

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality zemědělských produktů**



**Využití nukleární magnetické rezonance v pokročilé  
analýze zemědělských produktů**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Blanka Sládková**

**Obor studia: ATZD**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využití nukleární magnetické rezonance v pokročilé analýze zemědělských produktů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20. 4. 2017

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D., za odborné vedení, pomoc a cenné rady při zpracování této bakalářské práce. Velké díky za trpělivost a veškerou podporu při studiu patří také mé rodině.

# Využití nukleární magnetické rezonance v pokročilé analýze zemědělských produktů

## Souhrn

Bakalářská práce se zabývá nukleární magnetickou rezonancí (NMR) a jejím využitím v analýze zemědělských produktů. Jev nukleární magnetické rezonance byl poprvé pozorován v roce 1945 ve Spojených státech amerických. Od té doby se využití NMR rozšířilo do různých vědních oborů např. medicíny, biochemie, farmacie a potravinářství.

V potravinářství se však trvale rozšířilo až v 80. letech. NMR využívá k detekci magnetické vlastnosti některých atomových jader. Tradičně se používá pro určení chemické struktury čistých látek. V současnosti je stále více využívána za účelem charakterizace složek potravy i hotových produktů. Výhodou metody je relativně jednoduchá příprava vzorků, která se odvíjí dle skupenství zkoumané látky. Minimální příprava vzorku je potřebná u látek v kapalném skupenství. Díky objevu HR-MAS NMR, která využívá při svém měření tzv. magického úhlu, je možné, za minimální přípravy vzorku měřit také heterogenní směsi a látky v polotuhém stavu.

Nejvíce vědeckých článků je zaměřeno na jednotlivé skupiny zemědělských produktů: polní plodiny, ovoce a zeleninu, mléko a mléčné výrobky, maso a masné výrobky a také koření a léčivé rostliny. NMR umožňuje stanovit metabolický profil produktů, určit jejich geografický původ, odlišit jednotlivé odrůdy, zhodnotit vliv vnějších podmínek při pěstování plodin či prokázat jejich případné falšování. Značný přínos má také při studiu struktury biologicky aktivních látek, jejich identifikaci a kvantifikaci. Společný přístup k vývoji metod a databází je nezbytný pro další pokroky ve využití NMR v potravinářství.

**Klíčová slova:** nukleární magnetická rezonance, strukturní analýza, kvalita zemědělských produktů, kvalita potravin, foodomika, metabolomika, autenticita, falzifikace

# NMR in advanced analysis of agricultural products

## Summary

The main purpose of this Bachelor's thesis is nuclear magnetic resonance (NMR) and its application in analysis of agricultural products. The first success in observing the phenomenon of NMR is traced back to 1945 in the USA. Since that time, the application of NMR spread into several fields of science such as medicine, biochemistry, pharmacology, food science etc.

Consistent and widespread application of NMR in food science started in the 1980's. The magnetic properties of several atomic nuclei are used for NMR detection. NMR is traditionally used for structure determination of pure chemical substances. Today NMR is being increasingly used in the field of food composition analysis. The advantage of this method remains in relatively simple preparation of samples which is based on the state of matrices. Minimal sample preparation is required for samples in liquid phase. It is possible to measure heterogenous mixtures and semi-solid samples with minimum preparation time thanks to the discovery of HR-MAS NMR (high-resolution magic angle spinning NMR).

The most of scientific articles is focused on different groups of agricultural products: e.g. field crops, fruit and vegetables, milk and dairy products, meat and meat products, spices and medicinal plants. NMR can define metabolic profiles of products, determine its geographical origin, differentiate various cultivars, evaluate the effect of environmental factors as well as the influence of growing conditions or can show its potential falsification. NMR also contributes to the structure elucidation and quantification of biologically active compounds. For further progress of NMR use in food science, the coordinated approach of method and databases is needed.

**Keywords:** nuclear magnetic resonance, structural analysis, quality of agricultural products, food quality, foodomics, metabolomics, authenticity, falsification

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>6</b>
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>7</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1 Nukleární magnetická rezonance .....</b>	<b>8</b>
3.1.1 Historie NMR .....	8
3.1.2 Princip metody .....	9
3.1.2.1 Klasický model .....	10
3.1.2.2 Kvantový model .....	11
3.1.2.3 Chemický posun .....	14
3.1.2.4 Spin-spinové interakce .....	15
3.1.3 NMR spektra .....	16
3.1.3.1 Spektra $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ .....	16
3.1.4 NMR spektrometr .....	19
3.1.4.1 LR-NMR a HR-NMR .....	20
3.1.5 Odběr a příprava vzorků .....	22
3.1.5.1 Konzervace .....	23
3.1.5.2 Odstranění vnějších nečistot .....	23
3.1.5.3 Redukce .....	24
3.1.5.4 Sušení .....	24
3.1.5.5 Extrakce a rozpouštědla .....	24
<b>3.2 Kvalita potravin .....</b>	<b>27</b>
3.2.1 Polní plodiny .....	30
3.2.1.1 Obilniny .....	30
3.2.1.2 Okopaniny .....	32
3.2.2 Ovoce a zelenina .....	33
3.2.3 Mléko a mléčné výrobky .....	36
3.2.4 Maso a masné výrobky .....	39
3.2.5 Koření a léčivé rostliny .....	40
<b>3.3 Studium struktury biologicky aktivních látek.....</b>	<b>42</b>
<b>4 Závěr.....</b>	<b>44</b>
<b>5 Seznam literatury .....</b>	<b>45</b>
<b>6 Seznam použitých symbolů a zkratk .....</b>	<b>52</b>

# 1 Úvod

Neustále se zvyšující požadavky na kvalitu a nutriční hodnotu potravin vedou k tomu, že se potraviny a veškeré dění s nimi související dostává do popředí výzkumu. S těmito zvyšujícími se požadavky roste zároveň i poptávka po spolehlivých analytických metodách, které budou schopné potraviny co nejlépe analyzovat a zajistit tak jejich kontrolu.

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je používána především pro svou robustnost, komplexnost a přesnost. V posledních letech začala být díky technologickým pokrokům aplikována právě při zkoumání potravin, kde nachází široké uplatnění. V první řadě dokáže objasnit strukturu molekul. Mimo to umožňuje porozumět např. mechanismu a kinetice chemických reakcí, metabolickým změnám probíhajícím jak v průběhu zrání plodin, tak i při následujícím skladování.

NMR je tedy cenným pomocníkem při charakteristice potravin: jejich autentifikaci, stopování změn v metabolickém profilu, určování geografického původu a mnohých dalších. Výrazně také přispívá při hledání biomarkerů různých onemocnění a objasňování struktury biologicky aktivních látek.

Doména využití NMR byla původně především v základním výzkumu, nyní se ale rozšiřuje i do dalších disciplín.

## **2 Cíl práce**

Cílem práce bude seznámení se s principy nukleární magnetické rezonance a především zmapování využití metody NMR v analýze zemědělských produktů. Práce bude zaměřena na komplexní metabolomické analýzy v zemědělství a potravinářství a studium struktury biologicky aktivních látek.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární neboli jaderná magnetická rezonance (NMR) je jednou z nejdůležitějších metod, které se využívají při určování chemické struktury organických sloučenin a je také jednou z hlavních analytických metod využívaných v syntetické chemii (Veeman, 1997). Mimo jiné umožňuje také studium průběhu chemických reakcí. Díky své univerzálnosti našla využití i v mnoha dalších vědních oborech jakými jsou: biochemie, fyziologie, medicína, farmacie, veterinární vědy nebo archeologie (Andrew et Szczesniak, 1995). V potravinářství je využívána např. při kontrole bezpečnosti a kvality produktů, autenticity a falzifikace potravin (Laghi et al., 2014). Využití NMR je velmi významné a umožňuje získání důležitých poznatků v různých odvětvích vědy.

#### 3.1.1 Historie NMR

Již v roce 1924 Pauli předpovídal, že jádra určitých atomů mají vnitřní moment hybnosti označovaný jako spin. Gerlach a Stern provedli experimentální pokusy s paprsky, čímž přímo potvrdili, že jádra atomů vykazují magnetický moment. Tento pokus byl později zdokonalen Rabim a kol., kteří jako první využili elektromagnetického záření a demonstrovali tak rezonanční efekt. První pokusy detekovat NMR signály byly neúspěšné, pravděpodobně z důvodu, že vybrané vzorky měly dlouhé relaxační časy (Emsley et Feeney, 1995).

Na přelomu roku 1945 a 1946 pracovaly ve Spojených státech amerických nezávisle na sobě dvě skupiny fyziků. Z Harvardovy univerzity to byli Edward M. Purcell, Howard C. Torrey a Richard V. Pound. V druhé skupině byli Felix Bloch, William W. Hansen a Martin Packard ze Stanfordovy univerzity v Kalifornii. Ti jako první uspěli v pozorování fenoménu NMR v pevné a kapalné fázi a položili tak základ dosud neprozkoumanému odvětví vědy. V roce 1952 obdrželi Bloch a Purcell Nobelovu cenu za fyziku (Günther, 2013).

Od té doby význam NMR neustále roste, což bylo umocněno i dalším udělením Nobelových cen. V roce 1991 byl oceněn Richard R. Ernst za významný přínos k rozvoji experimentálních technik NMR, v roce 2002 Kurt Wütrich za příspěvek k rozvoji strukturální biologie a v roce 2003 byli oceněni Paul C. Lauterbur a Sir Peter Mansfield za vynález zobrazovací metody pro NMR, dnes známé jako MRI (magnetic resonance imaging). Její využití stejně jako NMR tomografie je známé především v oblasti medicíny, kde představuje neinvazivní metodu zobrazující měkké tkáně a je pravidelně používána v mnoha nemocnicích.

V poslední době se však MRI začíná využívat i v potravinářství (Emsley et Feeney, 1995; Günther, 2013).

Využití NMR spektroskopie jako takové se v potravinářství datuje až od 80. let minulého století. Primárním důvodem byl nedostatek vědecké odbornosti, vysoké náklady na vybavení a absence součástí spektrometru, které by byly vhodné pro potravinářské účely. S rozvojem nástrojů pro NMR a se zlepšujícími se programy pro sbírání a analyzování dat se využití NMR v potravinářství rapidně zvýšilo (Marccone et al., 2013).

Objev chemického posunu a spin-spinových interakcí dramaticky změnil vývoj NMR. Tato metoda se mnohem více používá mezi chemiky než mezi fyziky (Emsley et Feeney, 1995).

### 3.1.2 Princip metody

NMR se řadí k spektroskopickým metodám, které se zakládají na magnetických vlastnostech atomových jader. Atomové jádro se skládá z protonů (jejich počet je určen protonovým číslem) a neutronů (jejich počet je spolu s počtem protonů dán nukleonovým číslem).

Jádra většiny atomů prvků rotují kolem své vlastní osy a mají tzv. vnitřní moment hybnosti  $\mathbf{p}$  (jaderný spin), díky kterému mohou vykazovat také magnetický moment  $\boldsymbol{\mu}$  daný vztahem:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{p}$$

kde  $\gamma$  je gyromagnetický poměr. Gyromagnetický poměr je konstanta charakteristická pro daný izotop (síla magnetického pole jádra). Protože dochází k párování spinů protonů a neutronů v jádře, můžeme dle protonového a nukleonového čísla izotopu rozlišit tři způsoby, jakých hodnot bude nabývat spinové kvantové číslo  $\mathbf{I}$  (celkový spin jádra):

- a) pokud je nukleonové číslo liché:  $\mathbf{I} = 1/2, 3/2, 5/2 \dots$  (např.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )
- b) pokud je nukleonové číslo sudé a protonové liché:  $\mathbf{I} = 1, 2, 3 \dots$  (např.  $^2\text{H}$ )
- c) pokud je nukleonové i protonové číslo sudé:  $\mathbf{I} = 0$  (např.  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O} \dots$ )

Magnetický moment  $\boldsymbol{\mu}$  mohou vykazovat pouze jádra s nenulovým spinovým kvantovým číslem  $\mathbf{I}$ . Taková jádra mohou být zároveň měřena pomocí NMR spektroskopie. Nejvýhodnější pro měření jsou jádra s  $\mathbf{I} = 1/2$ , jelikož jádra s vyšším spinovým kvantovým číslem mají navíc jaderný kvadrupólový moment, který způsobuje komplikace při měření spekter. K nejdůležitějším jádrům v organické chemii, které lze měřit, patří:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,

$^{19}\text{F}$ ,  $^{29}\text{Si}$ . Jejich vlastnosti jsou shrnuty v tabulce 1 (Buděšínský et Pelnář, 2000; Hesse et al., 2008).

**Tabulka 1:** Nejčastěji měřená jádra a jejich vlastnosti související s NMR. Převzato a upraveno z: (Günther, 2013).

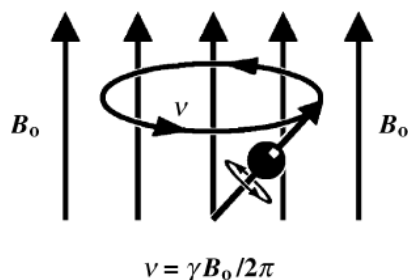
jádro	spin	přirozený		rezonanční	gyromagnetický
		výskyt (%)	citlivost	frekvence $\nu_0$ (MHz, pole o 1 T)	poměr $\gamma$ ( $10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
$^1\text{H}$	1/2	99,98	1,000	42,577	26,7522
$^{13}\text{C}$	1/2	1,108	0,016	10,705	6,7283
$^{31}\text{P}$	1/2	100	0,066	17,235	10,8394
$^{17}\text{O}$	5/2	0,037	0,029	5,772	-3,6281
$^{19}\text{F}$	1/2	100	0,834	40,055	25,1815
$^{29}\text{Si}$	1/2	4,7	0,008	8,460	-5,3190

Z tabulky 1 je mimo jiné patrné, že nejvyšší přirozený výskyt mají jádra  $^1\text{H}$  a  $^{31}\text{P}$ . Nižší výskyt vykazuje izotop  $^{13}\text{C}$ , i přesto patří k nejčastěji měřeným jádrům.

### 3.1.2.1 Klasický model

Kladně nabitá jádra mnoha atomů prvků (např.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) se chovají, jako kdyby rotovala kolem své vlastní osy, čímž kolem sebe vytváří slabé magnetické pole schopné interakce s vnějším magnetickým polem (Jacobsen, 2007).

Pokud tedy vložíme jádro s nenulovým spinovým kvantovým číslem ( $\mathbf{I} > 0$ ) do vnějšího magnetického pole o indukci  $\mathbf{B}_0$ , přitahované jádro se tomuto poli snaží vyrovnat, podobně jako je tomu u střílky kompasu v zemském magnetickém poli. Protože jádro rotuje a má vnitřní moment hybnosti, působením vnějšího magnetického pole dochází ke vzniku precesního pohybu vektoru magnetického momentu jádra  $\boldsymbol{\mu}$ . Precesní pohyb je dán kruhovou frekvencí, která se označuje jako Larmorova precesní frekvence. Tento pohyb je zobrazen na obrázku 1 (Jacobsen, 2007).



**Obrázek 1:** Klasický model – jádro se spinem ve vnějším magnetickém poli o indukci  $\mathbf{B}_0$  vykonávající precesní pohyb. Převzato a upraveno z: (Jacobsen, 2007).

Precesní pohyb je přímo úměrný síle vnějšího magnetického pole a síle magnetického pole jádra:

$$\nu_0 = \gamma \mathbf{B}_0 / 2\pi$$

Jako  $\nu_0$  je označen precesní pohyb (Larmorova frekvence – Hz),  $\gamma$  značí gyromagnetický poměr a  $\mathbf{B}_0$  sílu vnějšího magnetického pole (Jacobsen, 2007).

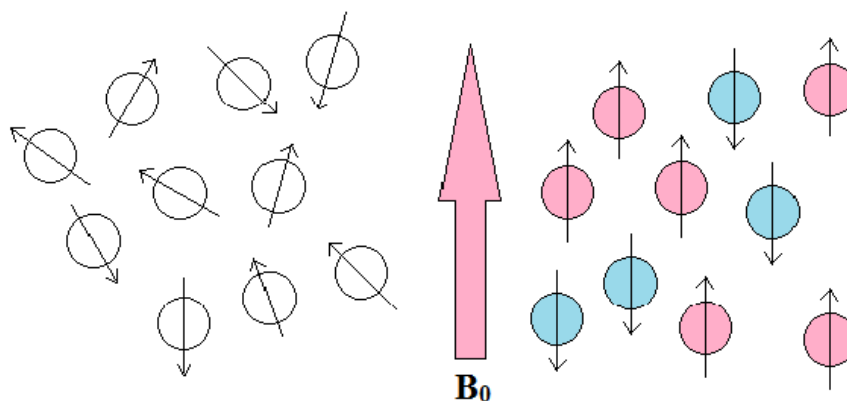
Tato rezonanční frekvence (je v rozmezí frekvence radiových vln pro silná magnetická pole) může být měřena tak, že vzorek je ozářen určitou frekvencí radiových vln – radiofrekvenčním pulzem, který je měněn do té doby, dokud není detekována absorpce energie. Drobné rozdíly v rezonanční frekvenci umožňují získat detailní informace o struktuře molekul, ve které se dané atomy vyskytují (Jacobsen, 2007).

Tento klasický pohled není dostačující pro vysvětlení všech aspektů NMR spektroskopie, proto byl popsán i jiný pohled.

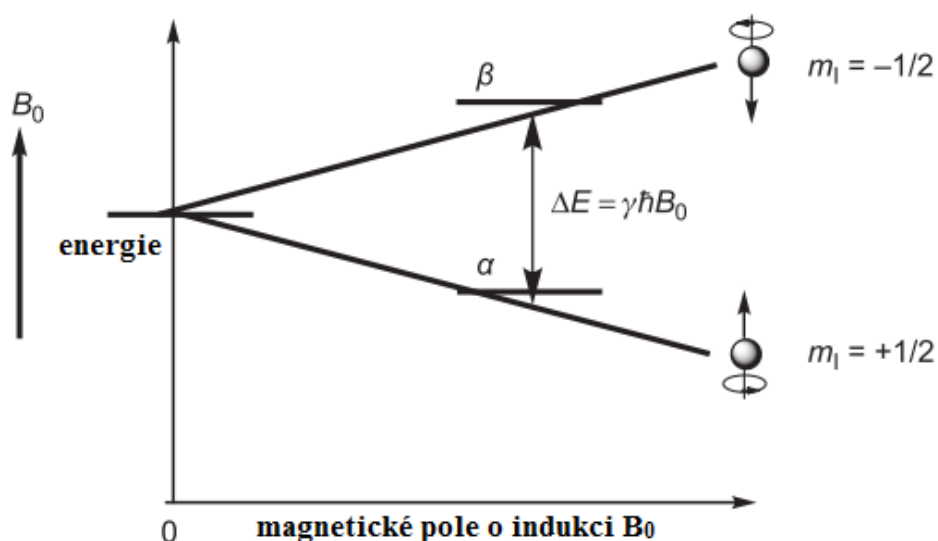
### 3.1.2.2 Kvantový model

Pokud na vzorek nepůsobí vnější magnetické pole, jaderné spiny jsou orientovány nahodile. Po vložení vzorku do magnetického pole o indukci  $\mathbf{B}_0$  dochází k orientaci spinů do dvou možných směrů. Orientují se buď paralelně (ve směru magnetického pole) nebo antiparalelně (proti němu), což je patrné z obrázku 2. Paralelní orientace (označovaná  $\alpha$ , odpovídající magnetickému kvantovému číslu  $\mathbf{m} = +1/2$ ) je zastoupena dominantněji než antiparalelní ( $\beta$  odpovídající  $\mathbf{m} = -1/2$ ), jelikož vykazuje nepatrně nižší energii. Tento rozdíl energií mezi dvěma kvantovými stavy je přímo úměrný síle vnějšího magnetického pole a se zvyšujícím se magnetickým polem se také zvyšuje, jak lze vidět na obrázku 3 (Spyros et Dais, 2012).

Stejně jako u ostatních spektroskopických metod, dochází k tomu, že jádro na nižší energetické hladině je schopno absorbovat foton elektromagnetické energie, čímž je povýšeno na vyšší energetickou hladinu. Energie fotonu se přesně shoduje s rozdílem energetických hladin  $\Delta E$  mezi těmito dvěma stavy. Tato energie se zároveň shoduje se specifickou frekvencí elektromagnetického záření. Rozdíl energií závisí také na vnějším magnetickém poli a gyromagnetickém poměru jádra:  $\Delta E = h \nu_0 = \gamma h B_0 / 2\pi$ , viz obrázek 3 (Jacobsen, 2007; Spyros et Dais, 2012).



**Obrázek 2:** Orientace jaderných spinů.



**Obrázek 3:** Orientace magnetického momentu jaderného spinu s  $I = 1/2$ . Každá orientace určuje nějaký energetický stav. Převzato a upraveno z: (Spyros et Dais, 2012).

Pro detailnější vysvětlení – spin se shoduje s rotací jader kolem určitých os a rotace nabitých jader produkuje magnetické pole, které si lze představit jako magnetický dipól. V mikroskopickém světě atomů má jaderný magnet  $2I+1$  možností, jak se zorientovat

k vnějšímu magnetickému poli.  $2I+1$  možností orientací jaderného spinu ve vnějším magnetickém poli o indukci  $B_0$  vede k  $2I+1$  možným energetickým stavům, které jsou rozdělené množstvím:

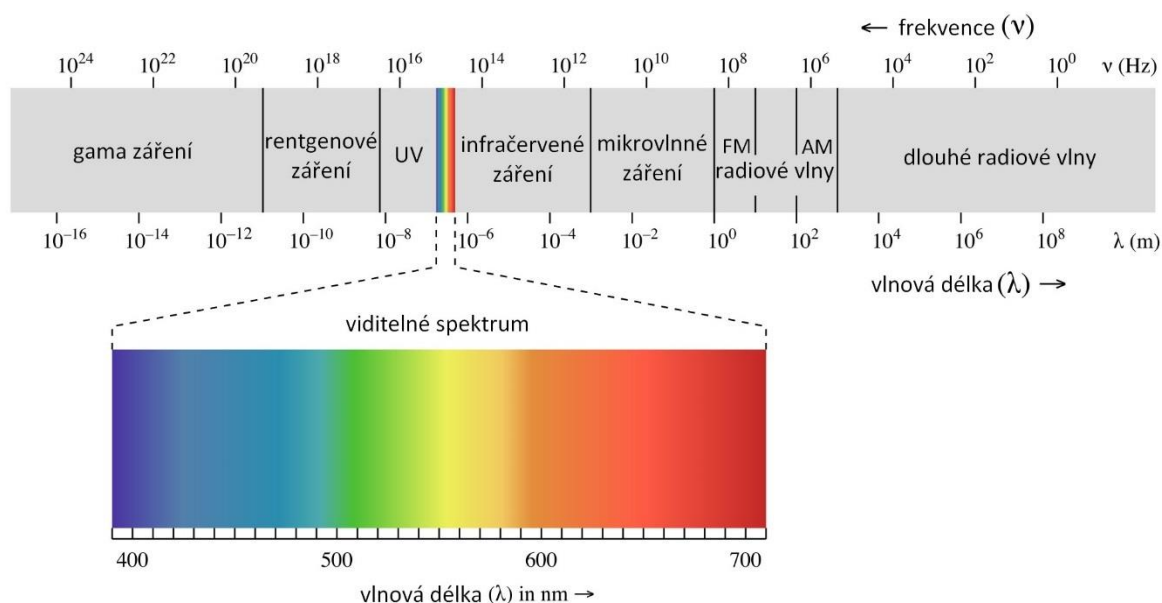
$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 / 2\pi$$

kde  $\hbar$  je Planckova konstanta. Ozáření systému stejných, neinteragujících spinů, elektromagnetickým polem o frekvenci  $\nu$  (radiofrekvenční vlna) může způsobit přechodné období mezi sousedními stavy v energetickém diagramu a to tehdy, pokud je splněna rezonanční podmínka:

$$\hbar \nu = \hbar \nu_0 = \Delta E$$

Pokud jsou fotony o frekvenci  $\nu_0$  z elektromagnetického pole jádrem absorbovány, může být tato změna počtu fotonů detekována a ve spektru vznikne rezonanční vlna (Veeman, 1997).

Celé elektromagnetické spektrum, kde je také zvýrazněna viditelná část spektra (400-700 nm), lze vidět na obrázku 4.



**Obrázek 4:** Elektromagnetické spektrum. Převzato z:

<http://tesla.xf.cz/img/spektrum.jpg>.

Z obrázku lze vyčíst, že s rostoucí vlnovou délkou klesá frekvence elektromagnetického záření. NMR spektroskopie využívá pro své měření jen určitou část spektra, a to frekvence

radiových vln. Při silnějším magnetickém poli je potřeba záření o vyšší frekvenci radiových vln (Günther, 2013).

### 3.1.2.3 Chemický posun

V praxi nejsou spiny nikdy kompletně izolovány od svého okolí, reagují s elektrony v elektronových oblacích kolem jader a s dalšími jadernými magnetickými dipóly. Přítomnost elektronových oblaků se projevuje v posunu rezonanční frekvence. Tento posun je charakteristický pro danou elektronovou hustotu, a proto je nazýván jako chemický posun. Chemický posun je takový „otisk prstu“ chemické struktury látky, ve které je dané jádro lokalizováno (Veeman, 1997). Bez chemického posunu by všechna jádra rezonovala při stejné frekvenci a měření NMR spektroskopii by poztrácelo jakýkoliv smysl.

S vložením atomu do vnějšího magnetického pole o indukci  $\mathbf{B}_0$  je vyvolán také rotační pohyb elektronů v elektronovém oblaku. Tento pohyb vytváří slabé lokální magnetické pole o indukci  $\mathbf{B}_{\text{lokální}}$ , které je namířené proti vnějšímu magnetickému poli  $\mathbf{B}_0$  a má opačný směr. To má za následek, že na jádro nepůsobí vnější magnetické pole  $\mathbf{B}_0$ , ale efektivní magnetické pole  $\mathbf{B}_{\text{efektivní}}$ , které je poněkud slabší než vnější magnetické pole  $\mathbf{B}_0$  (Spyros et Dais, 2012):

$$\mathbf{B}_{\text{efektivní}} = \mathbf{B}_0 - \mathbf{B}_{\text{lokální}} = \mathbf{B}_0 - \mathbf{B}_0 \sigma = \mathbf{B}_0 (1 - \sigma)$$

Parametr  $\sigma$  se nazývá stínící konstanta a závisí na hustotě a rozdělení elektronového oblaku obklopujícího jádro. Efektivní magnetické pole se u jednotlivých jader liší, jednotlivá jádra atomů mají rozdílné chemické okolí (jsou chemicky neekvivalentní), což způsobuje, že jsou stíněna rozdílně, a tudíž i rezonují při různých radiových frekvencích. Proto můžeme v NMR spektru pozorovat různé signály. Chemický posun v NMR spektru je měřen stupnicí delta  $\delta$ , kde je frekvence měřených jader vztažena k frekvenci referenční látky. Jako referenční látka je pro měření  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spekter používán nejčastěji tetramethylsilan – TMS, pro který je hodnota chemického posunu 0 (Hesse et al., 2008). Díky tomu může být chemický posun vyjádřen bezrozměrnou jednotkou, kterou je milióntina (ppm = parts per million) a přístroje s různými indukcemi magnetického pole pak při měření stejných vzorků poskytují stejné hodnoty. Jedná se o konstantu, která je nezávislá na pracovní frekvenci spektrometru (Jacobsen, 2007; Spyros et Dais, 2012).

Právě tento chemický posun má vzhledem ke své citlivosti ke změnám v okolí měřených jader veliký význam při určování struktury organických sloučenin (Hesse et al., 2008).

### 3.1.2.4 Spin-spinové interakce

Vedle chemického posunu je výsledná podoba spekter ovlivněna také spin-spinovými interakcemi, které byly nezávisle na sobě objeveny v několika laboratořích v roce 1950 (Günther, 2013). Díky rozdílnému elektronovému okolí neekvivalentních jader atomů vzniká v NMR spektru signál. Každé jádro s nenulovým spinem představuje také magnetický dipól a je nutné počítat, že jednotlivé dipóly jader se budou ovlivňovat a vzájemně interagovat. Rozlišují se dva typy těchto interakcí: přímá dipól-dipólová interakce a nepřímá spin-spinová interakce (Veeman, 1997).

První interakce se uplatňují u látek v pevném stavu, u ostatních jsou zprůměrovány na nulu. Nepřímé spin-spinové interakce jsou výsledkem magnetického působení mezi jednotlivými jádry, které jsou nepřímo spojeny skrze vazebné elektrony (Günther, 2013).

Magnetická pole jednotlivých sousedních jader se vzájemně ovlivňují. Signál protonů, které mají v sousedství  $n$  ekvivalentních protonů, je rozštěpen na  $n+1$  linií, čímž vzniká multiplet.

Pravidla tvorby multipletů vyvolaných spin-spinovými interakcemi:

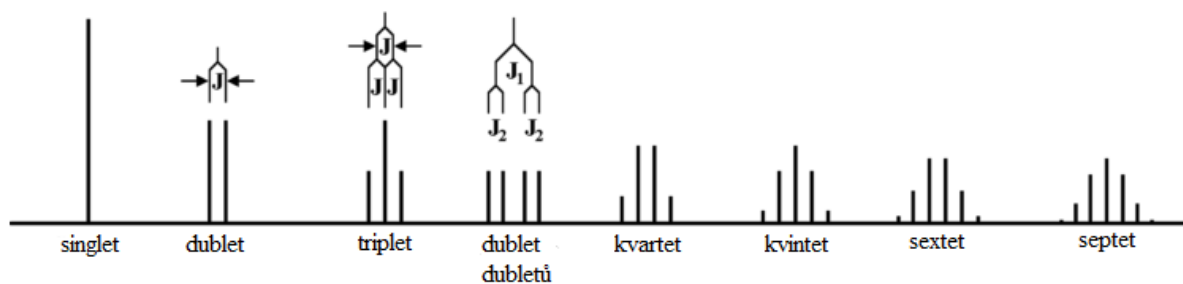
- Signál protonu, který má v sousedství  $n$  jiných, vzájemně ekvivalentních protonů, se štěpí na  $n+1$  linií s interakční konstantou  $J$ .
- Relativní intenzity složek multipletu jsou vyjadřovány tzv. Pascalovým trojúhelníkem, viz obrázek 5.
- Chemicky ekvivalentní jádra si vzájemně signály neštěpí.

<b>singlet</b>	1
<b>dublet</b>	1 1
<b>triplet</b>	1 2 1
<b>kvartet</b>	1 3 3 1
<b>kvintet</b>	1 4 6 4 1
<b>sextet</b>	1 5 10 10 5 1
<b>septet</b>	1 6 15 20 15 6 1

**Obrázek 5:** Pascalův trojúhelník.

Štěpení signálu ve spektru na různé multiplety tedy způsobují spin-spinové interakce, jak je vidět také na obrázku 6. Vzdálenost linií v multipletu je označována jako interakční konstanta  $J$ , jejíž hodnota se udává v Hz. Interakční konstanta  $J$  závisí na geometrii molekuly, ale není závislá na pracovní frekvenci spektrometru (Günther, 2013).





**Obrázek 6:** Možnosti štěpení signálu v NMR spektru. Převzato a upraveno z: (Jacobsen, 2007).

Spin-spinové interakce nepozorujeme u  $^{13}\text{C}$  spekter, jelikož je malá pravděpodobnost výskytu dvou sousedících jader  $^{13}\text{C}$  (Günther, 2013).

### 3.1.3 NMR spektra

Na horizontální ose NMR spektra je znázorněn chemický posun rezonanční frekvence v jednotkách ppm. Hodnota chemického posunu se zvyšuje zprava doleva. Na vertikální ose je znázorněna intenzita absorpce radiofrekvenční energie. Magnetická indukce ve spektru stoupá zleva doprava. Levá část spektra bývá nazývána jako downfield = u slabšího pole a pravá část spektra upfield = u silnějšího pole. Jádra mající spektrum více vlevo jsou relativně málo stíněna neboli odstíněna (působí na ně slabší magnetické pole), naproti tomu jádra v pravé části spektra jsou stíněna silně (působí na ně silnější magnetické pole) (Günther, 2013).

Stíněná jádra rezonují při nižších frekvencích a silnějším magnetickém poli, zatímco odstíněná jádra rezonují při vyšších frekvencích a slabším magnetickém poli. Stíněná jádra s ohledem na referenční látku vykazují také menší chemický posun než odstíněná jádra (Spyros et Dais, 2012).

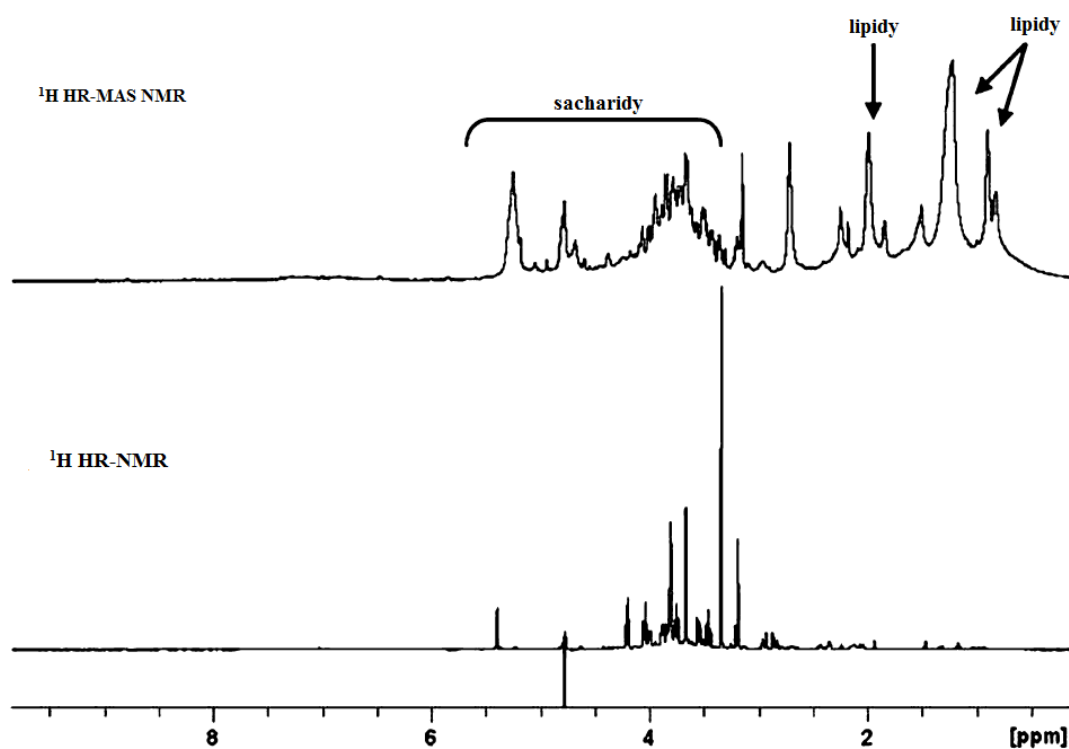
Hodnoty chemických posunů jsou rozdílné dle toho, jaká jádra jsou měřena. U jader  $^1\text{H}$  se chemický posun pohybuje v rozmezí 0-10 ppm, u jader  $^{13}\text{C}$  v rozmezí 0-220 ppm (Hesse et al., 2008).

#### 3.1.3.1 Spektra $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$

Jak už bylo zmíněno, nejčastěji studovanými jádry přírodních organických látek jsou jádra atomů  $^1\text{H}$  s přirozeným výskytem 99,98 % a  $^{13}\text{C}$ , s přirozeným výskytem 1,108 %. Bohužel v přírodě nejvíce zastoupený izotop uhlíku  $^{12}\text{C}$  s 98,93 % není pozorovatelný NMR spektroskopii. Měření jader s nízkým přirozeným výskytem je komplikovanější, protože síla

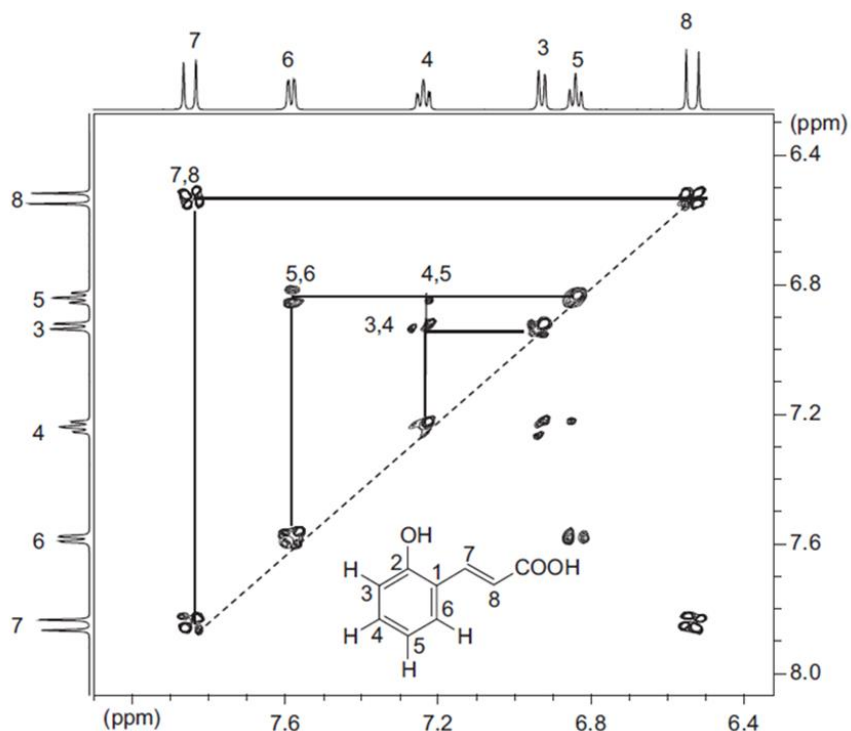
signálu je přímo úměrná počtu měřitelných jader ve vzorku. Dalšími běžně sledovanými jádry jsou jádra atomů  $^{31}\text{P}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{29}\text{Si}$  a  $^{27}\text{Al}$ , které jsou přítomné např. v půdě a usazeninách (Jacobsen, 2007; Simpson et Simpson, 2009).

Jádra  $^1\text{H}$ , která jsou charakterizována vysokým gyromagnetickým poměrem a přirozeným výskytem, jsou při analýze potravin zkoumána nejvíce.  $^1\text{H}$  spektroskopie poskytuje hodnotné informace o složení potravin (např. o fenolických sloučeninách, sterolech, terpenech), a to v přijatelném experimentálním čase. Na druhou stranu  $^1\text{H}$  spektra většiny potravin jsou velmi komplexní a jejich interpretace může být velmi složitá, viz obrázek 7 (Spyros et Dais, 2012). Na obrázku 7 je vidět metabolický profil kořenů rýže, které byly zkoumány pomocí 1D  $^1\text{H}$  HR-NMR a  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR v práci Fumagalli et al. (2009). Více o této studii je shrnuto v kapitole obilniny.



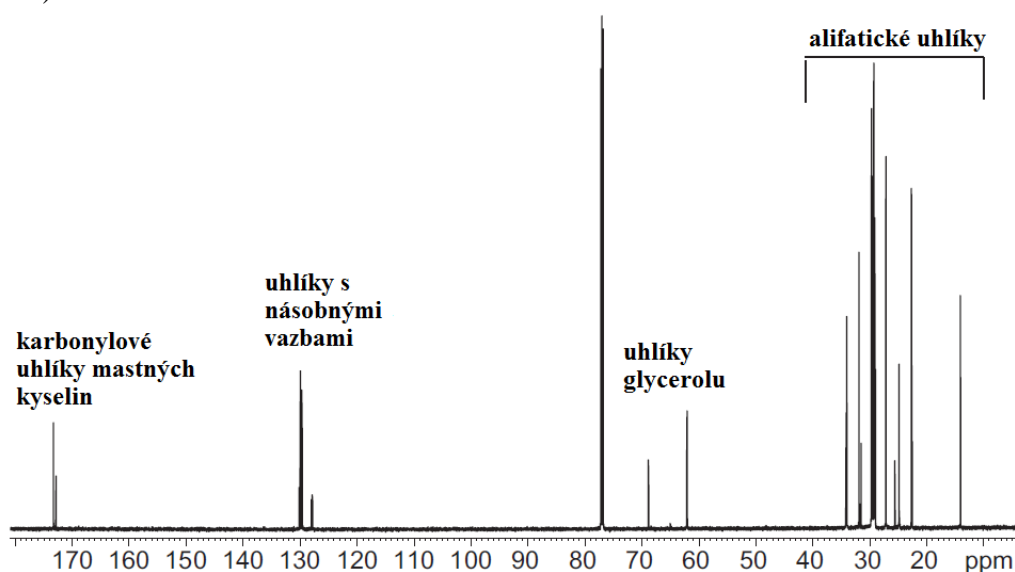
**Obrázek 7:**  $^1\text{H}$  NMR spektrum a  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR spektrum kořenů rýže pěstovaných za kontrolních podmínek. Převzato a upraveno z: (Fumagalli et al., 2009).

Příklad 2D NMR spektroskopie, která skýtá mnoho typů je uveden na obrázku 8. Jedná se o 2D  $^1\text{H}$  NMR (konkrétně COSY – homokorelované  $^1\text{H}$  –  $^1\text{H}$ ) spektrum kyseliny o-kumarové, která patří mezi výše zmíněné fenolové sloučeniny a nejčastěji se vyskytuje u rostlin. Na obrázku 8 je zároveň na jednotlivých osách k vidění také 1D  $^1\text{H}$  NMR spektrum s příslušnými chemickými posuny (Spyros et Dais, 2012).



**Obrázek 8:** 2D  $^1\text{H}$  NMR spektrum kyseliny o-kumarové. Převzato z: (Spyros et Dais, 2012).

Jádra  $^{13}\text{C}$  jsou na druhém místě při analýze potravin.  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopie poskytuje informace navíc k těm, která již byla získána  $^1\text{H}$  NMR a považuje se za komplementární techniku zjednodušující interpretaci  $^1\text{H}$  NMR spekter. Umožňuje zjistit počet jednotlivých druhů atomů uhlíku v molekule. Jako příklad  $^{13}\text{C}$  spektra je uveden obrázek 9, kde je zobrazeno spektrum extra panenského olivového oleje a signály čtyř různých skupin uhlíků (Spyros et Dais, 2012).



**Obrázek 9:**  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum extra panenského olivového oleje. Převzato a upraveno z: (Spyros et Dais, 2012).

### 3.1.4 NMR spektrometr

První komerční spektrometr byl vyroben v roce 1952 firmou Varian (Emsley et Feeney, 1995). Tyto první spektrometry nazývané CW NMR (continuous wave) byly v 60. letech 20. století nahrazeny FT NMR spektrometry využívající Fourierovu transformaci (Emsley et Feeney, 2007).

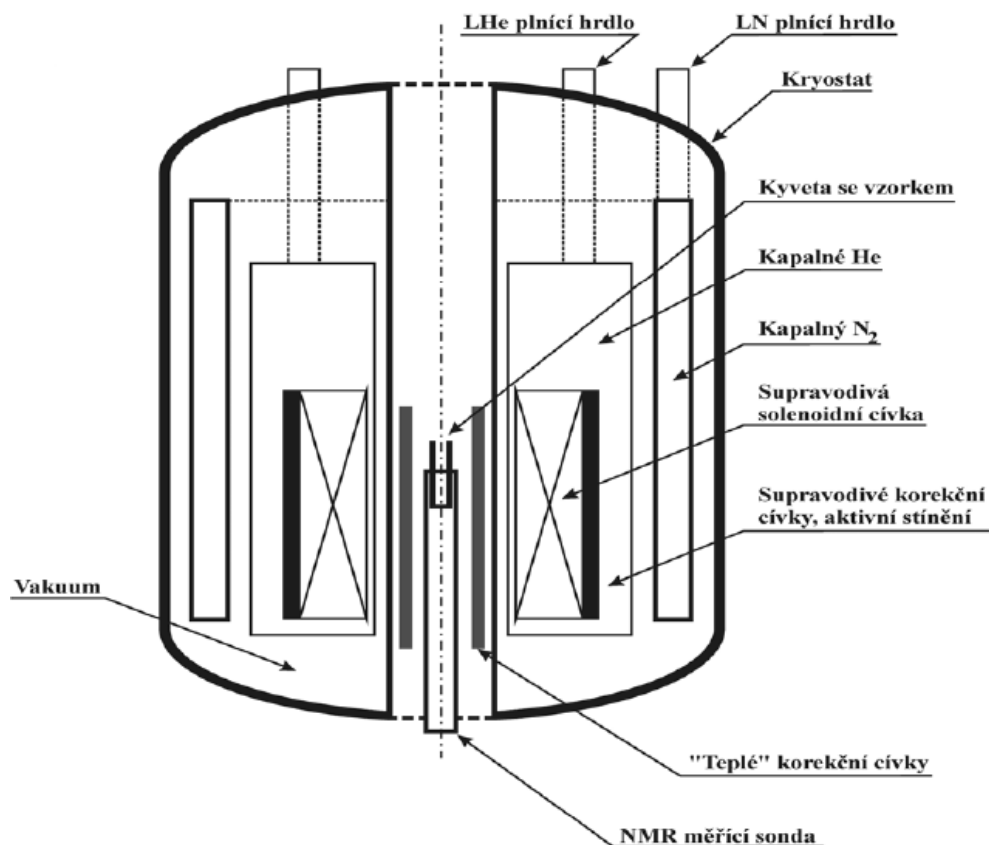
Spektrometr se skládá ze supravodivého magnetu (nejdražší část); sondy, kam se umísťuje květa se vzorkem; radiového vysílače a přijímače; ADC (převádí analogový signál na digitální) a výkonného počítače (Jacobsen, 2007).

Magnet tvoří solenoidní cívka ze supravodivé slitiny (Nb-Ti nebo Nb-Sn), která je ponořena do kryostatu, kde je chlazena kapalným heliem na teplotu zhruba 4 K a obklopena tekutým dusíkem o teplotě přibližně 77,4 K, který zamezuje vypařování helia a slouží také jako tepelný nárazník mezi teplotou vzduchu v okolní místnosti a heliem. To vše je chráněno vakuovým obalem, dvojitou Dewarovou nádobou. První Dewarova nádoba chrání cívku s kapalným heliem, druhá obsahuje kapalným dusík (Jacobsen, 2007; Spyros et Dais, 2012).

K tomu, aby magnetické pole působilo na vzorek stále stejným způsobem, je nutné, aby bylo homogenní. Homogenita magnetického pole v přístroji je proto zajištěna sadou různých prostorově orientovaných korekčních cívek (Shoolery, 1995; Spyros et Dais, 2012).

Sonda střídavě vysílá a přijímá radiofrekvenční signály. Počítač řídí vysílání tohoto signálu: přesněji jeho sílu a dobu, která musí být rychlá. Okamžitě po pulzu je slabý signál (FID – free induction decay = volně doznívající indukce) obdržen a zesílen sondou a pomocí ADC přeměněn na digitální signál, který představuje v podstatě jen seznam čísel. FID představuje závislost intenzity proudu indukovaného ve snímací cívce na čase. Počítač dále provede Fourierovu transformaci (FT) a výsledné spektrum je zobrazeno na obrazovce počítače, jako závislost intenzity na frekvenci. Mimo jiné, největší výhodou FT je to, že umožňuje rychle po sobě jdoucí opakování měření stejného vzorku, kterým je zvýšena citlivost měření (Jacobsen, 2007). Zjednodušené schéma přístroje lze vidět na obrázku 10 níže.

Požizovací cena NMR spektrometru se pohybuje v řádu jednotek až stovek miliónů korun, přičemž záleží na síle magnetického pole neboli jeho pracovní frekvenci, která je dána jeho magnetickou indukcí. V současnosti jsou nejčastěji využívány spektrometry s magnetickou indukcí 4,7-18,8 T (Tesla), pracovní frekvence se pohybuje od 200-900 MHz (Jacobsen, 2007). U HR-NMR spektroskopie je rozmezí magnetické indukce a radiové frekvence obecně vyšší, uvádí se např. 6-23,5 T a 250-1000 MHz (Spyros et Dais, 2012).



**Obrázek 10:** Schéma NMR spektrometru. Převzato a upraveno z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/NMR.pdf>.

#### 3.1.4.1 LR-NMR a HR-NMR

NMR umožňuje komplexní analýzu vzorků, ať už v kapalně, pevně nebo polotuhé fázi, aniž by došlo k pozměnění původních vlastností matrice (Santos et al., 2015).

Při analýze potravin je využíváno v zásadě dvou metod NMR, které se liší rozmezím použitých radiových frekvencí: LR-NMR (low-resolution = s nízkým rozlišením), využívající radiové frekvence od 10-40 MHz a odpovídající síle magnetického pole 0,23-0,95 T. Druhou je HR-NMR (high-resolution = s vysokým rozlišením) odpovídající frekvenci okolo 100 MHz a magnetickému poli o síle 2,35 T (Ibañez et Cifuentes, 2001).

LR-NMR se vyznačuje především jednoduchostí použití a relativně nízkými pořizovacími náklady. Proto je vhodná pro provádění rychlých a reprodukovatelných měření při kontrole kvality v potravinářských a zemědělských provozech a umožňuje např. běžnou analýzu tuku a obsahu vlhkosti v potravinách. Navíc poskytuje informace při určování hlavních sloučenin ve vzorcích, jakými je např. obsah oleje v olejnatých semenech a dále také informace

o skupenství a pohyblivosti vody uvnitř potravin a během jejich výroby (Ibañez et Cifuentes, 2001).

Naproti tomu HR-NMR je mnohem dražší, ale zároveň nejvýkonnější metodou při určování struktury sloučenin. V analýze potravin se využívá při popisování jejich chemických a fyzikálních vlastností. Umožňuje také kvalitativní a kvantitativní strukturní analýzu široké škály sloučenin. Slouží např. při určování produktů Maillardovy reakce, objasnění struktury neznámých antioxidantů a objasnění fyzikálně chemických vlastností velkých molekul, jakými jsou škrob a proteiny (Ibañez et Cifuentes, 2001).

V současnosti se těší oblibě také SNIF-NMR (site-specific natural isotope fractionation). Tento typ HR-NMR je využíván např. při zjišťování geografického původu potravin, a zakládá se na poměru izotopů daného jádra, které se nachází v analyzovaném vzorku. Příkladem je např. poměr izotopů vodíku  $^2\text{H}/^1\text{H}$  v ethanolu u různých druhů alkoholu. Díky tomu se dá zjistit např. původ a ročník vína i dalších lihovin a objasnit pravost potravin a případné pančování. Nevýhodou SNIF-NMR je náročná příprava vzorků (Ibañez et Cifuentes, 2001; Santos et al., 2015).

Mezi všemi používanými technikami se nejvíce používá HR-NMR v kapalně fázi. Její největší nevýhodou je potřeba extrakce vzorku, která může vést ke ztrátě informace o jeho přírodním stavu. Další stinnou stránkou je relativně velké množství vzorku, které je potřebné k získání dobrého signálu, již zmíněné zvýšené náklady a čas nutný pro analýzu (Santos et al., 2015).

Nicméně existuje také HR-NMR metoda využívající měření pod tzv. magickým úhlem ( $54,74^\circ$ ), která umožňuje zkoumání heterogenních nebo polotuhých vzorků, a to bez větších předchozích úprav. Jedná se o HR-MAS NMR (high resolution magic angle spinning). Její největší výhodou je produkce vysoce rozlišených spekter, přičemž kombinuje výhody jak pevné, tak kapalně fáze.  $^1\text{H}$  NMR spektra je možné získat velmi rychle a to i z pouhých několika miligramů vzorku. Je to velmi citlivá metoda, schopná detekovat sloučeniny v koncentracích menších než  $1 \mu\text{mol/l}$ , při minimální přípravě vzorku (Santos et al., 2015).

Polární i nepolární látky mohou být identifikovány současně, čímž je umožněno zhodnocení jak primárních, tak sekundárních metabolitů. Ne vždy je ale možná identifikace sekundárních metabolitů. Ve většině případů zabraňuje přítomnost majoritních složek pozorování minoritních. Proto mezi doposud nejčastěji zkoumané sloučeniny za využití magického úhlu patří: mastné kyseliny, aminokyseliny, organické kyseliny, sacharidy a fenoly. Nedílnou součástí měření je vzorkování, při kterém je nutné dbát na to, aby byl vzorek reprezentativní (Santos et al., 2015).

### 3.1.5 Odběr a příprava vzorků

Odběr vzorku se provádí výběrem malého množství vzorků z větší definované cílové skupiny, takovým způsobem, aby bylo možné vytvořit úsudek o celém vzorku. Účelem je, aby docházelo k co nejmenšímu možnému zkreslení výsledku. Na složení potravin má vliv mnoho proměnlivých faktorů, které musí být při analýze brány v úvahu. Patří mezi ně: geografický a botanický původ potravin, rozdělení vzorku, způsob pěstování a s tím spojený proces zrání, aj. (Spyros et Dais, 2012).

Odebírání vzorků zvířecích tkání se zdá být ještě složitější. Je potřeba znát místo, kde byla zvířata chována, pohlaví, věk, hmotnost, způsob chovu, aj. Veškeré tyto informace mohou být při analýze nápomocné (Spyros et Dais, 2012). Přestože pokrok moderních analytických metod vedl ke značnému zlepšení kvality analýz, bývá důležitost přípravy vzorků často podhodnocena (Ibañez et Cifuentes, 2001).

Specifickou přípravu vzorků vyžaduje studium metabolomiky u rostlin. Kvůli nízké molekulové hmotnosti sloučenin tvořících rostlinný metabolom je nutné převést rostlinnou matici pro NMR analýzu do deuterovaného rozpouštědla. Příprava vzorků je kritickou částí zkoumání, poněvadž předurčuje kvalitu získaných výsledků. Obvykle zahrnuje tyto části: sklizení, sušení, extrakci a přípravu pro analýzu. Je potřeba brát v úvahu několik zásad:

- Sklizení rostlinného materiálu musí probíhat ve stejnou denní dobu, protože hladiny metabolitů se v průběhu dne mění.
- Sklizené části rostlin musí být vybrány pečlivě, pokud je to možné, jednotlivé rostlinné orgány by měly být analyzovány odděleně, z důvodu rozdílných metabolických profilů.
- Metabolický profil je zároveň odlišný u stejných rostlinných orgánů různého stáří.
- Manipulace s rostlinným materiálem nebo jakékoliv jeho poškození může vést k nechtěným enzymatickým změnám.

Nejlepším způsobem, jak se vyhnout těmto změnám a znehodnocení vzorků, je rychlé zmrazení čerstvého rostlinného materiálu tekutým dusíkem. To zamezí jakékoliv enzymatické aktivitě a umožní další zpracování nebo skladování (při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), aniž by se vyskytly metabolické změny (Lubbe et al., 2013).

Primární odlišení způsobu přípravy vzorků závisí na tom, zda se jedná o vzorek v kapalném nebo pevném stavu. Příprava vzorků pevného stavu je zpravidla komplikovanější

a vyžaduje tyto předběžné kroky, které budou následně blíže vysvětleny: konzervaci, odstranění vnějších nečistot, redukci, sušení a extrakci vzorku (Mannina et al., 2012).

Vzorky v kapalném stavu můžou a nemusí být předem upravovány. Upravují se spíše za účelem získání lepších výsledků (příkladem je odstranění plynu z piva, předběžné zředění viskóznějších kapalin jako je med či olivový olej, aj.) (Mannina et al., 2012).

### 3.1.5.1 Konzervace

Rychlá konzervace zabraňuje potenciálním změnám ve složení potravin a je důležitým prvním krokem před samotnou analýzou. Například přeměna svaloviny v maso, způsobená postmortálními změnami může změnit jeho biochemické a fyzikální vlastnosti. Metabolické změny, které se po smrti projevují ve svalovině, hrají důležitou roli v kvalitě masa. Metabolické a enzymatické změny, které se objevují ve vzorcích potravin jak rostlinného, tak živočišného původu, mohou být zastaveny rychlým zmrazením v tekutém dusíku. Specifické podmínky konzervace jsou vyžadovány u některých potravin rostlinného původu, které jsou citlivé na extrémně nízké teploty tekutého dusíku. Patří sem např. olivový olej, skladovaný při -20 °C nebo med, který je naopak před analýzou skladován při pokojové teplotě. Specifické způsoby konzervace jsou využívány také pro mléko a mléčné výrobky, jejichž cílem je zachování kvality a složení živin (Spyros et Dais, 2012).

### 3.1.5.2 Odstranění vnějších nečistot

Odstranění vnějších nečistot je dalším důležitým krokem předčištění potravin. Zbytky půdy a písek, které přilnuly k čerstvému ovoci a zelenině, mohou být odstraněny omytím. Omytí musí být prováděno opatrně, aby nedocházelo k nadměrnému vymývání prospěšných látek rozpustných ve vodě. Dužina ovoce je obvykle oddělována od jader, zatímco sedimenty z kapalných vzorků (např. z piva, vína, džusu, jedlých olejů) jsou odstraňovány za pomoci filtrace, separace nebo centrifugace. Změny ve složení takto upravených vzorků rostlinného a živočišného původu by měly být při analýze brány v potaz. Pro zamezení změn ve složení je nutná inaktivace enzymů, využitím denaturace nebo horké směsi methanolu a vody nebo ethanolu a vody (Spyros et Dais, 2012).



### 3.1.5.3 Redukce

Redukce množství vzorku je důležitější pro potraviny v pevném nebo polotuhém stavu. Dokonale rozdělená pevná látka usnadňuje analýzu, neboť menší vzorky se rozpouští rychleji a jejich extrakce je díky většímu povrchu jednodušší. Rozlišujeme mnoho způsobů redukce vzorku: mechanické rozmělnění, vylisování, rozválení, míchání, mletí, aj. Tento proces je nutný pro snížení nerovnoměrností ve složení celého vzorku (Spyros et Dais, 2012).

### 3.1.5.4 Sušení

Vlhkost vzorku je důležitým faktorem a musí být stanovena ještě před analýzou. Nedostatečné stanovení vlhkosti může způsobit chybný výsledek. Navíc přítomnost vlhkosti může zapříčinit velké množství problémů při následné analýze zahrnující tvorbu emulzí a zakalení vzorku. Upřednostňováno je vakuové sušení, protože tato technika do velké míry snižuje riziko zhoršení kvality vzorku během zahřívání. Pro analýzu netěkavých sloučenin je užitečná zejména lyofilizace (sušení za pomoci mrazu) (Spyros et Dais, 2012).

Sušení umožní stabilizovat matici, ve které probíhají enzymatické reakce. Odstranění vody také snižuje signál vody v NMR spektru, stejně jako proměnlivé chemické posuny způsobené rozdílným pH. Sušení navíc také umožňuje přesnější kvantifikování metabolitů. Existuje mnoho způsobů sušení, nejvíce je ale využíváno sušení za pomoci výše zmíněné lyofilizace (Lubbe et al., 2013).

### 3.1.5.5 Extrakce a rozpouštědla

Extrakce je pravděpodobně nejkritičtější částí úpravy vzorku usilující o jeho kvantitativní převedení z pevného stavu do roztoku. Jelikož jsou potraviny tvořeny mnoha sloučeninami s naprosto různorodými polaritami, žádná extrakce neumožňuje získání všech metabolitů najednou. Mezi mnoha způsoby extrakce lze rozlišit dva základní přístupy: přímá extrakce deuterovaným rozpouštědlem a extrakce nedeuterovaným rozpouštědlem (Mannina et al., 2012).

V případě přímé extrakce je supernatant přímo po centrifugaci použit pro NMR analýzu. Nedeuterovaná rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel jsou obvykle používány pro nepřímou extrakci. Extrahovaný roztok je odpařen nebo vysušen pod vakuem a následně znovu rozpuštěn v deuterovaném rozpouštědle, které se smí lišit od toho použitého pro extrakci. Většinou je

potřebná také další centrifugace. Při použití nedeuterovaných rozpouštědel pro extrakci je všeobecně větší spotřeba rozpouštědla a vzorku potraviny. Výhodou je získání koncentrovanějšího roztoku vzorku (Mannina et al., 2012).

Extrakce má tři hlavní cíle:

- Odstranění nežádoucích součástí matrice, které by mohly narušit následnou analýzu.
- Koncentraci konkrétního analytu, čímž je zvýšen limit detekce a kvantifikace.
- Rozdělení analytu polárním a nepolárním rozpouštědlem pro další analýzu.

(Spyros et Dais, 2012).

Využití organických rozpouštědel pro extrakci je mnohdy časově velmi náročné s možným vznikem kvantitativních chyb. Použití velkého množství organických rozpouštědel představuje také určité zdravotní riziko pro člověka i okolní prostředí. Proto byly vynalezeny některé alternativní techniky řešící tyto problémy (Ibañez et Cifuentes, 2001).

Mezi typické příklady můžeme zařadit:

#### **Extrakce kapalina-kapalina = LLE (liquid-liquid)**

Extrakce kapalina-kapalina se využívá k separaci látek rozdělením směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny. Nevýhodou LLE je potřeba velkého množství rozpouštědla a časová náročnost. LLE se používá např. při extrakci fenolických sloučenin z jedlých olejů (Spyros et Dais, 2012).

**(Pře)tlaková kapalinová extrakce = PLE (pressurised liquid extraction)**  
**a superkritická kapalinová extrakce = SLE (supercritical liquid extraction)** využívají blíže specifikovaná rozpouštědla za vysokých teplot (80-200 °C) a tlaku (10-20 MPa). PLE se využívá např. při izolaci tokoferolů ze semen; steroidů, vitaminů a aromatických sloučenin zeleniny, ovoce a obilnin. SLE je aplikována při určování živin syrového rostlinného materiálu a potravin (Spyros et Dais, 2012).

#### **Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem = MAE (microwave assisted extraction)**

Základem této extrakční metody je využití mikrovlnné energie k zahřátí stopového množství vody uvnitř vzorku (Spyros et Dais, 2012). Díky této metodě mohou být sloučeniny ve srovnání s ostatními konvenčními technikami extrahovány selektivněji a rychleji. Další

výhodou je menší spotřeba rozpouštědla a pokles spotřeby energie. MAE je využívána např. při extrakci esenciálních rostlinných olejů; lipidů z masných a mléčných produktů či vajec; produktů Maillardovy reakce, a dalších (Ibañez et Cifuentes, 2001).

### **Extrakce pevnou fází = SPE (solid-phase extraction)**

Tento typ extrakce z kapaliny na tuhou fázi je velmi účinný pro přípravu vzorků, ve kterém analyt v kapalně fázi přichází do kontaktu s tuhou fází extrakčního materiálu, který je vložený v oddělené koloně (Spyros et Dais, 2012). Cíl této metody zahrnuje odstranění narušujících sloučenin a obohacení těch, které jsou zkoumány. Pomocí SPE jsou extrahovány např. heterocyklické aromatické aminy, které se tvoří při zahřívání; insekticidy v ovoci; tuk v obilninách; pesticidy v mléce a jiné (Ibañez et Cifuentes, 2001).

Je popsáno mnoho způsobu extrakce, přičemž všechny mají své výhody i nevýhody. Pro zvýšení počtu extrahovaných metabolitů vznikají směsi organických rozpouštědel. Např. dvoufázové rozpouštědlo zahrnující chloroform, methanol a vodu je jednou z takových kombinací. Vznikají dva extrakty ze vzorku, jeden s polárními sloučeninami a druhý s nepolárními. Nevýhodou této metody je její časová náročnost, v několika krocích použité odpařování a následné převedení extraktů do rozpouštědel pro NMR měření. Kromě rozpustnosti sloučenin ve vybraném extrakčním rozpouštědle, závisí účinnost extrakce také na míře rozpuštění. Ta může být zvýšena delším časem extrakce, nebo přidáním energie do systému např. tepla – s tím roste ale také riziko znehodnocení vzorku (Lubbe et al., 2013).

Příprava vzorků se také liší dle použitého typu metody, citlivosti spektrometru, typu jádra, doby měření, aj. Minimální množství vzorku potřebné pro měření nelze zobecnit, u spekter  $^1\text{H}$  je ale použité množství menší než u spekter  $^{13}\text{C}$  (Buděšínský et Pelnař, 2000).

Pro měření v kapalně fázi je potřebné rozpuštění vzorku. Molekuly rozpouštědla by měly mít všechny atomy vodíku  $^1\text{H}$  nahrazené atomy deuteria  $^2\text{H}$ , a to z několika důvodů. Při měření  $^1\text{H}$  spekter je nežádoucí, aby rezonance rozpouštědla převládala nad měřenými spektry. Molekuly rozpouštědla by převyšovaly molekuly vzorku a spektrum by vůbec nebylo možné rozpoznat. Dalším důvodem je, že spektrometr potřebuje signál atomů  $^2\text{H}$  k tzv. uzamknutí (zalockování) síly magnetického pole proto, aby nedocházelo ke změně jeho síly v průběhu měření. Pokud by se změnila síla magnetického pole během pokusu, měnila by se zároveň i frekvence a jednotlivé NMR signály po Fourierově transformaci by nebylo možné správně poskládat ve výsledné spektrum (Jacobsen, 2007).

Volba rozpouštědla závisí na rozpustnosti zkoumané látky, jeho koncentrace potom na citlivosti měřeného izotopu a spektrometru. Rozpouštědlo by mělo být stálé, to znamená chemicky inertní a v daném teplotním rozmezí měření nepříliš viskózní. Deuterium obsažené v rozpouštědle má za úkol stabilizovat rezonanční podmínku. Mechanické nečistoty, či nerozpuštěné částice vzorku jsou odstraňovány filtrací nebo centrifugací, aby nedocházelo k horšímu rozlišení (Buděšínský et Pelnář, 2000).

Pro běžně se vyskytující lipofilní organické molekuly je ideálním rozpouštědlem  $\text{CdCl}_3$  (deuterovaný chloroform = chloroform-d). Hydrofilní molekuly jsou nejlépe rozpustné v  $\text{D}_2\text{O}$  (těžká voda) (Jacobsen, 2007).

Všeobecně používanými deuterovanými rozpouštědly využívanými pro NMR analýzu jsou:  $\text{D}_2\text{O}$ , methanol- $\text{d}_4$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ , aceton- $\text{d}_6$ , acetonitril- $\text{d}_3$  a chloroform-d. Pro polární látky se obvykle používá  $\text{D}_2\text{O}$  a methanol- $\text{d}_4$  nebo jejich směs. Nepochární látky jsou většinou rozpouštěny v chloroformu-d (Mannina et al., 2012).

Pro molekuly, které nejsou ani polární, ani nepolární, nebo mají jak polární, tak nepolární část (organické kyseliny), existuje několik dražších rozpouštědel.  $\text{DMSO-d}_6$  neboli  $\text{CD}_3\text{-SO-CD}_3$  (dimethylsulfoxid) je velmi dobré rozpouštědlo, jehož nevýhodou je komplikované zpětné získávání vzorku (Jacobsen, 2007).

Plně deuterované verze rozpouštědel, jakými můžou být: aceton, methanol, acetonitril, benzen a THF (tetrahydrofuran), jsou velmi drahé. Aceton,  $\text{D}_2\text{O}$ , methanol a některá další rozpouštědla absorbují po otevření vodní páry z atmosféry, jejíž signál se poté projeví ve spektru v závislosti na chemickém posunu rozpouštědla (Jacobsen, 2007).

Na rozdíl od ostatních analytických metod se NMR řadí mezi nedestruktivní metody, což znamená, že lze zkoumaný vzorek zbavit rozpouštědla, např. jeho vypařením a vzorek je tak možné vrátit zpět do původního stavu a dále použít. Toho se využívá především při zkoumání různých typů rozpouštědel (Jacobsen, 2007).

## 3.2 Kvalita potravin

Zvyšující se poptávka po kvalitních potravinách přilákala mnohem větší všeobecný zájem o vlastnosti potravin, jako je nutriční hodnota, pravost potravin (autenticita), jejich kvalita a bezpečnost. To vše je dáváno do souvislosti s tím, kde jsou potraviny vyprodukovány, skladovány a jak jsou konzumovány (Santos et al., 2015).

Právo obdržet pravdivé informace o potravinách, které konzumenti kupují a jejich označování, je upraveno nařízením Evropské komise č. 178/2002 a 1169/2011. Tato nařízení

usilují o prevenci podvodných a klamných praktik, falšování potravin a jakýchkoliv dalších praktik, které by mohly vést ke klamání spotřebitele. Jako příklad nejběžnějšího podvodu je náhrada jedné z přísad podobnou, levnější, která je konzumentem obtížně rozpoznatelná. Rozpoznání je zároveň často složité i pro v současnosti používané analytické metody. Kromě toho, v závislosti na vlastnostech znehodnocující látky, může tato přidaná směs představovat zároveň i zdravotní riziko pro konzumenta. Právě proto je hlavním zájmem potravinářského průmyslu vystopovat a prokázat pravost potraviny, a to nejen z ekonomických, ale i z bezpečnostních důvodů (Cubero-Leon et al., 2014).

V oblasti prokazování pravosti potravin se objevují nové přístupy, které mohou snížit cenu a čas zkoumání. Jsou studovány nové metodiky pro řešení falšování potravin, protože klasické metody selhávají. Jednou takovou metodikou je výše zmíněná metabolomika. Například znehodnocení olivového oleje olejem z lískových jader je velmi znepokojující, jelikož vzhledem k podobnému složení triacylglycerolů, sterolů a mastných kyselin je toto falšování renomovanými technikami neprokazatelné. Metabolomika umožňuje hromadné zkoumání metabolitů v buňce, tkáni nebo organismu. Za její rozvoj se vděčí mnoha dalším nástrojům analytické chemie a softwarovým programům (Cubero-Leon et al., 2014; Santos et al., 2015).

Studium metabolomiky je obecně mnohem komplexnější u rostlin než u živočichů, a to kvůli značné různorodosti chemických struktur metabolitů přítomných v rostlinách, především pak sekundárních metabolitů, které jsou specifické pro každý rostlinný druh. Metabolomika se také pokouší identifikovat metabolity, které souvisí se změnami fyziologických podmínek. Často bývá využívána při analýze krevní plasmy, moči, žluči či mozkomíšního moku aj. (Mannina et al., 2012).

Při zkoumání metabolitů se používají dva komplementární přístupy: „metabolite profiling“ a „metabolic fingerprinting“. „Metabolite profiling“ se zaměřuje na analýzu, identifikaci a kvantifikaci skupiny metabolitů. V mnoha případech se jedná o přístup na základě hypotézy, kdy je zkoumána sada metabolitů, které jsou spojovány se specifickou metabolickou dráhou (Cubero-Leon et al., 2014; Mannina et al., 2012).

Původním záměrem druhého z přístupů, kterým je „metabolic fingerprinting“, není identifikovat každý pozorovaný metabolit, ale porovnávat vzory (otisky prstů) metabolitů, které se mění v reakci na onemocnění, enviromentální nebo genetické změny. NMR spektra jsou proměřována bez jakékoliv identifikace (Cubero-Leon et al., 2014; Mannina et al., 2012).

Významným přínosem v kontrole kvality potravin je i to, že byl změněn přístup ke zkoumání bezpečnosti a kvality potravin, na které je nyní nahlíženo jako na celek. Pro tento holistický pohled je nutné:

- Znat strukturu a koncentraci všech molekul v potravinách, v analogii na to, co se právě děje na poli genetiky.
- Získat informace o metabolických drahách a tocích charakteristických pro suroviny pro výrobu potravin, kde a jak dochází k metabolickým přeměnám.
- Mít znalost o vlivu vnějších faktorů a technologických opatření, které mění složení potravin.

Jinak řečeno, popis složení potravin musí být stejně dobře definovaný jako samotný člověk – na úrovni genomu, proteomu a metabolomu. Přesně definované složení potravin na těchto úrovních je nutné především při posuzování vlivu potravin na lidské zdraví. Tento celostní přístup bývá označován pod pojmem foodomika (foodomics). Foodomika je definována jako obor zabývající se potravinami a výživou skrze aplikaci pokročilých tzv. omik (omics technologies) za účelem zlepšení pohody, zdraví a spokojenosti konzumentů. Využívá proto výhod výše zmíněných omik, kam se řadí: genomika, transkriptomika, proteomika a metabolomika (Laghi et al., 2014).

Metabolomika nezaujatě identifikuje a kvantifikuje všechny metabolity v biologickém systému. Umožňuje získat hlubší vhled a lepší kontrolu nad zásadními biochemickými procesy toho, co konzumujeme. Metabolom je tvořen několika tisíci metabolity, které jsou konečným výsledkem genové exprese. Proto metabolomika zahrnuje analýzu široké škály sloučenin odlišné chemické povahy (Mannina et al., 2012).

Potravinový průmysl má zájem o produkci potravin se stejnými senzoryckými a chemickými vlastnostmi, a proto je kladen důraz na takové analytické metody, které jsou vhodné pro ověřování složení potravin. Každá potravina má svou specifickou charakteristiku (Mannina et al., 2012).

NMR využívá metabolomiku k monitorování senzorycké a nutriční kvality potravin rostlinného původu skrze analýzu majoritních a minoritních biochemických sloučenin. Velkou výzvou pro monitorování možných vedlejších biochemických změn jsou geneticky modifikované rostlinné odrůdy, které mají lepší nutriční a senzorycké vlastnosti, ale zároveň se s nimi pojí také určité riziko, které je nutné odhadnout (Mannina et al., 2012).

### 3.2.1 Polní plodiny

Mezi polní plodiny jsou řazeny obilniny, okopaniny, luskoviny, prádne rostliny a olejnin. Nejvíce prací se zabývá obilninami a některými okopaninami.

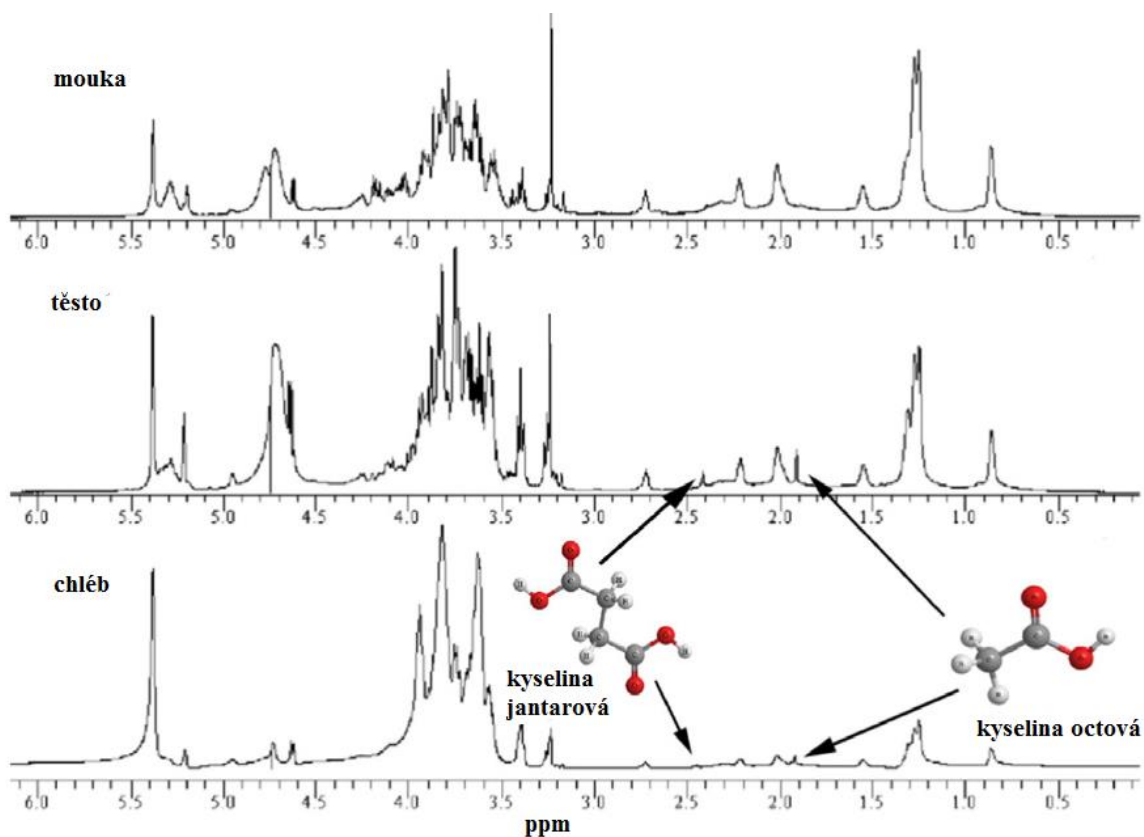
#### 3.2.1.1 Obilniny

Většina prací se zabývá určením  $^1\text{H}$  NMR profilu a jeho využitím při prokazování autenticity, určování geografického původu a zkoumání geneticky modifikovaných plodin. Nejvíce zkoumanou obilninou je pšenice.

Předpokládá se, že staré (dříve používané) odrůdy obilí vykazují nižší imunogenní vlastnosti, a proto by mohly být zařazeny do stravy celiaků a osob citlivých na lepek. V souvislosti s tím byl proveden pokus na myších, které byly krmeny těstovinami ze staré odrůdy pšenice (Kamutu) a těstovinami z pšenice tvrdé. Rozdílné krmivo způsobilo, že metabolický profil výkalů získaný  $^1\text{H}$  NMR naznačoval významné změny ve střevní mikrobiotě. Lze tedy předpokládat, že některé složky Kamutu mohou chránit organismus před oxidačním stresem i zánětem (Carnevali et al., 2014).

Pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie byl také stanoven metabolický profil pšeničné mouky z pšenice tvrdé různých botanických druhů/kultivarů pocházejících z jižní Itálie. Ačkoliv nebyly vzorky rozlišeny podle svého botanického původu, ukázalo se, že aromatické sloučeniny a aminokyseliny jsou zodpovědné za určení geografického původu (Lamanna et al., 2011).

U pšenice byly vedle geografického rozlišení vzorků semolinové mouky z pšenice tvrdé získány také informace o jejím chemickém složení: stanoveny byly především lipidy a polysacharidy (Brescia et al., 2002a). Ve vzorcích chleba připraveného z mouky pšenice tvrdé a pšenice seté byly pomocí  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR a dalších technik zjištěny také tyto látky: mléčná, jantarová a octová kyselina. Důvodem jejich přítomnosti je sekundární fermentace, která je zodpovědná za přeměnu polysacharidů v jednoduché sacharidy. Proto se signály některých sacharidů, které byly přítomné ve spektru mouky, neobjevují ve spektru chleba. Zároveň lze také ohodnotit roli mikroorganismů zapojených do fermentace (Brescia et al., 2003). Dále byly zkoumány také změny v chemickém složení těsta z pšenice tvrdé při samotném procesu výroby chleba. Výsledky studie jsou k vidění na obrázku 11, kde je zobrazeno  $^1\text{H}$  spektrum mouky, těsta i chleba. Zvýrazněn je signál kyseliny jantarové a octové, které vznikají při procesu fermentace v těstě a jsou tedy v hotovém chlebu přítomny s nižší intenzitou (Brescia et al., 2007; Corsaro et al., 2016).



**Obrázek 11:**  $^1\text{H}$  HR-MAS spektrum získané z mouky, těsta a chleba pšenice tvrdé. Převzato a upraveno z: (Corsaro et al., 2016).

Metabolický výzkum pomocí  $^1\text{H}$  NMR byl proveden také u mouky geneticky modifikované a konvenční pšenice, která byla pěstována na dvou různých lokalitách ve Velké Británii po dobu tří let. PCA (Principal Component Analysis = analýza hlavních komponent) prokázala, že vnější faktory (umístění pole, ročník) mají mnohem větší vliv na metabolický profil než genotyp. Metabolické rozdíly mezi vzorky z těchto dvou produkčních lokalit jsou přisuzovány rozdílnému obsahu aminokyselin, zejména kyselině asparagové, glutamové a jejich amidům. Nicméně byly pozorovány určité rozdíly mezi geneticky upravenými a parentálními liniemi. Ve spektru se tyto rozdíly projeví u jedné geneticky upravené linie, a to ve zvýšeném obsahu maltózy a sacharózy. Rozdíly v obsahu volných aminokyselin byly taktéž patrné (Baker et al., 2006).

Prostřednictvím  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR byla také studována hydratace škrobu u pšenice, brambor a kukuřice (Larsen et al., 2008).

U kukuřice, stejně jako u pšenice, byla věnována pozornost i rozdílu mezi geneticky modifikovanou a konvenční. Díky  $^1\text{H}$  NMR bylo provedeno srovnání metabolických profilů jejich semen a bylo možné prokázat rozdílné nahromadění metabolitů v průběhu vývoje. Role



pozměněného genu v kontrole buněčného cyklu byla prokázána (Castro et al., 2008). Ačkoliv se spektra vzorků zdála být stejná, u geneticky modifikované kukuřice byla zjištěna vyšší koncentrace těchto látek: betainu, kyseliny citronové, trehalózy a některých dalších látek, které nebyly doposud identifikovány (Piccioni et al., 2009). Další studie se zabývala rozdíly mezi dvěma geneticky modifikovanými liniemi na úrovni transkriptomu, proteomu a metabolomu. Profily obou linií byly sledovány po tři vegetační období. Bylo zjištěno, že vliv vnějšího prostředí hraje významnou roli v obsahu bílkovin, genové expresi i v obsahu metabolitů. Vzorky ze všech tří vegetačních období, pěstované na stejné lokalitě, se daly zřetelně rozlišit. Vliv vnějšího prostředí měl větší vliv než rozdílné genotypy (Barros et al., 2010).

Mezi další významné světové plodiny patří také rýže, jejíž růst je nepříznivě ovlivňován dlouhotrvajícím suchem a vysokou salinitou (vysokým obsahem soli). Metabolický profil kořenů a výhonků dvou odrůd rýže byl zkoumán za pomoci  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR i klasické  $^1\text{H}$  NMR. Díky PCA byly obě odrůdy jasně rozlišeny a pod vlivem stresových faktorů byla prokázána také značná akumulace aminokyselin a sacharidů jak v kořenech, tak ve výhoncích rýže. Navíc byly získány předběžné informace o metabolických změnách v rýži způsobených houbovou chorobou *Magnaporthe grisea* (Fumagalli et al., 2009).

### 3.2.1.2 Okopaniny

Z okopanin byly studovány např. brambory a to opět geneticky upravená odrůda a hlízy brambor dvou kontrolních odrůd. Největší rozdíl byl prokázán mezi dvěma kontrolními odrůdami, nikoliv mezi geneticky upraveným a kontrolními. Odlišnost odrůd spočívala dle PCA především mezi některými aminokyselinami a monosacharidy (Defernez et al., 2004). U pěti odrůd brambor (skladovaných při 4 °C a relativní vlhkosti 95 % po dobu dvou a osmi měsíců) byla použita zobrazovací metoda MRI. Získaná data a následná senzorická analýza vařených brambor potvrdila vysoký potenciál pokročilých zobrazovacích metod při analýze syrových brambor. Bylo zjištěno, že MRI analýza syrových brambor umožňuje předpovědět senzorické vlastnosti související se strukturou vařených brambor (Thybo et al., 2004). Úspěšné využití při analýze metabolického profilu hlíz raných brambor tří genotypů zaznamenala i  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR. Studovány byly brambory pěstované organickým a konvenčním způsobem, u kterých byly také posouzeny výkyvy celkového obsahu vodíku, uhlíku a dusíku. Vícerozměrná statistická analýza poskytla výsledek, díky kterému lze rozlišit jednotlivé odrůdy a pěstební systémy. U organicky pěstovaných brambor byl sledován pokles obsahu dusíku o 11-14 %, zatímco obsah kyseliny gama-aminomáselné (GABA) a lyzinu se ve všech hlízách

organicky pěstovaných brambor zvyšoval.  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR se ukázala jako dobrý nástroj pro určování původu organicky pěstovaných brambor (biobrambor) (Pacifico et al., 2013).

### 3.2.2 Ovoce a zelenina

Čerstvé ovoce a zelenina jsou považovány za zdroj cenných vitaminů, antioxidantů, vlákniny a minerálních látek. Mnoho těchto živin během tepelných úprav degraduje, a proto je značná část zeleniny a ovoce konzumována v čerstvém stavu nebo zpracována na čerstvé, zmražené či koncentrované šťávy (Mannina et al., 2012).

Profil ovocných šťáv se stanovuje cílenou i necílenou analýzou. Cílená analýza umožňuje identifikaci a kvantifikaci jednotlivých sloučenin (např. sacharózy, galakturonové kyseliny a dalších). Díky tomu lze snadno odhalit falšování šťáv. Mezi nejčastější způsoby falšování patří: přidavek cukru, kyseliny citronové, či citronové šťávy nebo extrakce pomerančových slupek a použití nezralého ovoce. Druhý přístup využívá statistické metody k určení anomálních vzorků, jejich původu, obsahu ovoce nebo přídavku jiného druhu ovoce, (Spraul et al., 2009).

Mezi nejčastěji studované plody patří: mango, melouny, jahody, jablka, citrusové plody, rajčata, olivy a mnohé další.

Gil et al. (2000) byli prvními, kdo úspěšně stanovili metabolický profil ovoce. V průběhu zrání manga byly pomocí  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR sledovány změny v chemickém složení šťávy přímo z ovoce a pro měření byla použita jak dužina, tak získaná šťáva. Výsledky ukázaly nečekaný pokles obsahu kyseliny citronové již v prvních stádiích zrání, a naopak zvýšení obsahu alaninu a menší nárůst kyseliny mléčné, GABA, fenylalaninu a niacinu. Navíc bylo zjištěno, že v pokročilých stádiích zralosti převládá ze všech sacharidů nejvíce sacharóza. Z aromatické části spektra bylo odhaleno, že k procesu zrání přispívají také polyfenolické sloučeniny. Byly prokázány rozdíly mezi vzorky získanými přímo z ovoce a vzorky šťávy, kterým předcházelo určité předzpracování. Vzorky získané přímo vykazovaly vyšší obsah  $\alpha$ -glukózy a  $\beta$ -glukózy (Gil et al., 2000).

Cílem studie zabývající se melouny bylo prozkoumat rozmanitost metabolitů a základní složení několika komerčních odrůd za rozdílných vnějších podmínek. Analýza získaných dat odhalila rozdíly vztahující se k vnějším faktorům, jakými jsou: odrůda, vegetační období, způsob pěstování (skleník vs. pole) a datum výsadby. Výsledky prokázaly, že informace o metabolomu a základních složkách jsou užitečným diagnostickým nástrojem pro charakteristiku plodin pěstovaných pro komerční účely (Bernillon et al., 2013). NMR

spektroskopie posloužila také při hodnocení kvality čerstvě naporcovaných melounů během skladování za chladírenských teplot (Fundo et al., 2015). Stanovení sacharózy, jakožto primárního produktu fotosyntézy a určující složky sladkosti bylo dosaženo za pomoci  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR. Kvantifikován byl zároveň i obsah glukózy a fruktózy v mezokarpu tří odrůd melounů. Výsledný obsah sacharidů mezi jednotlivými odrůdami melounů se lišil a výsledky se shodovaly s výsledky získanými tradičními enzymatickými metodami. Výhodou HR-MAS NMR je její rychlost stanovení za méně jak 30 minut, citlivost a nízká spotřeba vzorku (obvykle 50 mg). Navíc může tato metoda umožnit kvantifikaci dalších rostlinných metabolitů (Delgado-Goñi et al., 2013).

Při zpracování ovoce má velký význam také vliv tlaku (100-200 MPa), který byl studován u jahod, a to za pomoci zobrazovací metody MRI a  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR. Díky MRI byly prokázány významné změny v chování molekul vody, které se zvyšovaly spolu s použitým tlakem. Účinkem tlaku docházelo k rozsáhlému přerozdělení molekul vody z intracelulárního do extracelulárního prostoru v dřeni a centrálním dutém místě jahody.  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR umožnila identifikaci hlavních sacharidů (sacharózy,  $\alpha$ -glukózy,  $\beta$ -glukózy a fruktózy). Použitý tlak značně ovlivňoval hydrolyzu sacharózy, zatímco změny v profilu kyseliny citronové, jablečné a asparagové nebyly pozorovány. NMR metody se ukázaly jako velmi užitečný nástroj pro porozumění působení tlaku při zpracování potravin (Otero et Préstamo, 2009).

HR-MAS NMR, jakožto metoda umožňující studium polotuhých látek, byla aplikována u citronu a cedrátu, kde byly detekovány např. terpeny, sacharidy, organické kyseliny a aminokyseliny. Zároveň se projevila jako cenná metoda pro pozorování změn týkajících se sacharidů, organických kyselin (především citronové a jablečné), obsahu ethanolu ve vzorcích dužiny a obsahu mastných kyselin v semenech. To vše souvisí s průběhem zrání a ukazuje na možnost, jak posuzovat zralost ovoce pro komerční účely (Mucci et al., 2013). Podobně byla  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR užita při analýze šťávy dvou hybridních citronů. První byl pěstován v Messině a získal chráněné označení PGI (viz níže), druhý bez chráněného označení pocházel z Turecka. V obsahu mnoha metabolitů se vzorky obou citronů shodovaly, v čem se lišily, byl vyšší obsah asparaginu, fruktózy, glukózy, kyseliny jablečné a myo-inositolu u citronu z Messiny. Naproti tomu citron pěstovaný v Turecku byl bohatší na mastné kyseliny, GABA, arginin, cholin, izoleucin a některé další látky. Perspektivou do budoucna je stanovení metabolických profilů dalších kultivarů za účelem identifikace nejdůležitějších biomarkerů, které budou jednoznačně vypovídat o geografickém původu, a tak zabezpečí kontrolu pravosti certifikovaných potravin (Cicero et al., 2015).

Ve studii D'abrosca et al. (2017) byla popsána souvislost metabolických změn v jablku po sklizni s rozdílnými pěstebními systémy. Jiná studie porovnávala polyfenolické profily sušených jablek (křížal) odrůd (Mantovana, Mora, Nesta, Cipolla, aj.) s komerční odrůdou (Golden Delicious), které byly sušené vzduchem při teplotě 45 °C po dobu 19 hodin. Ačkoliv během průběhu sušení došlo ke ztrátě některých polyfenolických sloučenin, antioxidační kapacita některých málo využívaných odrůd zůstala oproti komerční odrůdě Golden Delicious vyšší. Výsledky studie naznačují, že stabilita nutričně hodnotných sloučenin v jablkách podléhajících dehydratačním změnám závisí na široké škále a typu analyzovaných sloučenin. Získaná data dokazují, že jablka po usušení nadále obsahují značné množství antioxidantů (Francini et al., 2017).

Mezi nejvíce probádané potraviny patří olivy a olivové oleje, které se z nich, především v oblasti Středomoří, vyrábí. Jedná se o poměrně drahou komoditu, která bývá často falšována a jejíž chráněné označení původu (CHOP = PDO = Protected Designation of Origin) je zneužíváno. Logo CHOP lze spolu s dalším chráněným označením EU vidět na obrázku 12 níže. Výsledky NMR studií olivových olejů jsou shrnuty v přehledovém článku autorů Dais et Hatzakis (2013).

U olivových olejů je sledována jejich kvalita, či druhová příslušnost a mnoho dalších faktorů. Analýza vzorků olejů z Libanonu popisovala také význam nadmořské výšky, zeměpisné šířky nebo morfologických a teplotních vlivů při pěstování oliv. Zabývala se i významem doby sklizně a bylo zjištěno, že významnou roli pro charakteristiku olejů hraje také míra srážek v dubnu a květnu. Geografický původ olejů byl určen na úrovni podoblastí (Merchak et al., 2017). Nadmořská výška byla zohledněna také v další studii olivových olejů z Lazia v Itálii, a to společně s účinkem zavlažování. Zatímco obsah těkavých sloučenin byl citlivý na nadmořskou výšku, zavlažování nejvíce ovlivnilo obsah kyseliny olejové a nasycených mastných kyselin (D'imperio et al., 2007). Tradiční chemická analýza i NMR byly aplikovány při studiu jednodruhových olivových olejů z Alžírsko a pomohly při určování jejich geografického původu a hodnocení kvality. Studie prokázala závislost obsahu chlorofylu, karotenoidů, tokoferolů a olejové kyseliny na odrůdě oliv (Laincer et al., 2016).

Využitím  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR byla charakterizována struktura slupky rajčete. Z výsledků vyplývá, že slupka rajčete je po chemické stránce tvořena převážně alifatickými skupinami spolu s některými alkeny a aromatickými skupinami, což se shoduje s předchozími studii. Dále byly identifikovány primární a sekundární alkoholy, stejně jako volné mastné kyseliny a jejich deriváty zodpovědné za síťovitou strukturu kutinu, což je biopolymer, který je součástí listů a kutikul rostlin (Deshmukh et al., 2003). U rajčat byla zkoumána také jejich

dužina, semena, slupka a rajčatové pyré, přičemž byly vybrány plody tří stádií zralosti. Rozdíly mezi vybranými částmi byly snadno patrné  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR spektroskopii. Semena byla tvořena především triacylglyceroly, zatímco ostatní části sestávaly z fruktózy, glukózy, kyseliny citronové a dominantní byla také GABA, glutamin a kyselina glutamová. Chemometrická analýza umožnila vizualizaci průběhu zrání a poukázala na to, že ačkoliv se plody z vnějšku zdají být stejné, liší se obsahem určitých metabolitů (Pérez et al., 2010).  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR byla také využita při prokazování autenticity a geografického původu známých rajčat odrůdy Pachino, pěstovaných na Sicílii. Právě proto, že rajčata získala chráněné zeměpisné označení Evropské unie (CHZO = PGI = Protected Geographical Indication) a certifikát kvality, čímž se zvýšila i jejich cena, docházelo často k podvodům jak na italských, tak na mezinárodních trzích. Logo CHZO je zobrazené na obrázku 12. Díky HR-MAS NMR bylo zjištěno, že Pachino rajčata mají vyšší koncentraci sacharidů, esenciálních aminokyselin a GABA. Na druhou stranu mají nižší obsah mastných kyselin a methanolu, látek, jejichž nadbytek není lidskému tělu prospěšný. Proto jsou v určité míře považována za zdraví prospěšná a vykazují také dobré organoleptické vlastnosti. Ačkoliv některé vnější faktory, jako je proměnlivost počasí v průběhu roku, mohou přispívat k metabolickým změnám, celkový metabolický obsah je závislý pouze na geografickém původu. Tudíž je možné vyloučit nebo naopak potvrdit případné falšování (Mallamace et al., 2014).



**Obrázek 12:** Chráněné zeměpisné označení a chráněné označení původu EU. Převzato z: <http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/znacky-kvality-potravin/evropske-znacky-kvality/>.

### 3.2.3 Mléko a mléčné výrobky

Mléko je obzvláště komplexní a nutričně hodnotnou základní složkou potravy. Nejvíce studií se zabývá změnami ve složení mléka, které byly provedeny za účelem zlepšení jeho funkčních vlastností a zvýšení tržní schopnosti. Další oblastí výzkumu je jednoznačné určení

příslušnosti mléka konkrétnímu zvířecímu druhu. Tato problematika se týká mnoha zemí nacházejících se v oblasti kolem Středozemního moře a dalších takových, kde je značné množství mléčných produktů vyráběno i z jiného mléka než kravského (Corsaro et al., 2016).

Obecně  $^1\text{H}$  NMR nebývá při analýze mléka aplikována přímo, a to ze dvou důvodů: jednou z hlavních složek mléka je také voda, která může způsobovat výrazné překrytí signálů dalších jeho složek. Při analýze mléka jsou tedy často měřena  $^{13}\text{C}$  a  $^{31}\text{P}$  NMR spektra. Nutná je také příprava vzorku (extrakce triacylglycerolů, odstranění tuku, upravení pH apod.). Zatímco  $^{31}\text{P}$  NMR umožnila analyzovat složení glycerofosfolipidů mléka v souvislosti s odlišným způsobem skladování,  $^{13}\text{C}$  poskytla informace o skladbě mastných kyselin a s tím související rozlišení mléka dle druhového původu (Mannina et al., 2012).

Rozlišením kravského a buvolího mléka na základě složení triacylglycerolů (TAG) se zabývala starší studie Andreotti et al. (2000). Kravské, buvolí, kozí a ovčí mléko potom porovnávala o něco novější studie Andreotti et al. (2002). Lepší porozumění metabolitům mléka odlišných druhů zvířat může posunout možnosti hodnocení mléka a detekci jeho falšování. Yang et al. (2016) charakterizovali metabolické profily mléka u holštýnského skotu, skotu plemene Jersey, jaka, buvola, kozy, velblouda a koně. Některé metabolity, jako cholin a kyselina jantarová, byly využity pro odlišení mléka holštýnského skotu od všech ostatních. Analýza metabolické cesty odhalila, že metabolismus glycerofosfolipidů, stejně jako biosyntéza valinu, leucinu a izoleucinu, jsou stejné i pro ostatní přežvýkavce (plemeno Jersey, buvola, jaka a kozu). Biosyntéza nenasycených mastných kyselin byla naproti tomu společná pro koně a velblouda. Výsledky tohoto výzkumu jsou užitečné pro pochopení rozdílů v syntéze mléka holštýnského skotu a ostatních zvířat, produkujících mléko (Y. Yang et al., 2016).

Pomocí NMR byly také odhaleny biomarkery často se vyskytujícího metabolického onemocnění krav – ketózy. Ketóza bývá obvykle diagnostikována ze vzorků krve nebo moči, jejichž odběr není tak jednoduchý. Proto je vždy dostupné mléko vhodnějším vzorkem pro analýzu. Nevýhodou může být závislost biomarkerů na stádiu laktace, plemeni a způsobu krmení. Jeden z biomarkerů se zdál být aplikovatelný pouze pro dané zkoumané plemeno, proto je potřeba jej pro další plemena stanovit individuálně (Klein et al., 2012). Dalším indikátorem nežádoucích změn v mléce je počet somatických buněk (PSB), jehož zvýšená hodnota obvykle indikuje mastitidu. Somatické buňky různého typu přispívají k rozdílnému metabolickému fingerprintu mléka. Pomocí NMR byly identifikovány již známe biomarkery, konkrétně laktát a acetát, a také některé nové: kyselina hippurová, izoleucin, butyrát, fumarát a  $\beta$ -hydroxybutyrát (Sundekilde et al., 2013).

Velmi všestrannou metodou pro kvantitativní analýzu fosfolipidů v mléce je  $^{31}\text{P}$  NMR, která byla porovnávána s (2D-TLC) tenkovrstvou chromatografií. Ačkoliv se  $^{31}\text{P}$  NMR ukázala jako méně citlivější metoda pro detekci minoritních sloučenin, její hlavní výhodou oproti tenkovrstvé chromatografii byl celkový čas analýzy, který činil pouhých 36 minut. Metoda se dala použít i pro vzorky s vysokým obsahem fosfolipidů, přičemž předchozí extrakce lipidů nebyla potřebná (MacKenzie et al., 2009).

Co se týká falšování mléka, někteří producenti do mléka bezohledně přidávají nebílkovinné dusíkaté sloučeniny. Cílem je zdánlivé zvýšení koncentrace bílkovin. Neuvědomují si však následky přidavku těchto sloučenin, které mají nefrotoxické účinky a mohou tak zapříčinit onemocnění močových cest. Díky NMR byly v mléce současně určeny tyto látky: močovina, melamin, guanidin, biuret a diaminoguanidin. V závislosti na lokalitě produkce mléka byly zjištěny vyšší hladiny močoviny, které však nepřekračovaly maximální bezpečný limit 620 mg/l (Li et al., 2016).

Pro ověření pravdivosti tvrzení „bez laktózy/neobsahuje laktózu“, která se nachází na obalech bezlaktózových mlék a mléčných náhražek ze sóji, ovsa a rýže, byla využita  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie. V tomto případě byla  $^1\text{H}$  NMR shledána jako vhodná rutinní metoda pro analýzu mlék a jeho náhražek (Monakhova et al., 2012). Novou alternativou tradičních metod (např. plynové chromatografie, která je kvůli přípravě vzorků velmi časově náročná) pro měření konjugované kyseliny linolové (CLA) obsažené v lipidické frakci mléka, představuje v kombinaci se spolehlivou extrakcí lipidů  $^1\text{H}$  NMR. Celkový obsah CLA byl měřen u vzorků různých kanadských sýrů vyrobených z mléka dojníc, které byly krmeny konvenčním krmivem, organickým krmivem nebo trávou. Výsledky prokázaly, že sýry vyrobené z mléka krav krmených výlučně trávou vykazují značně vyšší celkový obsah CLA než ostatní sýry (Prema et al., 2013). Chráněné označení původu (CHOP) nese také produkt z buvolího mléka – Mozzarella di Bufala Campana vyráběný v oblasti Campania v Itálii. Pro zajištění kontroly autenticity, geografického původu a kvality mozzareilly byla aplikována  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR, která bez jakékoliv přípravy vzorku (extrakce, apod.) pomohla přímo identifikovat specifické metabolity. PCA vysvětlila odlišnosti mezi dvěma vzorky ze dvou různých produkčních lokalit, a to díky těmto metabolitům:  $\beta$ -galaktóze,  $\beta$ -laktóze, kyselině octové a glycerolu. Zásluhou  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR bylo umožněno statistické rozlišení geografického původu mozzareilly i její čerstvosti (Mazzei et Piccolo, 2012).

Za zmínku stojí také využití MRI zobrazovací metody při studiu mléčných výrobků. MRI porovnávala sýry vyrobené ze syrového a tepelně upraveného ovčího mléka ze Sardinie. Získané výsledky se shodovaly s předchozími studiemi, zabývajícími se podobnou

problematikou. Výhodou MRI je čas nutný pro analýzu, který je velmi krátký (6-18 min.), a především také to, že se jedná o nedestruktivní metodu (Mulas et al., 2013).

### 3.2.4 Maso a masné výrobky

Kvalita masa závisí na mnoha faktorech ovlivňujících postmortální metabolické reakce, které jsou zodpovědné za přeměnu svaloviny v maso. Patří sem: genetické predispozice, krmivo, způsob usmrcení atd. NMR spektroskopie může poskytnout informace o pH, metabolických změnách, obsahu a rozdělení vody či tuku v mase a mnohé další. Proto se stává důležitým nástrojem pro analýzu masa (Spyros et Dais, 2012).

Potenciál  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR pro určování původu masa a identifikaci jeho falšování byl poprvé popsán v práci Brescia et al. (2002b). Bylo potvrzeno, že tato metoda umožňuje, bez jakýchkoliv zvláštních příprav vzorku, rychlé získání kvalitativních i kvantitativních informací o chemickém složení masa (Brescia et al., 2002b). Nalezením parametrů vhodných pro určení geografického původu jehněčího masa ze tří lokalit v Apulii (jižní Itálie) se zabývala práce autorů Sacco et al. (2005), kteří kombinovali  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR s dalšími analytickými metodami. Schopnost metody předpovědět vlastnosti vzorku dosahovala vysoké úspěšnosti (Sacco et al., 2005). V souvislosti s tím byly za účelem určení geografického původu provedeny předběžné studie vzorků sušeného hovězího masa (z Austrálie, Brazílie, Kanady, Švýcarska a USA). Ačkoliv se obsah tuku a některých specifických metabolitů zdál být dobrým biomarkerem, bylo zjištěno, že odlišné krmivo, plemena a podmínky chovu zvířat mohou způsobit komplikace při rozlišování původu vzorků (Shintu et al., 2007).

Informace o původu hovězího masa byly také velmi žádané především v době, kdy byl zvýšený výskyt onemocnění BSE, tzv. „nemoci šílených krav“, a v době implementace dohody o volném obchodu. Fingerprinting a profilování získané na základě  $^1\text{H}$  NMR umožnil rozlišení syrových vzorků masa ze čtyř zemí: Nového Zélandu, Austrálie, USA a Koreje. Jako možný biomarker pro identifikaci původu byla označena kyselina jantarová a několik aminokyselin – izoleucin, leucin, methionin, tyrosin a valin (Jung et al., 2010).

Mnoho prací se zabývá také rybím masem a tím, jaké účinky na maso má způsob jeho ošetření.  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR byla využita při analýze uzeného lososa obecného a umožnila určení nejdůležitějších látek: mastných kyselin, sacharidů, aminokyselin, dipeptidů, organických kyselin a dalších. Poprvé byla také představena nová možnost identifikace  $\omega$ -3 mastných kyselin u ryb a rybích produktů (Castejón et al., 2010).  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR v kombinaci s PCA našli využití při rozlišení mezi ozářeným a neozářeným za studena uzeným vzorkem lososa obecného. NMR profil byl získán z malého množství svaloviny za méně jak



8 minut. Obdržené výsledky poukázaly na některé sloučeniny, které mohou být využity při diagnostice ošetření potravin ozářením. Jedná se o tyto sloučeniny: kreatin, trimethylaminoxid, fosforylcholin a glycerol fosforylcholin.  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR je schopná odhalit změny ve složení masa související se způsobem jeho zpracování, stejně jako potvrdit nebo vyvrátit přítomnost bioaktivních sloučenin v ozářených potravinách (Villa et al., 2013).

Při rozlišování masa volně žijících lososů a lososů z farmových chovů byla aplikována  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopie. Rozlišení bylo provedeno také za účelem určení geografického původu a ověření případného zneužití označení lososů prodávaných na trhu (Aursand et al., 2009). Cílem LR-NMR spolu s tradičními chemickými metodami bylo zjistit fyzikální a chemické rozdíly před a po nástupu rigor mortis (posmrtné ztuhlosti). Studie zahrnovala volně žijící a na farmách chované tresky a přinesla cenné informace týkající se struktury masa stejně jako informace o stavu vody během aplikace solného nálevu a informace o denaturaci bílkovin. Bylo zjištěno, že aplikace soli a rehydratační proces způsobují nevratné změny buněk (Gudjonsdottir et al., 2010).

NMR spektroskopie se uplatňuje také u drůbežího masa. Pro lepší porozumění rozdílům ve složení prsího masa dvou plemen kachen (lišících se věkem) byla společně s PCA a dalšími statistickými analýzami využita  $^1\text{H}$  NMR (Wang et al., 2017). V posledních desetiletích je pozoruhodný zvýšený výskyt abnormalit prsího svalstva a jeho dystrofie u komerčních kuřat. Dystrofie prsího svalstva byla spojena se značně sníženým obsahem anserinu, karnozinu a kreatinu (Soglia et al., 2016; Sundekilde et al., 2017).

### 3.2.5 Koření a léčivé rostliny

Nejen živočišné produkty, ale také produkty rostlinného původu, a především samotné koření a léčivé rostliny jsou předmětem studia NMR spektroskopie.

Byliny a léčivé rostliny jsou již od nepaměti používány při léčbě závažných zdravotních komplikací a jejich význam je i v současnosti zásadní. Z tradičních léčivých rostlin lze získat mnoho biologicky aktivních látek. Získávání informací o jednotlivých rostlinných metabolitech je však velmi časově náročné (Kumar, 2015).

$^1\text{H}$  HR-MAS NMR byla použita pro posouzení metabolického profilu sladké papriky. 1D a 2D NMR spektra získaná přímo z několika miligramů vzorku umožnila identifikaci organických kyselin, mastných kyselin, aminokyselin a minoritních sloučenin, jakými jsou trigonellin, cholin a deriváty kyseliny skořicové. K druhovému rozlišení papriky posloužily právě sacharidy, organické a mastné kyseliny (Ritota et al., 2010). NMR data společně

s chemometrickou analýzou dokázala stanovit metabolity zodpovědné za odlišení vzorků česneku dle druhu (na červený a bílý česnek) a dále pak podle geografického původu. Metodika se prokázala jako vhodná pro kontrolu kvality a falšování česneku (Ritota et al., 2012).

Mezi jedno z nejdražších koření na světě vůbec patří šafrán, který z tohoto důvodu podléhá také často falzifikaci. Použití zakázaných barviv řady Sudan (I-IV), běžně používaných při barvení plastů, bylo odhaleno za pomoci  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter.  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie byla pro svou vysokou přesnost a rychlost potvrzena jako vhodná metoda pro hodnocení falšování šafránu (Petraakis et al., 2017). Další studie zabývající se šafránem se zaměřila na problémy se zpětným určováním staří komerčních vzorků neznámého původu. Byly zkoumány ověřené a komerční vzorky různého původu a doby sklizně, které byly skladovány za definovaných podmínek po různě dlouhou dobu. Výsledky byly velmi povzbuzující, protože bylo možné stanovit mezní hodnotu, nad kterou může být jakýkoliv komerční šafrán považován za nevyhovující (Consonni et al., 2016).  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie byla aplikována také při určování kvality šafránu z Itálie označeného chráněným označením původu CHOZ. Přestože se jedná spíše o předběžné výsledky, vzhledem k malému množství zkoumaných vzorků, je možné rozlišit šafrán s CHOZ a komerčně dostupný. Byly určeny dvě ze základních složek šafránu zodpovídající za jeho kvalitu, a to pikrokrocín a krocín. Komerčně dostupný šafrán byl charakterizován na základě mastných kyselin (Cagliani et al., 2015).

Další studie zaměřená na  $^{31}\text{P}$  NMR spektra prokázala svůj potenciál pro detekci a kvantifikaci velkého množství fenolických sloučenin a triterpenických kyselin extraktů oregana v jednom experimentu. Porovnáním chemických posunů modelových sloučenin z 2D NMR spektroskopie bylo dosaženo jednoznačného přiřazení chemických posunů dihydroxy- a polyhydroxyfenolů jednotlivým odrůdám oregana v  $^{31}\text{P}$  NMR spektru. Pokud by byly dobře zdokumentované chemické posuny funkčních skupin všech odrůd oregana, byla by tato technika vhodná pro rychlý screening velkého počtu vzorků a pro vytvoření komplexní databanky autentických odrůd oregana. Na základě studie bylo zjištěno, že zkoumané vzorky oregana byly bohaté na triterpenické kyseliny stejně jako na fenolové sloučeniny, mezi které patří karvakrol (Agiomyrgianaki et al., 2012).

Velmi zajímavé využití NMR spolu s dalšími analytickými metodami představuje izolace a strukturní identifikace biologicky aktivních látek. Zeng et al. (2015) provedli studii, ve které dokázali izolovat a identifikovat látky indikující smrt rakovinných buněk. Jednalo se o látky ze semene čínského koření známého pod názvem galgán. Na buněčných liniích byla zhodnocena jejich cytotoxická aktivita a bylo potvrzeno, že semena této rostliny můžou sloužit při prevenci rakoviny (Zeng et al., 2015).

### 3.3 Studium struktury biologicky aktivních látek

NMR je tedy také důležitým nástrojem pro studium biologicky aktivních látek a jejich struktury. Při jejich zkoumání se běžně využívá jak  $^1\text{H}$ , tak i  $^{13}\text{C}$  NMR.

V případě objasňování struktury těchto látek je však zásadní jejich izolace v co nejčistší formě, např. formou tzv. bioaktivitou řízené frakcionace (bioassay-guided fractionation). K tomu se využívají také preparativní techniky jako je např. TLC, HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie) nebo sloupcová chromatografie. Jako příklad lze uvést studii Eom et al. (2016), kde byla zkoumána kůra břízy mandžuské (*Betula platyphylla* var. *japonica*) za účelem izolace a identifikace bioaktivních chemických sloučenin. Díky 1D a 2D NMR byla objasněna struktura nového triterpenu. Bříza mandžuská je používána k léčbě zápalu plic, zánětu ledvin nebo chronické bronchitidy. Výsledky studie prokázaly, že její kůra je potenciálním zdrojem přírodních antioxidantů, které lze použít ve farmacii i jako součást funkčních potravin (Eom et al., 2016).

V přehledovém článku Agerbirk et Olsen (2012) je shrnuto využití NMR a dalších analytických metod při studiu struktury různých glukosinolátů, produkovaných např. čeledi brukvovité. Zkoumány jsou především odrůdy, u kterých je známá jejich fylogeneze a lze tak zhodnotit i vliv evoluce na profil glukosinolátů. NMR v mnoha případech poskytla chybějící informace o struktuře glukosinolátů (Agerbirk et Olsen, 2012).

Další studie hodnotila případné použití flavonoidů endemického tropického ovoce pocházejícího z Íránu ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Konkrétně se jednalo o *Trigonostadium brachytaenium* z čeledi miříkovité. Flavonoidy jsou přítomné v potravinách a léčivých rostlinách a jsou tedy přímo konzumovány. V rostlinách se nachází převážně ve formě glykosidů. Jejich biologická aktivita má vliv na lidské zdraví, proto slouží také při vývoji nových léků. Z extraktu tohoto ovoce byly poprvé izolovány dva nové deriváty flavonoidů, jejichž struktura byla objasněna za pomoci  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR a dalších metod. Extrakt vykazoval antimikrobiální aktivitu proti sedmi různým bakteriím (např. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*), stejně jako proti třem houbám (např. *Saccharomyces cerevisiae* a *Aspergillus niger*) (Akhavan et al., 2015).

V Ájurvédě se již po staletí používá pryskyřice (guggul) ze stromu *Commiphora wightii* (syn. *Commiphora mukul*) – u nás známého jako myrhovník. U této pryskyřice byla NMR spektroskopií objasněna struktura 51 různých metabolitů. Jako hlavní metabolity byly poprvé identifikovány myo-inositol a kyselina chinová. Poprvé byla také zmíněna izolace houbového endofyta *Nigrospora* sps. z této rostliny. Tato endosymbiotická houba produkovala značné

množství bostrycinu a deoxybostrycinu, látek známých pro své protirakovinné vlastnosti (Bhatia et al., 2015).

$^1\text{H}$  NMR přispěla také při analýze biologicky aktivních látek rostliny *Glycyrrhiza glabra*, všeobecně známé pod názvem lékořice. Lékořice se používá při léčbě zánětlivých stavů, má protirakovinné a antivirové účinky. Identifikace biologicky aktivních látek je nutným předpokladem pro vysvětlení jejího léčebného využití (Farak et al., 2012).

Biologicky aktivní diterpeny se vyskytují v kořenech endemické planě rostoucí šalvěže (*Salvia rhytidia*) z čeledi hluchavkovité, kterou lze najít na východě Íránu.  $^{13}\text{C}$  NMR odhalila v této rostlině dvě velmi účinné protirakovinné látky (sahandinon a miltiron) (Jassbi et al., 2017).

Zdrojem přírodních fenolických antioxidantů jsou semena stromu *Dimocarpus longan* Lour (syn. *Euphoria longan* Lam.), který roste např. v Thajsku, kde jsou jeho plody velmi významné. Ovoce tohoto stromu se konzumuje v čerstvém, sušeném i konzervovaném stavu. Právě konzervářský průmysl produkuje velké množství semen, která jsou ceněna pro své antioxidační účinky. Strukturní objasnění polyfenolické frakce bylo provedeno také za pomoci  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopie (Sudjaroen et al., 2012).

V přehledovém článku Yang et al. (2014) jsou shrnuty pokroky související se zkoumáním rodu *Panax* (ženšen), který je zdrojem přírodních léčivých přípravků. Přípravky z ženšenu již po staletí přispívají lidskému zdraví. Rod *Panax* obsahuje bohaté množství saponinů, biologicky aktivních látek s účinky na centrální nervový systém a příznivými účinky u pacientů trpících kardiovaskulárními chorobami. Dále působí proti rakovině a pomáhá při diabetu. Při charakteristice ženšenu byla taktéž využita  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR, která umožnila objasnění neznámých struktur (Yang et al., 2014).

Díky pozitivním vlastnostem BAL se studium jejich struktury pomocí NMR spektroskopie využívá stále častěji. Jejich případné použití při léčbě konkrétních onemocnění a využití při vývoji nových léků je velmi významné.

## 4 Závěr

Nukleární magnetická rezonance je tradičně využívána při objasnění chemické struktury malých syntetických i přírodních molekul, v poslední době poté i velkých biomolekul. Při tom se stává stále přesnějším nástrojem.

S lepšími možnostmi ve výpočetní technice, snižujícími se náklady, vývojem silnějších magnetických polí, technik pro potlačení signálu rozpouštědel a také s velkým počtem všestranných pulzních sekvencí 1D a 2D NMR, se aplikace NMR rozšířila v metabolomice i nutrigenomice.

Využití nukleární magnetické rezonance v potravinářství tedy nachází stále větší uplatnění a díky svým možnostem se stává více a více předmětem zájmu mnoha vědeckých studií. Použití NMR v zemědělsko-potravinářském odvětví je jednou z nejrychleji se rozvíjejících oblastí. NMR dokáže např. analyzovat změny ve složení zemědělských plodin i produktů, způsobené vnějším prostředím, prokázat jejich případné falšování nebo naopak potvrdit pravost.

Aplikaci NMR v potravinářství by do budoucna mohlo podpořit vytvoření interaktivních databází a softwaru, které by společně umožnily kvantifikování metabolitů v potravinách. Pro vytvoření takové databáze je nezbytné, aby mezi sebou jednotlivé vědecké týmy komunikovaly a spolupracovaly.

Stále je však mnoho oblastí, kde studium metabolomiky za pomoci NMR nebylo využito. Aby mohly být výsledky získané NMR spektroskopii aplikovány při hodnocení kvality, autenticity a původu potravin je potřeba vypracování jednotných experimentálních protokolů, vytvoření výše zmíněných databází a zdokonalení vhodných statistických metod. To vše je základem pro uznání NMR jako vhodné metody k rutinnímu použití při kontrole potravin.

## 5 Seznam literatury

- Agerbirk, N., Olsen, C. E. 2012. Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry*. 77. 16–45.
- Agiomyrgianaki, A., Dais, P. 2012. Simultaneous determination of phenolic compounds and triterpenic acids in oregano growing wild in Greece by  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 50 (11). 739–748.
- Akhavan, M., Jahangiri, S., Shafaghat, A. 2015. Studies on the antioxidant and antimicrobial activity and flavonoid derivatives from the fruit of *Trigonostadium brachytaenium* (Boiss.) Alava. *Industrial Crops & Products*. 63. 114–118.
- Andreotti, G., Lamanna, R., Trivellone, E., Motta, A. 2002.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of TAG: An easy way to distinguish milks from different animal species. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 79 (2). 123–127.
- Andreotti, G., Trivellone, E., Lamanna, R., Di Luccia, A., Motta, A. 2000. Milk identification of different species:  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy of triacylglycerols from cows and buffaloes' milks. *Journal of dairy science*. 83 (11). 2432–2437.
- Andrew, E. R., Szczesniak, E. 1995. A historical account of NMR in the solid state. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 28 (1). 11–36.
- Aursand, M., Standal, I. B., Praél, A., Mcevoy, L., Irvine, J., Axelson, D. E. 2009.  $^{13}\text{C}$  NMR pattern recognition techniques for the classification of atlantic salmon (*Salmo salar L.*) according to their wild, farmed, and geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (9). 3444–3451.
- Baker, J. M., Hawkins, N. D., Ward, J. L., Lovegrove, A., Napier, J. A., Shewry, P. R., Beale, M. H. 2006. A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat. *Plant Biotechnology Journal*. 4 (4). 381–392.
- Barros, E., Lezar, S., Anttonen, M. J., Van Dijk, J. P., Röhlig, R. M., Kok, E. J., Engel, K. H. 2010. Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Plant Biotechnology Journal*. 8 (4). 436–451.
- Bernillon, S., Biais, B., Deborde, C., Maucourt, M., Cabasson, C., Gibon, Y., Hansen, T. H., Husted, S., de Vos, R. C. H., Mumm, R., Jonker, H., Ward, J. L., Miller, S. J., Baker, J. M., Burger, J., Tadmor, Y., Beale, M. H., Schjoerring, J. K., Schaffer, A. A., Rolin, D., Hall, R. D., Moing, A. 2013. Metabolomic and elemental profiling of melon fruit quality as affected by genotype and environment. *Metabolomics*. 9 (1). 57–77.
- Bhatia, A., Bharti, S. K., Tripathi, T., Mishra, A., Sidhu, O. P., Roy, R., Nautiyal, C. S. 2015. Metabolic profiling of *Commiphora wightii* (guggul) reveals a potential source for pharmaceuticals and nutraceuticals. *Phytochemistry*. 110. 29–36.
- Brescia, M. A., Di Martino, G., Fares, C., Di Fonzo, N., Platani, C., Ghelli, S., Reniero, F., Sacco, A. 2002a. Characterization of Italian durum wheat semolina by means of chemical

- analytical and spectroscopic determinations. *Cereal Chemistry*. 79 (2). 238–242.
- Brescia, M. A., Jambrenghi, A. C., Di Martino, V., Sacco, D., Giannico, F., Vonghia, G., Sacco, A. 2002b. High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) studies on meat components: potentialities and prospects. *Italian Journal of Animal Science*. 1 (2). 151–158.
- Brescia, M. A., Sacco, D., Sgaramella, A., Pasqualone, A., Simeone, R., Peri, G., Sacco, A. 2007. Characterisation of different typical Italian breads by means of traditional, spectroscopic and image analyses. *Food Chemistry*. 104 (1). 429–438.
- Brescia, M. A., Sgaramella, A., Ghelli, S., Sacco, A. 2003. <sup>1</sup>H HR-MAS NMR and isotopic investigation of bread and flour samples produced in southern Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83 (14). 1463–1468.
- Buděšínský, M., Pelnař, J. 2000. Fyzikálně-chemické metody (Nukleární magnetická rezonance). Ústav organické chemie a biochemie AV ČR. Praha. 248 s. ISBN: 8086241076.
- Cagliani, L. R., Culeddu, N., Chessa, M., Consonni, R. 2015. NMR investigations for a quality assessment of Italian PDO saffron (*Crocus sativus L.*). *Food Control*. 50. 342–348.
- Carnevali, A., Gianotti, A., Benedetti, S., Tagliamonte, M. C., Primiterra, M., Laghi, L., Danesi, F., Valli, V., Ndaghijimana, M., Capozzi, F., Canestrari, F., Bordoni, A. 2014. Role of Kamut® brand khorasan wheat in the counteraction of non-celiac wheat sensitivity and oxidative damage. *Food Research International*. 63. 218–226.
- Castejón, D., Villa, P., Calvo, M. M., Santa-María, G., Herraiz, M., Herrera, A. 2010. <sup>1</sup>H-HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Magnetic Resonance in Chemistry*. 48 (9). 693–703.
- Castro, C., Motto, M., Rossi, V., Manetti, C. 2008. Variation of metabolic profiles in developing maize kernels up- and down-regulated for the hda101 gene. *Journal of Experimental Botany*. 59 (14). 3913–3924.
- Cicero, N., Corsaro, C., Salvo, A., Vasi, S., Giofrè, S. V., Ferrantelli, V., Di Stefano, V., Mallamace, D., Dugo, G. 2015. The metabolic profile of lemon juice by proton HR-MAS NMR: the case of the PGI Interdonato Lemon of Messina. *Natural Product Research*. 29 (20). 1894–1902.
- Consonni, R., Ordoudi, S. A., Cagliani, L. R., Tsiangali, M., Tsimidou, M. Z. 2016. On the traceability of commercial saffron samples using <sup>1</sup>H-NMR and FT-IR metabolomics. *Molecules*. 21 (3). 1–13.
- Corsaro, C., Cicero, N., Mallamace, D., Vasi, S., Naccari, C., Salvo, A., Giofrè, S. V., Dugo, G. 2016. HR-MAS and NMR towards foodomics. *Food Research International*. 89 (SI). 1085–1094.
- Cubero-Leon, E., Peñalver, R., Maquet, A. 2014. Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International*. 60. 95–107.

- D'abrosca, B., Scognamiglio, M., Corrado, L., Chiocchio, I., Zampella, L., Mastrobuoni, F., Rega, P., Scortichini, M., Fiorentino, A., Petriccione, M. 2017. Evaluation of different training systems on Annurca apple fruits revealed by agronomical, qualitative and NMR-based metabolomic approaches. *Food Chemistry*. 222. 18–27.
- D'imperio, M., Mannina, L., Capitani, D., Bidet, O., Rossi, E., Bucarelli, F. M., Quaglia, G. B., Segre, A. 2007. NMR and statistical study of olive oils from Lazio: A geographical, ecological and agronomic characterization. *Food Chemistry*. 105 (3). 1256–1267.
- Dais, P., Hatzakis, E. 2013. Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: A critical review. *Analytica Chimica Acta*. 765. 1–27.
- Defernez, M., Gunning, Y. M., Parr, A. J., Shepherd, L. V. T., Davies, H. V., Colquhoun, I. J. 2004. NMR and HPLC-UV profiling of potatoes with genetic modifications to metabolic pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (20). 6075–6085.
- Delgado-Goñi, T., Campo, S., Martín-Sitjar, J., Cabañas, M. E., San Segundo, B., Arús, C. 2013. Assessment of a  $^1\text{H}$  high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy procedure for free sugars quantification in intact plant tissue. *Planta*. 238 (2). 397–413.
- Deshmukh, A. P., Simpson, A. J., Hatcher, P. G. 2003. Evidence for cross-linking in tomato cutin using HR-MAS NMR spectroscopy. *Phytochemistry*. 64 (6). 1163–1170.
- Emsley, J. W., Feeney, J. 1995. Milestones in the first fifty years of NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 28 (1). 1–9.
- Emsley, J. W., Feeney, J. 2007. Forty years of progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 50 (4). 179–198.
- Eom, H. J., Kang, H. R., Kim, H. K., Jung, E. B., Park, H. B., Kang, K. S., Kim, K. H. 2016. Bioactivity-guided isolation of antioxidant triterpenoids from *Betula platyphylla* var. *japonica* bark. *Bioorganic Chemistry*. 66. 97–101.
- Farag, M. A., Porzel, A., Wessjohann, L. A. 2012. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques. *Phytochemistry*. 76. 60–72.
- Francini, A., Romeo, S., Cifelli, M., Gori, D., Domenici, V., Sebastiani, L. 2017.  $^1\text{H}$  NMR and PCA-based analysis revealed variety dependent changes in phenolic contents of apple fruit after drying. *Food Chemistry*. 221. 1206–1213.
- Fumagalli, E., Baldoni, E., Abbruscato, P., Piffanelli, P., Genga, A., Lamanna, R., Consonni, R. 2009. NMR techniques coupled with multivariate statistical analysis: Tools to analyse *Oryza sativa* metabolic content under stress conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 195 (2). 77–88.
- Fundo, J. F., Amaro, A. L., Madureira, A. R., Carvalho, A., Feio, G., Silva, C. L. M., Quintas, M. A. C. 2015. Fresh-cut melon quality during storage: An NMR study of water transverse relaxation time. *Journal of Food Engineering*. 167. 71–76.



- Gil, A. M., Duarte, I. F., Delgadillo, I., Colquhoun, I. J., Casascelli, F., Humpfer, E., Spraul, M. 2000. Study of the compositional changes of mango during ripening by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48 (5). 1524–1536.
- Gudjonsdottir, M., Gunnlaugsson, V. N., Finnbogadottir, G. A., Sveinsdottir, K., Magnusson, H., Arason, S., Rustad, T. 2010. Process control of lightly salted wild and farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) by brine injection, brining, and freezing-A low field NMR study. *Journal of Food Science*. 75 (8). 527–536.
- Günther, H. 2013. *NMR spectroscopy: basic principles, concepts, and applications in chemistry*. 3rd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. p. 718. ISBN: 9783527330041.
- Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. 2008. *Spectroscopic methods in organic chemistry*. 2nd ed. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. p. 453. ISBN: 9783131060426.
- Ibañez, E., Cifuentes, A. 2001. New analytical techniques in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 41 (6). 413-450.
- Jacobsen, N. E. 2007. *NMR spectroscopy explained: simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology*. Wiley-Interscience. Hoboken, New Jersey. p. 688. ISBN: 9780471730965.
- Jassbi, A. R., Eghtesadi, F., Hazeri, N., Ma'sumi, H., Valizadeh, J., Chandran, J. N., Schneider, B., Baldwin, I. T. 2017. The roots of *Salvia rhytidea*: a rich source of biologically active diterpenoids. *Natural Product Research*. 31 (4). 477–481.
- Jung, Y., Lee, J., Kwon, J., Lee, K. S., Ryu, D. H., Hwang, G. S. 2010. Discrimination of the geographical origin of beef by <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (19). 10458–10466.
- Klein, M. S., Buttchereit, N., Miemczyk, S. P., Immervoll, A. K., Louis, C., Wiedemann, S., Junge, W., Thaller, G., Oefner, P. J., Gronwald, W. 2012. NMR metabolomic analysis of dairy cows reveals milk glycerophosphocholine to phosphocholine ratio as prognostic biomarker for risk of ketosis. *Journal of Proteome Research*. 11 (2). 1373–1381.
- Kumar, D. 2015. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: Metabolic profiling of medicinal plants and their products. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 46 (5). 400–412.
- Laghi, L., Picone, G., Capozzi, F. 2014. Nuclear magnetic resonance for foodomics beyond food analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 59. 93–102.
- Laincer, F., Iaccarino, N., Amato, J., Pagano, B., Pagano, A., Tenore, G., Tamendjari, A., Rovellini, P., Venturini, S., Bellan, G., Ritieni, A., Mannina, L., Novellino, E., Randazzo, A. 2016. Characterization of monovarietal extra virgin olive oils from the province of Béjaïa (Algeria). *Food Research International*. 89 (SI). 1123–1133.
- Lamanna, R., Cattivelli, L., Miglietta, M. L., Troccoli, A. 2011. Geographical origin of durum

- wheat studied by  $^1\text{H}$ -NMR profiling. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 49 (1). 1–5.
- Larsen, F. H., Blennow, A., Engelsen, S. B. 2008. Starch granule hydration—a MAS NMR investigation. *Food Biophysics*. 3 (1). 25–32.
- Li, Q., Meng, X., Zhu, D., Pang, X., Wang, K., Frew, R., Chen, G. 2016. Determination of nonprotein nitrogen components of milk by nuclear magnetic resonance. *Analytical Letters*. 49 (18). 2953–2963.
- Lubbe, A., Ali, K., Verpoorte, R., Hae Choi, Y. 2013. NMR-based metabolomics analysis. In: Lämmerhofer, M., Weckwerth, W. (eds.). *Metabolomics in practice: successful strategies to generate and analyze metabolic data*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany. p. 209–238. ISBN: 9783527655861.
- MacKenzie, A., Vyssotski, M., Nekrasov, E. 2009. Quantitative analysis of dairy phospholipids by  $^{31}\text{P}$  NMR. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 86 (8). 757–763.
- Mallamace, D., Corsaro, C., Salvo, A., Cicero, N., Macaluso, A., Giangrosso, G., Ferrantelli, V., Dugo, G. 2014. A multivariate statistical analysis coming from the NMR metabolic profile of cherry tomatoes (The Sicilian Pachino case). *Physica A*. 401. 112–117.
- Mannina, L., Sobolev, A. P., Viel, S. 2012. Liquid state  $^1\text{H}$  high field NMR in food analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 66. 1–39.
- Marcone, M. F., Wang, S., Albabish, W., Nie, S., Somnarain, D., Hill, A. 2013. Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. *Food Research International*. 51 (2). 729–747.
- Mazzei, P., Piccolo, A. 2012.  $^1\text{H}$  HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chemistry*. 132 (3). 1620–1627.
- Merchak, N., El Bacha, E., Bou Khouzam, R., Rizk, T., Akoka, S., Bejjani, J. 2017. Geoclimatic, morphological, and temporal effects on Lebanese olive oils composition and classification: A  $^1\text{H}$  NMR metabolomic study. *Food Chemistry*. 217. 379–388.
- Monakhova, Y. B., Kuballa, T., Leitz, J., Andlauer, C., Lachenmeier, D. W. 2012. NMR spectroscopy as a screening tool to validate nutrition labeling of milk, lactose-free milk, and milk substitutes based on soy and grains. *Dairy Science and Technology*. 92 (2). 109–120.
- Mucci, A., Parenti, F., Righi, V., Schenetti, L. 2013. Citron and lemon under the lens of HR-MAS NMR spectroscopy. *Food Chemistry*. 141 (3). 3167–3176.
- Mulas, G., Roggio, T., Uzzau, S., Anedda, R. 2013. A new magnetic resonance imaging approach for discriminating Sardinian sheep milk cheese made from heat-treated or raw milk. *Journal of Dairy Science*. 96 (12). 7393–7403.
- Otero, L., Préstamo, G. 2009. Effects of pressure processing on strawberry studied by nuclear magnetic resonance. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10 (4). 434–440.

- Pacifico, D., Casciani, L., Ritota, M., Mandolino, G., Onofri, C., Moschella, A., Parisi, B., Cafiero, C., Valentini, M. 2013. NMR-based metabolomics for organic farming traceability of early potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61 (46). 11201–11211.
- Pérez, E. M. S., Iglesias, M. J., Ortiz, F. L., Pérez, I. S., Galera, M. M. 2010. Study of the suitability of HRMAS NMR for metabolic profiling of tomatoes: Application to tissue differentiation and fruit ripening. *Food Chemistry*. 122 (3). 877–887.
- Petrakis, E. A., Cagliani, L. R., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., Consonni, R. 2017. Sudan dyes in adulterated saffron (*Crocus sativus L.*): Identification and quantification by <sup>1</sup>H NMR. *Food Chemistry*. 217. 418–424.
- Piccioni, F., Capitani, D., Zolla, L., Mannina, L. 2009. NMR metabolic profiling of transgenic maize with the Cry1A(b) gene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (14). 6041–6049.
- Prema, D., Pilfold, J. L., Krauchi, J., Church, J. S., Donkor, K. K., Cinel, B. 2013. Rapid determination of total conjugated linoleic acid content in select Canadian cheeses by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61 (41). 9915–9921.
- Ritota, M., Casciani, L., Han, B.-Z., Cozzolino, S., Leita, L., Sequi, P., Valentini, M. 2012. Traceability of Italian garlic (*Allium sativum L.*) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Food Chemistry*. 135 (2). 684–693.
- Ritota, M., Marini, F., Sequi, P., Valentini, M. 2010. Metabolomic characterization of Italian sweet pepper (*Capsicum annum L.*) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (17). 9675–9684.
- Sacco, D., Brescia, M. A., Buccolieri, A., Jambrenghi, A. C. 2005. Geographical origin and breed discrimination of Apulian lamb meat samples by means of analytical and spectroscopic determinations. *Meat Science*. 71 (3). 542–548.
- Santos, A. D. C., Fonseca, F. A., Lião, L. M., Alcantara, G. B., Barison, A. 2015. High-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance in foodstuff analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 73. 10–18.
- Shintu, L., Caldarelli, S., Franke, B. M. 2007. Pre-selection of potential molecular markers for the geographic origin of dried beef by HR-MAS NMR spectroscopy. *Meat Science*. 76 (4). 700–707.
- Shoolery, J. N. 1995. The development of experimental and analytical high resolution NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 28 (1). 37–52.
- Simpson, A. J., Simpson, M. J. 2009. Nuclear magnetic resonance analysis of natural organic matter. In: Senesi, N., Xing, B., Huang P. M. (eds.). *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. p. 589–650. ISBN: 9780470413005.

- Soglia, F., Laghi, L., Canonico, L., Cavani, C., Petracci, M. 2016. Functional property issues in broiler breast meat related to emerging muscle abnormalities. *Food Research International*. 89 (SI). 1071–1076.
- Spraul, M., Schütz, B., Rinke, P., Koswig, S., Humpfer, E., Schäfer, H., Mörtter, M., Fang, F., Marx, U. C., Minoja, A. 2009. NMR-based multi parametric quality control of fruit juices: SGF profiling. *Nutrients*. 1 (2). 148–155.
- Spyros, A., Dais, P. 2012. NMR spectroscopy in food analysis: RSC food analysis monographs. Royal Society of Chemistry. Cambridge. p. 1-343. ISBN: 9781849731751.
- Sudjaroen, Y., Hull, W. E., Erben, G., Würtele, G., Changbumrung, S., Ulrich, C. M., Owen, R. W. 2012. Isolation and characterization of ellagitannins as the major polyphenolic components of Longan (*Dimocarpus longan Lour*) seeds. *Phytochemistry*. 77. 226–237.
- Sundekilde, U. K., Poulsen, N. a, Larsen, L. B., Bertram, H. C. 2013. Nuclear magnetic resonance metabonomics reveals strong association between milk metabolites and somatic cell count in bovine milk. *Journal of dairy science*. 96 (1). 290–299.
- Sundekilde, U. K., Rasmussen, M. K., Young, J. F., Bertram, H. C. 2017. High resolution magic angle spinning NMR spectroscopy reveals that pectoralis muscle dystrophy in chicken is associated with reduced muscle content of anserine and carnosine. *Food Chemistry*. 217. 151–154.
- Thybo, A. K., Szczypiński, P. M., Karlsson, A. H., Dønstrup, S., Stødkilde-Jørgensen, H. S., Andersen, H. J. 2004. Prediction of sensory texture quality attributes of cooked potatoes by NMR-imaging (MRI) of raw potatoes in combination with different image analysis methods. *Journal of Food Engineering*. 61 (1). 91–100.
- Veeman, W. S. 1997. Nuclear magnetic resonance, a simple introduction to the principles and applications. *Geoderma*. 80 (3–4). 225–242.
- Villa, P., Castejón, D., Herraiz, M., Herrera, A. 2013. <sup>1</sup>H-HRMAS NMR study of cold smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) treated with E-beam. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 51 (6). 350–357.
- Wang, X., Fang, C., He, J., Dai, Q., Fang, R., Al, W. E. T. 2017. Comparison of the meat metabolite composition of Linwu and Pekin ducks using 600 MHz <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Poultry Science*. 96 (1). 192–199.
- Yang, W. Z., Hu, Y., Wu, W. Y., Ye, M., Guo, D. A. 2014. Saponins in the genus *Panax L.* (*Araliaceae*): A systematic review of their chemical diversity. *Phytochemistry*. 106. 7–24.
- Yang, Y., Zheng, N., Zhao, X., Zhang, Y., Han, R., Yang, J., Zhao, S., Li, S., Guo, T., Zang, C., Wang, J. 2016. Metabolomic biomarkers identify differences in milk produced by Holstein cows and other minor dairy animals. *Journal of Proteomics*. 136. 174–182.
- Zeng, Q.-H., Lu, C.-L., Zhang, X.-W., Jiang, J.-G. 2015. Isolation and identification of ingredients inducing cancer cell death from the seeds of *Alpinia galanga*, a Chinese spice. *Food & Function*. 6 (2). 431–443.

## 6 Seznam použitých symbolů a zkratek

$\Delta E$	rozdíl energie
<b>ADC</b>	část spektrometru převádějící analogový signál na digitální
<b>B<sub>0</sub></b>	indukce magnetického pole
<b>BAL</b>	biologicky aktivní látky
<b>BSE</b>	bovinní spongiformní encefalopatie – „nemoc šílených krav“
<b>CD<sub>3</sub>-SO-CD<sub>3</sub></b>	dimethylsulfoxid
<b>CdCl<sub>3</sub></b>	chloroform-d (deuterovaný)
<b>CLA</b>	konjugovaná kyselina linolová
<b>CW</b>	continuous wave
<b>D<sub>2</sub>O</b>	těžká voda
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	dimethylsulfoxid
<b>FID</b>	volně doznívající indukce
<b>FT</b>	Fourierova transformace
<b>GABA</b>	kyselina gama-aminomáselná
<b>h</b>	Planckova konstanta
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>HR-MAS NMR</b>	high resolution magic angle spinning
<b>HR-NMR</b>	high resolution NMR
<b>CHOP</b>	chráněné označení původu
<b>CHZO</b>	chráněné zeměpisné označení
<b>COSY</b>	homokorelované <sup>1</sup> H – <sup>1</sup> H spektrum
<b>I</b>	spinové kvantové číslo
<b>J</b>	interakční konstanta
<b>K</b>	Kelvinova stupnice
<b>LLE</b>	liquid-liquid – extrakce kapalina-kapalina
<b>LR-NMR</b>	low resolution NMR
<b>m</b>	magnetické kvantové číslo
<b>MAE</b>	microwave assisted extraction – extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem
<b>MRI</b>	zobrazovací metoda magnetické rezonance
<b>NMR</b>	nukleární magnetická rezonance
<b>p</b>	vnitřní moment hybnosti

<b>PCA</b>	analýza hlavních komponent
<b>PDO</b>	Protected Designation of Origin
<b>PGI</b>	Protected Geographical Indication
<b>PLE</b>	pressurised liquid extraction – (pře)tlačková kapalinová extrakce
<b>PSB</b>	počet somatických buněk
<b>SLE</b>	supercritical liquid extraction – superkritická kapalinová extrakce
<b>SNIF-NMR</b>	site-specific natural isotope fractionation
<b>SPE</b>	solid-phase extraction – extrakce pevnou fází
<b>THF</b>	tetrahydrofuran
<b>TLC</b>	tenkovrstvá chromatografie
<b>TMS</b>	tetramethylsilan
<b>v</b>	radiofrekvenční vlna
<b><math>\nu_0</math></b>	precesní pohyb o Larmorově frekvenci
<b><math>\gamma</math></b>	gyromagnetický poměr
<b><math>\delta</math></b>	delta – stupnice chemického posunu
<b><math>\mu</math></b>	magnetický moment
<b><math>\sigma</math></b>	stínící konstanta