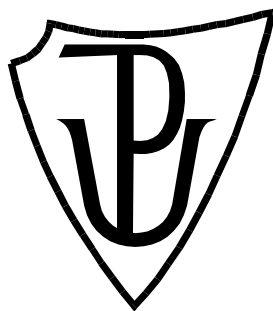


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie



Iontová mobilita a hmotnostní spektrometrie v kontrole falšování koření

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Dominik Halman
Studijní obor:	Analytická chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.
Konzultantka:	Marianna Nytko, M.Sc.

Olomouc 2024

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Dominik Halman

Název práce: Iontová mobilita a hmotnostní spektrometrie v kontrole falšování koření

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Konzultantka: Marianna Nytko, M.Sc.

Rok odevzdání práce: 2024

Anotace:

Falšování koření představuje rozsáhlý problém, tato práce se zabývá využitím iontové mobility ve spojení s hmotnostní spektrometrií při odhalování falšování šafránu pomocí kurkumy a falšování oregana pomocí olivových lístků. Byly porovnány dvě extrakční metody pro obě dvojice koření, testovány vhodné podmínky ionizace a kombinace iontové mobility s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Následně byly zvolené experimentální podmínky ověřovány při analýze modelových vzorků šafránu s přídavkem 5 až 20 % kurkumy, oregana s olivovými lístky (rovněž 5 až 20 %). V hmotnostních spektrech byly identifikovány signály charakteristických markerů, pro kurkumu to byl kurkumin a pro olivové lístky oleuropein. V případě kurkuminu iontová mobilita významně přispěla ke zlepšení selektivity měření, kdy bylo dosaženo jeho separace od interferující látky s blízkou hodnotou m/z (rozdíl m/z cca 2,2 mDa). V závěru byly analyzovány reálné vzorky koření od různých výrobců zakoupených v supermarketech či internetových obchodech. Kombinace iontové mobility s tandemovou hmotnostní spektrometrií je efektivním nástrojem pro přímou analýzu extraktů koření. Dle literární rešerše bylo spojení IMS-MS vůbec poprvé využito k testování falšování oregana a šafránu.

Klíčová slova: iontová mobilita, hmotnostní spektrometrie, elektrosprej, falšování potravin, koření, šafrán, kurkuma, oregano, olivové lístky

Počet stran: 83

Počet příloh: 1 (3 strany)

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Dominik Halman

Title: Ion mobility and mass spectrometry in the control of spice adulteration

Type of thesis: master's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Consultant: Marianna Nytká, M.Sc.

The year of submission: 2024

Annotation:

Spice adulteration represents a vast problem, this thesis deals with application of ion mobility with mass spectrometry for analysis of saffron adulterated with turmeric and oregano with olive leaves. Two extraction methods were compared for both pairs of spices, suitable ionization conditions and combination of ion mobility with tandem mass spectrometry were tested. Then the selected experimental conditions were verified in analysis of mock-up samples of saffron with turmeric addition from 5 to 20 %, oregano with olive leaves (likewise 5 to 20 %). Using mass spectrometry, characteristic markers were identified, for saffron it was curcumin and for olive leaves oleuropein. In case of curcumin, ion mobility significantly contributed to the improvement of selectivity of measurement. Curcumin separation from interfering compound with close m/z ratio (difference approx. 2,2 mDa) was achieved. At the end of this thesis, real samples of spices from different producers bought in supermarkets or internet stores were tested. Combination of ion mobility with tandem mass spectrometry is an effective tool for direct analysis of spice extracts. IMS – MS was according to the best knowledge employed for the first time for analysis of oregano and saffron adulteration.

Keywords: ion mobility, mass spectrometry, ESI, food fraud, adulteration, spice, saffron, turmeric, oregano, olive leaves

Number of pages: 83

Number of appendices: 1 (3 pages)

Language: Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci

.....

Podpis

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych touto cestou poděkoval svému vedoucímu diplomové práce, prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph. D. za jeho praktické připomínky, cenné rady při vyhodnocování naměřených dat a veškerý čas strávený nad mou prací. Dále bych rád poděkoval své konzultantce, Marianně Nytko M. Sc. za její ochotu, trpělivost a veškerý čas strávený se mnou v laboratoři při měření na přístroji.

V neposlední řadě patří velké díky mé rodině a přátelům za poskytnutí klidného zázemí pro vysokoškolské studium.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Problematika falšování potravin	9
2.1.1. Potraviny, jejich hlavní a vedlejší složky	9
2.1.2. Falšování potravin v Evropské unii.....	10
2.1.3. Nejčastěji falšované potraviny	12
2.2. Falšování koření	14
2.2.1. Historie koření a jeho pozice v dnešním světě.....	14
2.2.2. Vybrané druhy koření a jejich falšování	15
2.3. Analytické metody používané při kontrole koření	21
2.3.1. Metody založené na analýze DNA.....	21
2.3.2. Spektrometrické metody založené na interakci látky s elektromagnetickým zářením...	22
2.3.3. Hmotnostní spektrometrie	24
2.4. Role iontové mobility při analýze koření	28
2.4.1. Iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií	28
2.4.2. Současné poznatky o iontové mobilitě při kontrole falšování potravin	30
2.4.3. Využití iontové mobility pro kontrolu falšování koření.....	32
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
3.1. Přístroje a pomůcky	36
3.2. Vzorky a použité chemikálie	36
3.3. Pracovní postup	36
3.3.1. Příprava roztoků pro testování extrakčních činidel.....	36
3.3.2. Příprava pracovních roztoků pro testování ionizace kurkuminu v pozitivním módu.....	39
3.3.3. Příprava modelových směsí pro zjištění příměsí.....	39
3.3.4. Příprava reálných vzorků koření od různých výrobců	40
3.4. Měření spojením iontové mobility s hmotnostní spektrometrií	40
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	43
4.1. Volba extrakčního postupu a ovlivňování ionizace	43
4.1.1. Šafrán a kurkuma	43
4.1.2. Oregano a olivové lístky	56
4.2. Analýza modelových vzorků (modelové falšování)	60
4.2.1. Falšování šafránu pomocí kurkumy	60

4.2.2. Falšování oregana pomocí olivových lístků.....	64
4.3. Měření reálných vzorků od různých výrobců	70
4.3.1. Vzorky šafránu	70
4.3.2. Vzorky oregana	70
5. ZÁVĚR.....	72
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	74
7. LITERATURA	76
8. PŘÍLOHY	84
8.1. Grafy lineárních závislostí dalších fragmentů oleuropeinu	84

1. ÚVOD

Chuť a čich představují neoddělitelnou součást vnímání potravin a hotových pokrmů. Ne nadarmo jsou chuť a čich řazeny mezi pět základních lidských smyslů. Lze předpokládat, že již pravěcí lidé rozuměli důležitosti chuti a čichu, například když poprvé začali využívat oheň a byli tak schopni vnést nové aroma do svých pokrmů. O zlepšení chuti a vůně pokrmů se snažili i následující civilizace, a to až do současné doby. Z aroma pokrmů se tak stala jakási identifikační charakteristika jednotlivých kultur, např. pro východní Asii je typická chuť umami pocházející např. z fermentovaných sójových bobů, pro jižní Asii používání kurkumy a chilli, pro Blízký východ je typický římský kmín a pro Českou republiku např. mák či kmín. Původ aroma je dán charakteristickým chemickým složením pokrmů, především obsahem látek s organoleptickými vlastnostmi. Silné organoleptické vlastnosti má koření, čímž láká pozornost kuchařů a vyvolává tak poptávku na trhu i přes jeho často vysokou cenu. Není překvapením, že tyto podmínky jsou příhodným prostředím pro jeho falšování, nekalou praktiku okrádání či dokonce ohrožování konzumenta. Z tohoto důvodu je důležité zabývat se metodami schopnými falšování odhalit, aby konzument obdržel to, za co platí. Vzhledem k rozmanitosti koření, a tedy chemických individuů lze pro zkoumání falšování využít širokou nabídku analytických metod. Kontrola falšování potravin je nikdy nekončící souboj mezi schopnostmi kontrolních laboratoří a praktikami nepoctivých obchodníků či výrobců. Z tohoto důvodu je potřeba se zabývat novými metodami pro odhalování falšování a rozšiřovat tak arsenál analytických metod, které přispívají k ochraně konzumenta, ale také k udržení důvěry mezi konzumentem a obchodníkem.

V předložené práci je kombinována iontová mobilita s hmotnostní spektrometrií, což představuje spojení metod zatím vůbec nepoužívané při kontrole falšování koření. Navržené metody byly ověřovány pomocí modelových vzorků simulujících falšování dvou vybraných druhů koření a následně aplikovány na analýzu reálných vzorků šafránu a oregana.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Problematika falšování potravin

2.1.1. Potravin, jejich hlavní a vedlejší složky

Potravin představují nezbytnou součást všech lidských životů, neboť poskytují nezbytné živiny a energii lidskému organismu. Je na nich závislé jeho správné fungování, v případě nedostatku některé ze složek potravy se mohou projevit zdravotní následky, ve vážných případech až smrt. Živiny (také nazývané *nutrienty*) se tradičně dělí na hlavní a přídatné (akcesorní). Do skupiny hlavních živin se řadí bílkoviny, tuky a sacharidy. Přídatné živiny jsou vitamíny a minerální látky. Důležitou živinou je voda. Pro kulinářství jsou kromě živin velmi důležité látky senzorycky aktivní, které mají organoleptické vlastnosti – vliv na smyslový (senzorycký) vjem vznikající při konzumaci potravy. Nejčastěji jsou vyvolány vjemy olfaktorické (čichové), gustativní (chuťové), vizuální (zrakové), haptické (hmatové) a auditorické (zvukové). Nejčastěji vnímanými organoleptickými vlastnostmi u potravin jsou vůně a chuť, pro které se vžil souhrnné označení *aroma*. [1]

Významnou složkou potravin jsou látky biologicky aktivní, které mohou mít na lidské zdraví vliv pozitivní (antioxidanty), tak i vliv negativní (látky toxické pro člověka).

Látky, které jsou přidávány do potravin či pokrmů se nazývají *aditiva*. Jejich hlavních úkolem může být zlepšení výživové hodnoty potravy, trvanlivosti (konzervanty – prodlužují stabilitu potravy), *aroma* (aromata), barvy (barviva) či textury potravy (zahušťovadla – zvyšují viskozitu, emulgátory – stabilizátory disperzních systémů). Nežádoucími látkami v potravinách jsou kontaminanty, které se do nich dostávají v důsledku lidské aktivity. Kontaminanty se dělí na primární (exogenní), které jsou přítomny ve vnějším prostředí (typické jsou zbytková množství pesticidů, která mohou hrát zásadní roli při odhalování falšování biopotravin), a sekundární, které mohou vznikat při zpracování či skladování potravy. [1]

Potravin mohou obsahovat látky, které snižují jejich nutriční hodnotu, kvalitu (vlivem na organoleptické vlastnosti potravy), či látky jinak nežádoucí, v nejhorším případě až toxické. Z tohoto důvodu je důležité zabývat se falšováním potravin, resp. pravidelně kontrolovat potraviny pro odrazení od falšování či rychlé odhalení falšované potravy.

Nabídka potravin napříč světem je rozsáhlá a jejich složení je komplexní. To poskytuje rozsáhlou škálu látek, které je třeba analyzovat, resp. látek u kterých se projeví různé typy falšování. Je zřejmé, že zabývat se všemi potravinami, kde je možné falšování, není prakticky možné. Vždy je třeba se zaměřit na rizikové potraviny v rámci dané země, popř. širšího zeměpisného celku, ve kterém se setkává obchod dané země s dalšími zeměmi. U České republiky tak dává smysl zabývat se falšováním potravin v Evropské unii. Jaká je definice falšování, jaký je motiv pachatele, jak falšování poškozuje konzumenta a jaké jsou některé z nejhorších případů falšování minulosti? Na tyto otázky se snaží odpovědět následující kapitoly této práce.

2.1.2. Falšování potravin v Evropské unii

Falšování se v Evropě vyskytovalo už ve starověku. Existují zmínky o padělání římských pečeti na amforách s olivovým olejem či vínem. [2] Falšování se v průběhu let vyvíjelo. Vyvíjely se především praktiky pachatelů, kteří se vždy přizpůsobovali zavedeným normám a kontrolám. Motiv pachatele se však nezměnil a zůstává i po tisíciletích stále stejný. Je však nutné zmínit, že vlivem výrobní infrastruktury může v dnešní době ovlivnit mnohem větší počet lidí a je náročnější na odhalení vzhledem ke složitějším a rozsáhlejšími výrobním procesům. [3]

Je třeba definovat falšování potravin a odlišit jej od ostatních vlivů na složení potravin (např. od kontaminace ze životního prostředí). Podle Evropské komise je čin považován za falšování potravin, jestliže splňuje následující čtyři kritéria:

- 1) porušení pravidel Evropské unie (č. 1 odst. 2 nařízení (EU) 2017/625 – legislativa zemědělsko-potravinářského řetězce)
- 2) oklamání zákazníků – výrobce neuvádí při prodeji pravdivé informace
- 3) ekonomický zisk – čin generuje pachateli ekonomickou výhodu
- 4) záměr – musí být dokázáno, že čin se nestal náhodou, ale s vědomím výrobce.

Z hlediska způsobu falšování lze odlišit např. následující případy:

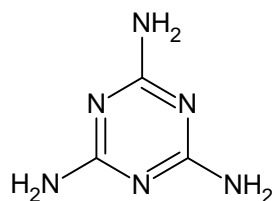
- 1) Výměna – kompletní nebo částečná výměna dražší složky produktu za levnější bez vědomí konzumenta (zatajení obsahu na obalu produktu)
- 2) Neschválené vylepšení – přidání neuvedené složky s cílem vylepšení vlastností produktu, zpravidla maskování špatné kvality produktu (různá neuvedená aditiva)

- 3) Padělání – porušení autorských práv
- 4) Nepravdivé označení – nepravdivé či zkreslené tvrzení na balení výrobku. [4; 5]

Falšování představuje problém, jak pro obchodníka, tak pro zákazníka. Jeho následky jsou především finanční ztráty, ale může představovat i zdravotní riziko pro konzumenta. Toto však není motivace či záměr pachatele, je to pouze možný důsledek. Motivem pachatele vždy zůstává ekonomický zisk. V literatuře se pro takovéto činy používá zkratka EMA – economically motivated adulteration. Z právního, ale také z analytického hlediska je třeba rozlišit EMA a činy cílící přímo proti bezpečnosti potravin (záměrná příměs toxické potravině za účelem ublížit konzumentovi). Hlavní rozdíl je především v látkách, které jsou využity. [3]

Látky, kterými jsou potraviny dopovány (EMA) často nejsou sledovány v rutinních analýzách, které bývají zaměřeny na kontrolu bezpečnosti potravin (např. kontrola aflatoxinů v potravinách, hlídání obsahu těžkých kovů...). Existují tři typy zdravotních rizik. Přímé je důsledkem přidání akutně toxické látky. Druhým typem je nepřímé zdravotní riziko, kdy je konzument vystaven nízkým koncentracím toxické látky, která se hromadí v těle během dlouhodobého vystavení. Do této skupiny patří také vynechání důležitých látek v potravině (např. konzervanty a vitamíny). Třetím typem je technické zdravotní riziko, kdy falšování nemá hmotnou podstatu a nastává např. při úmyslném chybném označení původu potravin. [3]

Nejdrastičtější a nejznámější příkladem falšování potravin (EMA) s přímým zdravotním rizikem z české historie byla methanolová aféra z roku 2012, která si v České republice vyžádala celkem 47 mrtvých a přes 100 lidí ponechala s trvalými zdravotními následky. [6] Dalším případem falšování bylo např. přidávání melaminu (Obr. 1) do mléka. Tento případ se objevil v roce 2008 v Číně, kdy výrobci deklarovali vyšší obsah bílkovin v mléce, aby bylo atraktivnější pro konzumenta. [3; 7] Princip spočíval v tom, že obsah bílkovin na obalu potravin vychází ze stanovení dusíku pomocí Kjeldahlovy metody. Tou se stanovuje pouze celkový dusík a nerozlišuje se, zda se skutečně jedná o bílkoviny. Takto stanovenému obsahu bílkovin se říká hrubá bílkovina. [8; 9] Následek falšování bylo několik mrtvých novorozenců a tisíce dalších hospitalizovaných. [3; 7] Poněkud speciálním, ale taktéž nebezpečným případem je nahrazení složky alergenem, což nepředstavuje zdravotní riziko pro širokou veřejnost, ale může mít u senzitivních jedinců fatální následky. [10]



Obr. 1: Struktura melaminu

V potírání falšování potravin se uplatňují dva přístupy – aktivní a pasivní. Aktivní způsob je založený především na řešení hrozeb v okamžiku, kdy nastanou. Oproti tomu pasivní monitoring spočívá v rutinní kontrole potravin rychlými nespecifickými metodami, kdy v momentě odhalení se poté přechází na aktivní monitoring. Budoucí vývoj sledování falšování potravin by měl být zaměřen především na pasivní monitoring potravin lukrativních k falšování. [3] Rolí Evropské unie by mělo být především odrazení pachatele od spáchání činu soustavou striktních vnitřních kontrol a právním definováním činu a trestu. [11]

2.1.3. Nejčastěji falšované potraviny

Falšování je možné u všech potravin, je patrné, že smysl má zabývat se potravinami, kde v minulosti došlo k falšování, či obecně potravinami, kde by falšování mohlo pachateli přinést ekonomický zisk. Nejvíce náchylné k falšování, a tedy skupiny s nejvyšším počtem případů jsou (pořadí je náhodné a neodpovídá četnosti falšování):

- 1) mléko a mléčné výrobky (např. nahrazení buvolího/ovčího mléka kravským při výrobě mozzarely/feta sýru)
- 2) maso a masné výrobky (např. nedeklarované koňské maso v klobásách)
- 3) ryby a mořské plody (např. falšování jeseterského kaviáru kaviárem jiného původu, kvality a ceny)
- 4) oleje a tuky (např. nahrazování extra panenského olivového oleje olejem z pokrutin či jiného rostlinného původu)
- 5) sladidla (např. falšování původu medu či dopování javorového sirupu kukuřičným sirupem)

6) káva a čaj (např. u kávy – příměs levnější robusty v dražší arabice a u čajů nahrazování prémiových čajů z vyhlášených lokalit za čaje horší kvality a jiného původu)

7) ovocné džusy (např. substituce pomerančového džusu jablečným)

8) alkoholické nápoje (např. použití jiného druhu hroznů pro přípravu vína či uměle přidaný cukr/ barviva)

9) koření a extrakty (např. barviva Sudan I-IV v kurkumě, sušené paprice a kari; falšování šafránu pomocí kurkumy)

10) obilniny (např. produkt s lepkem deklarovaný jako bezlepkový)

11) bioprodukty. [12]

Falšování se dotýká rozsáhlého spektra potravin, které jsou již tak složitou směsí desítek až stovek chemických látek. V analýze se lze zaměřit na lipidy (oleje, tuky), bílkoviny (maso) či sacharidy (obilniny), ale i na látky bez kalorické hodnoty (např. u potravin jejichž obsah makronutrientů je minimální či zcela nulový – káva, čaj a koření). Skupina potravin s nízkým obsahem makronutrientů se správně nazývá pochutiny. Hlavním úkolem pochutin je navození či zlepšení sensorického vjemu, typicky se jedná o aroma (např. koření), nebo povzbuzení organismu díky obsahu určitých chemických individuů (např. čaj či káva). [1] Právě na koření, příp. bylinky a jejich falšování jsou zaměřeny následující kapitoly této práce.

2.2. Falšování koření

2.2.1. Historie koření a jeho pozice v dnešním světě

Koření bylo lidem známo již od pravěku, kdy používali lístky keřů, ořechy, semínka, bobule či kůry ke zlepšení chuti masa. Postupem času se koření začalo používat i pro medicínské účely. Už 2700 let př. n. l. se v čínských spisech objevují zmínky o skořici. V Bibli je uváděno použití koření při rituálech. V 8. století př. n. l. v Babylonii jsou zmiňovány královské zahrady, jako místo kultivace několika druhů koření a bylin (např. kardamon, koriandr, tymián, šafrán či kurkuma). V Persii probíhala produkce esenciálních olejů z vonných rostlin. V Indii byly a dodnes jsou využívány skořice, kardamon, zázvor, kurkuma či pepř pro léčitelské účely a jsou jim připisovány blahodárné účinky na lidské zdraví. [13]

Starověká historie koření v Evropě začíná v antickém Řecku a Římě. Řekové své koření importovali z východu, ale také z okolních civilizací (např. fenykl, máta...). Bylinky a koření našly i tady uplatnění v medicíně (např. šafrán, tymián, koriandr, skořice, máta a majoránka). Vůbec poprvé se poznatky medicíny začaly odklánět od magie a předtuch k bylinkám a koření. Římané si libovali v kořeněném víně a koupelích ovoněných kořením či bylinkami. Byli to právě Římané, kteří při svých expanzích přinesli pepř a další koření z východu ostatním obyvatelům tehdejší Evropy. [13]

V raném středověku bylo koření běžně používáno jako platidlo, např. 1 libra (454 gramů) šafránu měla stejnou hodnotu jako 1 kůň, mnoho druhů koření se tak stalo privilegiem bohatých. V mnohých městech a zemích byly daně a nájemné vybírány ve formě kuliček pepře. Cena koření začala klesat až po období křižáckých výprav. V 15. století bylo poprvé do Evropy přivezeno koření z Nového světa (nové koření, vanilka) a o století později začalo námořní dovážení skořice, hřebíčku, muškátového oříšku a dalšího koření z Indie. [13]

Dnes hraje koření největší roli v kulinářství k dochucování pokrmů a stává se čím dál dostupnějším. Obchod s ním je značně decentralizovaný, což znamená lepší dostupnost. Navíc s nástupem internetu stoupá poptávka a konzumace koření ze zahraničí i v běžných domácnostech. Pravděpodobně největším úspěchem pro koření v moderní době je prokázání jeho prospěšnosti pro lidské zdraví, což potvrzuje domněnky starodávných civilizací. [13]

Evropský dovoz koření činí asi čtvrtinu světového importu koření a bylinek (je skoro dvojnásobný oproti USA). Téměř 95 % importu koření do Evropy je uskutečňováno

z rozvojových zemí. Cena koření v Evropě je oproti ostatním regionům vysoká (např. oproti Asii dvojnásobná). Z pohledu rozvojových zemí je Evropa lukrativní trh. Výjimkou jsou bylinky, které jsou produkovány ve velkém množství i v Evropě (Francie, Itálie a Řecko). Největšími dovozci koření jsou Nizozemí, Německo, Francie (především madagaskarská vanilka) a Španělsko (chilli). [14]

Je zřejmé, že koření se přes svou starodávnou historii dostalo do každodenního života lidí. Stoupající popularitu koření u Evropanů potvrzují i roční objemy konzumace koření a bylinek, které v 21. století rostou. [15; 16]

S decentralizací trhu a nástupem dostupnosti stoupá četnost falšování koření. To nemusí nastat pouze přímo u zemědělce, ale může k němu dojít v jakémkoliv kroku, který leží mezi plantáží a talířem konzumenta (např. při procesu mletí u různých typů mletého koření, v procesu balení, u prodejce...). [4] Pro odhalení falšování koření je nutné znát složení koření a určit, ve kterých měřitelných parametrech se projeví falšování.

Je zřejmé, že zabývat se všemi druhy koření by bylo značně nad rámec rozsahu této práce. Z tohoto důvodu je následující kapitola zaměřena na pepř, kmín (římský), kurkumu, šafrán, sušenou papriku (chilli) a oregano. Výběr byl učiněn na základě dřívějších případů falšování těchto koření [12; 15] a na základě prvního koordinovaného plánu kontroly autenticity bylinek a koření v rámci Evropské unie. V tomto šetření se 21 členů EU spolu se Švýcarskem a Norskem zaměřilo právě na falšování zmíněných šesti druhů koření. Byly zjištěny nemalé podíly falšovaných vzorků, 6 % pro papriku, 11 % pro šafrán i kurkumu, 14 % pro římský kmín a 17 % pro pepř. Vůbec nejvyšší četnost byla zaznamenána pro oregano, kde 48 % vzorků bylo falšovaných. [11]

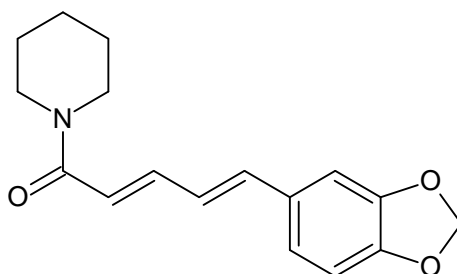
2.2.2. Vybrané druhy koření a jejich falšování

2.2.2.1 Pepř

Černý pepř (*Piper nigrum*) pochází z jižní Indie a je pěstován kvůli svému plodu, který je sušen, popř. následně mlet. [16] Pepř se stal běžnou součástí české kuchyně, proto má dlouhodobě své čestné místo na stole každé domácnosti hned vedle soli. Pálivost mu propůjčuje alkaloid piperin (Obr. 2), za jeho aroma jsou potom zodpovědné esenciální oleje. [16; 17] Esenciální olej z černého pepře lze získat destilací s vodní parou a jedná se o složitou směs látek sestávající především z monoterpenů, seskviterpenů a jejich oxidovaných forem a dalších látek různého charakteru. Obsah jednotlivých sloučenin není pevně daný druhem pepře, ale jejich obsah je závislý na místě původu a ročním období sběru.

Variabilita složení koření způsobená původem se projevuje u více druhů koření a mohlo by se tak jednat o užitečné vodítko při ověřování jejich původu. [18; 19] Je však důležité podotknout, že při ověřování autenticity původu koření poskytují mnohem spolehlivější výsledky metody zabývající se izotopovým složením jednotlivých koření než metody založené na stanovení funkčních chemických složek. [19] K analýze autenticity původu koření je třeba přistupovat velmi pečlivě, obezřetně a je důležité mít k dispozici vzorky s garancí původu.

Zajímavostí je, že zelený a černý pepř jsou stejný plod, avšak pouze v rozdílném stádiu oxidace. V důsledku enzymatické oxidace se tvoří fenolické sloučeniny, které jsou zodpovědné za tmavnutí.



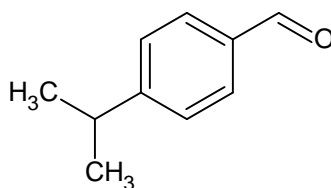
Obr. 2: Piperin

Zajímavým, avšak běžným adulterantem u pepře jsou semínka papáji. [20; 21]

2.2.2.2. Římský kmín

Římský kmín (*Cuminum cyminum*) pochází z oblasti Blízkého východu a z Indie, která je v současnosti jeho největším vývozcem. Nejčastěji se římský kmín prodává v podobě celých semen, dále v mleté formě, eventuálně ve formě esenciálního oleje. Je třeba rozlišovat římský kmín (ang. cumin) a kmín (ang. caraway), neboť se i přes vzhledovou podobnost nejedná o plod stejné rostliny a každá varianta má zcela odlišné aroma. [16]

Aroma římského kmínu je dáno především aldehydy a ketony, z nichž má největší zastoupení kuminaldehyd (Obr. 3), který je zodpovědný i za hořkost.



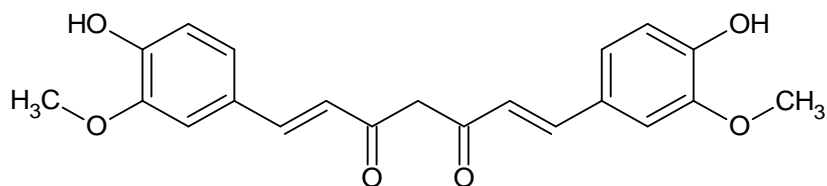
Obr. 3: Kuminaldehyd

V literatuře jsou zmínky o falšování římského kmínu různými typy ořechů (např. mandle či arašídy) [22] a jejich skořápkami. [23] Příměs ořechů do koření je extrémně nebezpečným hazardem, neboť se jedná o jeden z vůbec nejvíce frekventovaných a závažných alergenů. [24]

2.2.2.3. Kurkuma

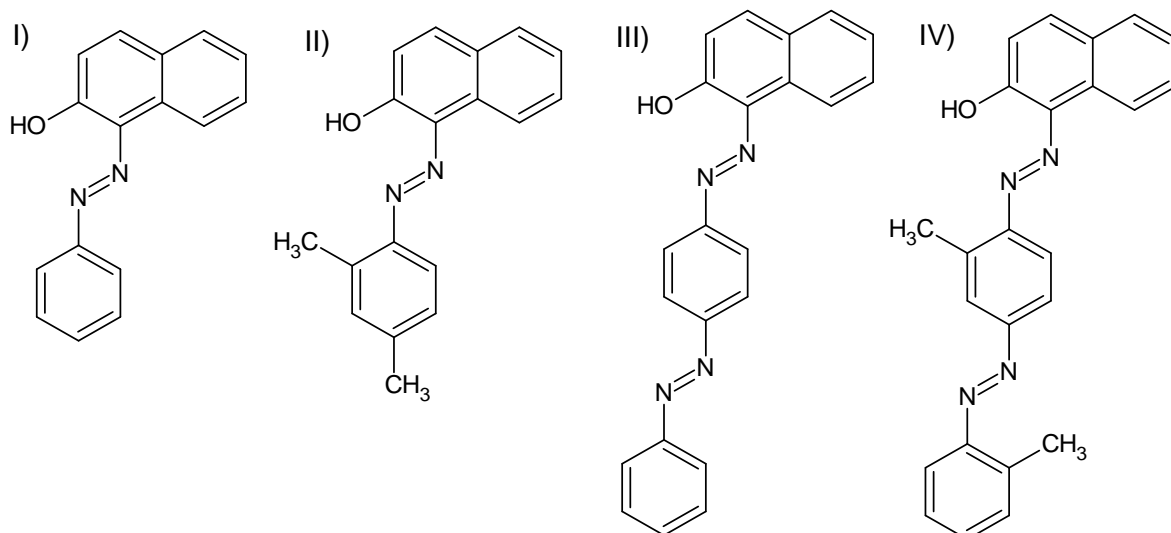
Kurkuma (*Curcuma longa*) je původem z Indie a ta je v dnešní době i největším vývozcem tohoto koření. Odtud pochází její označení indický šafrán. U kurkumy se využívá oddenek (zásobní část rostliny vznikající ze stonku – podzemní stonek). Kurkuma se dlouhodobě používá jako koření (především mletá, samostatně nebo jako složka kari koření), ale také jako součást náboženských rituálů hinduistů či jako barvivo, [16] kdy nahrazuje syntetická barviva (např. tartrazin). [25]

Hlavní aktivní složkou je oranžový kurkumin (Obr. 4). Za vůni jsou zodpovědné především ketony, seskviterpeny a alkoholy. Kurkumě jsou připisovány protizánětlivé, protirakovinné a antibakteriální účinky, proto našla uplatnění v tradiční čínské medicíně. Současné studie naznačují, že by kurkumin mohl hrát velmi důležitou roli ve spojení s nanomateriály v léčbě zánětlivých, rakovinných a dalších onemocnění způsobených oxidativním stresem. [16; 26]



Obr. 4: Kurkumin

Případy z minulosti poukazují na falšování kurkumy pomocí rozdílných druhů kurkumy [27]. Nechvalně známou příměsí kurkumy byly v minulosti silně karcinogenní azobarviva Sudan I-IV (Obr. 5). [28; 29] Obsah barviv je v potravinách striktně monitorován a od roku 2005 je zakázán dovoz kurkumy a chilli do EU bez certifikátu, že neobsahují daná barviva. [30] Další možnou příměsí je rozemletá křída. [31]



Obr. 5: I) Sudan I II) Sudan II III) Sudan III IV) Sudan IV

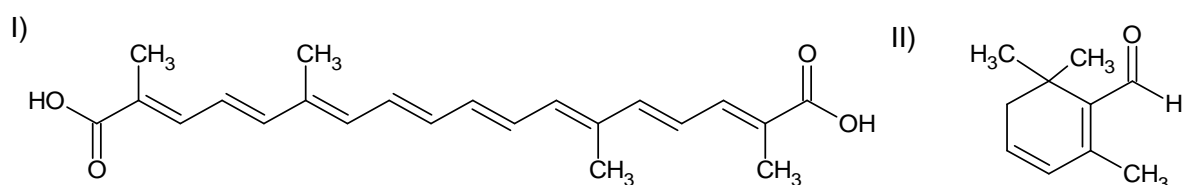
2.2.2.4. Šafrán

Šafrán (*Crocus sativus*) je nejdražší koření na světě. Cena se pohybuje okolo 10 eur za gram. [32] Vysoká cena pramení z náročnosti sběru. Květy šafránu musí být sbírány ručně brzy ráno těsně po otevření květu, kdy mají největší aroma, které by bylo ztraceno vlivem slunečního záření během dne. Koření šafrán navíc tvoří pouze červené pestíky (Obr. 6). Na každém květu jsou pouze tři. Hlavním producentem šafránu je dnes Írán. [33]

Senzoricky a biologicky aktivními komponentami šafránu jsou především krocetin (karotenoid s dvěma karboxylovými skupinami) a safranal, jejichž struktury jsou na Obr. 7. Jejich glykosidické formy se nazývají krocin (di-glykosyl ester krocetinu) a pikrokrocin (glykosid safranal). Krocetin je jako karotenoid zodpovědný za barvu, naopak safranal jako zástupce monoterpenů je zodpovědný za aroma. Šafránu jsou připisovány pozitivní efekty na problémy s trávicí soustavou, protirakovinné účinky a zkoumá se možné využití při léčení/zmírnění depresí. [34]



Obr. 6: Květ šafránu – převzato a upraveno z cit. [35]



Obr. 7: I) krocetin II) safranal

V současnosti je šafrán používán především jako koření, ale dlouhodobě je vyhledáván i kvůli barvení. Po vyluhování poskytuje zlatavě žlutou barvu, proto se šafránu někdy říká zlaté koření vzhledem k jeho vysoké ceně a barvě. Právě vysoká cena šafránu ho dělá atraktivním pro falšování. [34; 33] U šafránu bylo zaznamenáno falšování pomocí jiných částí rostliny (přimíchávání žlutých tyčinek k červeným pestíkům) či pomocí úplně jiné rostliny (např. kurkuma, světlice barvířská či gardénie jasmínovitá). [36; 37; 38]

2.2.2.5. Sušená paprika (chilli)

Sušená paprika, resp. chilli je koření připravené z jakéhokoliv druhu papriky seté (*Capsicum annuum*). Tradičně chilli označuje pálivý druh papriky. Hlavními producenty v Evropě jsou Maďarsko, Španělsko, dále blízké Turecko, ve světě je to pak Indie.

Nejvýznamnějšími chemickými skupinami v chilli jsou karotenoidy (dávají mu červenou barvu – především kapsantin a kapsorubin) a kapsaicinoidy (způsobují páliivost).

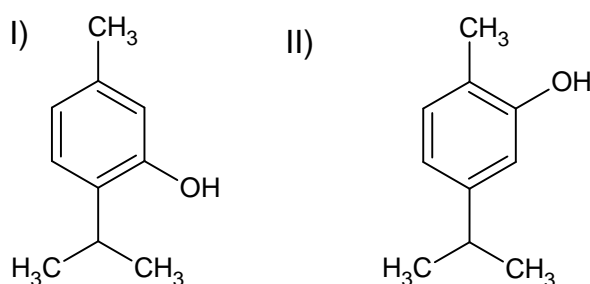
Karotenoidy jsou stabilní v čerstvém plodu, avšak v procesu sušení a mletí dochází k oranžovění vlivem oxidace. [16]

K falšování byla zneužívána barviva Sudan [39] nebo přidávána paprika jiného původu, než kterou uvádí prodejce. [40] Znamé je také falšování pomocí slupek z rajčat a nadrcené cihly. [12]

2.2.2.6. Oregano

Oregano (*Origanum vulgare*) nebo také dobromysl obecná je lidem známo několik století. Původně pochází ze Středomoří, odkud se postupně rozšířilo do celého světa. Hlavními chemickými komponentami dodávajícími aroma jsou thymol a karvakrol (Obr. 8).

Stejně jako u ostatních koření i u oregana a jeho esenciálního oleje jsou často zkoumány vlivy na lidské zdraví, především antibakteriální účinky. Samotný thymol se používá v parfémeh a mýdlech. [41]



Obr. 8: I) Thymol II) Karvakrol

Falšování oregana je rozsáhlé. V minulosti se autoři zabývali falšováním listy olivovníku. [11; 42; 43] Zjištěný podíl falšovaných vzorků (48 %) byl velmi vysoký. [11] Bylo by možné polemizovat, zda se skutečně jedná o falšování či o nedostatečnou separaci ve výrobním procesu. Při ověřování autenticity koření je třeba postupovat obezřetně a komplexně, brát v potaz výrobní proces a možné příměsi, které se jeho vlivem mohou v koření vyskytnout. Pokud se totiž nejedná o záměrné přidávání příměsí, nejedná se z právního hlediska o falšování. [3]

2.3. Analytické metody používané při kontrole koření

Způsobů falšování koření je mnoho. V některých případech se jedná o látky či materiály, pomocí kterých pachatelé falšují pouze jeden druh koření. Často však je určitá příměs zneužívána napříč rozdílnými druhy koření (barviva Sudan I-IV). Tato kapitola se zabývá metodami používanými pro odhalení falšování koření, jejich výhodami a nevýhodami. Upřednostňovány budou metody dovolující rychle a spolehlivě odhalit více příměsí v jednom vzorku, a to bez zdlouhavé úpravy vzorku a s minimální interferencí matrice koření.

Při kontrole falšování se uplatňují dva hlavní přístupy. První se orientuje na testování nepřítomnosti určité konkrétní příměsi. Hlavní nevýhodou je, že nezachytí neznámé či nové příměsi, výhodou je naopak schopnost detekovat sledované příměsi při relativně nízkých koncentracích. Druhým přístupem je sledování určité ingredience, která má být přítomna v deklarovaném množství. [5]

Norma upravující metody kontroly koření v České republice je ČSN 58 0110. Kontrolu šafránu upravuje norma ISO 3632. První část normy zavádí systém dělení šafránu do čtyř kategorií např. na základě výsledků ze stanovení kyselého rozpustného popelu, stanovení hořkosti (absorbance pikrokrocinu při 257 nm), absorbance safranalů při 330 nm, barvicí síla (absorbance krocinu při 440 nm). [44] V druhé části normy jsou zmíněny metody, mezi kterými jsou uvedeny také vizuální inspekce a mikroskopické vyšetření vzorku, [45] avšak taková analýza může být zdlouhavá a vyžaduje značnou zkušenost analytika. Z tohoto důvodu je třeba intenzivní výzkum pro nalezení efektivních metod, které by nebyly tak závislé na zkušenostech pracovníka. [15]

2.3.1. Metody založené na analýze DNA

Analýza DNA představuje rychlou, efektivní metodu pro detekci biologických příměsí v koření. Základní je metoda RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA – polymerase chain reaction), která je levná a umožňuje rozlišit biologické druhy mezi sebou. Její nevýhodou je však špatná reprodukovatelnost. Vylepšením je metoda SCAR-PCR (Sequence characterized amplified region – polymerase chain reaction), která replikuje pouze určité úseky DNA (SCAR markery). Její výhodou je lepší reprodukovatelnost a selektivita. [15]

Při detekci rostlinných příměsí šafránu se autorům podařilo odhalit sedm různých

složek v kontrolních vzorcích (např. kurkuma, měsíček lékařský či světlice barvířská), a to při obsahu od 1 % (m/m) výše. [46] V roce 2011 byly detekovány listy olivovníku v oreganu pomocí SCAR-PCR, a to i při obsahu pod 1 %. Hlavním omezením metody je nutnost extrakce DNA ze sušeného materiálu, a především vliv rušivých složek přítomných v matici (polysacharidy a sekundární metabolity – např. polyfenoly), které se spolusráží s DNA, čímž klesá dostupnost DNA pro enzymové reakce. [42] K. Dhanya a kol. se zabývali falšováním chilli pomocí červené řepy [47] a falšováním kurkumy odlišnými druhy kurkumy. [27]

Další metodou je využití „čárového kódu“ DNA (DNA barcoding), která je založená na sledování krátkého charakteristického úseku DNA v porovnání se známými úseky DNA jednotlivých druhů v knihovně (obdoba čárových kódů u zboží v obchodě). [48] Metoda odhalila falšování šafránu v Číně u každého třetího vzorku. [49]

Zmíněné metody analýzy DNA umožňují pouze kvalitativní analýzu, kvantitativní analýza většinou poskytuje výsledky s vysokou nejistotou měření. Další nevýhodou je nutná extrakce a ovlivnění výsledku čistotou extrahované DNA. [15]

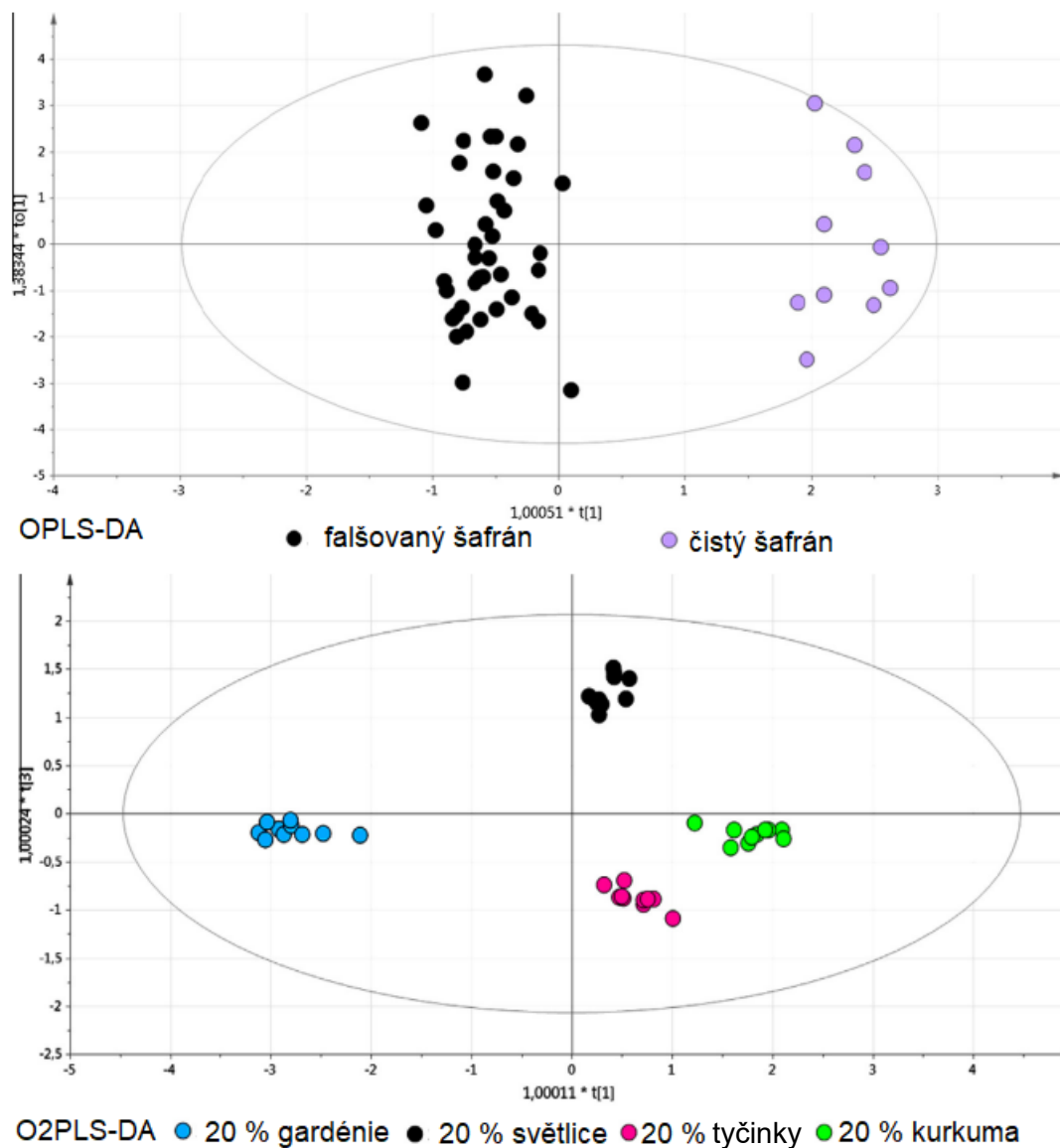
2.3.2. Spektrometrické metody založené na interakci látky s elektromagnetickým zářením

Spektrometrické metody spolu s chemometrií představují vhodné řešení pro rychlý a nedestruktivní screening falšování koření. Používá se infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), infračervená spektrometrie v blízké IR oblasti (FT-NIR), Ramanova spektrometrie [50] a nukleární magnetická rezonance (NMR). [36]

V minulosti byly publikovány práce zabývající se falšováním sušeného česneku, cibule a zázvoru pomocí kukuřičného škrobu. Techniky FTIR, NIR a Ramanova spektrometrie spolu s chemometrií úspěšně detekovaly až 35 % škrobu. [51; 52] FTIR a Ramanova spektrometrie poskytují více informací o struktuře látek než FT-NIR, u níž spektra obsahují pouze pásy vyšších harmonických frekvencí a kombinační pásy. Výhodou NIR je průnik záření do větší hloubky vzorku. Ramanova spektrometrie je vhodnější pro vzorky s vyšším obsahem vlhkosti (neruší signál vody) a umožňuje měřit bez porušení některých obalů. [15; 53]

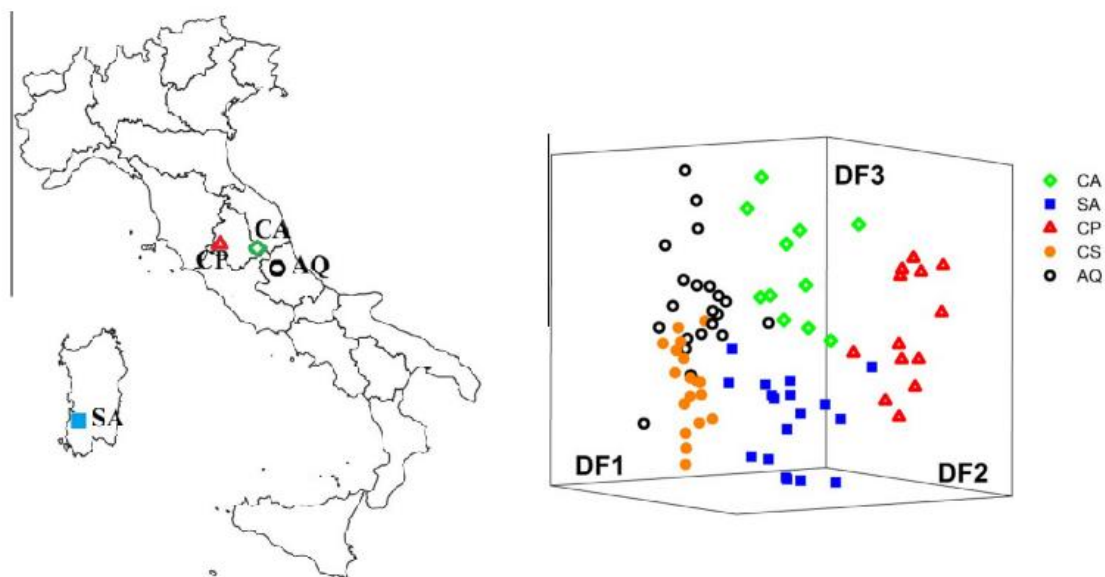
^1H – NMR ve spojení s chemometrickými metodami se ukázala účinná při ověřování autenticity např. šafránu. Získané výsledky byly reprodukovatelné, avšak hlavní nevýhodou byla zdlouhavější příprava vzorku. Autorům se podařilo odlišit pět skupin vzorků (Obr. 9)

(čistý šafrán a šafrán s 20 % (m/m) příměsí – tyčinky šafránu, kurkuma, gardénie jasmínovitá a světlice barvířská), tzn. nejen detekovat falšované vzorky, ale zjistit i způsob falšování. [36]



Obr. 9: OPLS-DA grafy pro vzorky zkoumané pomocí $^1\text{H-NMR}$ (nahore rozdělení na falšovaný a čistý šafrán, dole odlišení dle způsobů falšování) – převzato a upraveno z cit. [36]

Další spektrální technika UV-VIS spektrometrie se v oblasti detekce falšování koření využívá omezeně z důvodu nízké selektivity (absorpční pásy neposkytují dostatek informací o struktuře látek). Přesto UV-VIS spektrometrie ve spojení s lineární diskriminační analýzou (LDA) umožnila odlišit šafrán z rozdílných geografických lokalit. Chybovost analýzy byla okolo 15 %. [18] Rozdělení vzorků v 3D prostoru je na Obr. 10.



Obr. 10: Původ vzorků a jejich rozdělení v 3D prostoru pomocí tří diskriminačních funkcí (vzorky CS pochází z italských supermarketů) – převzato a upraveno z cit. [18]

Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV-VIS detekcí a PCA byly využity k detekci barviv Sudan I-IV v sušené paprice, kurkumě a kari. Falšované vzorky se odlišily od nefalšovaných, avšak nebylo možné rozpoznat barvivo použité k falšování. Využití statistické metody PLS-DA již umožnilo rozdělit jednotlivé skupiny od sebe s téměř 100% správností. [28]

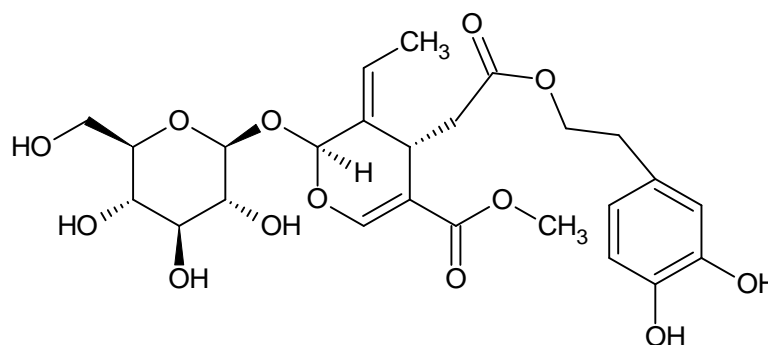
Spektrometrické metody jsou výhodné pro orientační, rychlou a relativně levnou analýzu. V některých případech je však výsledky nutné potvrdit, popř. blíže specifikovat další technikou s větší citlivostí, typicky hmotnostní spektrometrií. [15; 53]

2.3.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie představuje „zlatý standard“ při odhalování falšování potravin. Typické je spojení s plynovou chromatografií (GC-MS), kapalinovou chromatografií (LC-MS) a indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Dle zvolené techniky umožňuje analýzu molekul, prvků, ale také sledování izotopových poměrů. K jejím hlavním přednostem patří především vysoká selektivita, citlivost měření a v důsledku velmi nízké meze detekce. Často se používá jako potvrzující metoda. Hlavními nevýhodami jsou vysoká cena přístroje, provozní náklady a obtížná, ve většině případech nemožná, miniaturizace. [15]

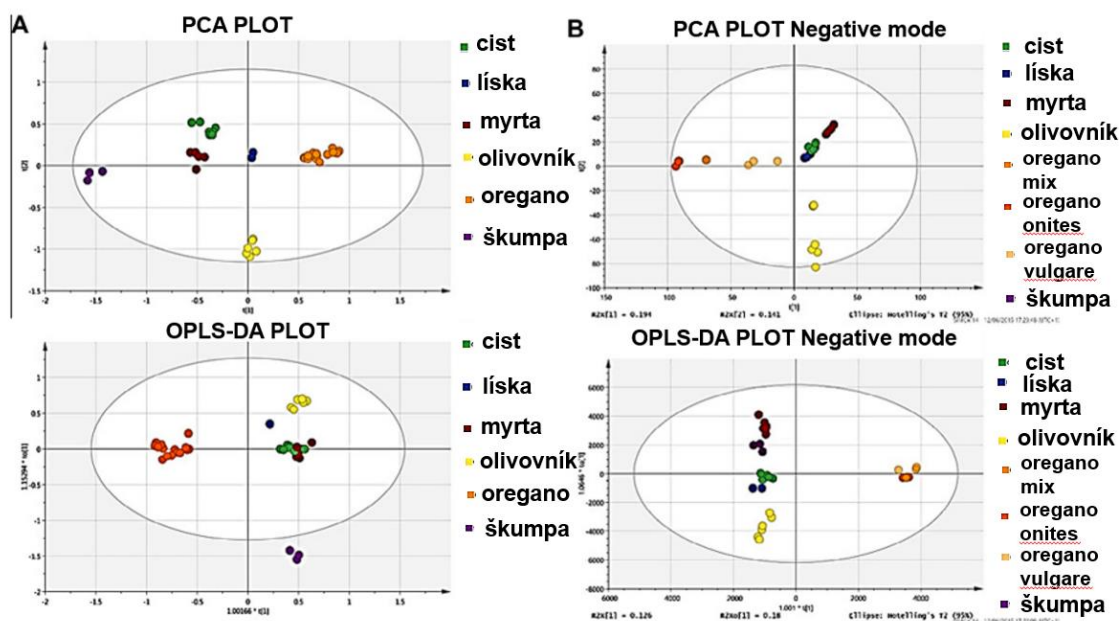
Spojením kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie byly detekovány

markery listů olivovníku, které se používají k falšování šalvěže a oregana. Podařilo se detekovat oleuropein (Obr. 11) jako marker olivových lístků v oreganu a šalvěži, vyvinout metodu na kvalitativní analýzu olivových lístků. Autoři vyhodnocovali příměs olivových lístků na základě přítomnosti či nepřítomnosti signálu deprotonované molekuly oleuropeinu, nevyužívali chemometrické metody. Kvantitativní analýza podle nich nebyla možná vzhledem k proměnlivému obsahu oleuropeinu v listech. [54]



Obr. 11: Struktura oleuropeinu (marker olivových lístků)

Na zmíněnou práci navázali C. Black, I. P. Chevallier a kol., kteří provedli dvoustupňové studium falšování oregana listy olivovníku, myrty, škumpy, cistu a lísky. Data získaná s využitím elektrospreje (ESI) a kvadrupólu v kombinaci s analyzátozem doby letu (QqToF) byla zpracována chemometrickými metodami – PCA a ortogonální diskriminační analýzou nejmenších čtverců (OPLS-DA). Při testování reálných vzorků zakoupených z internetu, Irsko a Spojeného království byl podíl falšovaných produktů 24 %. Pomocí FTIR se podařilo rozdělit vzorky do šesti skupin, u dat z LC-MS byla situace horší, protože jednotlivé skupiny se částečně překrývaly (Obr. 12). Překryv nastával u falšovaných vzorků, odlišení čistého oregana od falšovaného bylo úspěšné. Popsáno bylo několik biomarkerů charakterizujících jednotlivé skupiny. [55]



Obr. 12: PCA (nahore) a OPLS-DA (dole) grafy pro analýzu pomocí FTIR (sloupec A) a LC-MS (sloupec B) – převzato a upraveno z cit. [55]

To umožnilo další vývoj detekce falšování pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Podařilo se formulovat semikvantitativní modely nejen pro detekci, ale také stanovení množství příměsí v oreganu. Hlavní výhodou byl krátký čas analýzy, který činil 30 minut i s přípravou vzorku, vysoká selektivita, preciznost a nízké meze detekce a stanovitelnosti. Závislosti stanoveného množství příměsí a skutečného množství vykazovali vysoké koeficienty determinace ($R^2 > 0,988$). Necílenou analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokou rozlišovací schopností autoři odhalili i další příměsí (majoránku a saturejku) v zakoupených vzorcích. Studie vyzdvihuje nutnost necílené analýzy, protože pachatelé jsou schopni měnit své praktiky, přičemž nové postupy falšování nemusí být cílenou analýzou zjistitelné. [43]

J. Rubert a kol. použili kapalinovou chromatografii spolu s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro ověření autenticity původu šafránu. Jako iontové zdroje použili ESI a chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI). Podařilo se jim odlišit šafrán vypěstovaný a zabalený ve Španělsku s chráněným označením původu od šafránu neznámého původu pouze zabaleného ve Španělsku. Využity byly chemometrické metody PCA a OPLS-DA. Markerem byly glycerolfosfolipidy a jejich oxidované formy. [56]

Metoda GC-MS detekovala listy olivovníku v oreganu s detekčním limitem 1 %. Provedení analýzy sice bylo jednoduché a reprodukovatelné, ale nevýhodou byla analýza pouze těkavých olejů. Chromatografická separace trvala 50 minut, protože jako markery

autoři využili látky eluující okolo 37. a 44. minuty. Tyto látky nebyly identifikovány, ale autoři jim připisovali bifenolický charakter. [57]

S využitím ICP-MS se podařilo zjistit, že paprika pocházející z regionu Szegedi se vyznačuje charakteristickým izotopovým zastoupením pro stroncium, což dovoluje odhalit falsifikáty vydávající se za koření z tohoto regionu. [40]

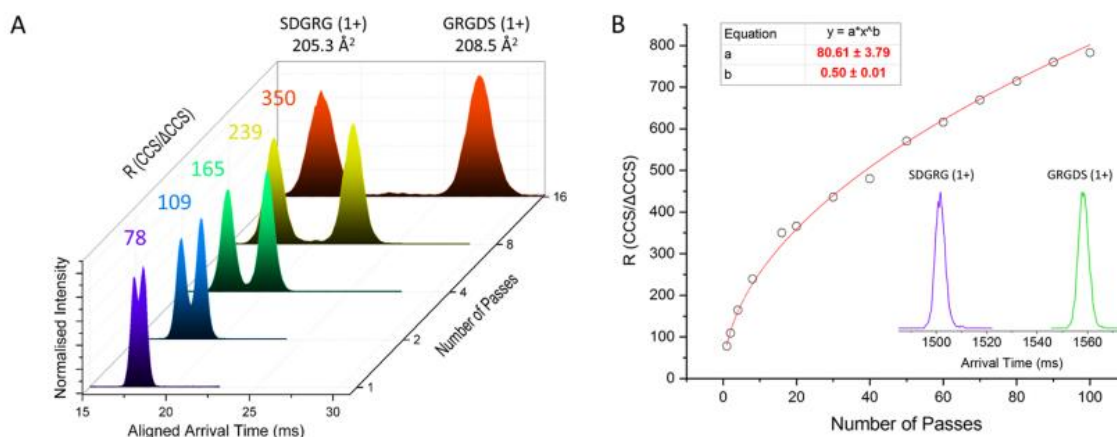
2.4. Role iontové mobility při analýze koření

2.4.1. Iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Iontová mobilita (IMS) je známá již přes 40 let, dříve se jí však říkalo plasmová chromatografie. Dnes se samotná iontová mobilita uplatňuje např. na letištích při kontrole výbušnin nebo ve farmaceutické analýze. Metoda je založena na dělení iontů v elektrickém poli za přítomnosti driftového plynu.

Spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií (IMS-MS) přineslo nové možnosti pro analýzu širokého spektra vzorků. Dnes se uplatňuje např. v biomedicinském výzkumu při hledání markerů některých onemocnění (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba...). Iontová mobilita je schopná odlišit rozdílně ionizované formy téže látky lišící se například polohou protonu. Takového dělení není samotná hmotnostní spektrometrie schopná. [58]

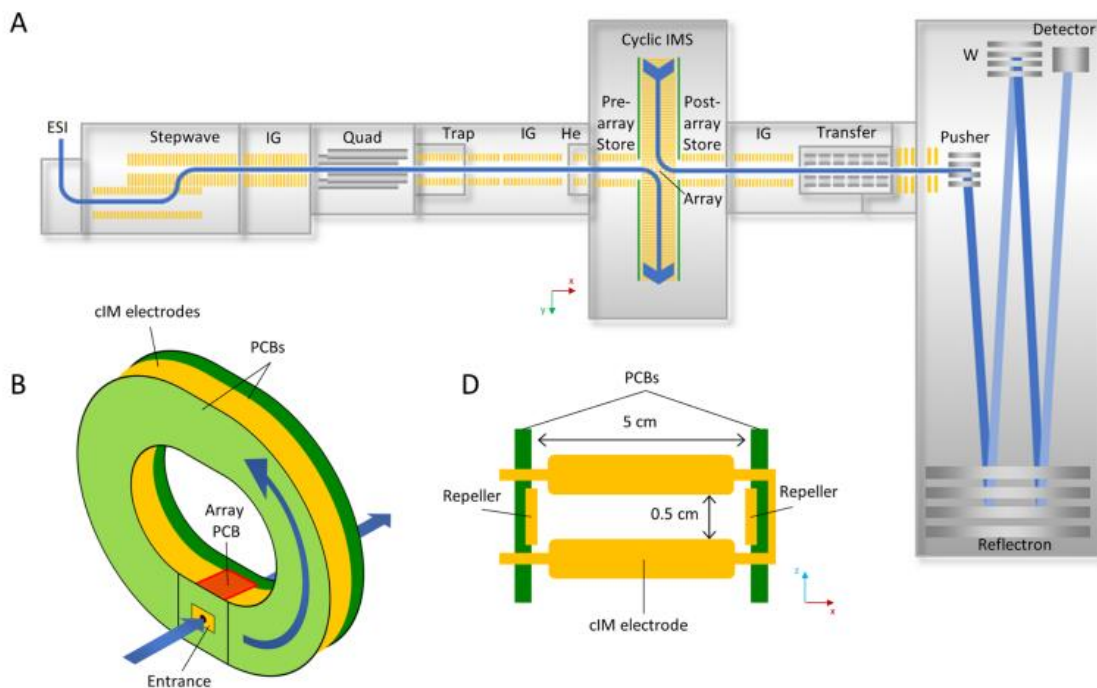
Naše laboratoř má k dispozici přístroj Select Series Cyclic IMS, který je vybaven cyklickou mobilitní celou. Výhodou takového uspořádání je možnost dosažení větší rozlišovací schopnosti (R). Ta je přímo úměrná délce dráhy iontu, kterou v cyklickém uspořádání lze opakovaným oběhem cyklu prodlužovat, přičemž R je úměrná \sqrt{n} , kde n je počet průchodů iontu mobilitní celou. Zlepšující se rozlišení bylo prokázáno měřením dvou izomerních pentapeptidů s reverzní sekvencí a m/z 491,2 (Obr. 13). Izolace iontovou mobilitou separovaných iontů a opětovný průchod zvoleného iontu celou se označuje jako IMS^n . Výsledkem je měření s lepší rozlišovací schopností, lepší separace iontů, a tedy lepší selektivita měření. Dále je R přímo úměrné vloženému napětí (intenzitě elektrického pole E) a náboji iontu (Q). Nepřímo úměrné je R teplotě driftového plynu. [59]



Obr. 13: Studium rozlišení dvou pentapeptidů s reverzní sekvencí – převzato z cit. [59]

Schéma přístroje je na Obr. 14 A. Jako iontový zdroj přístroj využívá elektrosprej (ESI). Ionty ze zdroje jsou vedeny přes optiku do kvadrupólu, který umožňuje první selekci iontů. Následuje úsek označený trap, který umožňuje fragmentaci iontů před vstupem do mobilní cely (cela je na Obr. 14 B a řez celou na Obr. 14 D). Ta je tvořena 608 cIM elektrodami ohraničenými deskami plošných spojů (PCB), které zajišťují požadovanou geometrickou strukturu a přívod napětí. Před a za mobilní celou jsou v přístroji umístěny prostory pro zachycení iontů před jejich dávkováním do cely, popř. po jejich vypuzení z cely. Vypuzení iontů před mobilní celou umožňuje jejich izolaci a experimenty IMSⁿ. Za mobilní celou je umístěna část označená transfer, která slouží jako druhá kolizní cela přístroje. Lze v ní provádět fragmentaci po separaci iontů iontovou mobilitou. Pro přesné určování hodnot m/z je přístroj vybaven analyzátozem doby lety (ToF) s vysokou rozlišovací schopností až kolem 100 000. [59]

Přístroj pracuje na principu putující vlny (TWIM), kdy ionty při průchodu vlny přístrojem „surfují“ na její přední části, než jsou vlnou předstiženy. Ionty s nižší mobilitou k průchodu mobilní celou potřebují větší počet vln, a tudíž putují přístrojem pomaleji. [59]



Obr.14: A – schéma přístroje Select Series Cyclic IMS, B – tvar a schématický popis mobilitní cely s elektrodami, D – schéma mobilitní cely na řezu – převzato z cit [59]

Dalším plusem přístroje je možnost hmotnostního zobrazování při využití desorpční ionizace elektrosprejem (DESI), což umožňuje sledovat rozložení sledovaného analytu ve vzorku. [60]

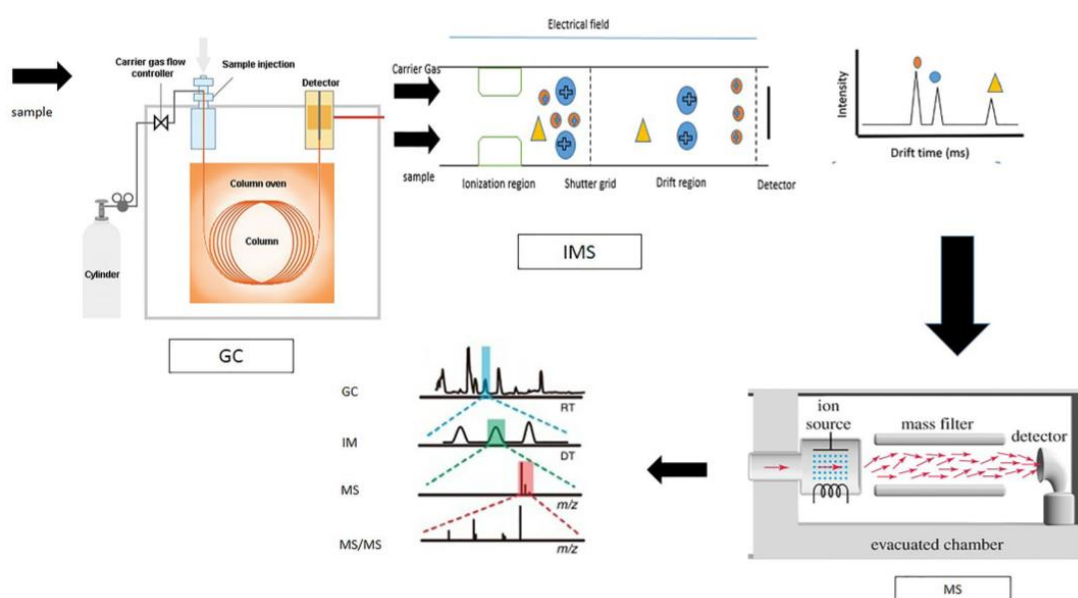
2.4.2. Současné poznatky o iontové mobilitě při kontrole falšování potravin

Iontová mobilita našla rozsáhlé využití ve forenzních vědách. Aplikace v potravinářství je zatím stále v počátcích, což se týká rovněž spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií (IMS-MS). IMS-MS se využívá především při omických přístupech (např. proteomika, metabolomika, lipidomika...). Při kontrole potravin našlo uplatnění při stanovení předem známých chemických individuí (cílená analýza) i při analýze neznámých molekul (necílená analýza). [61]

Vzhledem ke zlepšování rozlišovací schopností a zjednodušení hmotnostních spekter lze očekávat rychlý nárůst aplikací IMS. Současné aplikace IMS v analýze potravin se dělí na tři hlavní oblasti. První využívá samotné IMS, aplikace jsou omezeny na analýzy, kde nevádí nízká rozlišovací schopnost. Druhou oblastí je spojení IMS s chromatografickými technikami, kde slouží jako detektor. Třetí oblast zahrnuje předřazení kapalinové (LC)

či plynové chromatografie (GC) a přiřazení hmotnostního spektrometru za iontovou mobilitu. Vzniká tak spojení LC-IMS-MS a GC-IMS-MS, kde iontová mobilita např. zlepšuje selektivitu měření, odstup signálu od šumu nebo poskytuje další kvalitativní charakteristiku látek, kterou je srážkový průřez (collision cross section, CCS). CCS charakterizuje pravděpodobnost srážky (interakce) iontu s driftovým plynem a souvisí s tvarem a velikostí molekuly. [61] Schéma uspořádání GC-IMS-MS je na Obr. 15.

Při ověřování autenticity potravin byly vyvíjeny především metody založené na detekci těkavých a semitěkavých sloučenin obvykle využívající spojení GC-IMS. Jednalo se například o kontrolu autenticity olivových olejů. Podařilo se odlišit tři kategorie olivových olejů pomocí IMS s UV ionizací a GC-IMS. Celkový čas analýzy byl 18 resp. 15 minut. [62]



Obr. 15: Schéma multidimenzionálního spojení GC-IMS-MS – převzato z cit. [63]

Dále bylo spojení GC-IMS využito k ověřování pravosti iberské šunky pomocí headspace analýzy. Autoři srovnávali cílenou a necílenou analýzu. Podařilo se odlišit vzorky autentické šunky pocházející z prasat ve volném výběhu krmených žaludy a trávou a šunky z prasat krmených koncentrovaným krmivem. Cílená analýza pomocí několika markerů rozdělila validační vzorky se 100% správností, necílená analýza zařadila jeden vzorek chybně, ve výsledku rozdělila vzorky s 90% správností. [64]

Dalším příkladem aplikace GC-IMS je kontrola botanického původu medu, kde se autoři snažili nahradit pomalé $^1\text{H-NMR}$ profilování využívvané pro tento účel. [65]

Pro kontrolu falšování potravin bylo využito spojení GC-IMS s chemometrií např. v případě medu, [66] sezamového oleje [67] a lněného oleje. [68]

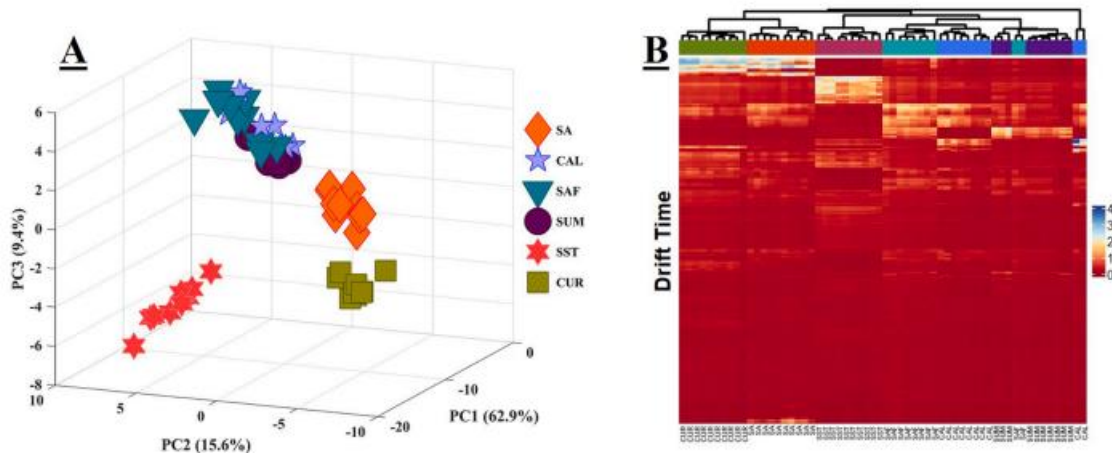
Spojení LC-IMS-MS bylo aplikováno pro ověřování červených vín z Makedonie. Pro charakterizaci jednotlivých druhů vín sloužily retenční časy, přesné hmotnosti a CCS, jako další identifikační charakteristika. Po zpracování dat metodou PCA se podařilo odlišit jednotlivé druhy vína. [69]

Největší část prací je zaměřena na falšování olivového oleje. Širší uplatnění iontové mobility, ať už samotné nebo ve spojení s jinými technikami, při kontrole falšování potravin ještě stále čeká na vývoj vhodných metod a postupů. [61; 63]

2.4.3. Využití iontové mobility pro kontrolu falšování koření

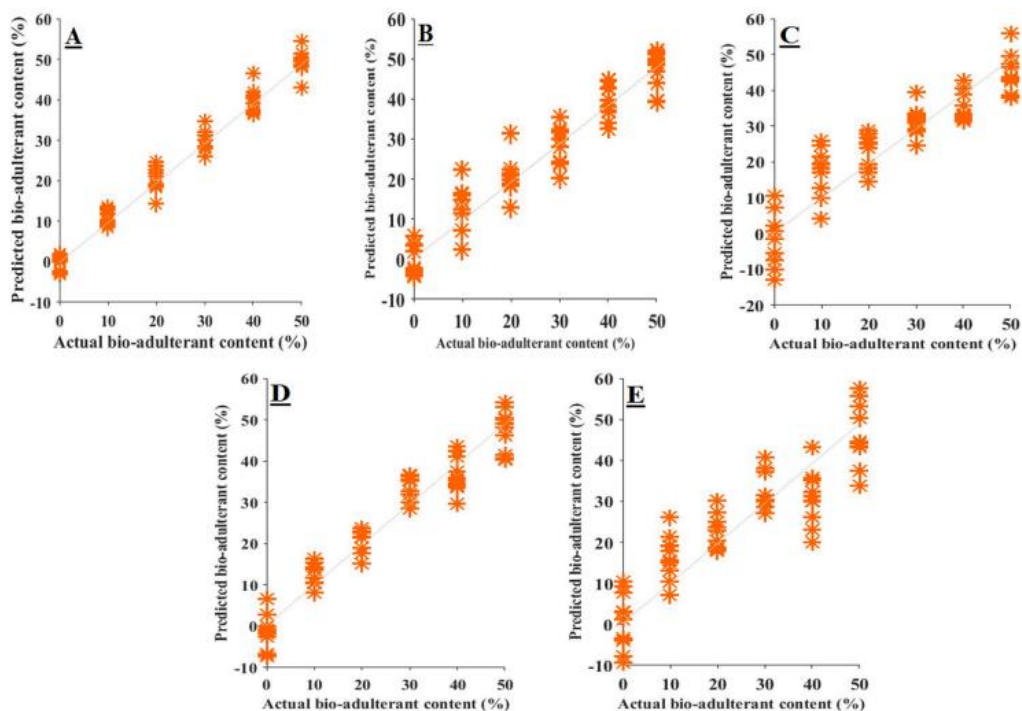
Využití IMS v kontrole falšování koření je zatím v počátcích, kdy této problematice byly doposud věnovány tři články.

První publikovaný v roce 2022 je zaměřen na detekci biopříměsí v šafránu (SA). Konkrétně se jedná o pět příměsí – okvětní lístky kalenduly (CAL), okvětní lístky světlice barvířské (SAF), škumpu (SUM), tyčinky šafránu (STT) a nakonec kurkumu (CUR). Použitý přístroj byl IMS-CDI-300, TOF Tech Pars Co., Ltd, Isfahan, Iran. Po ionizaci korónovým výbojem (CDI) probíhalo měření iontovou mobilitou v pozitivním módu. Podařilo se detekovat falšovaný šafrán a sestavit kalibrační model pro množství příměsí v rozsahu 0 % až 50 %. Autoři použili chemometrické metody analýzy hlavních komponent (PCA) a hierarchické klastrové analýzy (HCA) pro kvalitativní analýzu (Obr. 16) a chemometrickou metodu PLSR v případě kvantitativní analýzy (Obr. 17). Odlišení falšovaného šafránu a čistého šafránu bylo úspěšné pomocí PCA i HCA. Problém nastal při rozlišení falšování světlicí barvířskou (SAF), kalendulou (CAL) a škumpou (SUM), a to v PCA i v HCA.



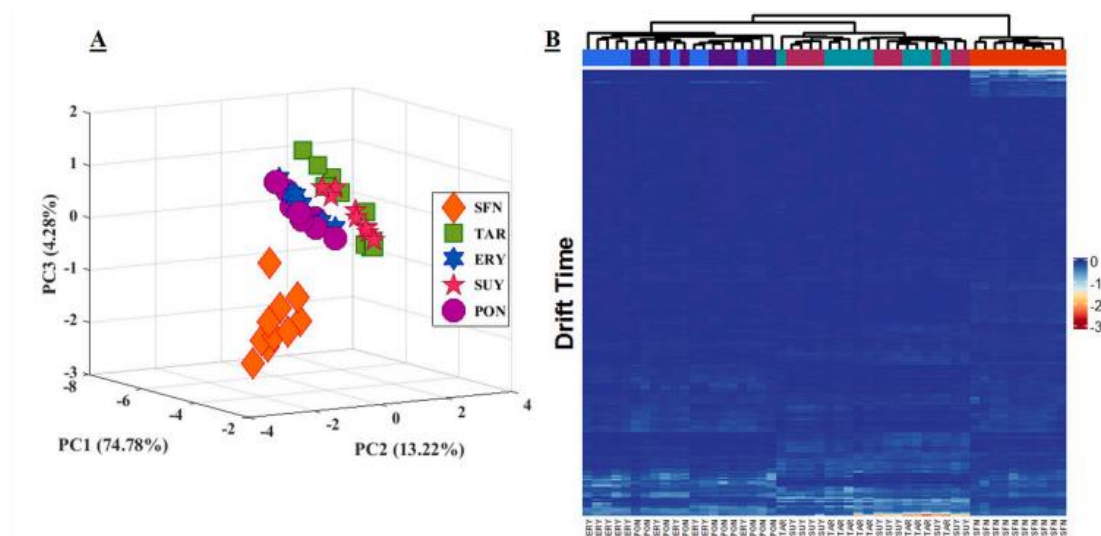
Obr. 16: Výsledky chemometrických metod PCA (A) a HCA (B) – převzato z cit. [38]

Hlavní výhodou, již autoři vyzdvihují, byla rychlá separace (v rámci milisekund), celková doba měření v rámci sekund, krátká a jednoduchá extrakce (okolo 40 minut). Autoři zjistili, že stanovení kurkumy v šafránu pomocí IMS bude problematické, neboť pro tuto příměs metoda poskytovala nejhorší koeficient determinace pro závislost množství stanovené vyvinutou metodou a reálného množství příměsi (graf viz Obr. 17). [38]



Obr. 17: Graf závislosti naměřeného množství příměsi a skutečného množství (A-SAF, B-SST, C-CAL, D-SUM, E-CUR) – převzato z cit. [38]

V roce 2023 stejní autoři publikovali článek zaměřený na detekci syntetických potravinářských barviv v šafránu (jednalo se o barviva – tartrazin, žlutí SY, košenilová červená A, erythrosin). Úspěšně se povedlo odlišit falšovaný šafrán od čistého a stanovit množství příměsi pomocí iontové mobility spolu s chemometrickými metodami (PCA, HCA a PLSR). [70] Výsledky PCA a HCA jsou na Obr. 18. Je zřejmé, že rozpoznání přidaného barviva bylo problematické a autorům se nepodařilo jednotlivé skupiny oddělit.



Obr. 18: Grafy chemometrických metod PCA (A) a HCA (B)

Nejnovější výzkum z roku 2024 zkoumá možnosti spojení headspace analýzy s GC-IMS (HS-GC-IMS) pro detekci olivových lístků v oreganu. Autoři zvolili necílenou analýzu těkavých organických sloučenin (VOC), kdy identifikovali celkem 30 VOCs (např. oleuropein, karvakrol, thymol, linalool a další), z nichž 24 splňovalo podmínky pro stanovení pomocí kalibračních závislostí. Separace plynovou chromatografií s teplotním gradientem trvala 20 min. Iontově mobilní separace byla prováděna v dusíku jako driftovém plynu, v pozitivním módu při teplotě 90 °C a konstantním napětí 500 Vcm⁻¹. K zpracování dat byly využity chemometrické přístupy, OPLS-DA pro detekci falšovaných vzorků a metoda PLS pro stanovení procenta příměsi olivových lístků. Z celkem 15 komerčně zakoupených vzorků dva byly falšovány s příměsí 31 a 43 %. [71]

Z uvedeného je zřejmé, že potenciál IMS doposud nebyl při zkoumání falšování koření plně využit. IMS zejména ve spojení s MS se může stát komplementární metodou, která může nabídnout rychlé analýzy a široké uplatnění pro nejrůznější typy koření.

Vzhledem k tomu, že iontová mobilita s hmotnostní spektrometrií doposud nebyla využita při kontrole falšování koření, výzkum zaměřený na problematiku detekce kurkumy

v šafránu a olivových lístků v oreganu popsaný v této práci může naznačit možnosti IMS-MS a přispět k zájmu o její využití ve studované oblasti.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístroje a pomůcky

Experimenty byly prováděny na přístroji Select Series Cyclic IMS (Waters, Wilmslow, UK) spojující Q-ToF s cyklickou iontovou mobilitou. Analyty byly ionizovány elektrosprejem (ESI) v negativním, popř. pozitivním módu. Zředěné a filtrované roztoky vzorků a standardů byly do přístroje zaváděny přímou infuzí s průtokem 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Rozdrcené koření bylo navažováno na vahách Mettler Toledo XSE205 Dual Range (Mettler-Toledo, Praha, České republiky). Při extrakci byla využita ultrazvuková lázeň S40H Elmasonic (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Německo). Centrifugace probíhala v přístroji Hettich Mikro 120. Veškeré odměřování objemů bylo realizováno pomocí automatických pipet.

3.2. Vzorky a použité chemikálie

Vzorky koření byly zakoupeny z internetových obchodů nebo místních obchodů. Šafrán byl objednan ve formě sušených pestíků. Kurkuma byla objednána v mleté formě. Oregano a olivové lístky byly dodány v nadrcené formě. Po otevření balení byly vzorky uchovávány v suchu a mimo svit slunečního záření či laboratorního osvětlení.

Veškerá voda v experimentech byla LC-MS kvality, methanol OPTIMA LC-MS kvality, $\geq 99,9\%$, kyselina mravenčí OPTIMA LC-MS kvality, $99,0 +\%$, vše od firmy Fisher Chemical (Pardubice, Česká republika). Kyselina octová měla čistotu $\geq 99\%$ a byla zakoupena u firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika). Standard kurkuminu, demethoxykurkuminu a bisdemethoxykurkuminu byl zakoupen od firmy Thermo Scientific (Pardubice, Česká republika), jednalo se o směs všech tří látek s čistotou $\geq 98\%$. Dusičnan sodný byl kvality p.a od firmy PENTA (Ing. P. Švec, Česká republika). Chlorid lithný měl čistotu $\geq 99,0\%$ a byl od firmy BioXtra, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika).

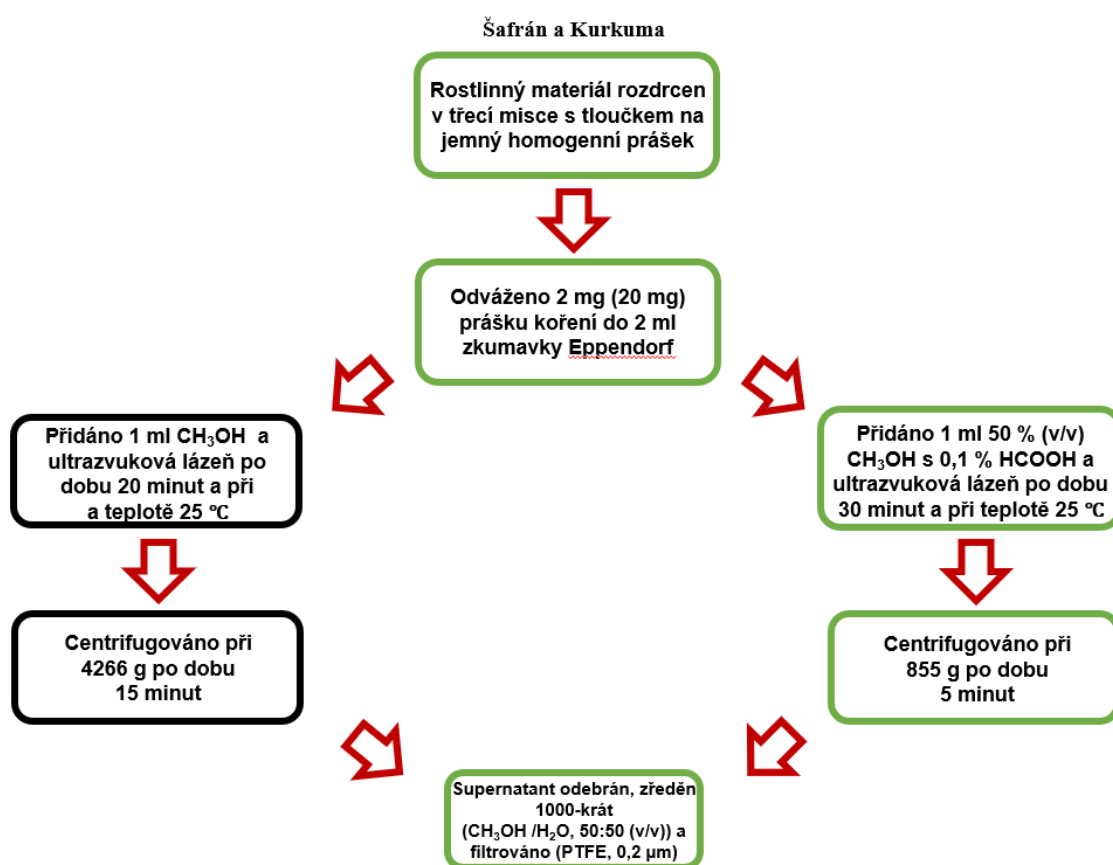
3.3. Pracovní postup

3.3.1. Příprava roztoků pro testování extrakčních činidel

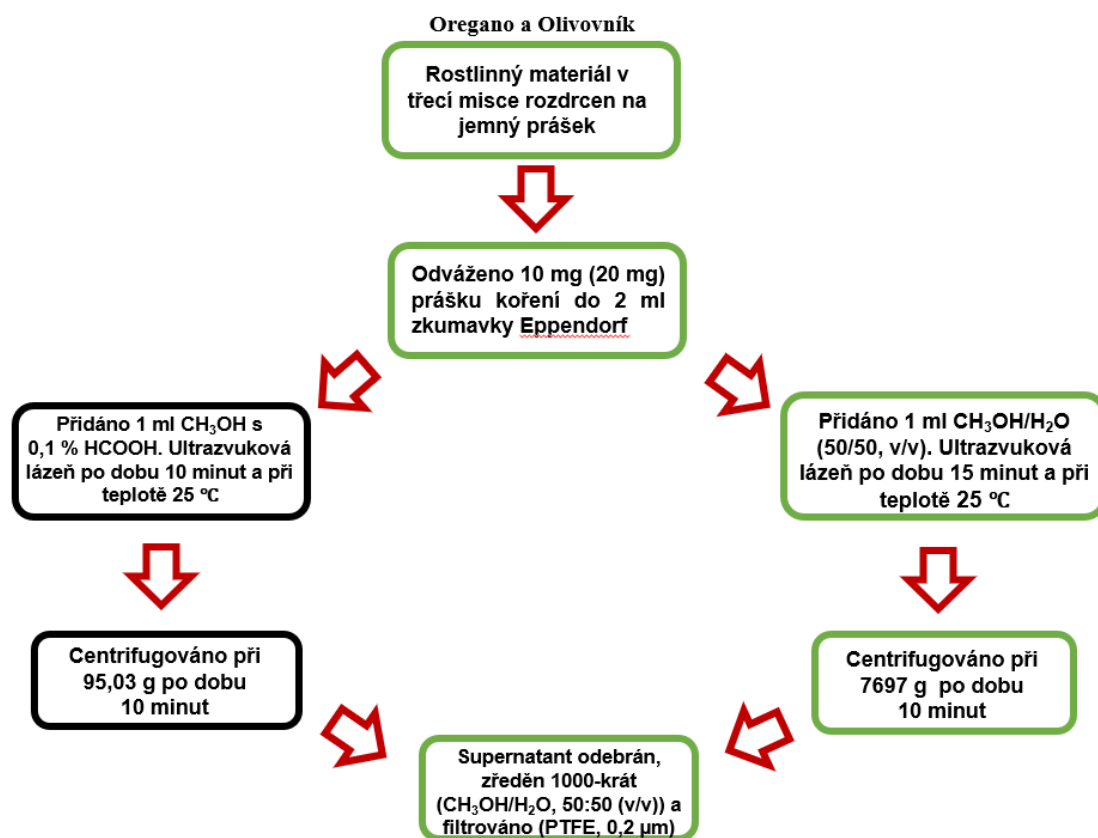
Jednotlivé druhy koření byly vždy zvlášť drceny na jemný prášek pomocí třecí misky s tloučkem. Získaný prášek byl navažován do 2 ml zkumavek typu Eppendorf. K navážce byl přidán 1 ml extrakčního činidla, extrakce probíhala v ultrazvukové lázni a následně

proběhla centrifugace. Po centrifugaci byl extrakt zředěn a zfiltrován (další informace k extrakčním postupům jsou uvedeny na Obr. 19 a Obr. 20).

Testovány byly dva extrakční postupy pro obě dvojice koření – příměs. Publikované postupy [55; 72; 38; 73] byly modifikovány, přičemž objem extrakčních činidel byl upraven na 1 ml, aby bylo možné extrakci provádět ve 2 ml zkumavkách typu Eppendorf, které lze přímo centrifugovat. Dále bylo upraveno navažované množství (2 mg pro kurkumu a šafrán, 10 mg pro olivovník a oregano), aby bylo možné srovnat účinnost dvou extrakčních činidel mezi sebou. Připraven byl rovněž roztok standardu kurkuminu, demethoxykurkuminu a bisdemethoxykurkuminu (směs) o koncentraci 1 µg/ml v CH₃OH/H₂O (50:50, v/v). Připravené vzorky byly změřeny pomocí IMS-MS v negativním módu.



Obr. 19: Schéma přípravy pro šafrán a kurkumu [38; 73]



Obr. 20: Schéma přípravy pro oregano a olivovník [55; 72]

3.3.2. Příprava pracovních roztoků pro testování ionizace kurkuminu v pozitivním módu

Byl připraven standardní roztok směsi standardů kurkuminu, demethoxykurkuminu a bisdemethoxykurkuminu o celkové koncentraci 1 mg/ml v CH₃OH. Z tohoto roztoku byly postupně připravovány jednotlivé pracovní roztoky vždy o koncentraci 1 µg/ml. Základní pracovní roztok měl složení CH₃OH/H₂O (50/50, v/v); poté byl testován přídavek kyseliny mravenčí, složení roztoku bylo CH₃OH/H₂O/HCOOH (50/49/1, v/v). Následně byl testován přídavek Li⁺ a Na⁺ iontů – jejich konečná koncentrace v pracovním roztoku CH₃OH/H₂O (50/50, v/v) byla 0,1 mmol/l. V neposlední řadě byl testován vliv kyseliny octové, kdy roztok zaváděný do iontového zdroje byl CH₃OH/H₂O/CH₃COOH (50/49/1, v/v), a vliv kyseliny octové spolu s mravenčí (CH₃OH/H₂O/CH₃COOH/HCOOH (500/490/9/1, v/v)). Pro ověření účinnosti ionizace kurkuminu extrahovaného z kurkumy bylo naváženo zvlášť 2 mg kurkumy a poté 1,6 mg šafránu s 0,4 mg kurkumy do 2 ml vialek typu Eppendorf (simulace falšování na úrovni 20 %). Tato množství rostlinného materiálu byla extrahována a následně ředěna 1000-krát do finálních pracovních roztoků. S uvedenými pracovními roztoky byly prováděny experimenty za účelem zlepšení ionizace kurkuminu v pozitivním módu.

3.3.3. Příprava modelových směsí pro zjištění příměsí

Jednotlivé vzorky koření byly vždy zvlášť podrobeny drcení na jemný prášek pomocí třecí misky s tloučkem. Z důvodu možnosti nehomogenity rostlinného materiálu a obtížného navažování přesného množství koření pod 1 mg bylo zvoleno navažování přibližně 20 mg každého rozetřeného koření zvlášť do 2 ml zkumavek typu Eppendorf. Vzorky byly extrahovány výše uvedenými postupy (viz Obr. 19 a Obr. 20). Po zhodnocení extrakčních činidel byl pro šafrán s kurkumou zvolen postup využívající CH₃OH/H₂O (50/50, v/v) + 0,1 % HCOOH a pro oregano s olivovými lístky postup s CH₃OH/H₂O (50/50, v/v). Po extrakci bylo následně odebíráno 100, 95, 90, 80 a 0 µl extraktu šafránu (resp. oregana) a k těmto objemům bylo přidáno 0, 5, 10, 20 a 100 µl extraktu kurkumy (resp. olivových lístků). Takto namíchané roztoky simulují příměs (falšování) na úrovni 0, 5, 10, 20 a 100 %. Z nich byly připraveny 200-krát zředěné pracovní roztoky pro šafrán a kurkumu a 1000-krát zředěné pro oregano a olivové lístky. Pro šafrán a kurkumu bylo po ověření ionizace zvoleno složení pracovního roztoku CH₃OH/H₂O/CH₃COOH (50/49/1, v/v) a pro oregano s olivovými lístky CH₃OH/H₂O (50/50). Pro ověření účinnosti extrakce markerů kurkumy,

resp. olivových lístků přímo ze směsi rostlinných materiálů bylo naváženo 1,8 mg šafránu (9 mg oregana) a 0,2 mg kurkumy (1 mg olivových lístků) do 2 ml vialek typu Eppendorf (simulace falšování na úrovni 10 %). Tato množství rostlinného materiálu byla extrahována a následně ředěna 1000-krát do finálních pracovních roztoků, pro šafrán a kurkumu směsí $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (50/49/1, v/v), pro oregano s olivovými lístky směsí $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50). Takto připravené vzorky byly proměřeny pomocí IMS-MS, IMS-MS s izolací iontu markeru a IMS-MSMS (izolace a fragmentace iontů markeru). Šafrán s kurkumou byly měřeny v pozitivním módu a oregano s olivovými lístky v negativním módu.

3.3.4. Příprava reálných vzorků koření od různých výrobců

Jednotlivé vzorky koření byly zakoupeny v supermarketech či objednány z webových obchodů. Vzorky byly homogenizovány v třecí misce s tloučkem. Od každého vzorku bylo navažováno přibližně 20 mg koření do 2 ml zkumavek typu Eppendorf. Vzorky byly extrahovány zvolenými postupy (viz Obr. 19 a Obr. 20, označeno zeleně). Pro šafrán a kurkumu bylo finální zředění 200-krát směsí $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (50/49/1) a pro oregano a olivovník bylo použito ředění 1000-krát směsí $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50, v/v).

3.4. Měření spojením iontové mobility s hmotnostní spektrometrií

Přístroj byl před měřením kalibrován v rozsahu od 50 do 1200 m/z pomocí 0,5 mM-HCOONa v propan-2-ol/ H_2O (90/10, v/v). Všechny pracovní roztoky byly do přístroje zaváděny přímou infuzí s průtokem 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Měření pro výběr extrakčního postupu bylo prováděno v negativním módu (nastavení Tab. 1 a Tab. 2). Měření pro zlepšení ionizace kurkuminu bylo prováděno v pozitivním módu. Následně byla veškerá měření pro oregano a olivovník prováděna v negativním módu a pro šafrán a kurkumu v pozitivním módu (nastavení Tab. 3 a Tab. 4).

Tab. 1: Nastavení elektrospreje pro negativní mód

Parametr (jednotka)	Zvolená hodnota
napětí na sprejovací kapiláře [kV]	2
teplota zdroje [°C]	100
napětí na kónusu [V]	40
offset zdroje [V]	10
desolvatační teplota [°C]	250
průtok plynu kónusem [l/h]	0
tlak zmlžovacího plynu [bar]	6
průtok desolvatačního plynu [l/h]	800

Tab. 2: Nastavení iontové mobility pro negativní mód

Parametr (jednotka)	Zvolená hodnota
výška putující vlny [V]	22
počet vyslání iontů do ToF na bin [-]	3
rychlost putující vlny [m/s]	375
doba na separaci (před otevřením výstupu z mobility cely do ToF) [ms]	2

Tab. 3: Nastavení elektrospreje pro pozitivní mód

Parametr (jednotka)	Zvolená hodnota
napětí na sprejovací kapiláře [kV]	2,50
teplota zdroje [°C]	100
napětí na kónusu [V]	40
offset zdroje [V]	10
desolvatační teplota [°C]	250
průtok plynu kónusem [l/h]	30
tlak zmlžovacího plynu [bar]	6
průtok desolvatačního plynu [l/h]	600

Tab. 4: Nastavení iontové mobility pro pozitivní mód

Parametr (jednotka)	Zvolená hodnota
výška putující vlny [V]	15
počet vyslání iontů do ToF na bin [-]	2
rychlost putující vlny [m/s]	375
doba na separaci (před otevřením výstupu z mobility cely do ToF) [ms]	2

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. Volba extrakčního postupu a ovlivňování ionizace

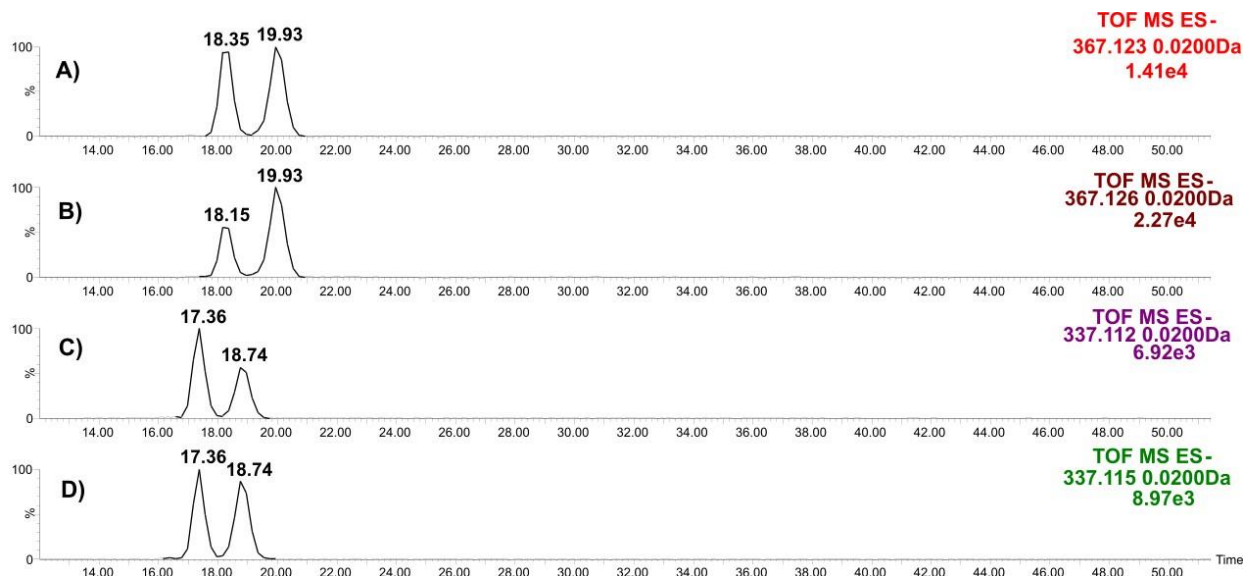
4.1.1. Šafrán a kurkuma

Kurkuma byla extrahována postupy popsány v experimentální části (Kap. 3.3.1.). Vhodnost extrakce byla posuzována na základě signálů deprotonovaných molekul kurkurminu a demethoxykurkurminu (markery kurkurmy) v hmotnostním spektru (intenzita píku) a mobilogramu (plocha píku) pro danou hodnotu m/z (Tab. 5). U ploch píků jsou uvedeny dvě hodnoty, protože kurkumin a demethoxykurkumin jsou přítomny ve formě dvou izomerů, které jsou v iontové mobilitě separovány (Obr. 21).

Tab. 5: Markery kurkurmy v šafránu (zvoleny dle cit. [73])

Marker	Extrakční rozpouštědlo	Teoretická hodnota m/z [M-H] ⁻	Intenzita v hmotnostním spektru	Plocha píku na mobilogramu
Kurkumin	CH ₃ OH	367,1182	$2,09 \cdot 10^4$	7547 + 8660
Kurkumin	CH ₃ OH /H ₂ O (50/50, v/v) s 0,1 % HCOOH	367,1182	$2,78 \cdot 10^4$	7105 + 14010
Demethoxykurkumin	CH ₃ OH	337,1076	$6,97 \cdot 10^3$	3487 + 2365
Demethoxykurkumin	CH ₃ OH /H ₂ O (50/50, v/v) s 0,1 % HCOOH	337,1076	$1,15 \cdot 10^4$	4296 + 4669

U obou markerů je viditelný nárůst signálů při použití extrakčního rozpouštědla CH₃OH /H₂O (50/50, v/v) s 0,1 % HCOOH. Změna signálu byla různá pro jednotlivé izomery. Příčinou by mohl být odlišný výtěžek extrakce, popř. účinnost ionizace pro jednotlivé izomery. Je vhodné zmínit, že pozadí v hmotnostních spektrech lze významně snížit pomocí iontové mobility (Obr. 22). Lze pozorovat „vyčištění“ hmotnostního spektra od iontů s nízkou hodnotou m/z při vykreslení z píku při 19,93 ms, naopak při vykreslení z píku při 18,15 ms jsou ze spektra odfiltrovány ionty s vyšší hodnotou m/z.

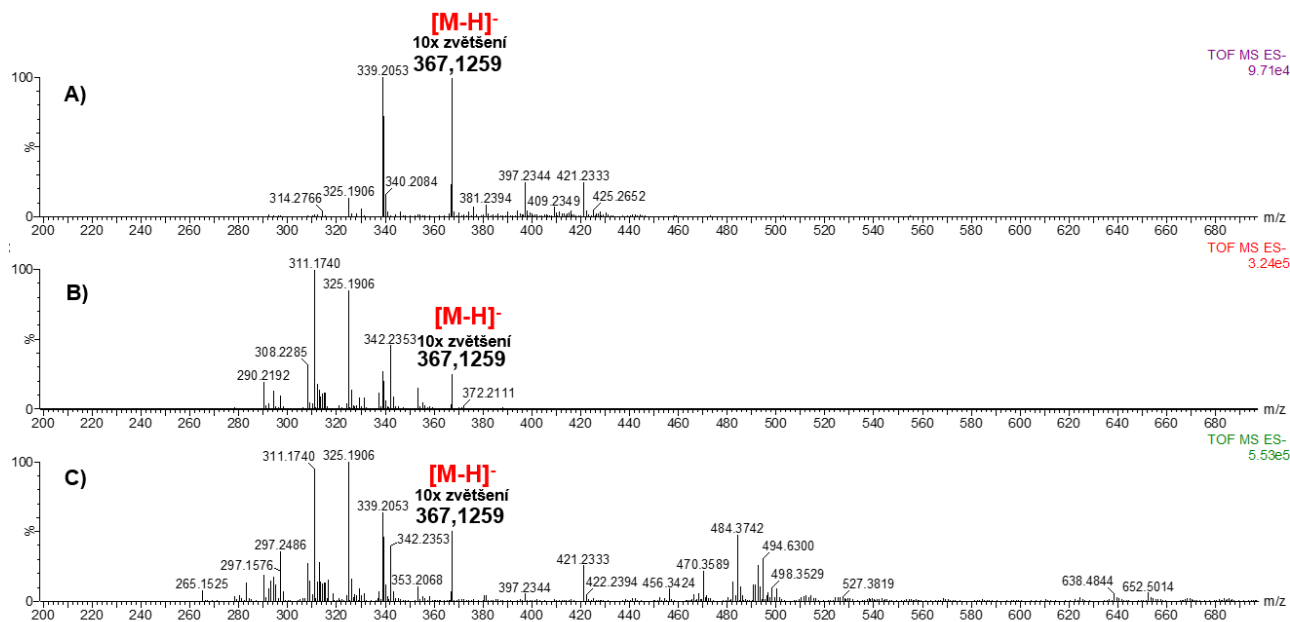


Obr. 21: Separované izomery kurkuminu - mobilogram pro m/z 367,12

(A – extrakce s CH₃OH, B – extrakce s CH₃OH/H₂O s 0,1 % HCOOH)

a demethoxykurkuminu - mobilogram pro m/z 337,11

(C – extrakce s CH₃OH, D - extrakce s CH₃OH/H₂O s 0,1 % HCOOH) v negativním módu



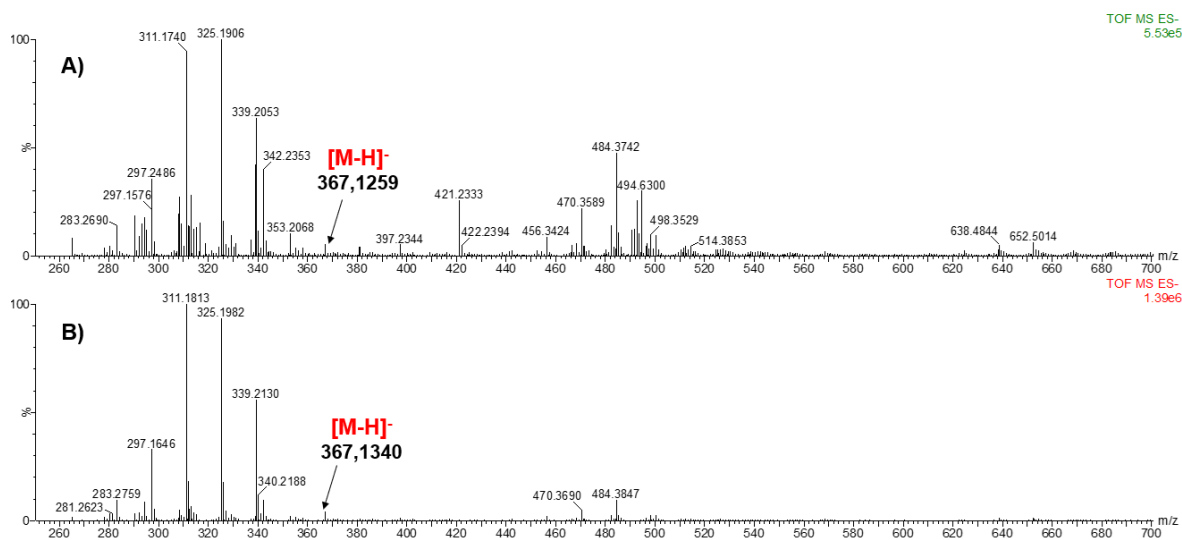
Obr.22: Přechištění hmotnostního spektra (negativní mód) po vykreslení pouze

z mobilních píků kurkuminu při použití CH₃OH/H₂O (50/50, v/v) s 0,1 % HCOOH

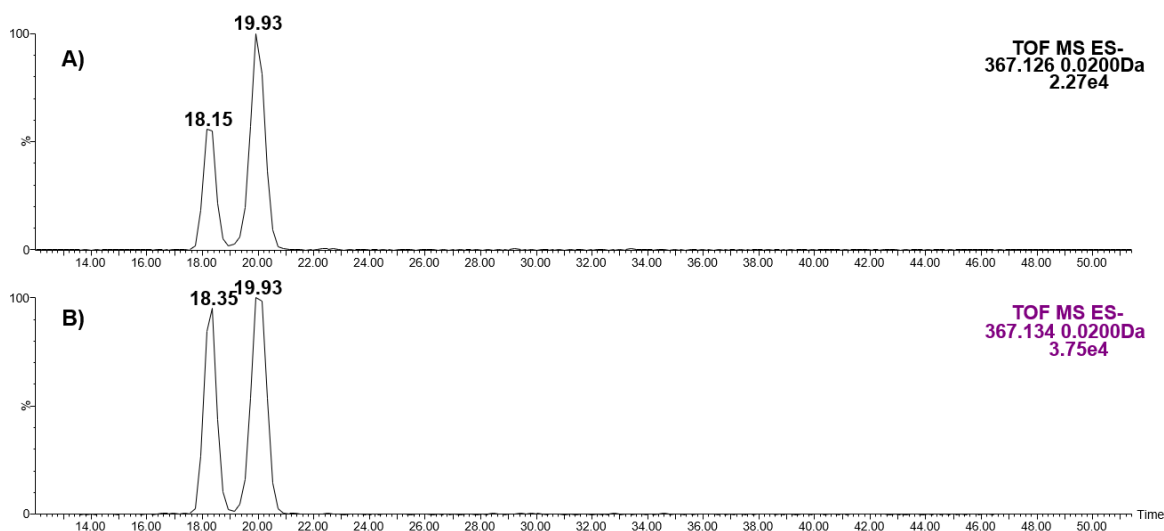
jako extrakčního rozpouštědla (A – vykresleno pro pík při 19,93 ms,

B – vykresleno pro pík při 18,15 ms, C – vykresleno pro TIC)

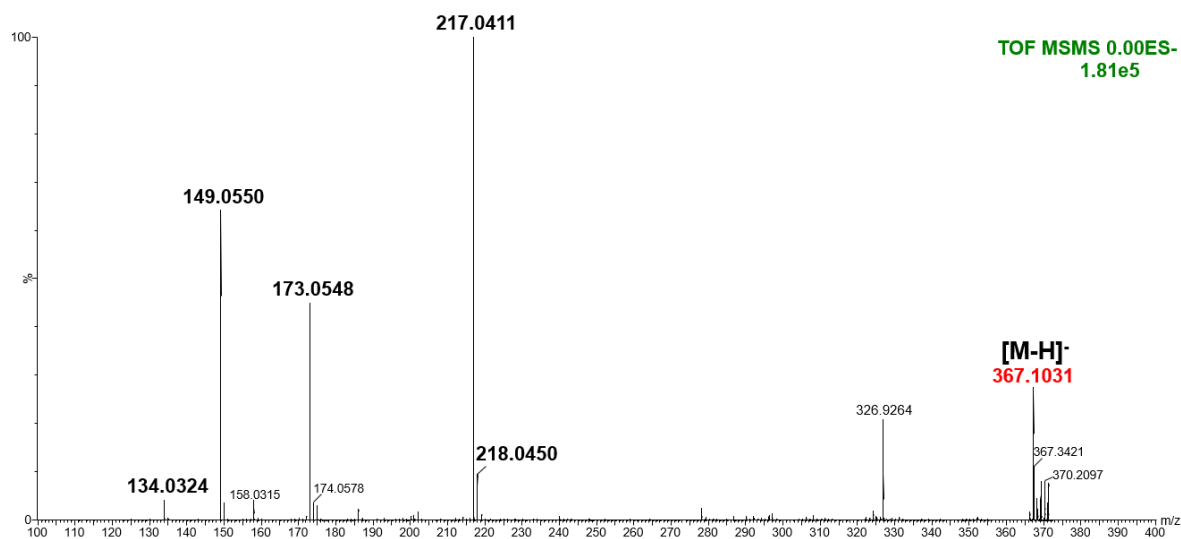
Pro ověření, zda je při m/z 367,1259 skutečně pozorován kurkumin byla provedena analýza standardu obsahujícího kurkumin, demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin (koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$ v $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50, v/v)). Hmotnostní spektra jsou na Obr. 23 a vykreslené mobilogramy na Obr. 24. Pozorované driftové časy v mobilogramech se shodují pro standard a extrakt. Fragmentace iontů v transferu (za mobilitní celou) při 13 V (Obr. 25) poskytla fragmenty s m/z 134,0324; 149,0550; 173,0548 a 217,0411, které se shodují s hodnotami pro kurkumin uváděnými v literatuře. [74] Ion s m/z 326,9264 není fragment kurkuminu, protože jednak není zmiňován v literatuře a jednak má odlišný driftový čas oproti prekurzorovému iontu, což při fragmentaci v transferu není možné. Pravděpodobně se jedná o fragment jiného iontu izolovaného v kvadrupólu spolu s iontem kurkuminu (vliv šířky izolačního okna).



Obr. 23: Hmotnostní spektra (negativní mód) – pracovní roztoky $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$
(A – extrakt kurkumy pomocí $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50, v/v) s 0,1 % HCOOH ,
B – standard kurkuminu 1 $\mu\text{g/ml}$)

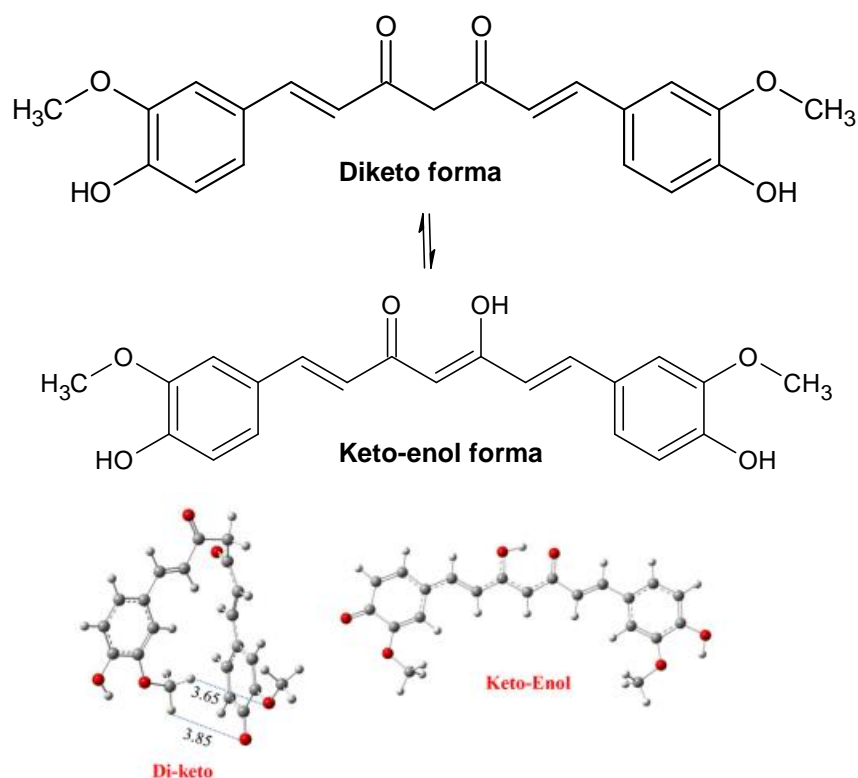


Obr. 24: Mobilogramy pro ion kurkuminu – m/z 367,1259 a 367,1340 (negativní mód měřen v odlišné dny) (A – extrakt kurkumy – $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ s 0,1 % HCOOH , ředěný $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, B – roztok standardu v $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$)



Obr. 25: Fragmentační spektrum standardu kurkuminu (m/z 367,1031) při napětí transferu 13 V pro negativní mód

Podle literatury lze dva píky (Obr. 24) přiřadit dvěma tautomerům kurkuminu, diketo a keto-enol formě (CCS - 196,8 a 213,4 \AA^2). Pro deprotonovanou diketo-formu je v literatuře navrhována kompaktnější struktura (Obr. 26), [75] a tedy menší srážkový průřez. Tento tautomer migruje rychleji (první pík na Obr. 24) než deprotonovaná forma keto-enol tautomeru.



Obr. 26: Tautomerní formy kurkuminu (nahore), prostorové uspořádání pro deprotonované molekuly (dole) – převzato a upraveno z cit. [75]

Kvůli relativně nízké intenzitě signálu kurkuminu v hmotnostním spektru, a tudíž nízké intenzitě v iontových mobilogramech (viz Obr. 21 a Obr. 24) byly testovány způsoby zlepšení ionizace kurkuminu (zvýšení intenzity signálu) v pozitivním módu pomocí různého složení pracovních roztoků. Zlepšení ionizace bylo posuzováno na základě změn intenzit iontů kurkuminu – $[M+H]^+$ (m/z 369,1330), $[M+Li]^+$ (m/z 375,1411), $[M+Na]^+$ (m/z 391,1158) (Tab. 6) v hmotnostních spektrech.

Tab. 6: Srovnání vlivu složení pracovního roztoku na intenzitu iontů kurkuminu v hmotnostních spektrech (sběr dat 1 minuta a poté suma spekter od 2. do 58. skenu)

Složení pracovního roztoku	Intenzita $[M+H]^+$ (m/z 369,1330)	Intenzita $[M+Li]^+$ (m/z 375,1411)	Intenzita $[M+Na]^+$ (m/z 391,1158)
CH ₃ OH/H ₂ O (50/50, v/v)	$4,21 \cdot 10^5$	$1,69 \cdot 10^4$	$7,00 \cdot 10^6$
CH ₃ OH/H ₂ O/HCOOH (50/49/1, v/v)	$7,03 \cdot 10^6$	$1,75 \cdot 10^4$	$1,05 \cdot 10^6$

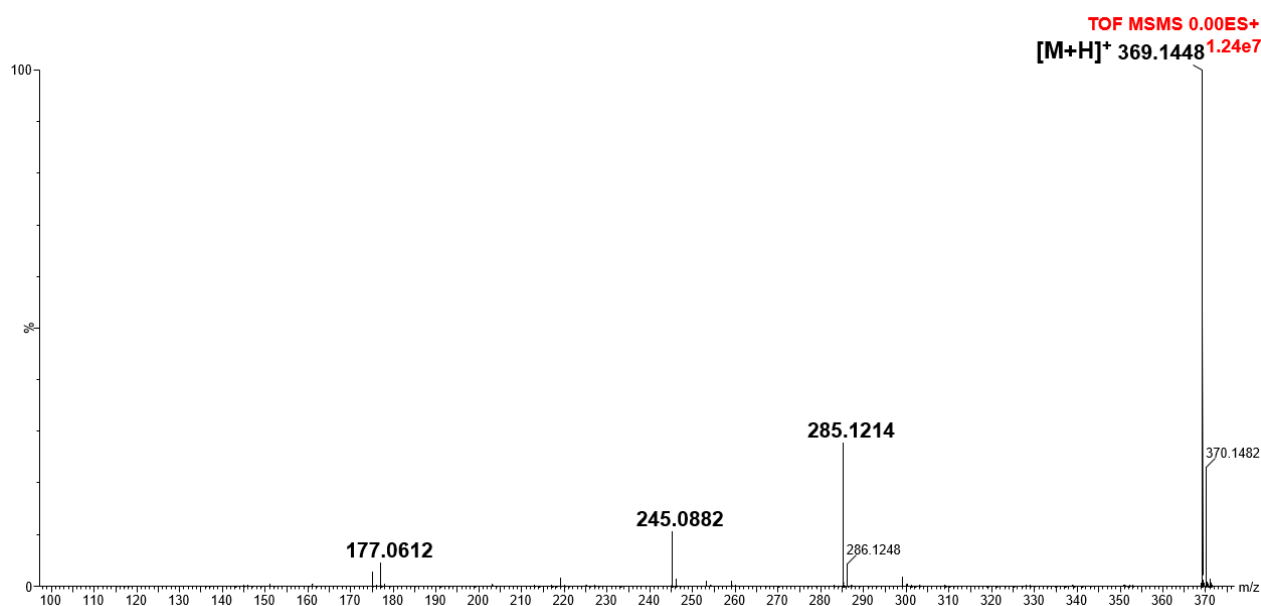
CH ₃ OH/H ₂ O (50/50, v/v) 0,1 mmol/l Li ⁺	2,21 · 10 ⁶	1,09 · 10 ⁶	1,53 · 10 ⁶
CH ₃ OH/H ₂ O (50/50, v/v) 0,1 mmol/l Na ⁺	6,24 · 10 ⁴	1,13 · 10 ⁴	3,17 · 10 ⁶
CH ₃ OH/H ₂ O/CH ₃ COOH (50/49/1, v/v)	6,14 · 10 ⁷	1,93 · 10 ⁵	3,82 · 10 ⁷
CH ₃ OH/H ₂ O/CH ₃ COOH/ HCOOH (500/490/9/1, v/v)	7,32 · 10 ⁷	1,57 · 10 ⁵	3,73 · 10 ⁷

Při srovnání intenzit iontů je patrné, že okyselení roztoku kyselinou mravenčí vede ke zvýšení intenzity iontu [M+H]⁺ o jeden řád. Přídavek Li⁺ iontů umožnil pozorovat adukt [M+Li]⁺ (zvětšil se odstup od pozadí, např. oproti signálu při použití CH₃OH/H₂O (50/50, v/v)). Přídavek Na⁺ iontů neposkytl pozitivní nárůst intenzity u žádného z iontů kurkuminu. Nejvýraznější nárůst intenzity signálu nastal při přidavku kyseliny octové pro ion [M+H]⁺, a to o dva řády. Pro hodnoty m/z, které odpovídají aduktům [M+Li]⁺ a [M+Na]⁺, se intenzita zvýšila o jeden řád v porovnání s použitím CH₃OH/H₂O (50/50, v/v). Přídavek kyseliny octové a kyseliny mravenčí (simulace ředěného extraktu) byl srovnatelný s přidavkem samostatné kyseliny octové.

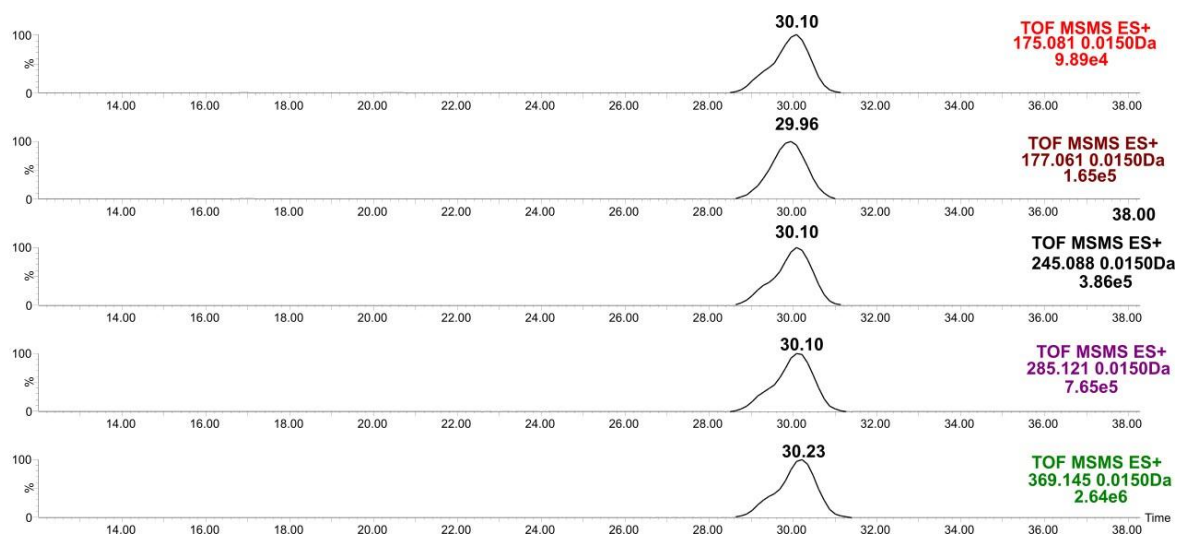
Pro ověření, zda se jedná o ionty kurkuminu, bylo provedeno vycentrování spekter a následně byl ion odpovídající sodnému aduktu dibutyl-ftalátu (teoretická hodnota m/z 301,1416) využit jako interní standard pro m/z („lock mass“). Odchylka od teoretických hodnot m/z byla u iontu [M+H]⁺ v rozsahu 0,9 - 1,9 mDa (2,4 - 5,1 ppm) u aduktu [M+Li]⁺ 0,7 mDa (1,9 ppm) a pro adukt [M+Na]⁺ byla chyba 1,1 mDa (2,8 ppm). Nízké odchylky (pod 5 ppm) podporují uváděné přiřazení iontů/aduktů kurkuminu. Pokud není uvedeno jinak, veškerá následující měření extraktu kurkumy a šafránu či standardu kurkuminu jsou prováděna s pracovním roztokem CH₃OH/H₂O/CH₃COOH (50/49/1).

Pro další ověření iontu [M+H]⁺ (m/z 369,1448) byla provedena fragmentace za mobilní celou (transfer) při analýze roztoku standardu kurkuminu (Obr. 27). Pozorované fragmenty s m/z 285,1214; 245,0882; 177,0612 a 175,0810 jsou ve shodě s literaturou a byly rovněž pozorovány při analýze extraktu (viz str. 52). [76] Z iontových mobilogramů

(Obr. 28) vykreslených pro jednotlivé ionty fragmentačního spektra je patrné, že všechny tyto ionty mají stejný driftový čas, což potvrzuje, že se jedná o fragmenty iontu 369,1448, které vznikají v transferu (za mobilitní celou) a jejich driftový čas již není ovlivněn iontově mobilitní separací. Z důvodu obtížné fragmentace a následné identifikace fragmentů z aduktů $[M+Na]^+$ či $[M+Li]^+$ bylo pro další studii upřednostněno sledování iontu $[M+H]^+$.

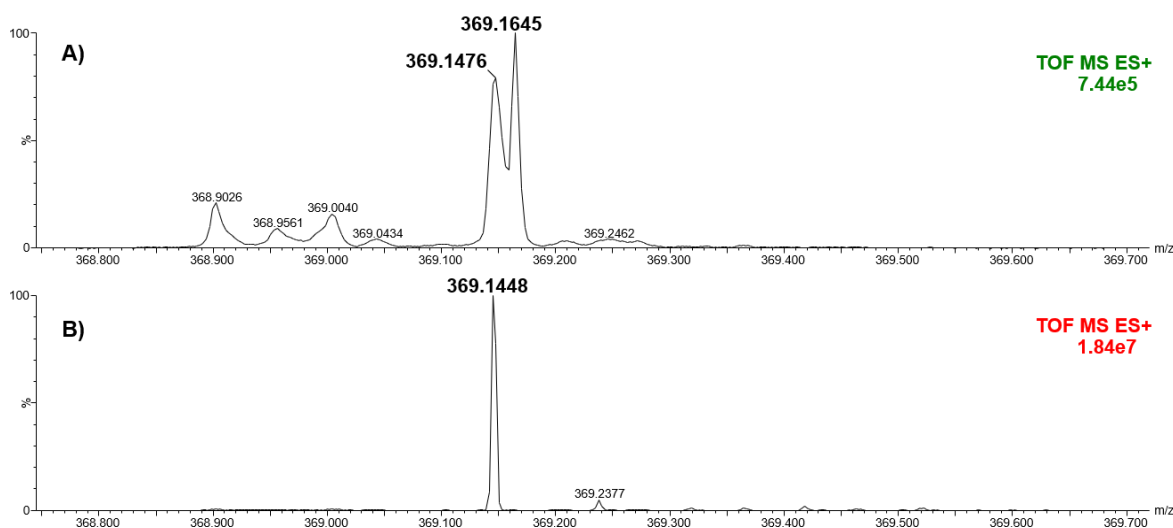


Obr. 27: Fragmentační spektrum iontu izolovaného při m/z 369 (pozitivní mód) fragmentovaného v transferu při 10 V pro pracovní roztok standardu kurkuminu (1 $\mu\text{g/ml}$) o složení $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (50/49/1, v/v)

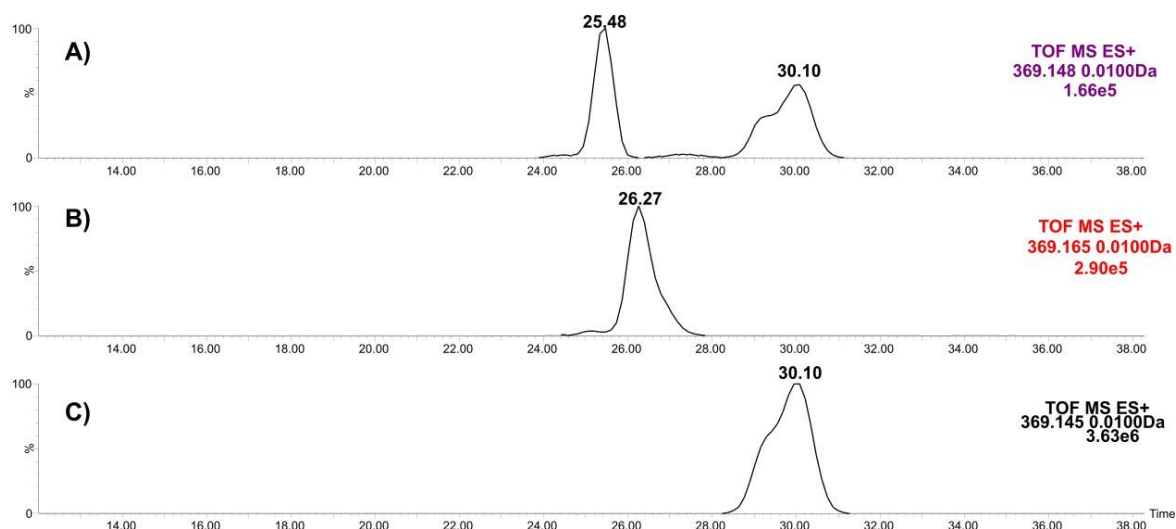


Obr. 28: Mobilogramy pro prekurzorový ion kurkuminu (spodní) a ionty fragmentů (napětí na transferu 10 V), pracovní roztok standardu v $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (50/49/1, v/v), pozitivní mód

Dále bylo provedeno měření extraktu kurkumy a šafránu připraveného dle dříve zmíněného postupu (Kap. 3.3.3.). Hmotnostní podíl kurkumy ve 2 mg analyzovaného materiálu byl 20 %. Extrakt byl zředěn 1000x směsí CH₃OH/H₂O/CH₃COOH (50/49/1). V hmotnostním spektru (Obr. 29) je patrná přítomnost dvou píků blízko teoretické hodnoty m/z iontu kurkuminu. Pomocí sodného aduktu dibutyl-ftalátu (teoretická hodnota m/z 301,1416) jako interního standardu pro m/z („lock mass“) byly zjištěny odchylky od teoretické hodnoty m/z iontu kurkuminu, pro ion 369,1363 (před vycentrováním a korekcí na standard 369,1476) 2,5 mDa (6,8 ppm) a pro ion 369,1532 (před vycentrováním 369,1645) 19,4 mDa (52,6 ppm). Ion s m/z 369,1645 není přítomný ve spektru standardu kurkuminu, ani ve vzorku kurkumy (viz str. 54) a byl přisouzen složce matrice šafránu (Obr. 29). Mobilogramy (Obr. 30) ukazují separaci iontů při m/z 369,1476 a 369,1645. Důležité je podotknout, že ion s m/z 369,1476 poskytl v iontovém mobilogramu dva píky. Jeden s driftovým časem 30,10 ms se shoduje se standardem kurkuminu, a to i tvarem píku. Druhý pík s časem 25,48 ms není přítomný ve standardu, ani v kurkumě (viz str. 54). Je pravděpodobné, že se jedná o látku ze šafránu se stejnou nebo velmi podobnou hodnotou m/z, kterou již samotná hmotnostní spektrometrie nerozliší.



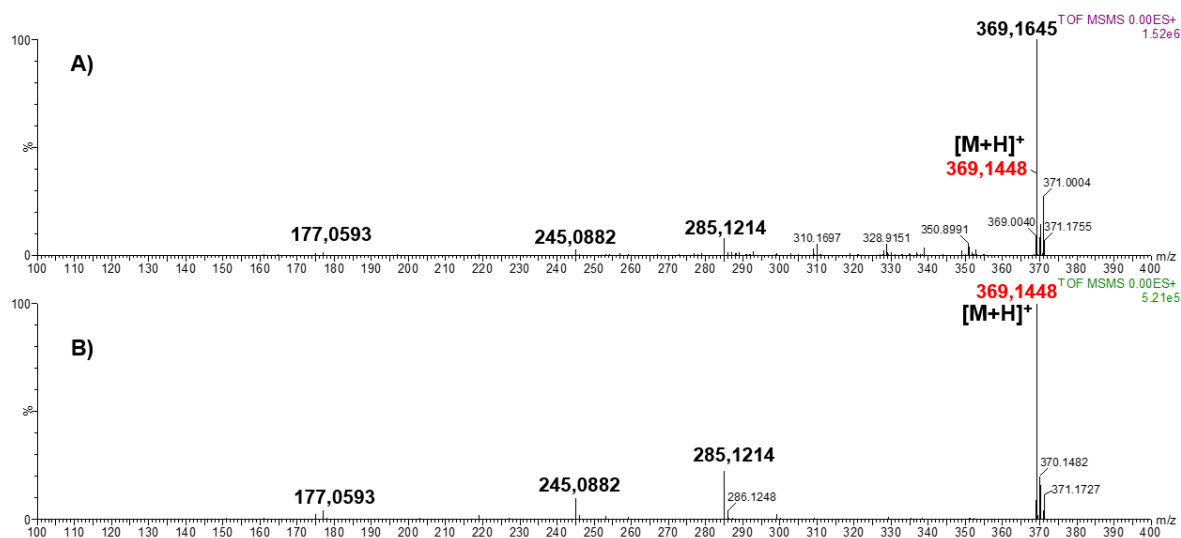
Obr. 29: Detail hmotnostních spekter (pozitivní mód): A – extrakt šafránu a kurkumy (80/20, w/w); B standard kurkuminu. Pracovní roztoky v CH₃OH/H₂O/CH₃COOH (50/49/1, v/v); přímá infúze s využitím iontové mobility



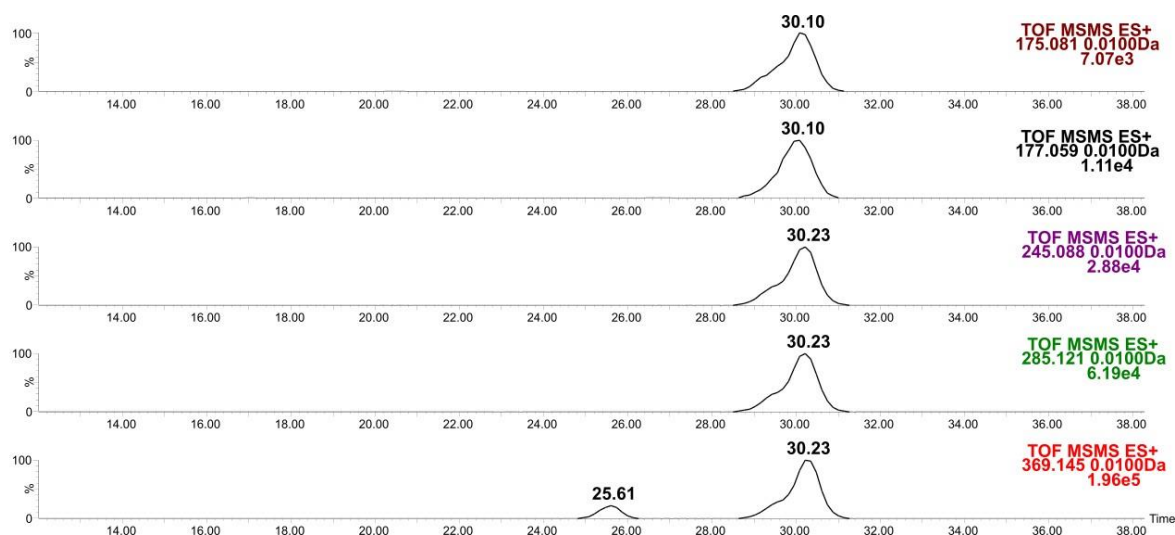
Obr. 30: Mobilogramy pro jednotlivé ionty okolo hodnoty m/z 369 pozorované v hmotnostním spektru extraktu šafránu a kurkumy (A – 369,1476 m/z ; B – 369,1645 m/z) a pro ion 369,1448 odpovídající standardu kurkuminu (C) pro pozitivní mód

Přítomnost kurkuminu v roztoku extraktu šafránu a kurkumy byla potvrzena fragmentací iontu m/z 369, který poskytl stejné fragmenty jako standard kurkuminu (Obr. 31). Ionová mobilita umožnila výrazně potlačit pozadí v hmotnostním spektru při jeho zobrazení pro driftový čas od 28 do 32 ms, kdy ve spektru není pozorován významný signál interferující látky při m/z 369,1645. Mobilogramy pro prekurzorový ion kurkuminu a jeho fragmenty (Obr. 32) ukazují, že odpovídající fragmentační spektrum poskytuje pouze ion s driftovým časem 30,23 ms. V šafránu je přítomna látka s blízkou hodnotou m/z , která je však separována iontovou mobilitou od iontu $[M+H]^+$ kurkuminu a má driftový čas 25,61 ms. Při vycentrování spekter a použití sodného aduktu dibutyl-ftalátu (teoretická hodnota m/z 301,1416) jako interního standardu pro m/z („lock mass“) bylo při m/z 369,1324 (před vycentrováním a korekcí na standard 369,1476) určováno elementární složení. Dobrou shodu poskytl ion $[C_{16}H_{26}O_7+K]^+$, který měl odchylku 2,2 ppm a může se jednat o draselný adukt pikrokrocinu (Obr. 33), látky přirozeně se vyskytující v šafránu. [77] Ve spektru byly pozorovány i další ionty pikrokrocinu $[C_{16}H_{26}O_7+H]^+$ (chyba 4,5 ppm) a $[C_{16}H_{26}O_7+Na]^+$ (chyba 0 ppm). Jelikož teoretická hodnota m/z draselného aduktu pikrokrocinu je 369,1316 a protonovaná molekula kurkuminu má teoretickou hodnotu m/z 369,1338, jejich odlišení ToF analyzátozem není dostačující. Látka s m/z 369,1645 (viz Obr. 29) poskytla po vycentrování a korekci na standard hodnotu m/z 369,1521, což by mohlo odpovídat sodnému aduktu jasminosidu B (Obr. 33) se složením $[C_{16}H_{26}O_8+Na]^+$ (chyba 1,1 ppm), byl pozorován také ion, který lze přiřadit draselnému

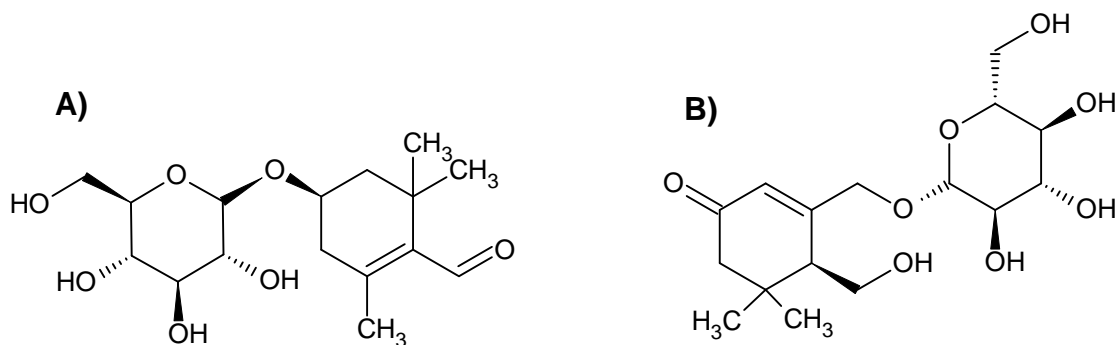
aduktu jasminosidu B $[C_{16}H_{26}O_8+K]^+$ (chyba 0,8 ppm) Opět se jedná o látku přirozeně se vyskytující v šafránu. [78] V našich experimentech byly dále pozorovány látky z šafránu např. krocetin a jeho příbuzné látky a krocin. [77]



Obr. 31: Fragmentační spektrum kurkuminu v extraktu kurkumy (A – zobrazení hmotnostní spektra přes celý rozsah mobilogramu; B – zobrazení hmotnostního spektra od 28 do 32 ms) pro pozitivní mód

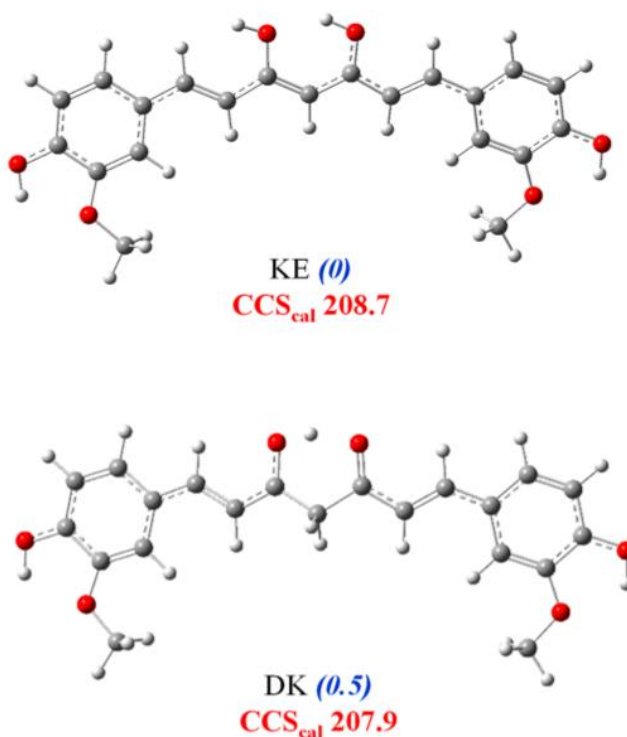


Obr. 32: Mobilogramy pro prekurzorový ion kurkuminu (spodní) a jeho fragmenty v extraktu kurkumy při napětí transferu 10 V pro pozitivní mód



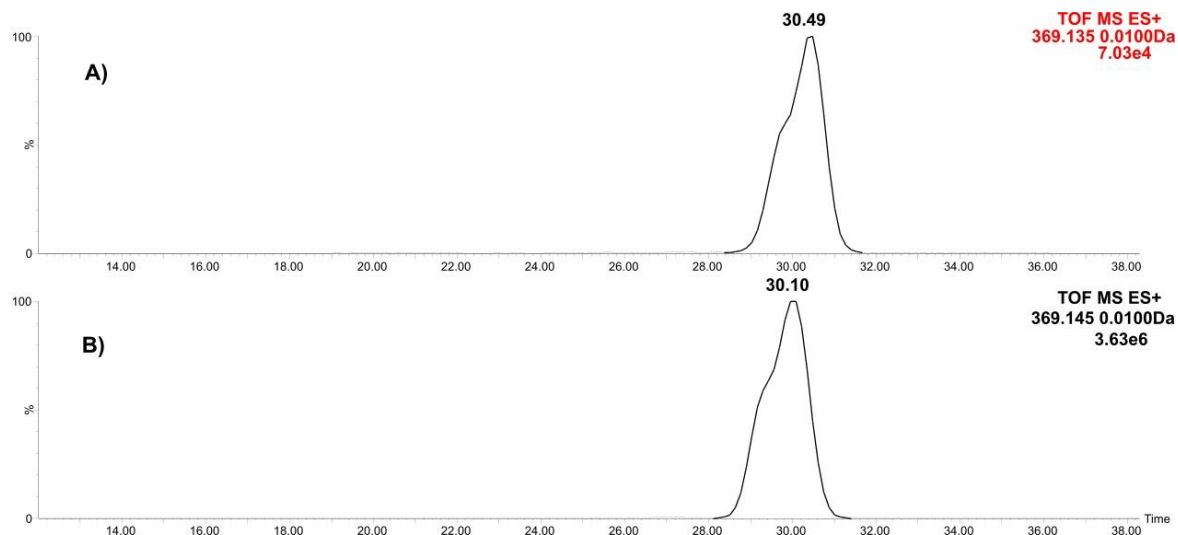
Obr. 33: Látky interferující při analýze kurkuminu pomocí MS
(A – pikrokrocin, B – jasminosid B)

Z tvaru mobilního píku kurkuminu (Obr. 30 a Obr. 32) při 30,10 ms či 30,23 ms je patrné, že se nejedná o symetrický (Gaussovský) pík. Pravděpodobně se jedná o směsný pík protonovaných molekul tautomerů kurkuminu, které v pozitivním narušení od negativního módu nejsou zcela separovány. Tomu odpovídají blízké hodnoty jejich CCS 207,9 a 208,7 Å². Důvodem blízkých CCS je změna geometrie pro protonovanou diketo-formu kurkuminu, kdy je proton sdílen karbonylovými skupinami jako součást planárního šestičlenného cyklu (Obr. 34). [76; 79]



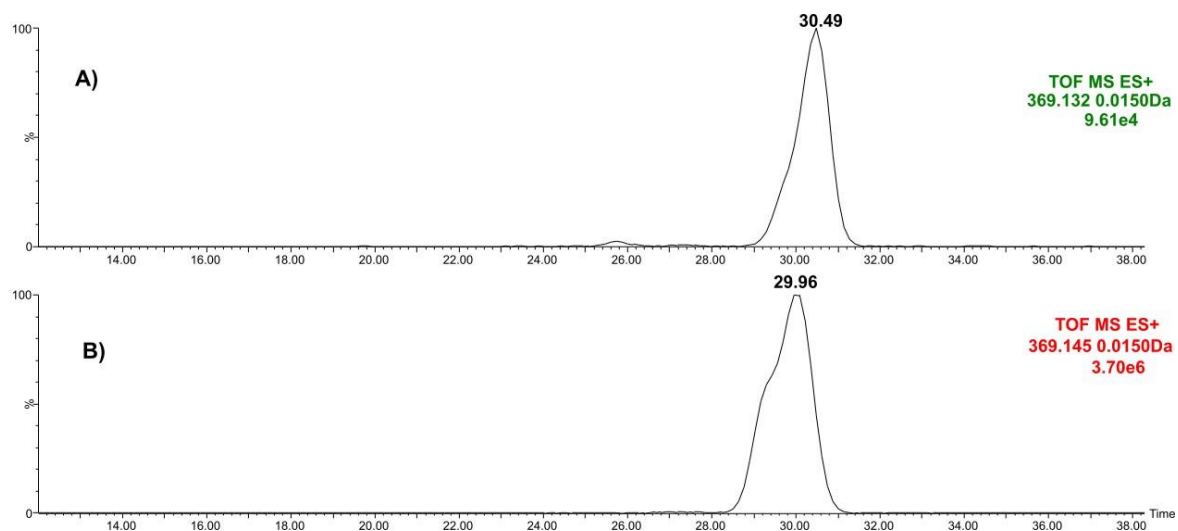
Obr. 34: Optimální geometrické uspořádání protonované diketoformy (DK) a protonované keto-enol formy (KE) v plynné fázi s vypočtenými hodnotami CCS (pro N₂) - převzato z citace [79]

Stejně jako u standardu (Obr. 35 B) i u extraktu čisté kurkumy (Obr. 35 A) je přítomný na mobilogramu pouze jeden pík odpovídající iontu s m/z 369,1352, což potvrzuje, že látka s driftovým časem 25,61 ms (pravděpodobně pikrokrocín) pochází z šafránu nikoliv z kurkumy.



Obr. 35: Mobilogramy pro ion kurkuminu při analýze extraktu kurkumy (A) a standardu kurkuminu (B) v pozitivním módu

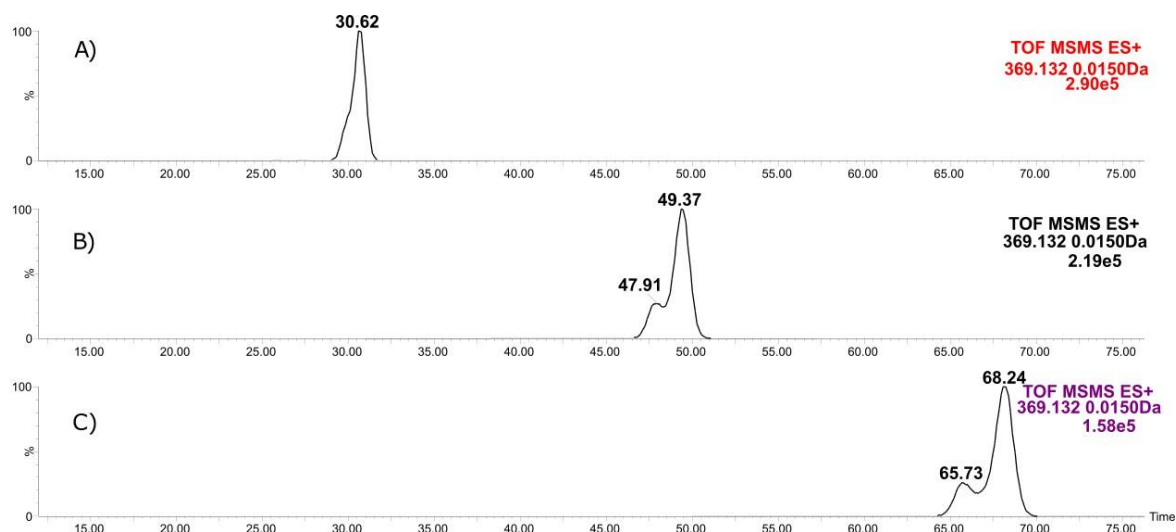
S ohledem na tvar píku byl testován vliv přídavku kyseliny octové na zastoupení jednotlivých tautomerů (Obr. 36). Je pozorovatelný mírný nárůst předního ramene píku při přídavku kyseliny octové, což by mohlo naznačovat zvýšení podílu diketo-formy, která je upřednostňována při nižším pH před keto-enol formou. [80]



Obr. 36: Mobilogramy standardu kurkuminu, A složení roztoku $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50, v/v), B složení roztoku $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (50/49/1, v/v) v pozitivním módu

Pozn. odlišné migrační časy jsou způsobeny měřením v odlišné dny

Následně byl testován vliv vyšší rozlišovací schopnosti iontové mobility při větším počtu cyklů v mobilitní cele, a to po izolaci iontů s m/z okolo 369 v kvadrupólu (Obr. 37). S vyšší rozlišovací schopností se dle očekávání zlepšuje separace tautomerů (Obr. 37), ale pro určení celkového podílu kurkuminu není nutná. Pro prokázání přítomnosti kurkumy v šafránu byl využíván pouze jeden cyklus.

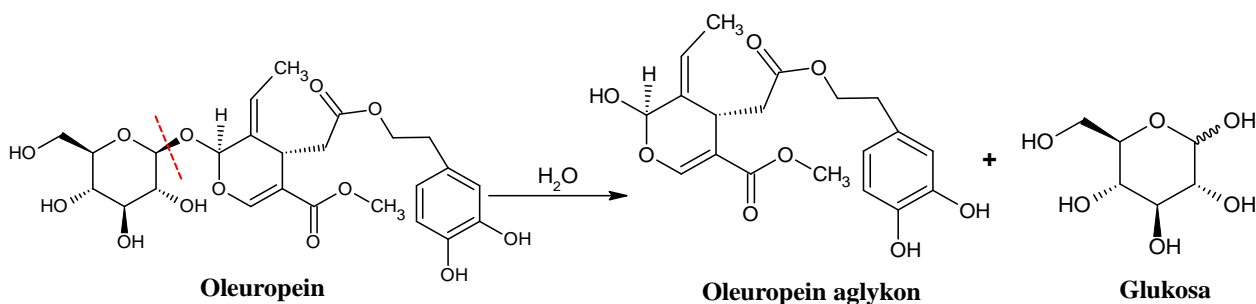


Obr. 37: Mobilogramy pro ion kurkuminu s m/z 369,1324 (pracovní roztok z extraktu čisté kurkumy v $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (50/49/1, v/v) demonstrující změnu separace tautomerů s vyšším počtem cyklů (A – 1 cyklus, B – 2 cykly, C – 3 cykly) v pozitivním módu

Po vyhodnocení experimentů byla pro extrakci šafránu a kurkumy zvolena směs $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (500/499/1, v/v), kdy byly pozorovány ionty kurkuminu s vyšší intenzitou. Přídavek kyseliny octové v pracovním roztoku má pozitivní vliv na intenzitu signálu protonované molekuly kurkuminu $[\text{M}+\text{H}]^+$, kdy došlo ke zvýšení o dva řády oproti měření bez kyseliny octové. Z důvodů nízké intenzity iontu demethoxykurkuminu (m/z 337,1076) nebyl tento marker dále uvažován při vyhodnocování stupně falšování.

4.1.2. Oregano a olivové lístky

Vzorky koření byly extrahovány postupy zmíněnými v experimentální části (zeleně v Obr. 20). Vhodnost extrakce byla posuzována na základě signálů markerů olivového listí [54; 57; 72], a to dle intenzity píků v hmotnostním spektru a plochy píku v mobilogramu pro danou hodnotu m/z (Tab. 7) v negativním módu. U většiny markerů poskytuje větší signál extrakční metoda využívající $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50, v/v) oproti metodě s $\text{CH}_3\text{OH} + 0,1\% \text{HCOOH}$. Největší rozdíl je pozorovatelný u aglykonu oleuropeinu (hydrolytický produkt – Obr. 38), kdy je jeho signál v metodě s $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50, v/v) vyšší o dva řády oproti metodě s $\text{CH}_3\text{OH} + 0,1\% \text{HCOOH}$. Zda je aglykon lépe extrahován už z rostlinného materiálu či vzniká v průběhu přípravy vzorku (extrakce vodným rozpouštědlem) nelze z těchto dat určit a je třeba provést další studii.

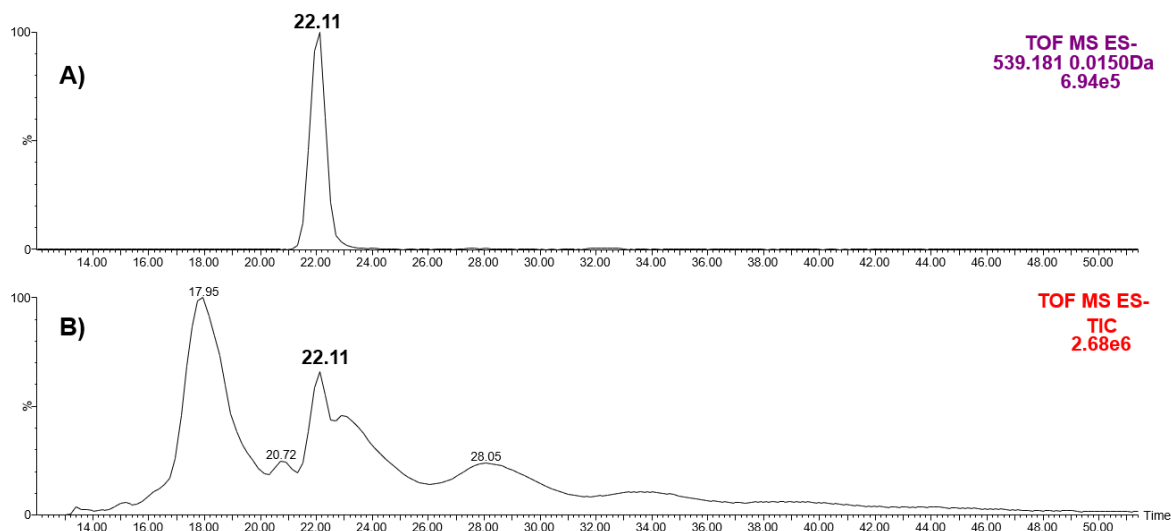


Obr. 38: Schéma hydrolyzy oleuropeinu

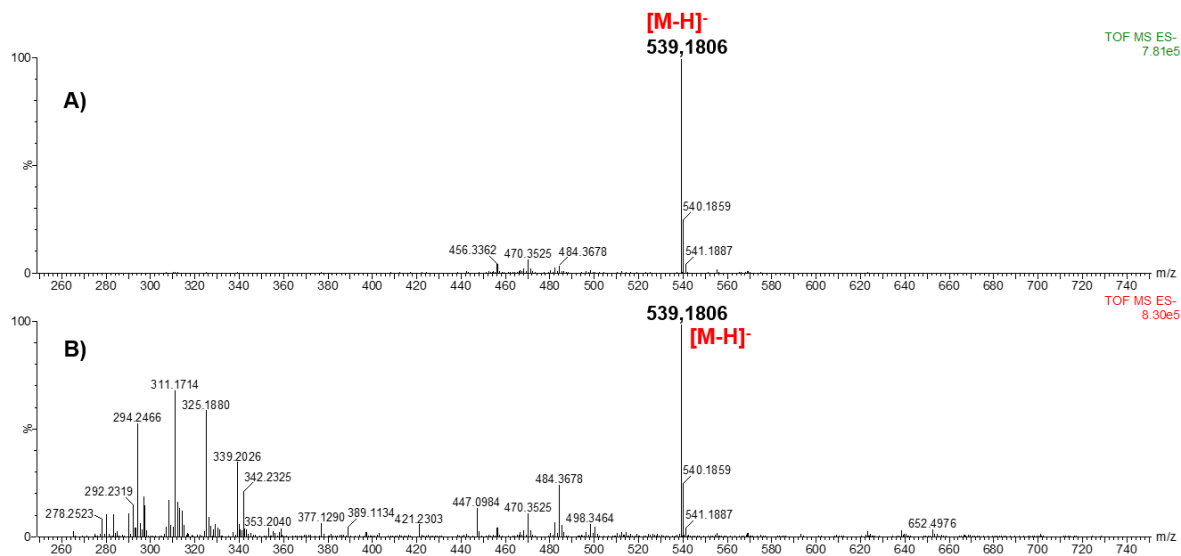
Při vykreslení mobilogramu pro ion oleuropeinu m/z 539,1806 (Obr. 39) je přítomen symetrický pík při 22,11 ms. Tento pík je pozorovatelný i v mobilogramu zobrazeném pro TIC (Obr. 39 B), což naznačuje, že se jedná o intenzivní signál. U oleuropeinu lze dosáhnout významného potlačení pozadí v hmotnostních spektrech pomocí iontové mobility (Obr. 40). Ion oleuropeinu (deprotonovaná molekula, m/z 539,1806) je základním iontem ve spektru, tudíž jeho detekce bude možná i na nízkých koncentracích a jedná se o velice intenzivní marker.

Pro ověření identity byl ion 539,1806 m/z izolován v kvadrupólu a následně fragmentován v transferu při 22 V (Obr. 41). Byly pozorovány fragmenty při m/z – 403,1400; 377,1360; 345,1077; 307,0880; 275,0959; 223,0595 a 179,0516, které se shodují s literaturou. [81] Ionty s m/z 377 a 403 byly identifikovány jako markery (viz Tab. 7), ale taktéž se může jednat o fragmenty oleuropeinu. U iontu s m/z 377, lze konstatovat, že vzhledem k absenci jeho signálu při extrakci směsí $\text{CH}_3\text{OH} + 0,1\% \text{HCOOH}$ tento ion nevzniká fragmentací ve zdroji. Naopak ion s m/z 403 byl ve spektru přítomen

při použití obou extrakčních činidel a nelze vyloučit jeho vznik v důsledku fragmentace ve zdroji. Mobilogramy iontů z fragmentačního spektra oleuropeinu (Obr. 42) ukazují stejné driftové časy prekurzorového iontu a jeho fragmentů, což dokládá vznik fragmentů v transferu (za mobilitní celou).



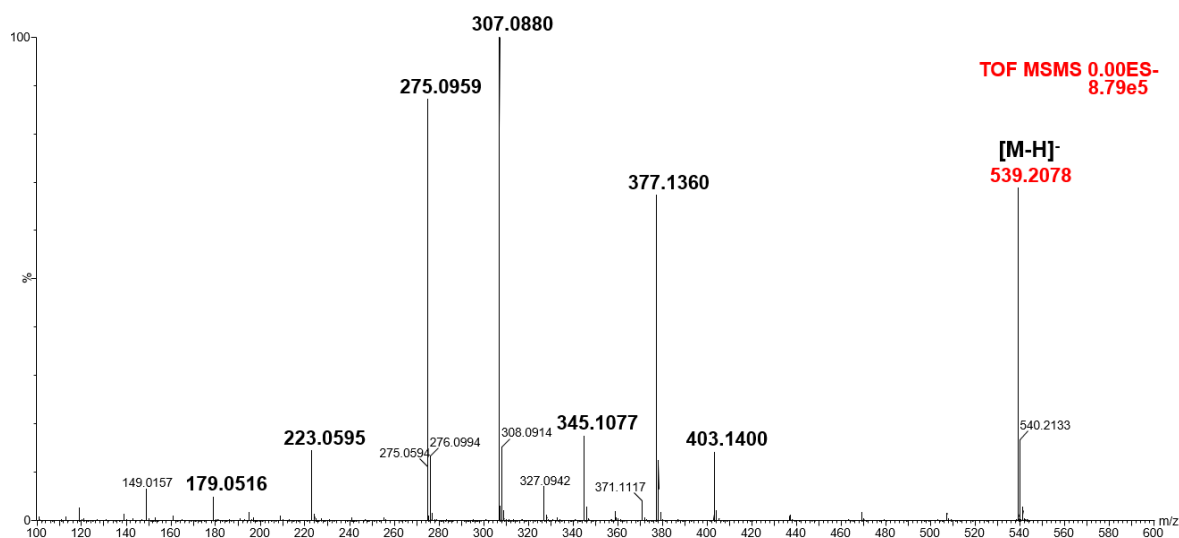
Obr. 39: Mobilogramy pro A – ion oleuropeinu při m/z 539,1806, B – celkový iontový proud; extrakt olivových lístků ředěný $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50, v/v), pozitivní mód



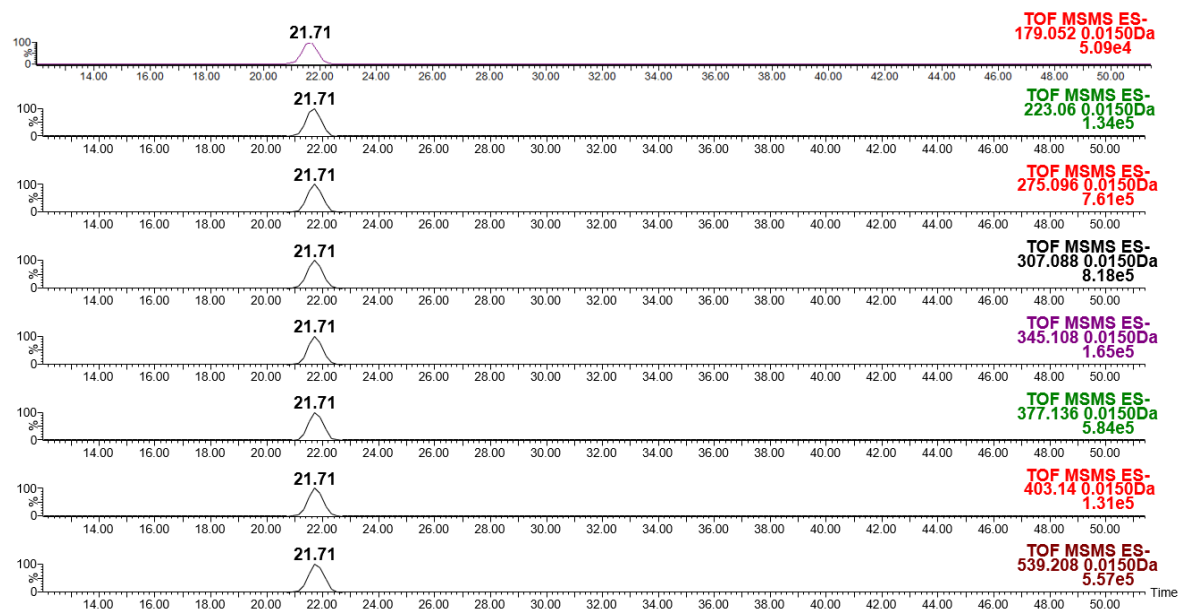
Obr. 40: Hmotnostní spektra zředěného extraktu olivových lístků (extrakce $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 50/50, v/v), A – pro mobilitní pík oleuropeinu při 22,11 ms, B – pro celý mobilogram)

Tab. 7: Markery olivových lístků v oreganu sledované ve spektrech (zvoleny na základě literárních údajů [54; 57; 72])

Hledané markery	Rozpouštědlo	Teoretická hodnota m/z [M-H] ⁻	Intenzita píku v hmotnostním spektru	Plocha píku v mobilogramu
10 – hydroxyoleuropein	CH ₃ OH + 0,1 % HCOOH	555,1719	1,26 · 10 ⁴	8742
10 – hydroxyoleuropein	CH ₃ OH + H ₂ O (50/50, v/v)	555,1719	1,35 · 10 ⁴	9716
Oleuropein diglykosid	CH ₃ OH + 0,1 % HCOOH	701,2298	8,21 · 10 ³	3877
Oleuropein diglykosid	CH ₃ OH + H ₂ O (50/50, v/v)	701,2298	8,72 · 10 ³	4280
Oleuropein	CH ₃ OH + 0,1 % HCOOH	539,1770	1,16 · 10 ⁶	502480
Oleuropein	CH ₃ OH + H ₂ O (50/50, v/v)	539,1770	8,30 · 10 ⁵	473809
Oleuropein aglykon	CH ₃ OH + 0,1 % HCOOH	377,1242	3,69 · 10 ³	412
Oleuropein aglykon	CH ₃ OH + H ₂ O (50/50, v/v)	377,1242	5,25 · 10 ⁴	34603
Oleoside	CH ₃ OH + 0,1 % HCOOH	389,1089	2,46 · 10 ⁴	15676
Oleoside	CH ₃ OH + H ₂ O (50/50, v/v)	389,1089	3,78 · 10 ⁴	25032
Glykosid eleanové kyseliny	CH ₃ OH + 0,1 % HCOOH	403,1246	1,08 · 10 ⁴	5701
Glykosid eleanové kyseliny	CH ₃ OH + H ₂ O (50/50, v/v)	403,1246	1,27 · 10 ⁴	7744



Obr. 41: Fragmentační spektrum iontu s m/z 539 při napětí transferu 22 V při analýze ředěného extraktu (extrakce s CH₃OH/H₂O, 50/50, v/v) olivových lístků

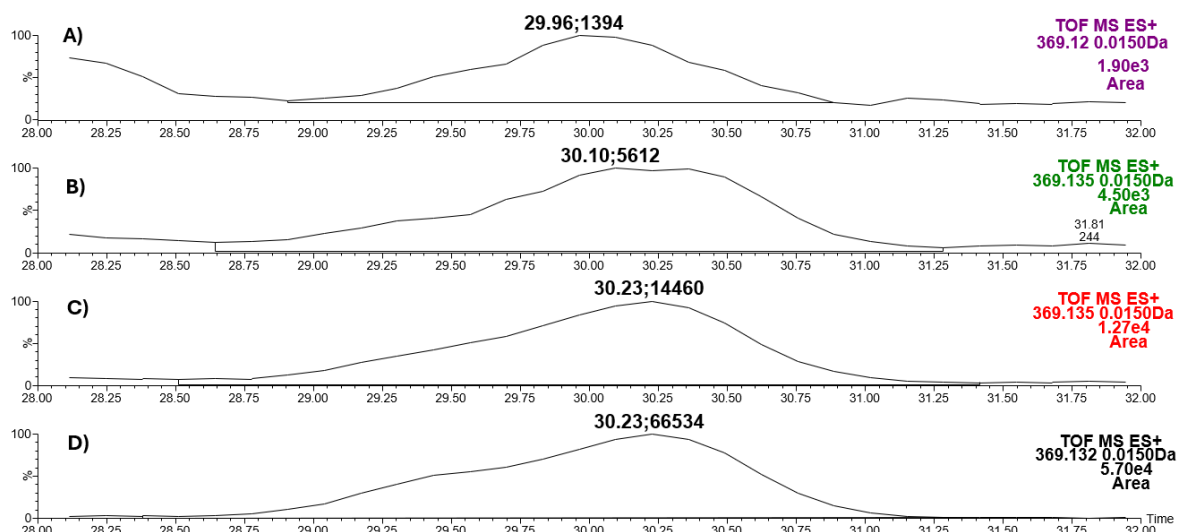


Obr. 42: Mobilogramy pro prekurzorový ion oleuropeinu (spodní) a jeho hlavní fragmenty při analýze ředěného extraktu (extrakce s CH₃OH/H₂O, 50/50, v/v) olivových lístků

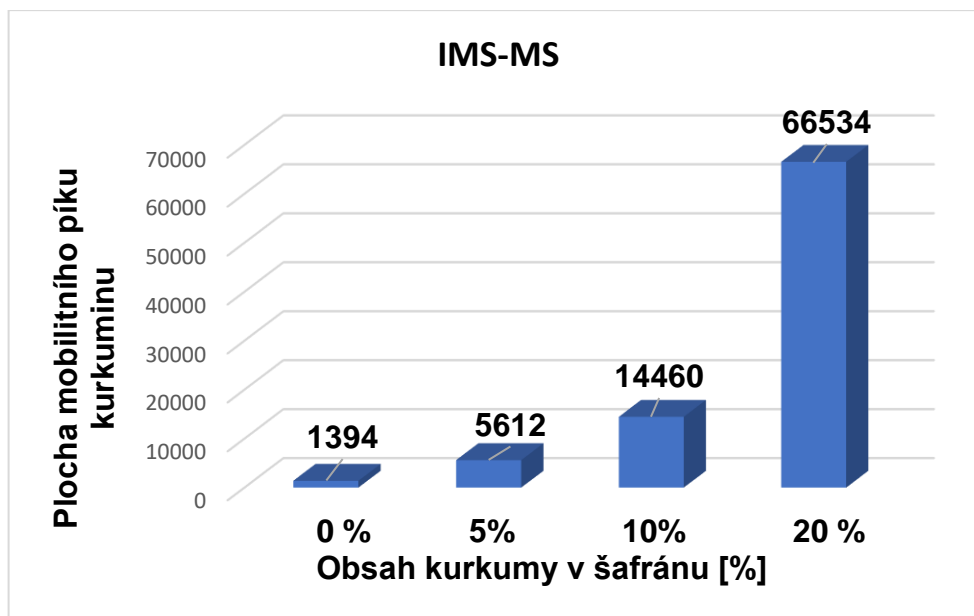
4.2. Analýza modelových vzorků (modelové falšování)

4.2.1. Falšování šafránu pomocí kurkumy

Pomocí postupů z experimentální části (viz Kap. 3.3.3.) byly změřeny jednotlivé vzorky napodobující falšovaný šafrán. Obsah kurkumy byl na úrovni 0, 5, 10, 20 % a odpovídající mobilogramy jsou zobrazeny na Obr. 43. Z důvodu interference iontu s blízkou hodnotou m/z (viz Kap. 4.1.1.) nelze sledovat intenzitu markeru v samotném hmotnostním spektru. Pro posouzení přítomnosti kurkumy byla využita plocha mobilního píku pro ion kurkuminu (okno 0,015 Da) v čase 29,96 - 30,23 ms. S narůstajícím obsahem kurkumy plocha píku rostla (Obr. 43 a Obr. 44), ale závislost nebyla lineární. Je patrné, že už obsah kurkumy na úrovni 5 % je rozeznatelný od vzorku čistého šafránu.

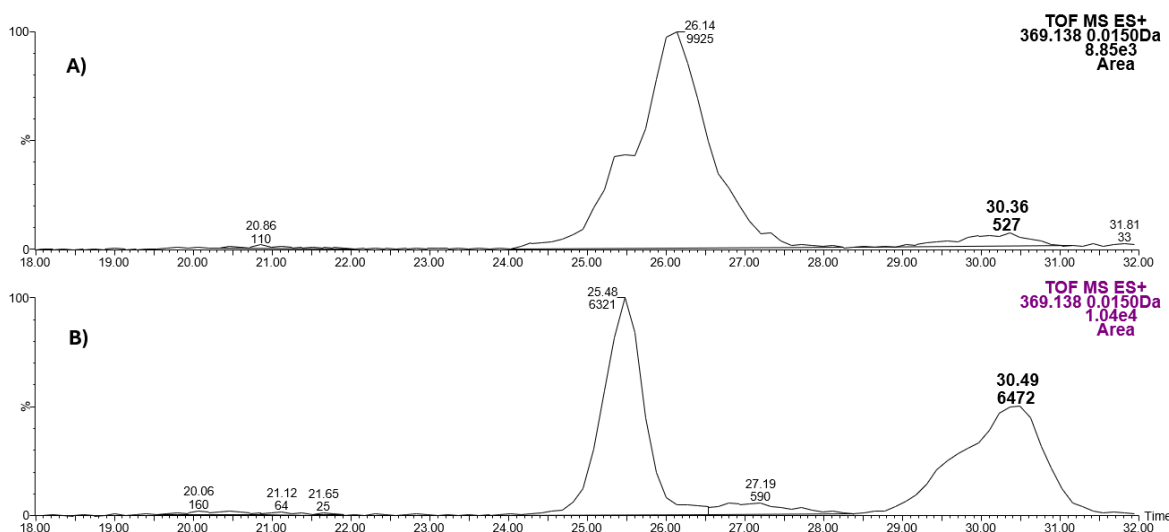


Obr. 43: Detail mobilogramů s uvedenými plochami píků pro ion kurkuminu (obsah kurkumy A – 0 %, B – 5 %, C – 10 % a D – 20 %)



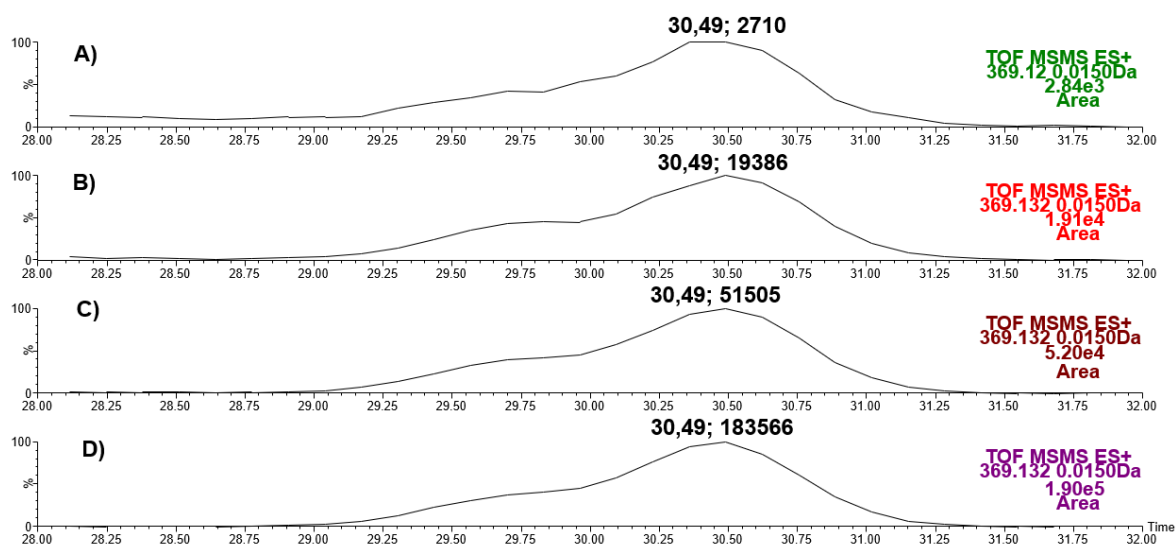
Obr. 44: Sloupcový graf závislosti plochy mobilního píku kurkuminu na obsahu kurkumy v šafránu pro měření IMS-MS (bez izolace prekurzorového iontu m/z 369,138 v kvadrupólu)

Pro ověření, zda metoda dokáže odhalit falšování reálných vzorků, byl připraven vzorek simulující 10% falšování pomocí navažování rostlinného materiálu. Je zřejmé, že signál pozorovaný v oblasti mobilního píku markeru je řádově vyšší ve falšovaném oproti čistému šafránu (Obr. 45).

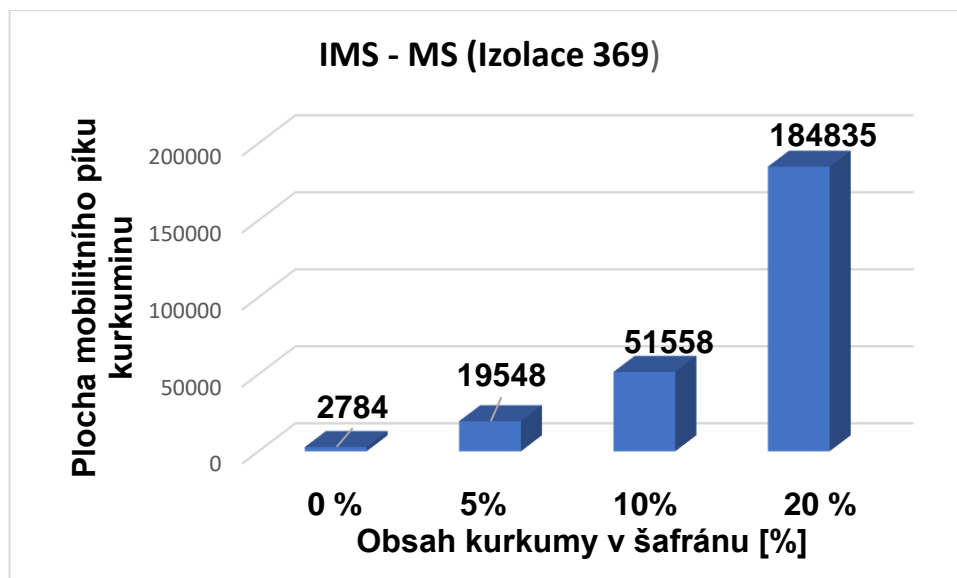


Obr. 45: Mobilogramy s uvedenými plochami píků pro ion při m/z 369,1380 ředěných extraktů (pomocí $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (50/49/1, v/v) (A – čistý šafrán, B – šafrán a kurkuma (90/10, w/w))

Experimenty IMS-MS s izolací iontu 369 (kurkumin) v kvadrupólu poskytly pro signál kurkuminu podobná data (Obr. 46). Nárůst ploch píků opět není lineární (sloupcový graf na Obr. 47), ale pozadí v oblasti signálu kurkuminu pro vzorek čistého šafránu (Obr. 46 A) by odpovídalo obsahu kurkumy pod 1 %. Takovýto podíl kurkumy ve falšovaných vzorcích není očekáván, neboť by nezajišťoval dostatečný ekonomický efekt. Výhodou měření IMS-MS s izolací iontu 369 je zlepšení odezvy. (viz srovnání Obr. 43 A, B a 46 A, B, resp. Obr. 44 a 47).



Obr. 46: Detail mobilogramů a plochy píků pro ion kurkuminu izolovaný v kvadrupólu v pozitivním módu (obsah kurkumy A – 0 %, B – 5 %, C – 10 % a D – 20 %)

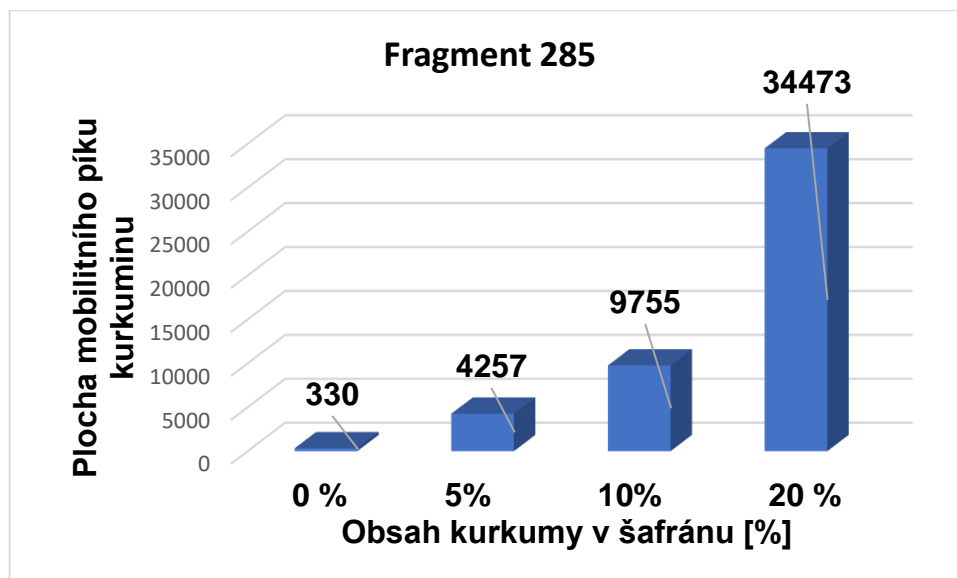


Obr. 47: Sloupcový graf závislosti plochy mobilního píku kurkuminu (průměr ze dvou měření) na obsahu kurkumy v šafránu pro měření IMS-MS s izolací iontu 369 v kvadrupólu

Experimenty IMS-MSMS s izolací iontu 369 a jeho fragmentací v transferu při 10 V přispívají k identifikaci kurkuminu ve vzorku. Rovněž pro fragmenty byl pozorován nelineární růst ploch mobilních píků v závislosti na obsahu kurkumy (Tab. 8, Obr. 48). Popsaná nelinearita může souviset s matričními efekty, ale pro potvrzení příčin by bylo vhodné provést další studii.

Tab. 8: Plochy mobilních píků fragmentů kurkuminu (průměr ze dvou měření), signál pozadí při 0 % kurkumy

Obsah kurkumy v šafránu [%]	Plocha píku fragmentu s hodnotou m/z			
	285	245	177	175
0	330	197	110	58
5	4257	2071	963	573
10	9755	4764	2051	1257
20	34473	16786	7181	4167



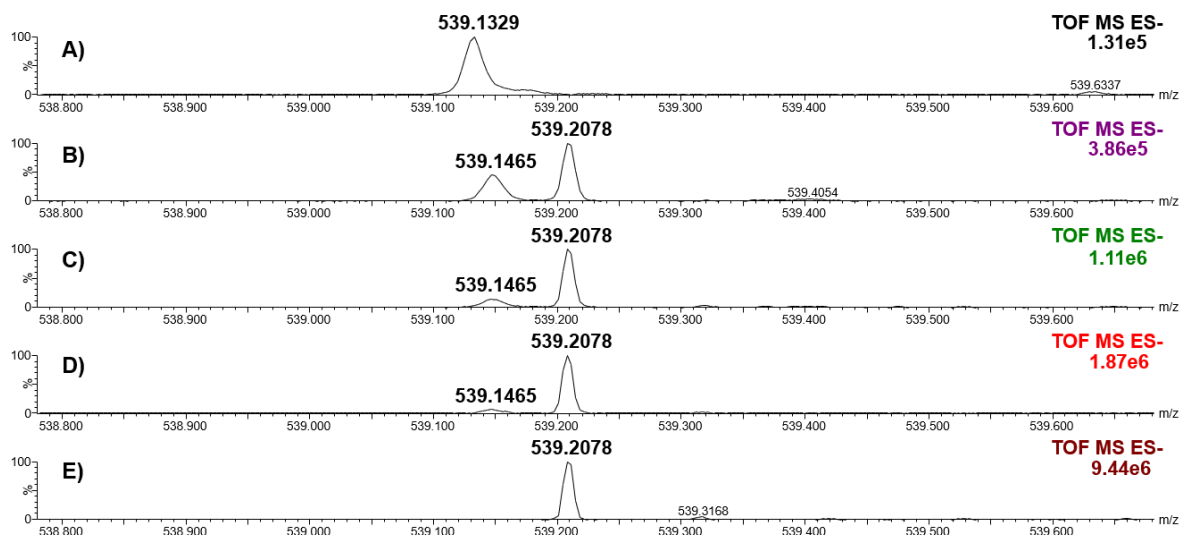
Obr. 48: Sloupcový graf závislosti plochy mobilního píku fragmentu kurkuminu při m/z 285 (průměr ze dvou měření) na obsahu kurkumy v šafránu pro měření IMS-MSMS (izolace iontu 369 v kvadrupólu a fragmentace v transferu při 10 V)

Všechny varianty popsaných experimentů (IMS-MS, IMS-MS (izolace iontu 369), IMS-MSMS (izolace iontu 369 a fragmentace v transferu při 10 V)) poskytly výsledky vykazující nelineární nárůst plochy píků markeru (kurkuminu či jeho fragmentů) se zvyšujícím se obsahem kurkumy v šafránu. Lze konstatovat, že všechny metody měření umožňují detekci 5 % kurkumy v šafránu. Vhodné je kombinovat IMS-MS (izolace iontu 369), kdy je dosahováno vyšší odezvy pro ion 369, a IMS-MSMS (izolace iontu 369 a fragmentace v transferu při 10 V) pro potvrzení identity markeru.

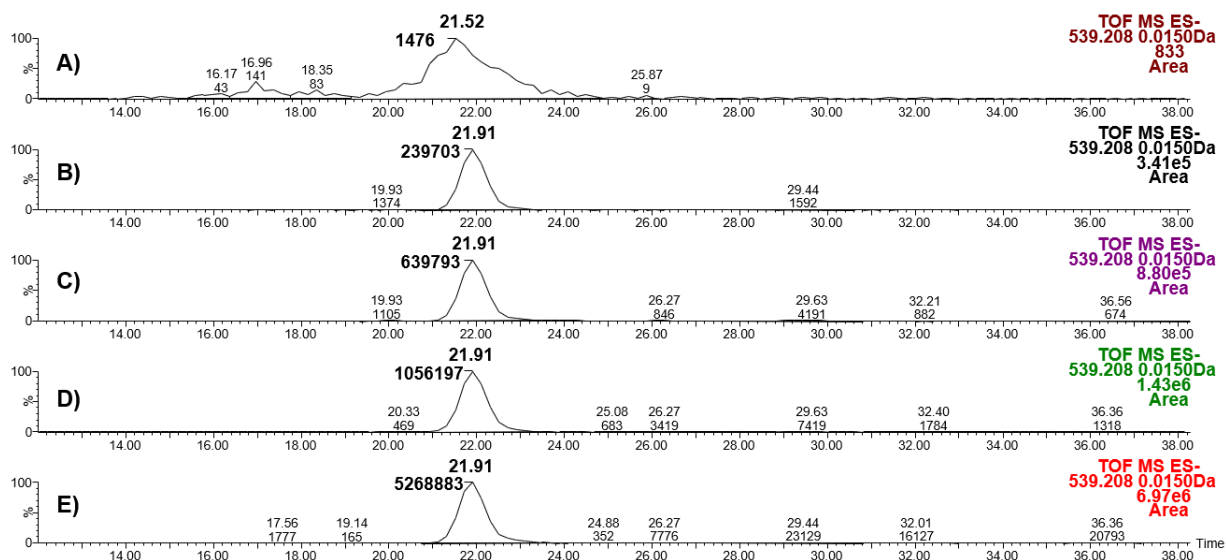
4.2.2. Falšování oregana pomocí olivových lístků

Pomocí postupů popsaných v experimentální části (viz Kap. 3.3.3.) byly změřeny vzorky napodobující falšované oregano olivovými lístky na úrovni 0, 5, 10 a 20 % a samotné olivové lístky. V hmotnostních spektrech pro oblast m/z , kde je očekáván ion oleuropeinu (teoretická hodnota m/z 539,1770) se vyskytují dva ionty (Obr. 49). Vzhledem k nárůstu intenzity iontu s m/z 539,2078 a jeho absenci v čistém oreganu (Obr. 49 A), jej lze přiřadit oleuropeinu. Ion s hodnotou m/z 539,1465 náleží látce z matrice oregana (není přítomný v extraktu čistých olivových lístků (Obr. 49 E)).

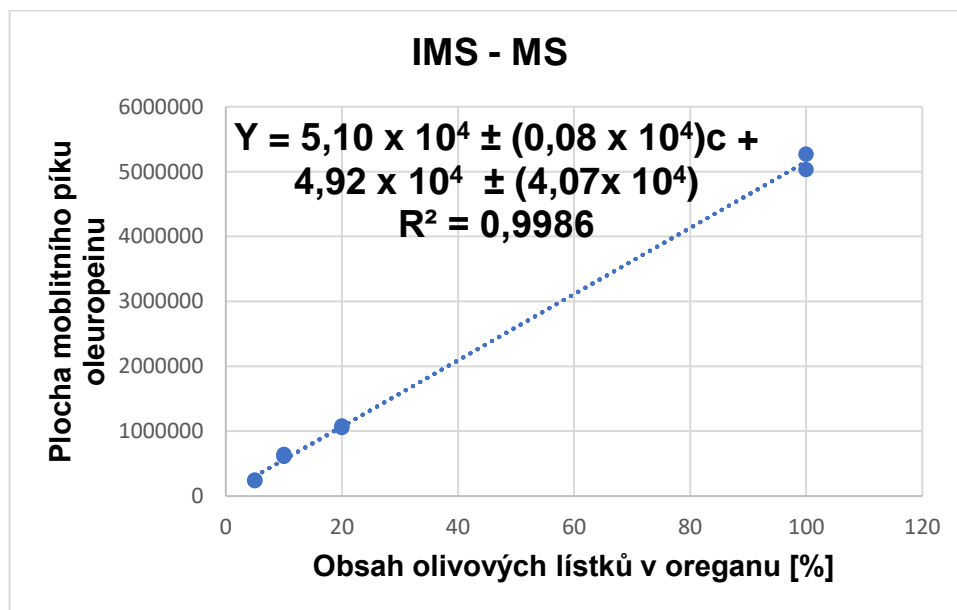
Další identifikační charakteristika oleuropeinu je driftový čas iontu s m/z 539,2078 (oleuropeinu), který byl 21,91 ms (Obr. 50) a shoduje se napříč všemi extrakty vzorků s obsahem olivových lístků. Z ploch píků oleuropeinu v mobilogramech (Obr. 50) je patrný nárůst plochy s obsahem olivových lístků v oreganu, přičemž její závislost na obsahu olivových lístků v oreganu je lineární (Obr. 51) s koeficientem determinace $R^2 = 0,9986$.



Obr. 49: Hmotnostní spektra z IMS-MS (detail celkového spektra) (A – čistého oregana, B – 5% olivových lístků v oreganu, C – 10 % olivových lístků, D – 20 % olivových lístků, E – 100 % olivových lístků) v negativním módu

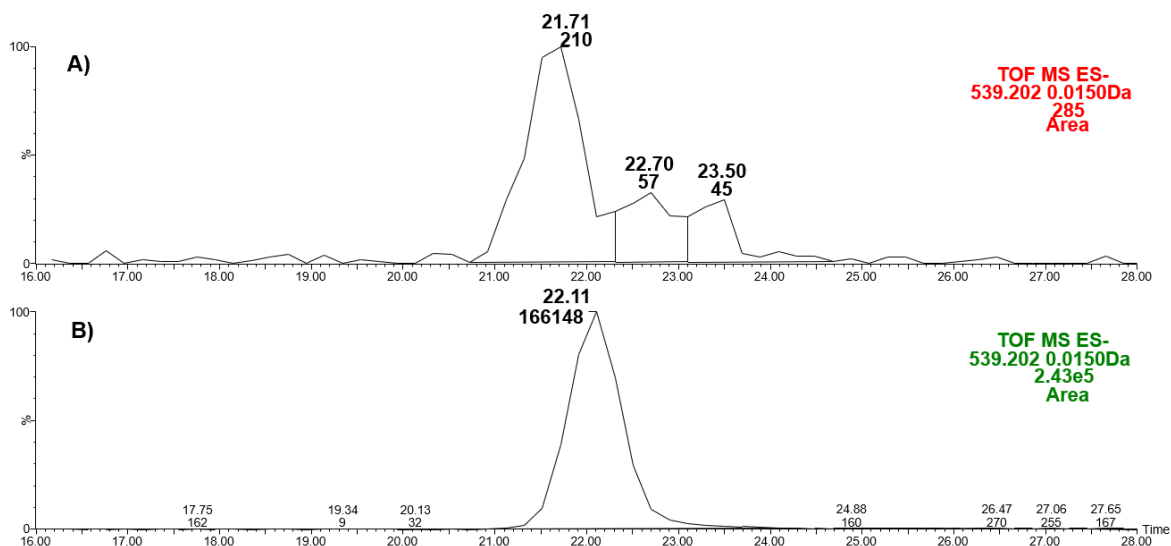


Obr. 50: Mobilogramy s plochou píkú pro ion oleuropeinu m/z 539,2078 z měření IMS-MS (celkové spektrum, bez izolace iontu markeru) (obsah olivových lístků A – 0 %, B – 5 %, C – 10 %, D – 20 % a E – 100 %)



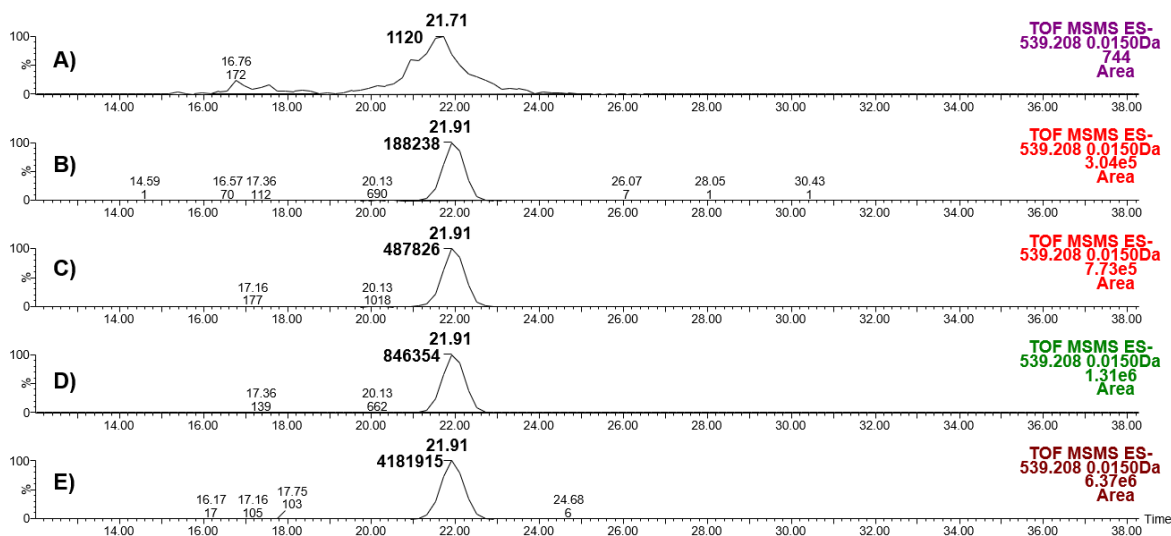
Obr. 51: Graf lineární závislosti plochy mobilního píku oleuropeinu na obsahu olivových lístků v oreganu, experiment IMS-MS bez izolace iontu markeru v kvadrupólu, každý obsah měřen dvakrát

Pro ověření, zda metoda dokáže odhalit falšování reálných vzorků, byl připraven vzorek simulující 10% falšování pomocí navažování rostlinného materiálu. Je zřejmé, že intenzita signálu pozorovaná v oblasti mobilního píku markeru je o 3 řády vyšší ve falšovaném oproti čistému oreganu (Obr. 52).

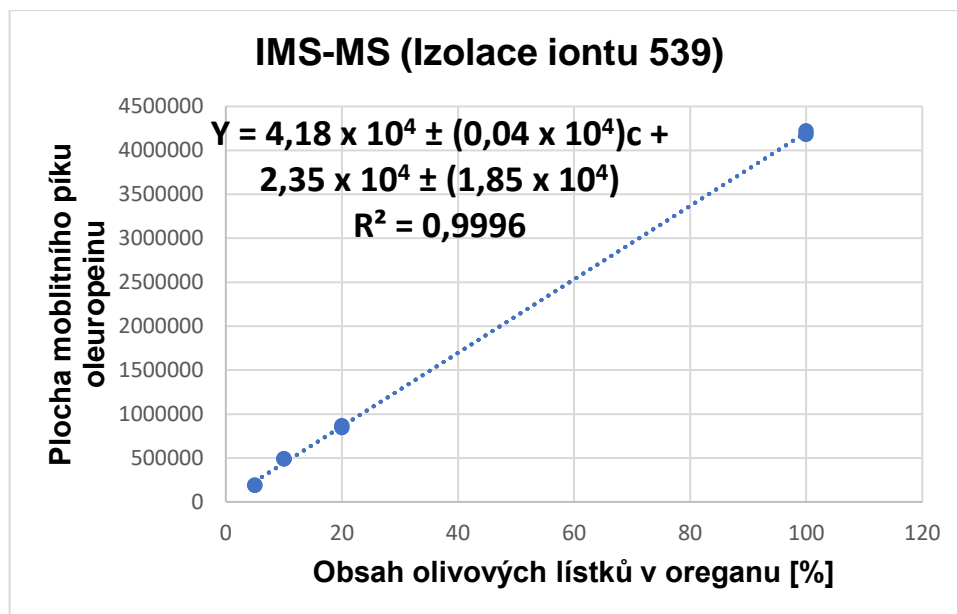


Obr. 52: Mobilogramy s uvedenými plochami píků pro ion při m/z 539,2024 ředěných extraktů (pomocí $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 50/50, v/v) (A – čisté oregano, B – oregano a olivové lístky (90/10, w/w))

Měření IMS-MS (s izolací iontu 539) poskytlo obdobné výsledky (Obr. 53 a 54). S vyšší selektivitou měření narůstá koeficient determinace $R^2 = 0,9996$, avšak dochází k mírnému poklesu citlivosti metody (směrnice lineární závislosti).



Obr. 53: Mobilogramy s plochou píků pro ion oleuropeinu m/z 539,2078 z měření IMS-MS (izolace iontu 539 v kvadrupólu) (obsah olivových lístků A – 0 %, B – 5 %, C – 10 %, D – 20 % a E – 100 %)

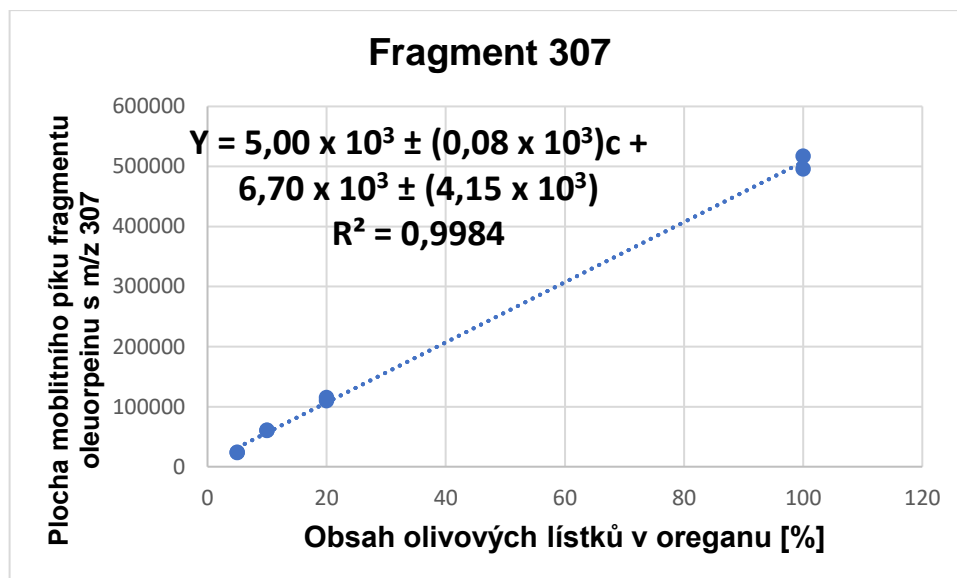


Obr. 54: Graf lineární závislosti plochy mobilního píku oleuropeinu na množství olivových lístků v oreganu, experiment IMS-MS s izolací iontu m/z 539 v kvadrupólu, každý obsah měřen dvakrát

Poslední experiment IMS-MSMS využil izolaci iontu m/z 539 v kvadrupólu a jeho následnou fragmentaci v transferu při 22 V (Tab. 9). I přes vyšší koeficienty determinace pro závislost ploch mobilních píků některých jiných fragmentů, byl pro určení obsahu oleuropeinu zvolen fragment s m/z 307, který vykazoval nejvyšší intenzitu signálu. Srovnání lineárních modelů je patrné z Obr. 55 a Příloh – Obr. A až Obr. F.

Tab. 9: Plochy mobilních píků fragmentů oleuropeinu (průměr ze dvou měření)

Obsah olivových lístků v oreganu [%]	Plocha píku fragmentu s hodnotou m/z						
	403	377	345	307	275	223	179
0	34	41	4	33	80	65	202
5	3471	15785	4318	23656	23630	4244	1764
10	8598	40424	10423	60373	57086	10055	4005
20	16246	76958	19672	112458	105405	18454	6978
100	80959	352383	97993	506549	460718	83634	31813



Obr. 55: Graf lineární závislosti plochy mobilního píku nejintenzivnějšího fragmentu oleuropeinu s m/z 307 na obsahu olivových lístků v oreganu, experiment IMS-MSMS s izolací iontu m/z 539 v kvadrupólu a jeho fragmentací v transferu při 22 V, každý obsah měřen dvakrát

Pro všechny varianty testovaných experimentů bylo dosaženo v případě oleuropeinu lineární závislosti plochy mobilních píků na obsahu olivových lístků. Se stoupající selektivitou měření je pozorovatelný pokles citlivosti metody (snižuje se směrnice přímky). Pro koeficient determinace (R^2) poskytlo nejvyšší hodnotu měření IMS-MS s izolací iontu 539, naopak nejhorší linearita, ale také citlivost byla pozorována u měření IMS-MSMS s izolací iontu 539 v kvadrupólu a fragmentací v transferu při 22 V a následné stanovení plochy mobilního píku fragmentu s m/z 307. Avšak i v tomto případě je již na úrovni 5 % příměsi olivových lístků patrný značný rozdíl oproti vzorku s 0 %, což dokazuje schopnost metody zachytit i relevantní (z hlediska ekonomického efektu) podíl olivových lístků v oreganu.

4.3. Měření reálných vzorků od různých výrobců

4.3.1. Vzorky šafránu

Postupem popsáním v experimentální části (viz Kap. 3.3.4.) byly připraveny a proměřeny tři vzorky šafránu. Případná příměs kurkumy byla vyhodnocována z plochy mobilního píku kurkuminu získaného při experimentu IMS-MS s izolací iontu m/z 369 (Tab. 10). Jelikož plochy mobilních píků pro sledovaný ion v analyzovaných vzorcích odpovídaly ploše pro vzorek s 0 % kurkumy, lze konstatovat, že kurkuma nebyla detekována v žádném ze zakoupených vzorků.

Tab. 10: Zjištěné množství kurkumy v zakoupených vzorcích šafránu (IMS-MS s izolací iontu 369)

Typ vzorku	Obsah kurkumy
A	n. d.
B	n. d.
C	n. d.

4.3.2. Vzorky oregana

Dle postupu v experimentální části (viz Kap. 3.3.4.) bylo připraveno a proměřeno celkem šest vzorků oregana. Přítomnost olivových lístků byla hodnocena na základě plochy mobilního píku oleuropeinu s využitím experimentu IMS-MS, který poskytoval nejvyšší citlivost. Všechny vzorky oregana poskytly plochy mobilního píku pro ion 539 a příslušný driftový čas na úrovni pozadí (srovnatelné s úrovní při úrovni 0 % olivových lístků). V žádném ze zakoupených vzorků nebylo detekováno falšování olivovými lístky (Tab. 11).

Tab. 11: Zjištěné množství olivových lístků v zakoupených vzorcích oregana (IMS-MS)

Typ vzorku	Zjištěný obsah olivových lístků
A	n. d.
B	n. d.
C	n. d.
D	n. d.
E	n. d.
F	n. d.

5. ZÁVĚR

Role koření v dnešním světě je nezanedbatelná, jeho nezaměnitelné aroma a velké množství druhů představuje rozsáhlou paletu možností a kombinací pro dochucování pokrmů. Falšování potravin a koření představuje zásadní problém a schopnost odhalení nežádoucích příměsí je esenciální pro zachování kvality koření.

Analýza falšování je nezbytný prvek potravinové analýzy. K tomuto účelu se v současné době používají metody analýzy DNA, především pro kvalitativní cílenou i necílenou analýzu. Metody jako FTIR, ¹H-NMR a UV-VIS už umožňují preciznější stanovení příměsí a v kombinaci s chemometrickými metodami lze provádět necílenou analýzu pro odhalení falšování. Rozsáhle používaná je hmotnostní spektrometrie většinou ve spojení s chromatografií, GC či LC. Jejich hlavní výhodou je měření v sekvencích, slabinou může být zdlouhavá optimalizace separačních systémů a delší doba analýzy.

V předložené práci je využito moderní spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií umožňující rychlé odhalení falšování šafránu pomocí kurkumy a oregana pomocí olivových lístků. Sběr dat na tomto přístroji se dá spolehlivě provést do 2 minut. Bylo vybráno vhodnější extrakční rozpouštědlo a navržen postup pro každou dvojici koření – příměs. Šafrán a kurkuma byly extrahovány směsí složení CH₃OH/H₂O/HCOOH (50/49/1, v/v), oregano a olivovník směsí CH₃OH/H₂O (50/50, v/v). Při experimentech s modelovými vzorky nastaly problémy přesného navažování malého množství koření (s ohledem na cenu šafránu), který však byl částečně překonán při použití míchání extraktů v určitých poměrech. Navržené metody jsou schopny spolehlivě odhalit falšování již na úrovni jednotek procent. Z ploch mobilitních píků lze usuzovat i na možnost záchytu nižších obsahů, a to 0,1 % pro oregano a olivové lístky a cca 1 % pro šafrán a kurkumu. Takovéto nízké obsahy příměsí již ale nebudou pro falšovatele zajímavé z ekonomických důvodů. V literatuře bylo popsáno falšování oregana s příměsí olivových lístků přes 30 %. [71] Pro oregano byla získána lineární závislost mezi plochou mobilitních píků a podílem olivových lístků. U šafránu závislost pro obsah kurkumy lineární nebyla. Odhalení příčiny této nelinearity je námětem pro další výzkum. Pro obě studovaná koření je třeba připomenout, že stanovení obsahu příměsí na základě vybraných markerů může být ovlivněno variabilitou jejich obsahu v přimíchávané složce (kurkumě, olivových lístcích). Pro zachycení falšování je však podstatné zjistit obsah na úrovni jednotek a více procent, což obě popsané metody umožňují. Analýza reálných vzorků neprokázala falšování u žádného z nich, kdy signál, který by mohl být přiřazen markerům, byl

na úrovni pozadí z matrice. Další vývoj metody by měl směřovat do vývoje průtokové analýzy IMS-MS, což umožní velmi rychlou analýzu velkého množství vzorků automaticky v sekvenci za sebou, kdy analýza jednoho vzorku by trvala do 3 minut. V dalších experimentech by bylo možné zvážit necílenou analýzu s aplikací chemometrických metod jako jsou PCA a HCA na data získaná spojením iontové mobility a hmotnostní spektrometrie. Ta by mohla odhalit falšování určitého koření různými příměsi.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APCI – Atmospheric pressure chemical ionization – chemická ionizace za atmosférického tlaku

CCS – Collision cross section – srážkový průřez (Ω)

CDI – Corona discharge ionization – ionizace korónovým výbojem

cIM – Cyclic ion mobility – cyklická iontová mobilita

DESI – Desorption electrospray ionization – desorpční ionizace elektrosprejem

EMA – Economically motivated adulteration – ekonomicky motivované falšování

ESI – Electrospray ionization – ionizace elektrosprejem

FTIR – NIR – Fourier Transformed Infra Red – Near Infra Red (Spectroscopy) – infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací – blízká infračervená oblast

GC – Gas chromatography – plynová chromatografie

HCA – Hierarchical cluster analysis – hierarchická shluková analýza

HS – headspace

ICP – Inductively coupled plasma – indukčně vázané plasma

IMS – Ion mobility spectrometry – iontová mobilitní spektrometrie

LDA – Linear discriminant analysis – lineární diskriminační analýza

LC – Liquid chromatography – kapalinová chromatografie

LCHRMS – Liquid chromatography high resolution mass spectrometry – kapalinová chromatografie s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií

n. d. – not detected – nedetekováno

NMR – Nuclear magnetic resonance – nukleární magnetická rezonance

MS – Mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie

OPLS-DA – Orthogonal partial least squares discriminant analysis – Ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců

PCA – Principal component analysis – analýza hlavních komponent

PCB – Printed circuit board – tištěná obvodová deska

PLS-DA – Partial least squares discriminant analysis – diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců

PLSR – Partial least square regression – regrese metodou částečných nejmenších čtverců

QqToF – Quadrupole time of flight – kvadrupól analyzátor doby letu

RAPD – PCR – Random amplified polymorphic DNA – polymerase chain reaction – náhodná amplifikace polymorfni DNA – polymerázová řetězová reakce

SCAR – PCR – Sequence characterized amplified region – polymerase chain reaction – amplifikovaná oblast charakterizovaná sekvencí – polymerázová řetězová reakce

TIC – Total ion current – celkový iontový proud

ToF – Time of flight – analyzátor doby letu

TWIM – Travelling wave ion mobility – iontová mobilita s putující vlnou

UV-VIS – Ultra Violet – Visible – ultrafialová – viditelná (oblast spektra)

7. LITERATURA

1. J. Velíšek, J. Hajšlová, *Chemie potravin 1*, 3. vydání, Tábor: OSSIS, 2009.
2. E. Mello, S. Lusuardi, S. Meloni, M. Oddone, Provenance studies of Roman amphorae by instrumental neutron activation analysis, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 69 (1982) 259-270.
3. J. Spink, D. C. Moyer, Defining the public health threat of food fraud, *J. Food Sci.* 76 (2011) 157-163.
4. Evropská komise, Food safety, Food, Agri food-fraud, Food Fraud: What does it mean? https://food.ec.europa.eu/safety/agri-food-fraud/food-fraud-what-does-it-mean_cs, staženo a přeloženo 30.10.2022.
5. J. C. Moore, J. Spink, M. Lipp, Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010, *J. Food. Sci.* 77 (2012) 118-126.
6. <https://www.denik.cz/moravskoslezsky-kraj/zabijak-jmenem-metanol-rok-pote-20130903-q2fe.html>, staženo 6.11.2022.
7. Y.-C. Tuan, M.-H. Yang, S.-B. Jong, C.-K. Wang, J. Shiea, Melamine contamination, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 729-735.
8. M. Boland, H. Singh, *Milk proteins: From Expression to Food*, third ed., Academic press, an imprint of Elsevier, San Diego 2020.
9. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a o zrušení směrnice Komise 87/250/EHS, směrnice.
10. S. Bansal, A. Singh, M. Mangal, A. K. Mangal, S. Kumar, Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57 (2017) 1174-1189.
11. https://food.ec.europa.eu/safety/eu-agri-food-fraud-network/eu-coordinated-actions/herbs-and-spices-2019-2021_en, staženo a přeloženo 1.2.2023.
12. E. Hong, S. Y. Lee, J. Y. Jeong, J. M. Park, B. H. Kim, K. Kwon, H. S. Chun, Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category, *J. Sci. Food Agric.* 97 (2017) 3877-3896.

13. <https://www.mccormickscienceinstitute.com/resources/history-of-spices>, staženo 18.11.2022.
14. <https://www.cbi.eu/market-information/spices-herbs/what-demand>, staženo 19.11.2022.
15. P. Galvin-King, S. A. Haughey, C. T. Elliott, Herb and spice fraud: the drivers, challenges and detection, *Food Control* 88 (2018) 85-97.
16. V. A. Parthasarathy, B. Chempakam, T. J. Zachariah, *Chemistry of spices*, CABI 2008.
17. C. S. Narayanan, *Chemistry of black pepper*, ed. P. N. Ravindran, *Black Pepper*, London, CRC Press, Chapter 3 (2000).
18. A. A. D'Archivio, M. A. Maggi, Geographical identification of saffron (*Crocus sativus* L.) by linear discriminant analysis applied to the UV–visible spectra of aqueous extracts, *Food Chem.* 219 (2017) 408-413.
19. L. Zhi, G. Xianmei, Y. Jian , Z. Duoyong , L. Bin, Z. Zihong, C. Piao, W. Dongguang, Quality evaluation and origin traceability of the imported and domestic saffron spice (*Crocus sativus* L.) products in China market using chemical composition and stable isotope analysis, *J. Food Compos. Anal.* 118 (2023) 105202.
20. S. Khan, K. J. Mirza, F. Anwar, M. Abdin, Development of RAPD markers for authentication of *Piper nigrum* (L.), *Environ. We Int. J. Sci. Tech.* 5 (2010) 47-56.
21. I. Orrillo, J. P. Cruz-Tirado, A. Cardenas, M. Oruna, A. Carnero, D. F. Barbin, R. Siche, Hyperspectral imaging as a powerful tool for identification of papaya seeds in black pepper, *Food Control* 101 (2019) 45-52.
22. E. A. E. Garber, C. H. Parker, S. M. Handy, C. Y. Cho, R. Panda, M. Samadpour, D. H. Reynaud, G. C. Ziobro, Presence of Undeclared Food Allergens in Cumin: The Need for Multiplex methods, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 1202-1211.
23. J. P. Cruz-Tirado, R. Lopes de França, M. Tumbajulca, G. Barraza-Jauregui, D. F. Barbin, R. Siche, Detection of cumin powder adulteration with allergenic nutshells using FT-IR and portable NIRS coupled with chemometrics, *J. Food Compos. Anal.* 116 (2023) 105044.
24. R. L. Peters, K. J. Allen, S. C. Dharmage, J. J. Koplin, T. Dang, K. P. Tilbrook, A. Lowe, M. L. K. Tang, L. C. Gurrin, Natural history of peanut allergy and predictors of resolution

in the first 4 years of life: A population-based assessment, *J. Allergy Clin. Immunol.* 135 (2015) 1257-1266.

25. V. S. Govindarajan, W. H. Stahl, Turmeric - chemistry, technology and quality, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 12 (1980) 199-301.

26. M. E. A. El-Hack, M.T. El-Saadony, A. A. Swelum, M. Arif, M. M. A. Ghanima, M. Shukry, A. Noreldin, A. E. Taha, K. E. El-Tarabily, Curcumin, the active substance of turmeric: its effects on health and ways to improve its bioavailability, *J. Sci. Food Agric.* 101 (2021) 5747-5762.

27. K. Dhanya, S. Syamkumar, S. Siju, B. Sasikumar, Sequence characterized amplified region markers: A reliable tool for adulterant detection in turmeric powder, *Food Res. Int.* 44 (2011) 2889-2895.

28. C. V. Di Anibal, M. Odena, I. Ruisánchez, M. P. Callao, Determining the adulteration of spices with Sudan I-II-III-IV dyes by UV-visible spectroscopy and multivariate classification techniques, *Talanta* 79 (2009) 887-892.

29. T. M. Fonovich, Sudan dyes: are they dangerous for human health?, *Drug Chem. Toxicol.* 36 (2012) 343-352.

30. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_05_385, staženo a přeloženo 5.2.2023.

31. K. Nallappan, J. Dash, S. Ray, B. Pesala, Identification of adulterants in turmeric powder using terahertz spectroscopy, In 38th International conference on Infrared, millimeter, and Terahertz waves (ImmW-Thz) - 2013.

32. <https://www.bhg.com/what-is-saffron-6889743>, staženo 16.6.2023.

33. <https://www.businessinsider.com/why-saffron-world-most-expensive-spice-2018-4>.

34. J. P. Melnyk, S. Wang, M. F. Marccone, Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron, *Food Res. Int.* 43 (2010) 1981-1989.

35. <https://www.britannica.com/topic/saffron>, staženo 15.4.2024.

36. E. A. Petrakis, L. R. Cagliani, M. G. Polissiou, R. Consonni, Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by ¹H NMR metabolite fingerprinting, *Food Chem.* 173 (2015) 890-896.

- 37.** E. A. Petrakis, M. G. Polissiou, Assessing saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant-derived adulterants by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy coupled with chemometrics, *Talanta* 162 (2017) 558-566.
- 38.** R. Fattahi, A. Mani-Varnosfaderani, M. Barzegar, M. A. Sahari, Rapid metabolites fingerprinting by ion mobility spectrometry: A novel evaluation method for bio-adulteration of saffron (*Crocus sativus* L.), *Ind. Crop. Prod.* 188 (2022) 115707.
- 39.** S. A. Haughey, P. Galvin-King, Y.-Ch. Ho, S. E. J. Bell, Ch. T. Elliott, The feasibility of using near infrared and Raman spectroscopic techniques to detect fraudulent adulteration of chilli powders with Sudan dye, *Food Control* 48 (2015) 75-83.
- 40.** M. Brunner, R. Katona, Z. Stefánka, T. Prohaska, Determination of the geographical origin of processed spice using multielement and isotopic pattern on the example of Szegedi paprika, *Eur. Food Res. Technol.* 231 (2010) 623-634.
- 41.** K. W. Singletary, Oregano: Overview of the Literature on Health Benefits, *Nutr.* 45 (2010) 129-138.
- 42.** M. Marieschi, A. Torelli, A. Bianchi, R. Bruni, Development of a SCAR marker for the identification of *Olea europaea* L.: A newly detected adulterant in commercial Mediterranean oregano, *Food Chem.* 126 (2011) 705–709.
- 43.** E. Wielogorska, O. Chevallier, C. Black, P. Galvin-King, M. Deletre, C. T. Kelleher, S. A. Haughey, Ch. T. Elliott, Development of a comprehensive analytical platform for the detection and quantitation of food fraud using a biomarker approach. The oregano adulteration case study, *Food. Chem.* 239 (2018) 32-39.
- 44.** ISO 3632-1: Saffron (*Crocus sativus* Linnaeus) - Part 1: Specification, 15.12.1993.
- 45.** ISO 3632-2: Saffron (*Crocus sativus* Linnaeus) - Part 2: Test Methods, 15.12.1993.
- 46.** M. Marieschi, A. Torelli, R. Bruni, Quality Control of Saffron (*Crocus sativus* L.): Development of SCAR Markers for the Detection of Plant Adulterants Used as Bulking Agents, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 10998-11004.
- 47.** K. Dhanya, S. Syamkumar, S. Siju, B. Sasikumar, SCAR markers for adulterant detection in ground chilli, *Br. Food J.* 113 (2011) 656-668.

- 48.** P. D. N. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. deWaard, Biological identifications through DNA barcodes, *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 270 (2003) 313-321.
- 49.** W. Huang, F. Li, Y. Liu, Ch. Long, Identification of *Crocus sativus* and its Adulterants from Chinese Markets by using DNA Barcoding Technique, *Iran. J. Biotechnol.* 13 (2015) 36-42.
- 50.** S. Lohumi, S. Lee, H. Lee, B. K. Cho, A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration, *Trends Food Sci. Technol.* 46 (2015) 85-98.
- 51.** S. Lohumi, S. Lee, B. Cho, Optimal variable selection for Fourier transform infrared spectroscopic analysis of starch-adulterated garlic powder, *Sens. Actuator B-Chem.* 216 (2015) 622-628.
- 52.** S. Lohumi, S. Lee, W. Lee, M. S. Kim, Ch. Mo, H. Bae, B. Cho, Detection of Starch Adulteration in Onion Powder by FT-NIR and FTIR Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 9246-9251.
- 53.** K. Kucharska-Ambrozej, J. Karpinska, The application of spectroscopic techniques in combination with chemometrics for detection adulteration of some herbs and spices, *Microchem J.* 153 (2020) 104278.
- 54.** M. Bononi, F. Tateo, LC-ESI-MS/MS Identification of oleuropein as marker of *Olea Europaea* L. leaves used as a bulking agent in ground oregano and sage, *Ital. J. Food Sci.* 23 (2011) 245-251.
- 55.** C. Black, S. A. Haughey, O. P. Chevallier, P. Galvin-King, Ch. T. Elliott, A comprehensive strategy to detect the fraudulent adulteration of herbs: The oregano approach, *Food Chem.* 210 (2016) 551-557.
- 56.** J. Rubert, O. Lacina, M. Zachariasova, J. Hajslova, Saffron authentication based on liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry and multivariate data analysis, *Food Chem.* 204 (2016) 201-209.
- 57.** M. Bononi, I. Fiordaliso, F. Tateo, Rapid GC/MS test for identification of *Olea Europaea* L. leaves in ground oregano, *Ital. J. Food Sci.* 22 (2010) 479-483.

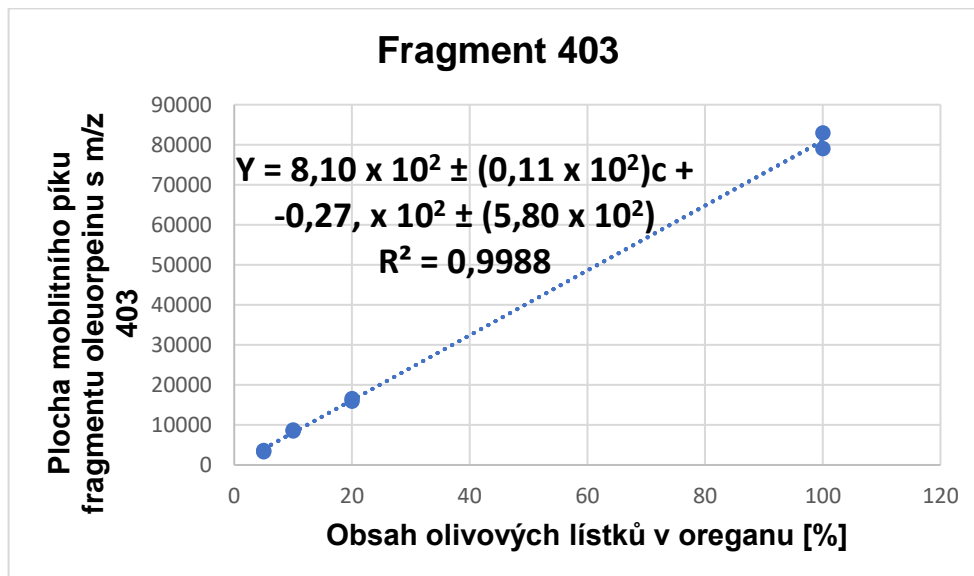
- 58.** T. Wyttenbach, J. Gidden, M. T. Bowers, *Developments in Ion Mobility: Theory, Instrumentation, and Applications*, v knize: C. L. Wilkins a S. Trimpin (ed.), *Ion Mobility Spectrometry - Mass Spectrometry*, CRC Press, Boca Raton 2011 str. 3-30.
- 59.** K. Giles, J. Ujma, J. Wildgoose, S. Pringle, K. Richardson, D. Langridge, M. Green, A Cyclic Ion Mobility-Mass Spectrometry System, *Anal. Chem.* 91 (2019) 8564-8573.
- 60.** https://www.waters.com/waters/en_US/SELECT-SERIES-Cyclic-IMS-ion-mobility-mass-spectrometer/nav.htm?cid=135021297&locale=en_US, staženo 15.4.2024
- 61.** M. Hernández-Mesa, D. Ropartz, A. M. Garcia-Campana, H. Rogniaux, G. Dervilly-Pinel, B. Le Bizec, *Ion Mobility Spectrometry in Food Analysis: Principles, Current Applications and Future Trends*, *Molecules* 24 (2019) 2706.
- 62.** R. Garrido-Delgadoa, F. Mercader-Trejoa, S. Sielemann, W. de Bruyn, L. Arce, M. Valcárcel, Direct classification of olive oils by using two types of ion mobility spectrometers, *Anal. Chim. Acta* 696 (2011) 108-115.
- 63.** M. Alikord, A. Mohammadi, M. Kamankesh, N. Shariatifar, Food safety and quality assessment: comprehensive review and recent trends in the applications of ion mobility spectrometry (IMS), *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 62 (2022) 4833-4866.
- 64.** N. Arroyo-Manzanares, A. Martín-Gómez, N. Jurado-Campos, R. Garrido-Delgado, C. Arce, L. Arce, Target vs spectral fingerprint data analysis of Iberian ham samples for avoiding labelling fraud using headspace – gas chromatography – ion mobility spectrometry, *Food Chem.* 246 (2018) 65-73.
- 65.** N. Gerhardt, M. Birkenmeier, S. Schwolow, S. Rohn, P. Weller, Volatile-compound fingerprinting by headspace-gas-chromatography ion-mobility spectrometry (HS-GC-IMS) as a benchtop alternative to ¹H NMR profiling for assessment of the authenticity of honey, *Anal. Chem.* 90 (2018) 1777-1785.
- 66.** X. Wang, S. Yang, J. He, L. Chen, J. Zhang, Y. Jin, J. Zhou, Y. Zhang, A green triple-locked strategy based on volatile-compound imaging, chemometrics, and markers to discriminate winter honey and sapium honey using headspace gas chromatography-ion mobility spectrometry, *Food Res. Int.* 119 (2019) 960-967.

- 67.** L. Zhang, Q. Shuai, P. Li, Q. Zhang, F. Ma, W. Zhang, X. Ding, X. Wang, Ion mobility spectrometry fingerprints: A rapid detection technology for adulteration of sesame oil, *Food Chem.* 192 (2016) 60-66.
- 68.** Q. Shuai, L. Zhang, P. Li, Q. Zhang, X. Wang, X. Ding, W. Zhang, Rapid adulteration detection for flaxseed oil using ion mobility spectrometry and chemometric methods, *Anal. Methods* 6 (2014) 9575-9580.
- 69.** T. J. Causon, V. Ivanova-Petropulos, D. Petrusheva, E. Bogeveva, S. Hann, Fingerprinting of traditionally produced red wines using liquid chromatography combined with drift tube ion mobility-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 1052 (2019) 179-189.
- 70.** R. Fattahi, A. Mani-Varnosfaderani, M. Barzegar, M. A. Sahari, An ion mobility spectrometry-chemometrics combination approach for assessing adulteration in saffron (*Crocus sativus* L.) with synthetic colorants, *Ind. Crop. Prod.* 193 (2023) 116161.
- 71.** B. Rocamora-Rivera, N. Arroyo-Manzanares, P. Viñas, Detection of Adulterated Oregano Samples Using Untargeted Headspace-Gas Chromatography-Ion Mobility Spectrometry Analysis, *Foods* 13 (2024) 516.
- 72.** S. Fu, D. Arráez-Roman, A. Segura-Carretero, J. A. Menéndez, M. P. Menéndez-Gutiérrez, V. Micol, A. Fernández-Gutiérrez, Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 643-654.
- 73.** L. Sabatino, M. Scordino, M. Gargano, A. Belligno, P. Traulo, G. Gagliano, HPLC/PDA/ESI-MS Evaluation of Saffron (*Crocus sativus* L.) Adulteration, *Nat. Prod. Commun.* 6 (2011) 1873-1876.
- 74.** H. Jiang, A. Somogyi, N. E. Jacobsen, B. N. Timmermann, D. R. Gang, Analysis of curcuminoids by positive and negative electrospray ionization and tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 1001-1012.
- 75.** P. Chatterjee, S. S. Dutta, T. Chakraborty, Tautomers and Rotamers of Curcumin: A Combined UV Spectroscopy, High-Performance Liquid Chromatography, Ion Mobility Mass Spectrometry, and Electronic Structure Theory Study, *J. Phys. Chem. A* 126 (2022) 1591-1604.

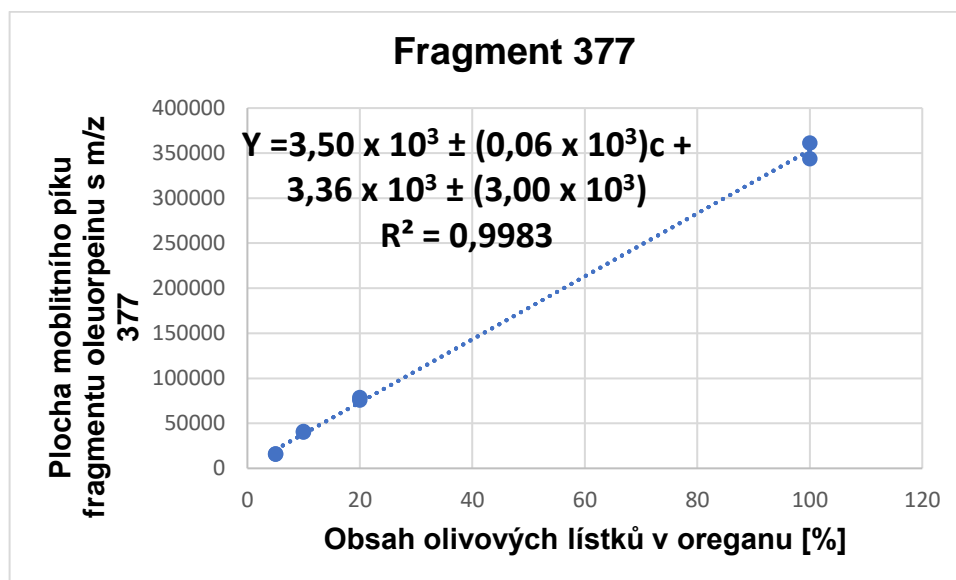
- 76.** J. Cyriac, J. Paulose, M. George, R. Srinivas, D. Giblin, M. L. Gross, Protonation of curcumin triggers sequential double cyclization in the gas-phase: An electrospray mass spectrometry and DFT study, *Int. J. Mass Spectrom.* 438 (2019) 107-114.
- 77.** A. Mena-Garcia, D. Herrero-Gutierrez, M. L. Sanz, M. Diez-Municio, A. I. Ruiz-Matute, Fingerprint of Characteristic Saffron Compounds as Novel Standardization of Commercial *Crocus sativus* Extracts, *Foods* 12 (2023) 1634.
- 78.** I. Y. Younis, E. Mohsen, R. M. Ibrahim, A. R. Fernie, S. Alseekh, M. A. Salem, Non-targeted metabolomics and chemometrics for saffron (*Crocus sativus* L.) authentication and adulteration detection in relation to its anticholinesterase activity, *Food Chemistry Advances* 2 (2023) 100217.
- 79.** P. Chatterjee, S. S. Dutta, M. Agarwal, S. Dey, T. Chakraborty, UV-A-Induced Photoisomerization and Photodimerization of Curcumin: An Ion Mobility Mass Spectrometry Study, *J. Phys. Chem. A* 128 (2024) 548-562.
- 80.** N. K. Bhatia, S. Kishor, N. Katyal, P. Gogoi, P. Narang, S. Deep, Effect of pH and temperature on conformational equilibria and aggregation behaviour of curcumin in aqueous binary mixtures of ethanol, *RSC Adv.* 6 (2016) 103275-103288.
- 81.** L. Gentile, N. A. Uccella, Selected bioactives from callus cultures of olives (*Olea europaea* L. Var. Coratina) by LC-MS, *Food Res. Int.* 55 (2014) 128-136.

8. PŘÍLOHY

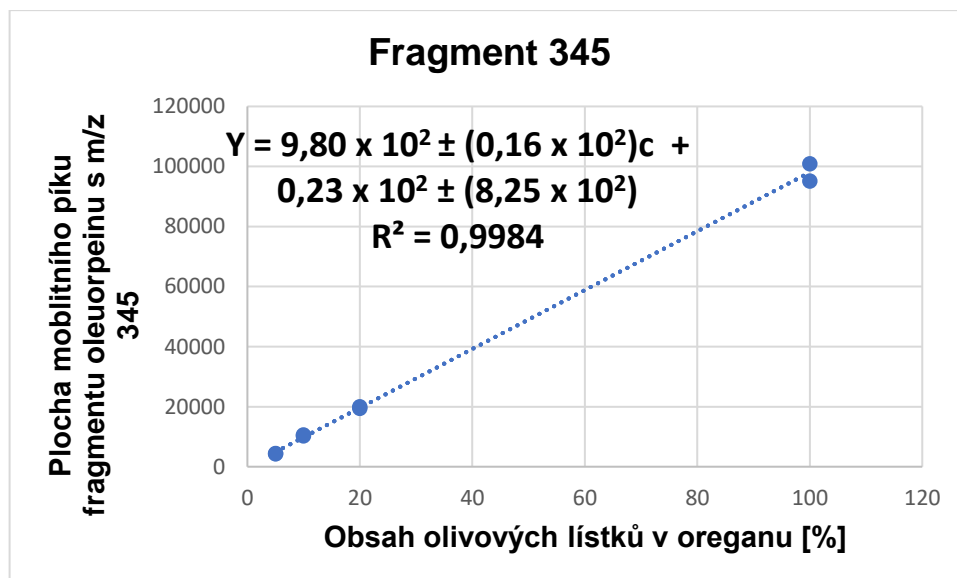
8.1. Grafy lineárních závislostí dalších fragmentů oleuropeinu



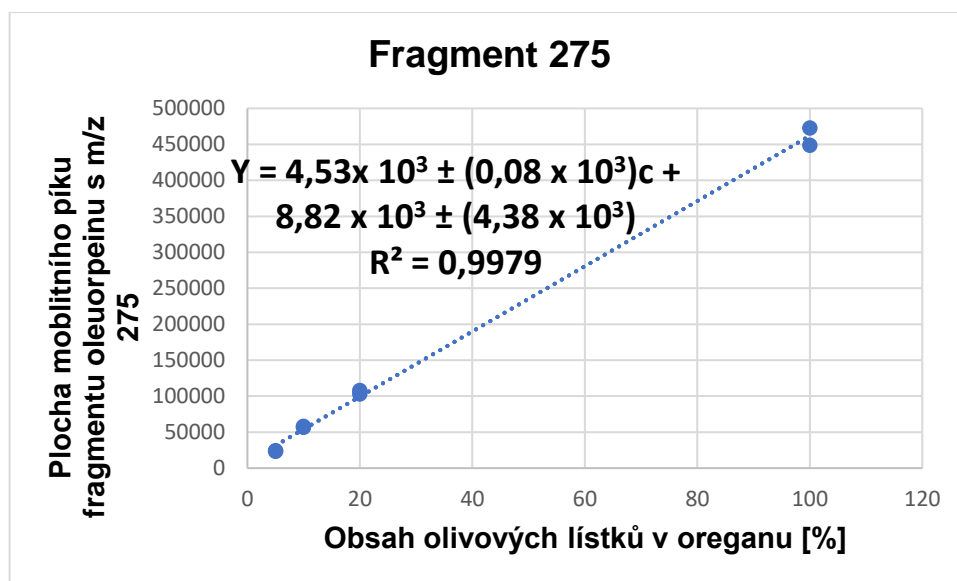
Obr. A: Graf lineární závislosti plochy mobilního píku fragmentu oleuropeinu s m/z 403 na obsahu olivových lístků v oreganu, experiment IMS-MSMS s izolací iontu m/z 539 v kvadrupólu a jeho fragmentací v transferu při 22 V, každý obsah měřen dvakrát



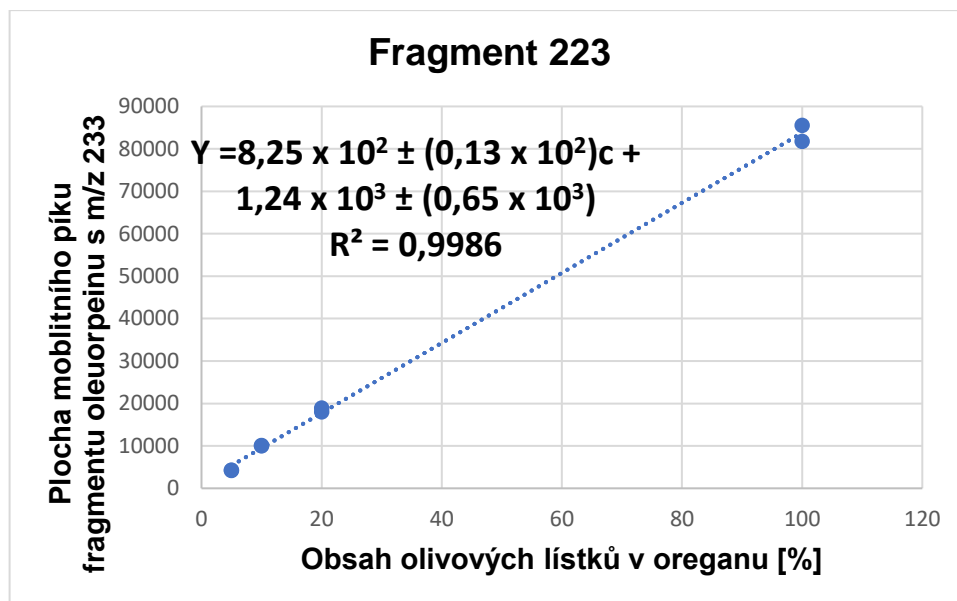
Obr. B: Graf lineární závislosti plochy mobilního píku fragmentu oleuropeinu s m/z 377 na obsahu olivových lístků v oreganu, experiment IMS-MSMS s izolací iontu m/z 539 v kvadrupólu a jeho fragmentací v transferu při 22 V, každý obsah měřen dvakrát



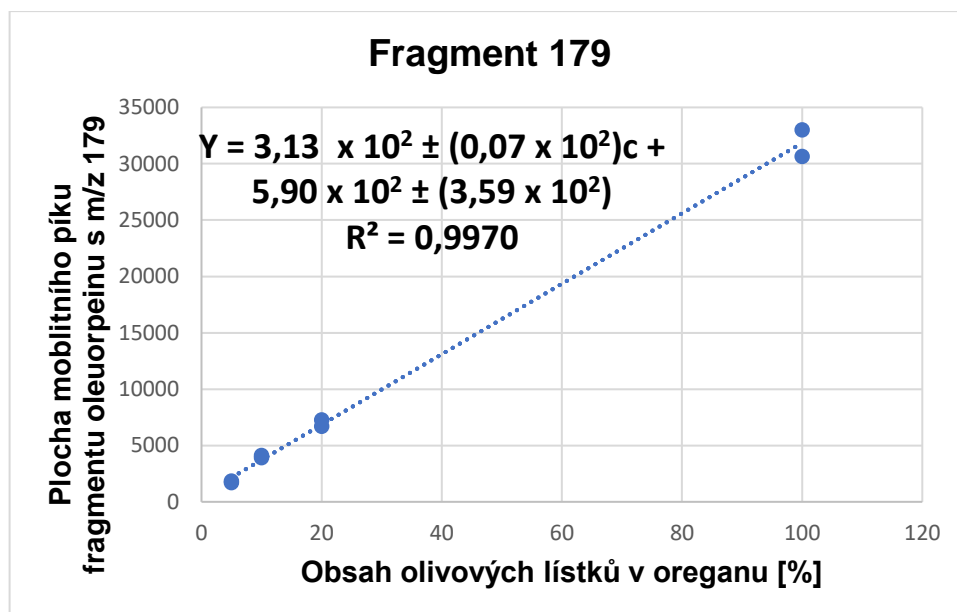
Obr. C: Graf lineární závislosti plochy mobilního píku fragmentu oleuropeinu s m/z 345 na obsahu olivových lístků v oreganu, experiment IMS-MSMS s izolací iontu m/z 539 v kvadrupólu a jeho fragmentací v transferu při 22 V, každý obsah měřen dvakrát



Obr. D: Graf lineární závislosti plochy mobilního píku fragmentu oleuropeinu s m/z 275 na obsahu olivových lístků v oreganu, experiment IMS-MSMS s izolací iontu m/z 539 v kvadrupólu a jeho fragmentací v transferu při 22 V, každý obsah měřen dvakrát



Obr. E: Graf lineární závislosti plochy mobilního píku fragmentu oleuropeinu s m/z 223 na obsahu olivových lístků v oreganu, experiment IMS-MSMS s izolací iontu m/z 539 v kvadrupólu a jeho fragmentací v transferu při 22 V, každý obsah měřen dvakrát



Obr. F: Graf lineární závislosti plochy mobilního píku fragmentu oleuropeinu s m/z 179 na obsahu olivových lístků v oreganu, experiment IMS-MSMS s izolací iontu m/z 539 v kvadrupólu a jeho fragmentací v transferu při 22 V, každý obsah měřen dvakrát