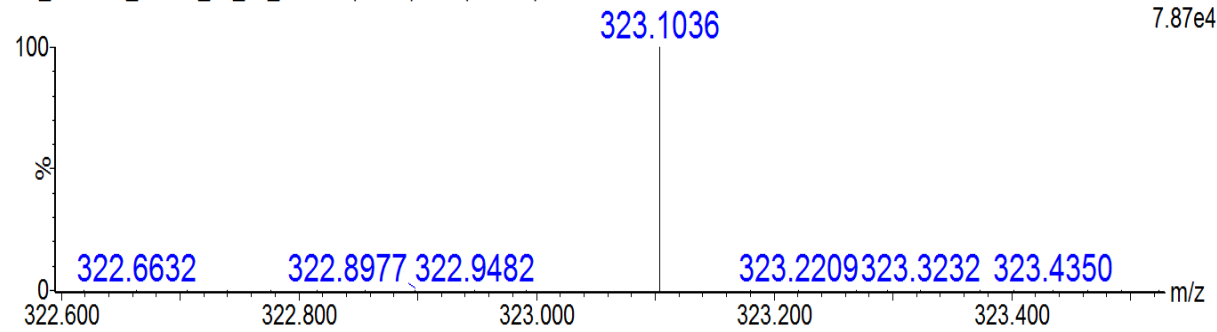


Příloha 13: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 179/slepý pokus UPLC/MS

blank MeOH 100%

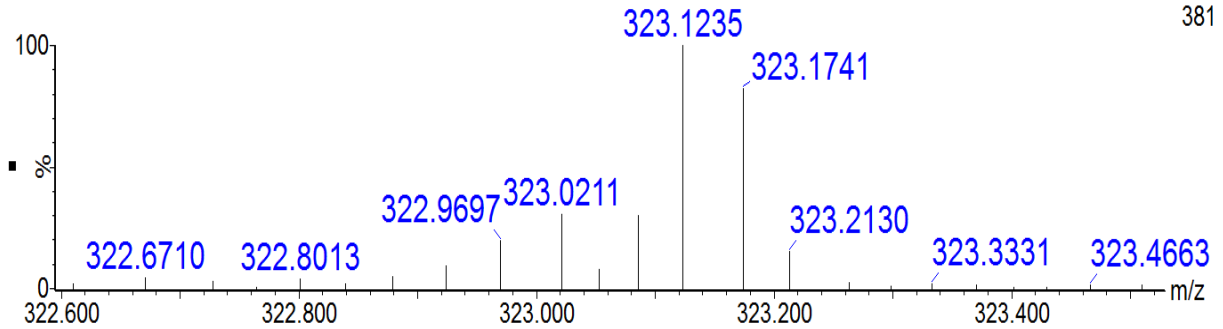
Jor_caramel_MeOH_23_04_13 150 (5.851) Cm (65:192)

1: TOF MS ES-
7.87e4



Jor_blank_MeOH_23_04_13 70 (2.730) Cm (65:192)

1: TOF MS ES-
381

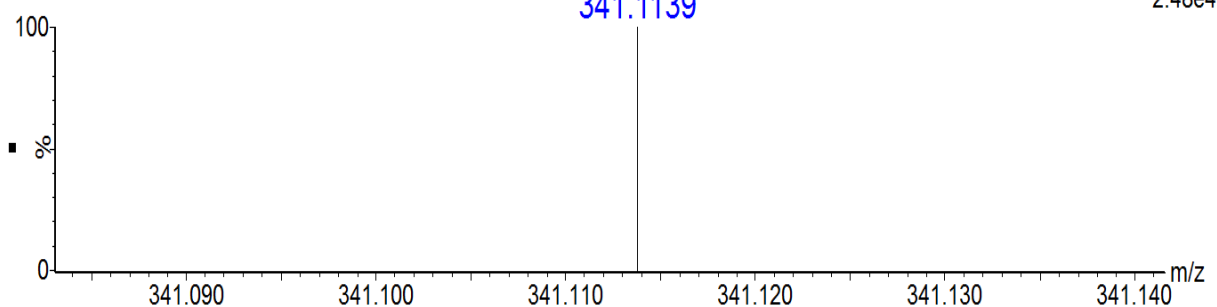


Příloha 14: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 323/slepý pokus UPLC/MS

caramel 1mg/ml in MeOH

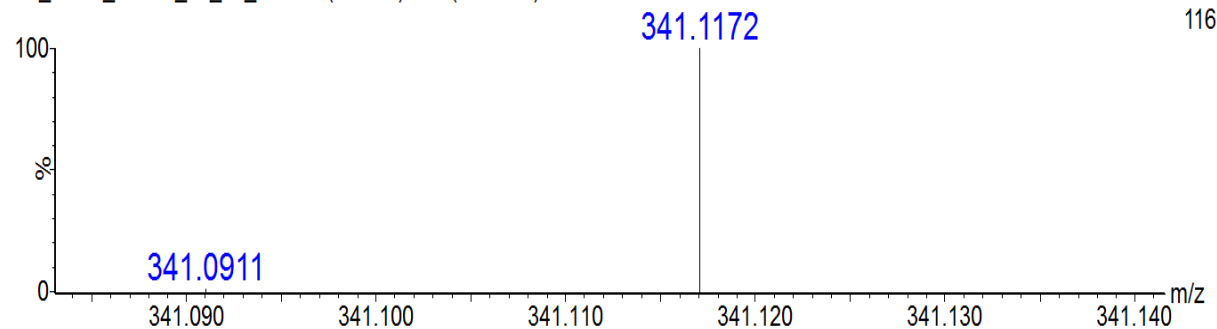
Jor_caramel_MeOH_23_04_13 262 (10.226) Cm (258:384)

1: TOF MS ES-
2.48e4



Jor_blank_MeOH_23_04_13 270 (10.531) Cm (258:384)

1: TOF MS ES-
116

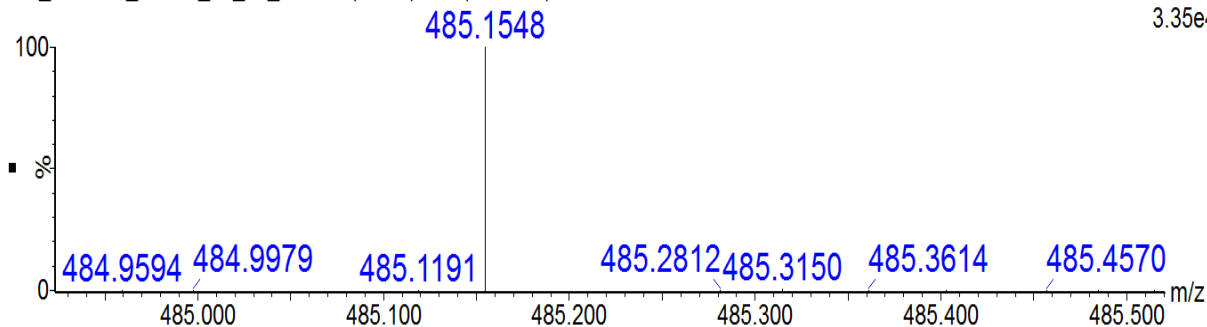


Příloha 15: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 341/slepý pokus UPLC/MS

caramel 1mg/ml in MeOH

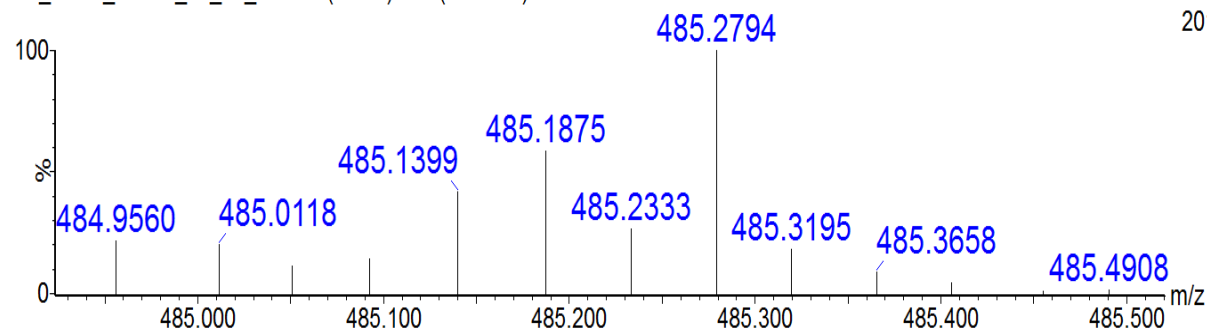
Jor_caramel_MeOH_23_04_13 248 (9.677) Cm (129:256)

1: TOF MS ES-
3.35e4



Jor_blank_MeOH_23_04_13 130 (5.070) Cm (129:256)

1: TOF MS ES-
201

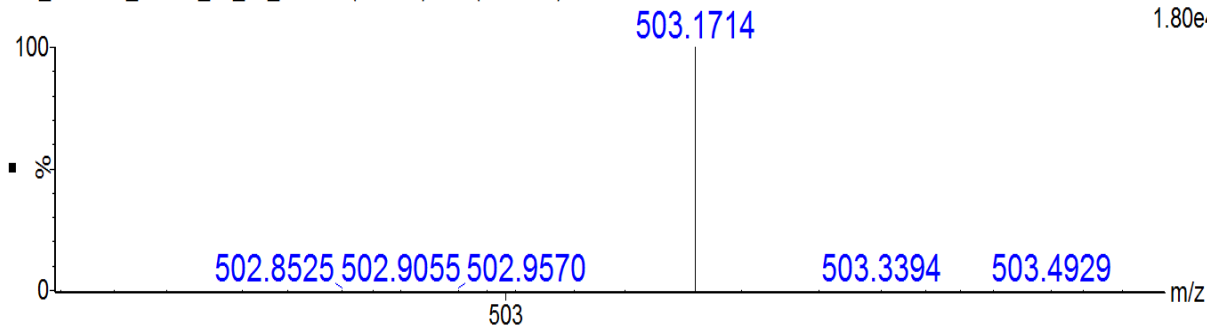


Příloha 16: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 485/slepý pokus UPLC/MS

caramel 1mg/ml in MeOH

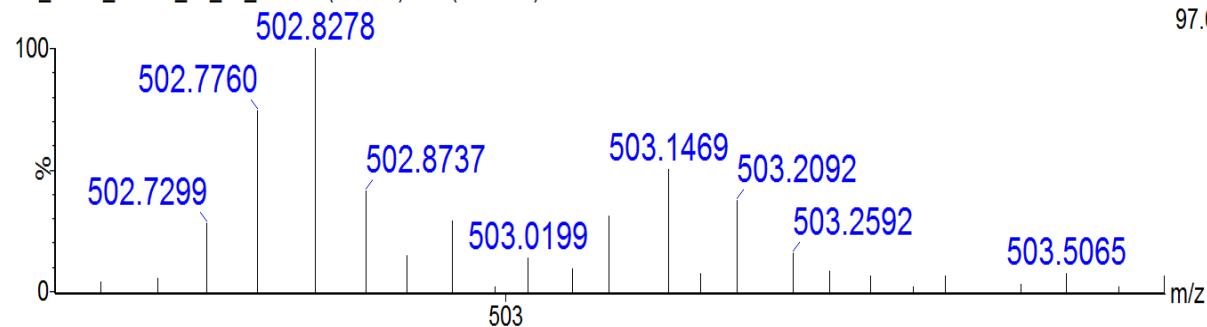
Jor_caramel_MeOH_23_04_13 412 (16.076) Cm (386:512)

1: TOF MS ES-
1.80e4



Jor_blank_MeOH_23_04_13 461 (17.989) Cm (386:512)

1: TOF MS ES-
97.0

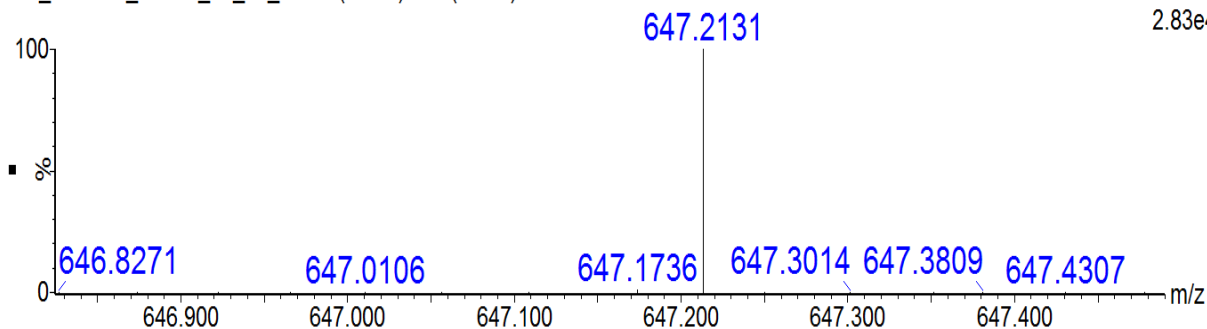


Příloha 17: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 503/slepý pokus UPLC/MS

caramel 1mg/ml in MeOH

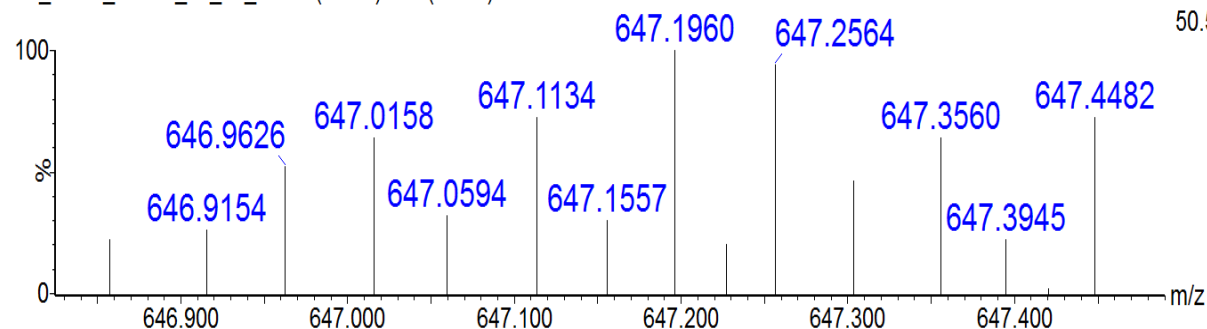
Jor_caramel_MeOH_23_04_13 47 (1.839) Cm (1:204)

1: TOF MS ES-
2.83e4



Jor_blank_MeOH_23_04_13 49 (1.913) Cm (1:204)

1: TOF MS ES-
50.5

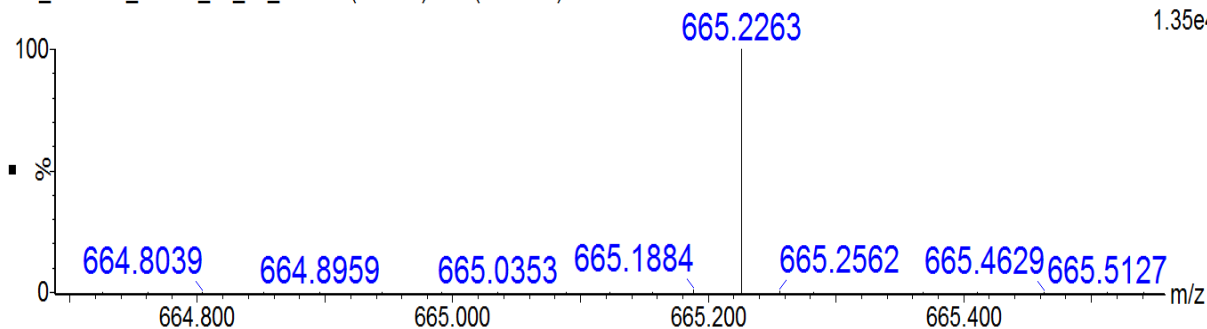


Příloha 18: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 647/slepý pokus UPLC/MS

caramel 1mg/ml in MeOH

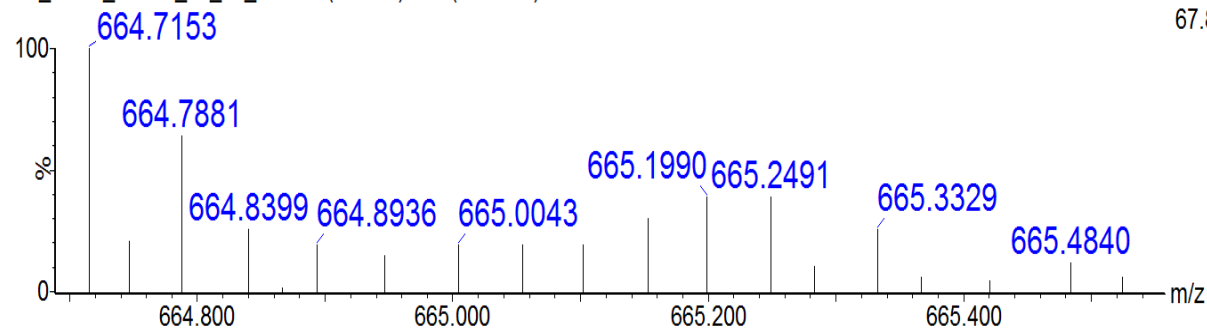
Jor_caramel_MeOH_23_04_13 412 (16.076) Cm (384:538)

1: TOF MS ES-
1.35e4



Jor_blank_MeOH_23_04_13 461 (17.989) Cm (384:538)

1: TOF MS ES-
67.8

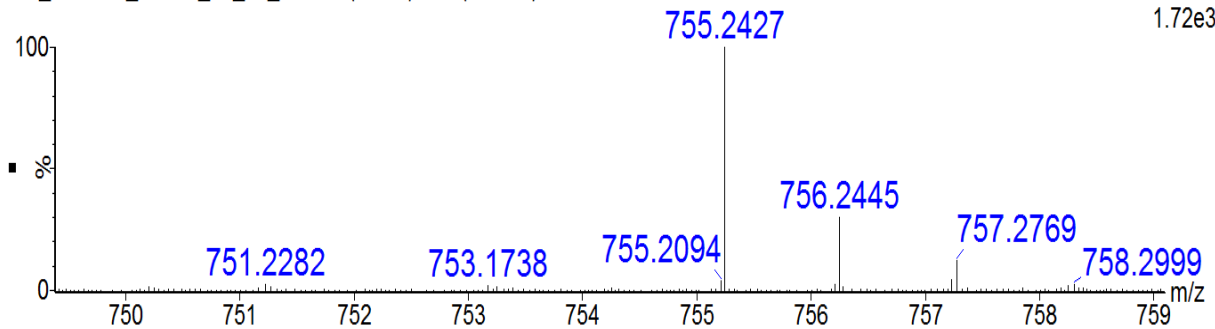


Příloha 19: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 665/slepý pokus UPLC/MS

caramel 1mg/ml in MeOH

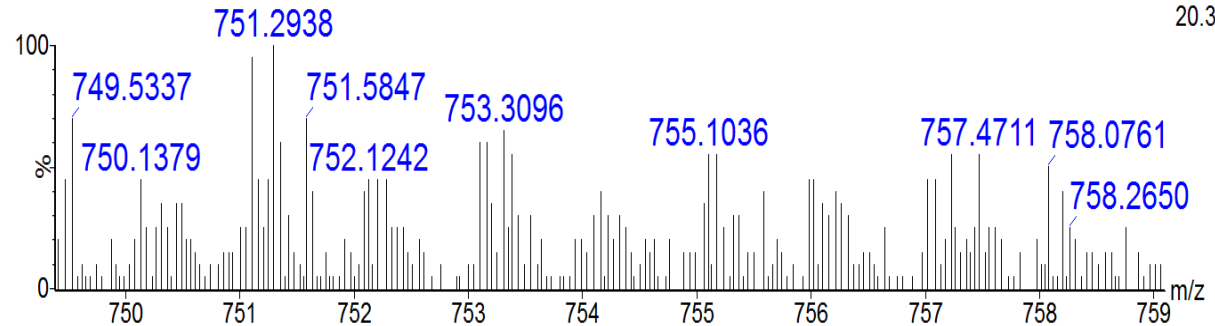
Jor_caramel_MeOH_23_04_13 116 (4.532) Cm (65:128)

1: TOF MS ES-
1.72e3



Jor_blank_MeOH_23_04_13 70 (2.730) Cm (65:128)

1: TOF MS ES-
20.3

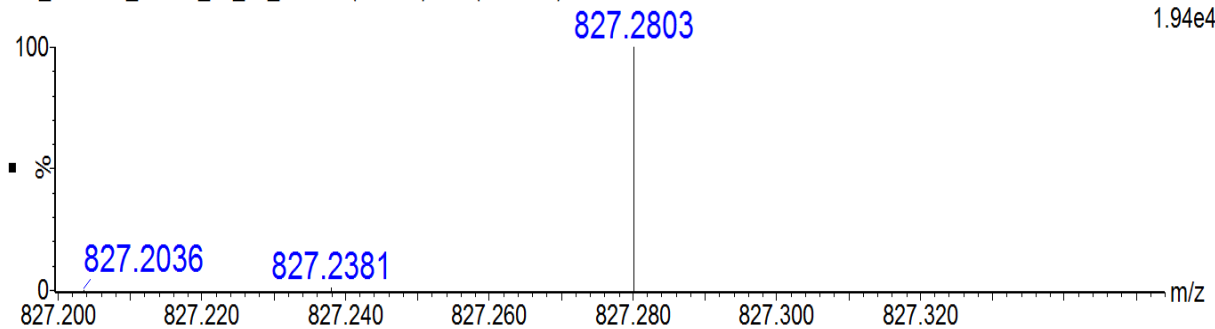


Příloha 20: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 755/slepý pokus UPLC/MS

caramel 1mg/ml in MeOH

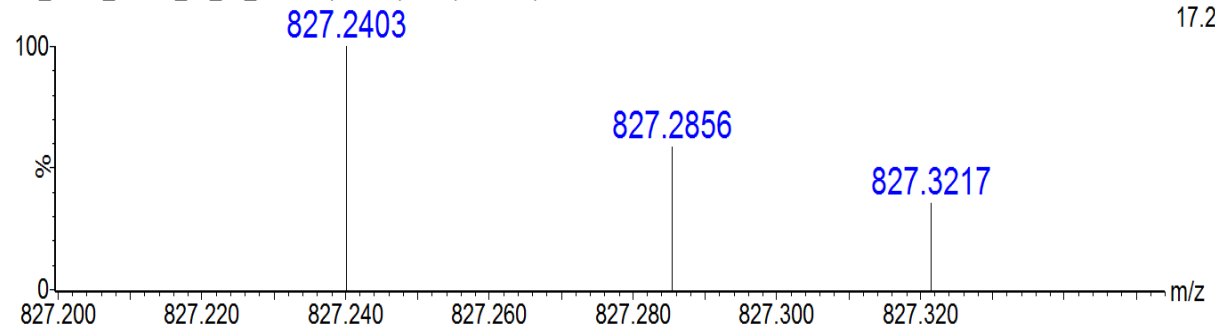
Jor_caramel_MeOH_23_04_13 262 (10.226) Cm (258:384)

1: TOF MS ES-
1.94e4



Jor_blank_MeOH_23_04_13 270 (10.531) Cm (258:384)

1: TOF MS ES-
17.2

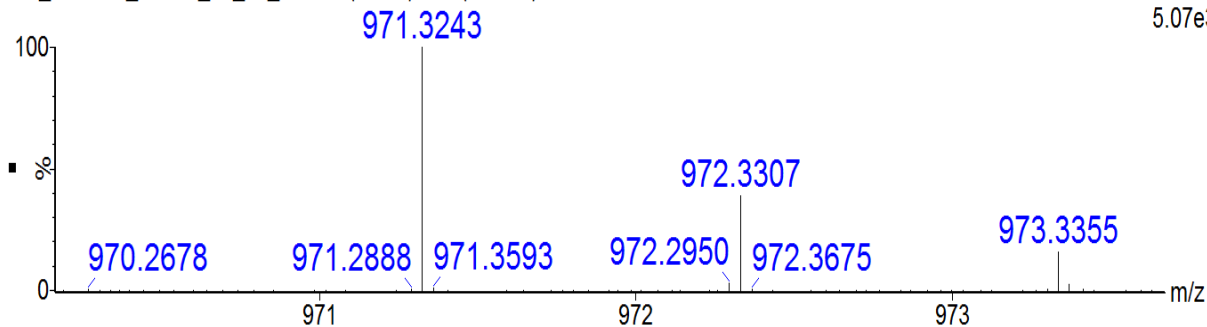


Příloha 21: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 827/slepý pokus UPLC/MS

caramel 1mg/ml in MeOH

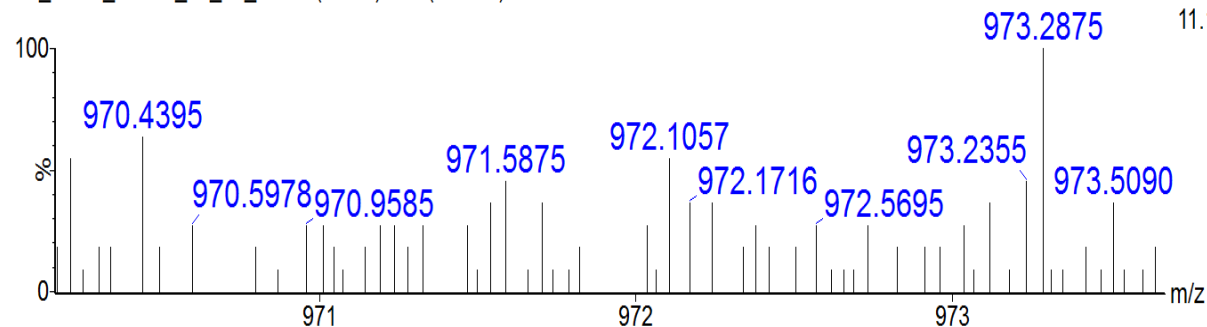
Jor_caramel_MeOH_23_04_13 116 (4.532) Cm (65:128)

1: TOF MS ES-
5.07e3



Jor_blank_MeOH_23_04_13 70 (2.730) Cm (65:128)

1: TOF MS ES-
11.1



Příloha 22: Detail spektra karamelu v methanolu v okolí iontu m/z 971/slepý pokus UPLC/MS

fructose 100mg/L in MeOH:H2O, col energ 10

JOR_FRUCTOSE_12_04_13_07 8 (0.080) Cm (3:301)

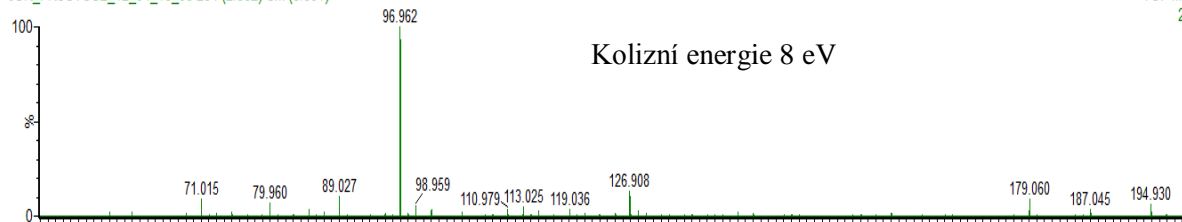
TOF MS ES-
1.70e4



Kolizní energie 10 eV

JOR_FRUCTOSE_12_04_13_05 254 (2.532) Cm (3:301)

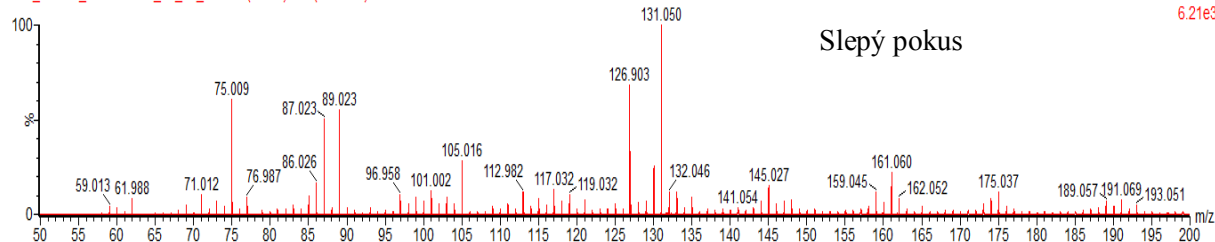
TOF MS ES-
2.37e4



Kolizní energie 8 eV

JOR_BLANK_FRUCTOSE_12_04_12 400 (2.302) Cm (172:470)

TOF MS ES-
6.21e3



Slepý pokus

Příloha 23: Hmotnostní spektrum fragmentace fruktosy/slepý vzorek

11. SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1: Detail spektra glukosy v okolí iontu m/z 178/slepý pokus
- Příloha 2: Detail spektra glukosy v okolí iontu m/z 224/slepý pokus
- Příloha 3: Detail spektra glukosy v okolí iontu m/z 358/slepý pokus
- Příloha 4: Detail spektra fruktosy v okolí iontu m/z 178/slepý pokus
- Příloha 5: Detail spektra fruktosy v okolí iontu m/z 224/slepý pokus
- Příloha 6: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 119/slepý pokus
- Příloha 7: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 179/slepý pokus
- Příloha 8: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 265/slepý pokus
- Příloha 9: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 283/slepý pokus
- Příloha 10: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 287/slepý pokus
- Příloha 11: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 323/slepý pokus
- Příloha 12: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 449/slepý pokus
- Příloha 13: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 179/slepý pokus UPLC/MS
- Příloha 14: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 323/slepý pokus UPLC/MS
- Příloha 15: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 341/slepý pokus UPLC/MS
- Příloha 16: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 485/slepý pokus UPLC/MS
- Příloha 17: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 503/slepý pokus UPLC/MS
- Příloha 18: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 647/slepý pokus UPLC/MS
- Příloha 19: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 665/slepý pokus UPLC/MS
- Příloha 20: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 755/slepý pokus UPLC/MS
- Příloha 21: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 857/slepý pokus UPLC/MS
- Příloha 22: Detail spektra karamelu v metanolu v okolí iontu m/z 971/slepý pokus UPLC/MS
- Příloha 23: Hmotnostní spektrum fragmentace fruktosy/slepý vzorek