

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ METODY LC/MS K ANALÝZE VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH
FYZIOLOGICKY AKTIVNÍCH
LÁTEK

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

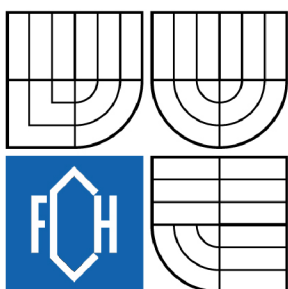
Bc. MARIE TRČKOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ METODY LC/MS K ANALÝZE VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH FYZIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

USE OF LC/MS TECHNIQUE TO ANALYSIS OF SOME PHYSIOLOGICALLY ACTIVE NATURAL
COMPOUNDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

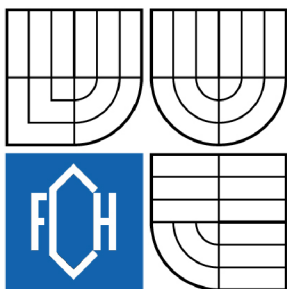
Bc. MARIE TRČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. RADKA KOČÍ, Ph.D.

BRNO 2008



Zadání diplomové práce

| | | |
|-----------------------------|--|----------------------------------|
| Číslo diplomové práce | FCH-DIP0231/2007 | Akademický rok: 2007/2008 |
| Ústav | Ústav chemie potravin a biotechnologií | |
| Student(ka) | Trčková Marie Bc. | |
| Studijní program | Chemie a technologie potravin (N2901) | |
| Studijní obor | Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010) | |
| Vedoucí diplomové práce | Ing. Radka Kočí, Ph.D. | |
| Konzultanti diplomové práce | | |

Název diplomové práce:

Využití metody LC/MS k analýze vybraných přírodních fyziologicky aktivních látek

Zadání diplomové práce:

- Zpracování literární rešerše zaměřené na možnosti analýzy přírodních látek s využitím hmotnostní detekce - kombinované instrumentální techniky GC/MS, CZE/MS a zejména LC/MS a jejich aplikace.
- Optimalizace metod pro stanovení vybraných přírodních látek pomocí LC/MS včetně úpravy reálných vzorků před vlastní analýzou.
- Stanovení vybraných metabolitů izolovaných z biologických vzorků technikou HPLC/ESI/MS v uspořádání off-line i on-line, využití nastavení MSn.
- Srovnání výsledků získaných metodou HPLC/ESI/MS s analýzami pomocí HPLC/UV-VIS, popř. dalšími instrumentálními metodami.

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Marie Trčková
student(ka)

Ing. Radka Kočí, Ph.D.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená práce je zaměřena na aplikaci kombinované instrumentální metody RP-HPLC/ESI-MS a její možnosti využití v analýze vybraných skupin přírodních fyziologicky aktivních látek sledovaných v běžných a hojně konzumovaných potravinách. Dále pak byly ve vzorcích identifikovány některé typy sloučenin, pro které nebyly dostupné standardní preparáty. Experimentální část zahrnuje analýzu 11 vybraných standardů ze skupiny polyfenolických a karotenoidních sloučenin, u kterých byly určeny kvazi-molekulární ionty a charakteristické fragmenty metodou jednostupňové i tandemové hmotnostní detekce. Byla provedena optimalizace podmínek chromatografické separace pro obě skupiny standardů a následně byly analyzovány komponenty reálných vzorků (izolace pomocí SPE) metodou on-line LC/MS. Byla provedena optimalizace podmínek chromatografické separace pro obě skupiny standardů a následně byly analyzovány komponenty reálných vzorků (izolace pomocí SPE) metodou on-line LC/MS. Podle MS spekter byly nejhojněji zastoupené ve vybraných vzorcích polyfenolické kyseliny (především gallová a chlorogenová), ve studovaných 16 druzích potravin a poživatin byl jejich obsah nejvyšší v pražené zrnkové kávě (14 g/100 g). Naopak jako komplexní zdroj flavonoidů (stanoveno více než 8 komponent ve vzorku) byla určena dýňová semena (2 g/100 g), ze zeleniny mrkev (1,4 g/100 g) a z ovoce především jablka (2 g/100 g) a pomeranče (0,5 g/100 g). Obdobně byly potraviny testovány i na obsah karotenoidů, které však byly v MS spektrech daleko méně patrné. Kromě tradiční mrkve fungují jako nezanedbatelný zdroj citrusové plody (~500 mg/100 g) nebo červené brambory (2 mg/100 g). Ze studie je patrné, že metoda HPLC/ESI-MS je poměrně výhodnou koncovkou pro stanovení velké řady polyfenolických sloučenin, zatímco k analýze karotenoidů by bylo vhodnější využít jiného typu ionizace.

ABSTRACT

Presented work is focused on application of combined instrumental method RP-HPLC/ESI-MS in analysis of several groups of natural compounds with positive physiological activities. Especially some antioxidants were studied in commonly and abundantly consumed food. Moreover some other substances than standard compounds were observed in complex diets. Experimental part involves analysis of 11 standards of phenolic and carotenoid compounds. Using MS full scan and MS/MS full scan experiment quasi-molecular ions and/or typical product ions were determined. Conditions of chromatographic separation of phenolics as well as carotenoids were optimized. Compounds isolated using SPE were analysed sequentially by on-line LC/MS. Acids gallic and chlorogenic were found as principal phenolics in 16 analysed samples, its highest amount was observed in coffee (14 g/100 g). Whereas complex source of flavonoids (more than 8 compounds were identified) was found in gourd seeds (2 g/100 g), carrot (1,4 mg/100 g), apples (2 g/100 g) and/or oranges (0,5 mg/100 g). MS responses of carotenoids in spectra were substantially lower than in phenolic analysis. Carrot was traditionally rich on carotenoid amount, but also citrus fruit are indispensable source of carotenoids (~500 mg/100 g) as well as red potatoes (2 mg/100 g). In conclusion the HPLC/ESI-MS method is comparatively advantageous in phenolic analysis, while another type of ionisation would be used in case of carotenoid compound.

KLÍČOVÁ SLOVA: kapalinná chromatografie, hmotnostní spektrometrie, LC/MS, polyfenoly, karotenoidy

KEYWORDS: liquid chromatography, mass spectrometry, LC/MS, phenolics, carotenoids

TRČKOVÁ, M. Využití metody LC/MS k analýze vybraných přírodních fyziologicky aktivních látek. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 100 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Radka Kočí, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Mé poděkování patří především paní Ing. Radce Kočí, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a pomoc při řešení praktické části práce a za čas strávený nad opravami mnoha dílčích verzí studie. Poděkovat chci také paní doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za výborné technické zázemí, bez kterého by nebylo dosaženo požadovaných výsledků. V neposlední řadě patří můj dík také, prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. a paní Ing. Ludmile Mravcové za poskytnuté materiálové vybavení, bez něhož by byla realizace diplomové práce obtížná.

Obsah

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Úvod | 8 |
| 2 | Teoretická část | 9 |
| 2.1 | Metody analýzy přírodních biologicky aktivních látek | 9 |
| 2.1.1 | Metody izolace fytochemických látek a příprava vzorku | 9 |
| 2.1.1.1 | Izolace vybraných přírodních látek | 9 |
| 2.1.1.2 | Využití metody SPE pro izolaci přírodních látek | 10 |
| 2.1.1.3 | Mikroextrakce SPME | 11 |
| 2.1.1.4 | Extrakce disperzní tuhou fází | 11 |
| 2.1.2 | Kapalinová chromatografie | 11 |
| 2.1.2.1 | Instrumentace | 11 |
| 2.1.2.2 | Možnosti detekce vzorků v HPLC | 12 |
| 2.1.3 | Plynová chromatografie | 13 |
| 2.1.3.1 | Základní prvky přístrojového vybavení pro plynovou chromatografii | 13 |
| 2.1.3.2 | Plynová chromatografie v praxi | 14 |
| 2.1.4 | Kapilární zónová elektroforéza | 14 |
| 2.1.5 | Hmotnostní spektrometrie | 14 |
| 2.1.5.1 | Vstup do detektoru | 15 |
| 2.1.5.2 | Iontový zdroj a nejběžnější ionizační techniky | 15 |
| 2.1.5.3 | Typy hmotnostních analyzátorů | 19 |
| 2.1.5.4 | Detektorové systémy | 21 |
| 2.1.6 | Spojení hmotnostní spektrometrie s vybranými typy rozdělovacích technik, spektrálních metod | 21 |
| 2.1.6.1 | Kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie (LC/MS) | 21 |
| 2.1.6.2 | Tandemová hmotnostní spektrometrie v kombinaci s kapalinovou chromatografií (LC/MS/MS) | 23 |
| 2.1.6.3 | Plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie (GC/MS) | 23 |
| 2.1.6.4 | Kapilární elektroforéza – hmotnostní spektrometrie (CZE/MS) | 24 |
| 2.1.6.5 | Spojení ICP – hmotnostní spektrometrie (ICP/MS) | 24 |
| 2.1.7 | Využití kombinovaných systémů s MS detekcí | 24 |
| 2.1.7.1 | Aplikace metody LC/MS | 24 |
| 2.1.7.2 | Analytické využití spojení GC/MS | 25 |
| 2.1.7.3 | CZE/MS – aplikace | 25 |
| 2.2 | Charakterizace vybraných přírodních fyziologicky aktivních látek | 25 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.2.1 | Flavonoidy..... | 26 |
| 2.2.2 | Ostatní polyfenolické sloučeniny | 27 |
| 2.2.3 | Karotenoidy..... | 27 |
| 2.2.4 | Zdroje fenolických látek..... | 29 |
| 2.2.4.1 | Ovoce a zelenina | 29 |
| 2.2.4.2 | Ořechy, semena, oleje | 30 |
| 2.2.4.3 | Mok století -pivo | 30 |
| 2.2.4.4 | Čaj a med patří neodmyslitelně k sobě..... | 31 |
| 2.2.5 | Zdroje karotenoidních sloučenin..... | 32 |
| 2.2.5.1 | Zelenina..... | 32 |
| 2.2.5.2 | Ovoce | 32 |
| 2.2.5.3 | Mikrobiální producenti karotenoidů..... | 32 |
| 2.3 | LC/MS v analýze vybraných fyziologicky aktivních látek..... | 32 |
| 2.3.1 | Identifikace a strukturální charakterizace pomocí fragmentace mateřského iontu | 33 |
| 2.3.1.1 | Fragmentace v kladném módu | 34 |
| 2.3.1.2 | Fragmentace v záporném módu | 35 |
| 3 | Experimentální část..... | 36 |
| 3.1 | Použité chemikálie, přístroje a pomůcky | 36 |
| 3.1.1 | Chemikálie | 36 |
| 3.1.2 | Přístroje a pomůcky..... | 36 |
| 3.2 | Kalibrace a optimalizace (ladění) hmotnostního spektrometru..... | 37 |
| 3.2.1 | Kalibrace MS detektoru | 37 |
| 3.2.2 | Ladění přístroje komerčním standardem – reserpinem | 38 |
| 3.2.3 | Optimalizace parametrů MS detekce pro vybrané standardní sloučeniny | 38 |
| 3.2.3.1 | Polyfenolické sloučeniny – kvercetin | 38 |
| 3.2.3.2 | Chromatografické analýzy v záporném módu – ladící standard kyselina chlorogenová | 39 |
| 3.2.3.3 | Karotenoidy | 39 |
| 3.3 | Analýza standardních látek | 40 |
| 3.3.1 | Polyfenolické sloučeniny | 40 |
| 3.3.1.1 | Kompletní hmotnostní spektrum kvazi-molekulárních iontů (mód MS full scan) | 40 |
| 3.3.1.2 | Tandemová hmotnostní spektrometrie (režim MS ⁿ full scan)..... | 40 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.3.1.3 | Optimalizace složení mobilní fáze pro chromatografickou separaci polyfenolů | 41 |
| 3.3.1.4 | Gradientová eluce polyfenolických sloučenin | 42 |
| 3.3.1.5 | Výběr chromatografické kolony pro separaci směsí standardních látek | 43 |
| 3.3.1.6 | Off-line analýza | 43 |
| 3.3.1.7 | Příprava kalibračních křivek standardních preparátů | 43 |
| 3.3.2 | Karotenoidní látky | 44 |
| 3.3.2.1 | Kompletní hmotnostní spektrum kvasi-molekulárních iontů (mód MS full scan) | 44 |
| 3.3.2.2 | Tandemová hmotnostní spektrometrie (režim MS ⁿ full scan) | 44 |
| 3.3.2.3 | Optimalizace složení mobilní fáze vhodné pro separaci karotenoidů | 45 |
| 3.3.2.4 | Příprava kalibračních křivek standardních preparátů | 45 |
| 3.4 | Optimalizace izolačního postupu | 45 |
| 3.4.1 | Látky polyfenolického typu | 45 |
| 3.4.1.1 | Optimalizace SPE extrakce pomocí standardní látky | 45 |
| 3.4.1.2 | Optimalizace typu rozpouštědla a množství reálného vzorku aplikovaného na extrakční kolonku | 46 |
| 3.4.1.3 | Kombinace množství kyseliny chlorovodíkové a ovocné šťávy aplikované na SPE | 47 |
| 3.4.2 | Látky karotenoidního typu | 48 |
| 3.4.2.1 | Optimalizace SPE extrakce pomocí standardu | 48 |
| 3.4.2.2 | Optimalizace množství vzorku aplikovaného na extrakční kolonu | 48 |
| 3.5 | Stanovení obsahu polyfenolických a karotenoidních látek v potravinách | 49 |
| 3.5.1 | Izolace polyfenolických látek z reálné matrice a jejich analýza metodou HPLC/ESI-MS | 49 |
| 3.5.2 | SPE extrakce karotenoidů z reálné matrice | 50 |
| 4 | Výsledky A Diskuze | 52 |
| 4.1 | Analýza standardních látek – mód MS full scan a MS ⁿ full scan | 52 |
| 4.2 | Optimalizace chromatografické separace pro flavonoidní sloučeniny | 55 |
| 4.2.1 | Změna složení mobilní fáze | 55 |
| 4.2.1.1 | Optimalizace poměru rozpouštědel v mobilní fázi | 55 |
| 4.2.1.2 | Optimalizace pH mobilní fáze | 56 |
| 4.2.2 | Gradientová eluce standardních látek | 57 |
| 4.2.3 | Výběr chromatografické kolony | 58 |
| 4.3 | Konfrontace off-line a on-line separace | 58 |

| | | |
|---------|---|--|
| 4.3.1 | Off-line separace | 58 |
| 4.3.2 | On-line separace sloučenin..... | 60 |
| 4.4 | Chromatografická separace karotenoidních látek | 63 |
| 4.4.1 | Složení mobilní fáze..... | 63 |
| 4.5 | Kalibrační křivky standardních látek polyfenolů a karotenoidů a stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti | 63 |
| 4.6 | Optimalizace SPE extrakce | 64 |
| 4.6.1 | Polyfenolické sloučeniny | 64 |
| 4.6.1.1 | Standardní sloučenina - kvercetin | 64 |
| 4.6.1.2 | Optimalizace izolace polyfenolických látek z reálných vzorků..... | 65 |
| 4.6.2 | Karotenoidy..... | 67 |
| 4.6.2.1 | β -karoten – standard pro optimalizace SPE karotenoidů | 67 |
| 4.6.2.2 | Optimalizace izolace karotenoidů z mrkve – zástupce reálných vzorků . | 68 |
| 4.7 | Analýza obsahu polyfenolů ve vybraných potravinách a poživatinách | 69 |
| 4.7.1 | Identifikace sloučenin pomocí standardů..... | 69 |
| 4.7.1.1 | Polyfenolické kyseliny | Chyba! Záložka není definována. |
| 4.7.1.2 | Zástupci katechinů – epikatechin a katechin..... | 78 |
| 4.7.1.3 | Diglykosid rutin..... | 79 |
| 4.7.1.4 | Flavonoidy identifikované ve většině analyzovaných vzorků | 80 |
| 4.7.1.5 | Minoritní flavonoidy | 83 |
| 4.7.2 | Ostatní polyfenoly | 84 |
| 4.7.2.1 | Citrusy | 84 |
| 4.7.2.2 | Zelenina..... | 84 |
| 4.7.2.3 | Semena a káva..... | 84 |
| 4.7.2.4 | Pivo..... | 85 |
| 4.7.3 | Komplexní zdroj polyfenolických sloučenin | 85 |
| 4.7.3.1 | Celkový obsah flavonoidů..... | 85 |
| 4.8 | Analýza obsahu karotenoidů | 86 |
| 4.8.1.1 | Zelenina..... | 88 |
| 4.8.1.2 | Ovoce | 88 |
| 5 | Závěr..... | 89 |
| 6 | Seznam použitých zdrojů | 91 |
| 7 | Seznam použitých zkratk a symbolů | 96 |

| | | |
|---|--------------------|----|
| 8 | Seznam příloh..... | 98 |
| 9 | Přílohy | 99 |

1 ÚVOD

Každý člověk potřebuje ke svému životu tři základní faktory: kyslík, vodu a potravu. Potraviny, které člověk přijímá, by neměly být jednostranné, ale měly by zahrnovat široké spektrum aminokyselin, bílkovin, nenasycených mastných kyselin, sacharidů ale i nejrůznější biologicky aktivní látky jako jsou například stopové prvky, vitamíny, minerály a v neposlední řadě také antioxidační látky. K tomu, aby populace mohla zmíněný požadavek úspěšně plnit, je zapotřebí obsah jednotlivých složek v potravinách dobře znát. Díky rostoucím možnostem moderních instrumentačních technologií je dnes možné identifikovat i stopová množství nejen zdraví prospěšných látek, ale také monitorovat obsah toxických sloučenin.

Jednou z nejžádanějších moderních technologií vhodnou pro identifikaci nutričně významných látek je kapalinová chromatografie. Je to vysoce selektivní metoda s velkým potenciálem a téměř nevyčerpatelnými možnostmi separace komponent v komplexních matricích. Ve spojení s citlivou, spolehlivou a jednoznačně definující detekční technikou dává možnosti stanovení jakékoliv netěkavé sloučeniny či prvku na základě vhodně zvoleného parametru identifikace.

V současné době se za nejhodnotnější typ detekce ve spojení s kapalinovou chromatografií považuje identifikace sloučenin na základě jejich hmotností. Charakteristickou vlastností hmotnostní detekce je vysoká citlivost a možnost stanovení velkého počtu látek v jednom kroku. Oproti ostatním typům detekčních technik spočívají výhody hmotnostní spektrometrie v její univerzálnosti, která umožňuje rozeznat prakticky všechny složky v komplexním vzorku. Po překonání prvotních technologických problémů při pokusech o propojení kapalinového chromatografu s hmotnostním detektorem tak byla nalazena technologie, která spojuje prvky dokonalé separace komponent a přesné identifikace jednotlivých eluovaných složek.

Předložená diplomová práce je zaměřena na analýzu vybraných přírodních složek komplexního biologického materiálu s využitím metody HPLC/ESI-MS(IT). Kromě důsledné řešerše o kombinovaných instrumentálních technikách, které využívají hmotnostní detekci, bude v práci snaha o stanovení optimálních podmínek pro izolaci a analýzu určitých skupin fyziologicky aktivních látek vyskytujících se v běžných potravinových matricích jako jsou ovoce, zelenina a vybrané druhy dalších potravin a pochutin. V rámci práce budou využity techniky off-line i on-line spojení pro LC/MS analýzu, přičemž složky vzorků budou determinovány jak jednostupňovou tak tandemovou hmotnostní spektrometrií. Pro snadnější orientaci bude před hmotnostní detektor předřazen fotometr s volitelnou vlnovou délkou v UV-VIS oblasti.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Metody analýzy přírodních biologicky aktivních látek

V současné době se mnoho vědeckých studií zaměřuje na analýzu obsahu fytochemických látek v potravinách. Tyto látky mohou lidstvu poskytovat ochranu proti mnoha různým onemocněním (např. rakovina, arteroskleróza), které jsou z velké části způsobeny environmentálními podmínkami zahrnujícími např. stav ovzduší nebo špatné potravinové návyky. [1, 2, 3]

Biologicky aktivní látky se v rostlinné matrici vyskytují ve velmi složitých směsích, a proto k jejich izolaci nelze použít žádná univerzální metoda. Nejdůležitějším hlediskem je charakter použité matrice a vlastnosti izolované látky. [4, 5]

Pro kvalitativní i kvantitativní analýzu přírodních látek jsou využívány separační metody. Mezi základní techniky patří chromatografické metody, kde je dělení směsi přírodních komponent založeno na principu opakovaného vytváření rovnovážných stavů na základě různých fyzikálně-chemických interakcí mezi složkami mobilní a stacionární fáze. Z makroskopického hlediska může jít o adsorpci, rozpouštění, chemisorpci, srážení, tvorbu komplexů či síťový efekt, přičemž pro chromatografické separace je charakteristické, že výsledné interakce jsou kombinací uvedených procesů. [6]

Podle uspořádání systému se jedná o chromatografické metody kolonové nebo plošné. K identifikaci přírodních látek se využívá obou uspořádání. Pro rychlou kvalitativní analýzu je výhodnější metoda plošného uspořádání (např. tenkovrstevná chromatografie - TLC nebo papírová chromatografie - PC), naopak k důkladnější separaci a kvantitativní analýze je lépe zvolit některou z technik kolonové chromatografie (např. plynová chromatografie – GC, kapalinová chromatografie - LC nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC). Výhodou kolonových metod je možnost identifikace složek vzorku podle různých fyzikálních principů (např. refraktometricky, spektrofotometricky, hmotnostní detekcí apod.). [7]

2.1.1 Metody izolace fytochemických látek a příprava vzorku

2.1.1.1 Izolace vybraných přírodních látek

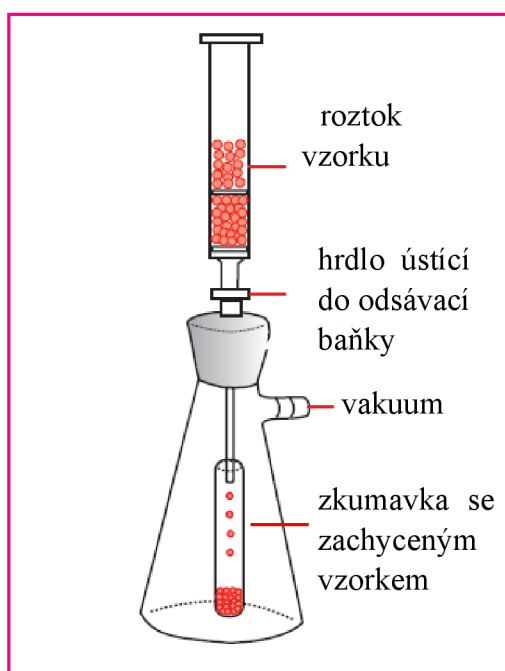
Pro izolaci přírodních látek z matric pevného složení je nutné vzorek nejprve zhomogenizovat. Příkladem může být homogenizace opakovaným zmrazováním a rozmrazováním vzorku či pouhá mechanická dezintegrace se skleněnými kuličkami. Velmi často se pro tyto účely používá rozpouštědlové extrakce. Pro uvolnění karotenoidních látek je vhodným extrahovadlem aceton nebo po zmýdelnění vzorku mohou být použita i nepolární rozpouštědla (diethylether, hexan, petrolether). Polární látky lze z matric uvolňovat do vody, kyseliny chlorovodíkové či polárních rozpouštědel. Primární extrakční krok je s výhodou následován extrakcí pevnou fází s vynikajícími purifikačními účinky. [8, 9, 5]

Při zpracování kapalných materiálů je nutné vzorky filtrací a centrifugací zbavit pevného podílu. V závislosti na následné detekční metodě vzorek může, ale nemusí být podroben další úpravě. Buď je přímo takto vpraven do separačního systému nebo mohou být žádané sloučeniny purifikovány a zakoncentrovány různými typy extrakčních metod. [5]

2.1.1.2 Využití metody SPE pro izolaci přírodních látek

Extrakce pevnou fází (solid-phase extraction, SPE) je velmi výkonná a rychlá technika pro selektivní přípravu vzorků. Metoda slouží především k velmi dobrému přečištění a zakoncentrování analytu z roztoků a nejrůznějších extraktů. Extrakce má své uplatnění v environmentální, farmaceutické, potravinářské a biomedicínské oblasti. [10, 5, 11]

Podstatou této extrakční metody je zachycení molekul látky na částech tuhého sorbentu v důsledku mezimolekulových interakcí. Jedná se tedy o chemickou filtraci, jelikož jsou využívány chemické vlastnosti molekul. Metoda je z hlediska instrumentace velmi jednoduchá. Je založena na použití jednorázových extrakčních kolonek o různých velikostech a náplních (obr. 1). [10]



Obr. 1: Princip zařízení pro SPE [12]

SPE kolony jsou většinou naplněny sorbentem na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. Na silanolové skupiny částic jsou chemicky navazovány nejrůznější skupiny, které rozhodují o vlastnostech sorbentu. Při volbě vhodné náplně je uvažována podstata analytu, požadovaný stupeň čistoty, vlastností matrice a finální analytický postup. Pro stacionární fáze nepolárního charakteru jsou typické hydrofobní vlastnosti, a proto se využívají pro extrakci nepolárních a středně polárních sloučenin. Lze sem zařadit kolony s označením C18 (funkční skupina oktadecyl), C8 (funkční skupina oktyl) či CH (funkční skupina cyklohexyl). Naopak sorbent na polární bázi je selektivní pro polární sloučeniny. Kolony s těmito vlastnostmi se vyznačují přítomností například silanolových, aminopropylových či kyanopropylových funkčních skupin. [10, 13]

Po aplikaci vzorku na kolonku s nepolární náplní (např. C18) jsou zachyceny lipofilní látky (např. karotenoidy). Ty lze po promytí eluovat nepolárními rozpouštědly (benzín, hexan). Látky již mírně polárního charakteru, jako jsou např. polyfenolické sloučeniny, z větší části projdou skrz kolonu. Naopak při použití kolonky se sorbentem vázaným s polárnější skupinou, lze polyfenoly purifikovat a zakoncentrovat. [5]

2.1.1.3 Mikroextrakce SPME

Jednou z modifikací SPE je mikroextrakce pevnou fází (solid-phase micro-extraction, SPME). Oproti klasické extrakci pevnou fází je potřeba velmi malé množství organických rozpouštědel, ale na druhou stranu je časově náročná zpětná eluce sloučenin (přibližně 60 minut). [5]

K extrakci analytu z kapalných nebo plyných vzorků či z prostoru nad kapalným vzorkem využívá SPME žhaveného křemenného vlákna pokrytého polyakrylátovou či polydimethylsiloxanovou stacionární fází. Obecně je metoda kombinována s plynovou chromatografií pro extrakci těkavých organických sloučenin z ovzduší, potravin nebo biologických vzorků. SPME může být spojeno i s chromatografií kapalinovou pro analýzu netěkavých a/nebo polárních sloučenin, ale v praxi je toto spojení většinou nahrazováno jinými technikami. [5]

2.1.1.4 Extrakce disperzní tuhou fází

Extrakce disperzní tuhou fází (matrix solid-phase dispersion, MSPD) je proces simultánního rozrušení, izolace a přečištění analytu z homogenně disperzní směsi. Jsou používány sorbenty typu C18 nebo C8 na pevném základě. V jednom kroku probíhá zároveň extrakční i purifikační fáze. [5, 14]

MSPD je obvykle uplatňována v identifikaci škodlivin a pesticidů v nejrůznějších potravinových maticích (například v ovoci, zelenině či nápojích). [5, 14]

2.1.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je využívána k separaci netěkavých nebo málo těkavých a termicky labilních látek. Je založena na různých kombinacích pevné nebo kapalné stacionární fáze a aktivní kapalně mobilní fáze. Podle mechanismu separace jsou používány rozmanité směsi rozpouštědel s různou polaritou. Změna vlastností mobilní fáze je v systému s danou stacionární fází hlavním faktorem ovlivňujícím retenci jednotlivých složek směsi a tím i jejich vzájemné rozdělení. [6] Částečně se zde uplatňuje vliv teploty, jejímž zvýšením se u složitých směsí většinou dosáhne lepšího rozlišení zón jednotlivých složek. [6]

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) využívá kolony s vysoce homogenní stacionární fází a velmi malým průměrem částic (3-10 μm), která umožňuje rychlou separaci složitých směsí s vysokým rozlišením zón. [6]

2.1.2.1 Instrumentace

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří mezi uzavřené systémy. Pohyb mobilní fáze zajišťuje čerpadlo konstruované z inertního materiálu s regulovatelným průtokem do tlaků 30-50 MPa. Vnitřní objem čerpadla by měl být co nejmenší, aby umožnil rychlou výměnu mobilní fáze převážně při využití gradientové eluce. Zařízení pro dávkování vzorku na kolonu musí být konstruováno tak, aby bylo elimonováno rozšiřování elučních zón. [6, 15]

Volba vhodné kolony má ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii rozhodující význam, jelikož výsledek analýzy je závislý na kvalitě kolony a její náplně. Obvykle jsou využívány kolony z kvalitní antikorozi oceli s leštěným vnitřním povrchem nebo trubice z tlustostěnného borosilikátového skla. Rozměry kolon jsou závislé na velikosti částic náplně a na účelu použití. Pro analýzu potravin se nejvíce používají analytické kolony s vnitřním průměrem 2-6 mm a délkou 5-30 cm o velikosti částic náplně 3-10 μm . S rostoucí délkou

kolony se zvyšuje účinnost, ale také doba separace a pracovní tlak. [15] Dlouhé kolony jsou využívány převážně v preparativní chromatografii s cílem izolovat rozdělené látky po předchozí separaci a tam, kde je potřeba zpracovat co největší množství vzorku. Při práci s krátkými kolonami (5-6 cm) se značně urychluje analýza, snižuje se spotřeba mobilní fáze, ale pro dobrou separaci je nutná velikost částic stacionární fáze 3 μm a méně. Mikrokolony (průměr 2 μm) se vyznačují sníženou spotřebou mobilní fáze i vzorku a zvýšenou citlivostí detekce. [15]

Účinnost kolonové kapalinové chromatografie je významně závislá na velikosti a typu náplně kolony. Materiály používané pro plnění kolon jsou z větší části založeny na anorganickém nosiči (silikagel, oxid hlinitý, pórovité sklo) s chemicky navázanou stacionární fází. Střední až slabě polární charakter náplně kolony lze získat modifikací silikagelu silanizačními činidly (alkylchlorsilany nebo alkoxyasilany) a tyto kolony lze využít v systému s normálními i s reverzními fázemi [15] Do skupiny polárnějších náplní patří fáze s hydroxylovými skupinami a s primárními, sekundárními či terciárními aminoskupinami, které mohou vytvářet vodíkové vazby s fenoly, cukry, alkoholy a některými dalšími podobnými látkami. Za vhodně zvolených podmínek mohou aminové fáze působit i jako slabý měnič iontů. [15]

2.1.2.2 Možnosti detekce vzorků v HPLC

Nejvíce používanou detekční technikou ve spojení s kapalinovou chromatografií jsou spektrofotometrické detektory. Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony, a to buď při jedné nastavené vlnové délce u jednoduchých přístrojů (rtuťová výbojka 254 nm) nebo dokáží pomocí diodového pole proměřit celé absorpční spektrum ve vybrané oblasti vlnových délek. Pro látky polyfenolického charakteru jsou typická dvě absorpční maxima – první je mezi 240 – 285 nm a druhé v oblasti 300 – 550 nm. [10, 5]

Další možnost identifikace sloučenin představuje refraktometrická detekce. Metoda je založena na měření rozdílu indexu lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Detektor sice nevyniká extrémní citlivostí, ale za to je velmi univerzální. [5]

Elektrochemický detektor je používán v případech, kdy jsou v roztoku přítomny oxidovatelné nebo redukovatelné látky. Detektory tohoto typu mají sice nižší citlivost, avšak v jistých případech jsou i přes to používány (například zjištění antioxidační aktivity fenolických sloučenin). [5, 10]

Hmotnostní spektrometry představují další možnost charakterizace eluentu vycházejícího z chromatografické kolony (obr. 2). Je to technika, která převádí analyt na ionizovanou plynnou formu a vzniklé ionty separuje na základě podílu jejich hmotnosti a náboje. [10]



Obr. 2: Spojení LC/MS [16].

2.1.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je metoda zajišťující vysoké rozlišení a nízké detekční limity pro analyzované látky. Tato technika je však laboratorně dosti náročná vzhledem ke zvýšení těkavosti a termické stability sloučenin (potřeba trimethylsilyletherových derivátů). [5]

Plynová chromatografie využívá k dělení látek systém s plynnou mobilní fází, složky vzorku se pak v takovémto uspořádání dělí po převedení do plynné fáze. Metoda je používána pro separaci složité směsi plynů a těkavých látek s bodem varu menším než 400°C. [6]

2.1.3.1 Základní prvky přístrojového vybavení pro plynovou chromatografii

Plynová chromatografie nejčastěji využívá kolonového uspořádání a jednorázového nástřiku na kolonu. Jednotlivé složky vzorku jsou separovány na základě rozdílných interakcí se stacionární fází a jsou postupně eluovány inertním nosným plynem (vodík, dusík, helium nebo argon). [6] Nosný plyn sám neinteraguje se směsí ani se stacionární fází a slouží pouze k transportu složek kolonou. [6, 17]

Pro plynovou chromatografii byly vyvinuty dva základní typy kolon, a to náplňové a kapilární. Materiálem pro výrobu náplňových kolon je obvykle kov (hliník, nerez, ocel, měď, nikl) nebo sklo. Vnitřní průměr kolon bývá 2-6 mm a délka 1-5 m. Kolony jsou plněny různými adsorbenty (silikagel, aktivní uhlí, kopolymery styrenu nebo divinylbenzenu) zakotvenými na nereaktivním nosiči (křemelina, chromosorby, celit, chromatony). Kolony se vyznačují všeobecně horším rozlišením, proto se využívají převážně k preparativním účelům nebo pro separaci nízkovroucích plynů. [6]

Mezi materiály používané pro výrobu kapilárních kolon patří sklo, křemen, plast (polyamidy, teflon, polyestery) či kov (nerez, ocel, nikl, hliník, měď). Vnitřní průměr kapilárních kolon bývá 100 – 700 μm a délka 15 – 100 metrů. Vnitřní strana kapiláry může být stacionární fází buď potažena (síla 0,1 – 10 μm) nebo s ní může být vyplněn celý objem kapiláry. Podle typu stacionární fáze se rozlišuje několik typů kolon. Patří sem kolony s označením WCOT (wall-coated open tubular column - kolony s kapalnou stacionární fází), kolony SCOT (Support-coated open column - se zakotvenou kapalnou stacionární fází), kolony PLOT (porous-layer open tubular column - s vrstvou pevného aktivního sorbentu na vnitřní straně kapiláry). [6, 17]

Dávkování vzorku je vedeno buď přímo nad ústí kolony na konci injektoru (vhodné především pro náplňové kolony) nebo přímo na kolonu (použitelné pro kapilární kolony). [6]

Vlastnosti ideálního detektoru pro plynovou chromatografii jsou následující – vysoká citlivost, dobrá stabilita a reprodukovatelnost signálu, nízký šum, rychlá odezva nezávislá na rychlosti toku mobilní fáze, teplotní rozsah minimálně do 400 °C a obdobná odezva pro všechny analyzované vzorky. [6]. V zásadě se rozlišují dva základní typy. Detektory koncentračně závislé se vyznačují závislostí signálu na koncentraci složky vstupující do detektoru. Druhým typem jsou detektory hmotnostně závislé, kde je signál funkcí množství složky vstupující do detektoru. Detektory jsou dále zaměřené buď na univerzální analýzu širokého spektra sloučenin nebo na selektivní detekci látek specifických vlastností. Mezi univerzální typ detektoru vhodný pro plynovou chromatografii patří tepelně vodivostní katarometr (TCD) nebo plamenový ionizační detektor (FID) určený pro detekci organických sloučenin. [6]

2.1.3.2 Plynová chromatografie v praxi

Pro dělení směsí plynu, jako jsou například inertní plyny, methan, oxid uhelnatý, kyslík, či plynné uhlovodíky do C5, je vhodný především adsorpční typ plynové chromatografie. Pro separaci těkavých organických látek do 200 °C je univerzální metodou rozdělovací plynová chromatografie v temperovaných kolonách se zakotvenou kapalinou s možností gradientového nárůstu teploty. [6]

V analýze nětěkavých přírodních látek není GC tak populární jako kapalinová chromatografie kvůli náročnosti separačních a purifikačních kroků. Pro analýzu je využíváno především uspořádání s kapilárními kolonami a hmotnostní detekcí. [6]

2.1.4 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza patří mezi elektromigrační analytické metody, které jsou obecně založeny na orientovaném pohybu elektricky nabitých částic (iontů, koloidních částic) v roztoku. Orientovaný pohyb je navozován stejnosměrným elektrickým polem, ale je ovlivňován také velikostí, nábojem, tvarem částice a viskozitou prostředí. [6]

Pro kapilární zónovou elektroforézu se k navození migrace elektricky nabitých sloučenin používají křemenné kapiláry o délce 20 – 100 cm a vnitřním průměru 25 – 100 μm . Objem kapiláry činí přibližně 10 μl a objem vzorku dávkovaného na kolonu se pohybuje v řádech jednotek (μl). Povrch kapiláry může být opatřen ochrannou polyamidovou vrstvou. Dělení elektricky nabitých částic probíhá v elektrickém poli o vysoké intenzitě (15 – 30 kV) na základě rozdílných elektroforetických mobilit. [6]

Problémovým bodem metody je detekční systém, a to díky velikosti objemu detekované látky 1 μl . Mezi tři základní typy detekce patří spektrofotometrický, fluorimetrický či hmotnostní detektor. [6, 18]

Kapilární zónová elektroforéza je rychlá metoda s vysokou separační účinností a nízkými hodnotami meze detekce použitelná pro miniaturní objemy nabitých i nenabitých sloučenin. Slouží především k identifikaci nízkomolekulárních organických sloučenin, peptidů, proteinů, nukleových kyselin, ale i léčiv či anorganických komplexů. [6, 18]

2.1.5 Hmotnostní spektrometrie

Analýza směsí přírodních látek vyskytujících se v potravinách vyžaduje vysoce selektivní a citlivou analytickou metodu, která je schopna identifikovat a kvantifikovat žádané

sloučeniny a charakterizovat neznámé složky. Použití tradičních detektorů (např. UV-VIS) zanechává vždy určité procento nejistoty, zda měřené píky jsou píky aktuálně žádané sloučeniny nebo jiné, současně eluované složky. Právě problém s koelucí jiných sloučenin řeší hmotnostní spektrometrie, která poskytuje přesnou identifikaci všech složek vzorku. Hmotnostní spektrometrie je tedy fyzikálně chemická metoda sloužící k určování hmotnosti atomů a molekul po jejich konverzi na kladné nebo záporné ionty. [7, 19, 20, 21]

Přístrojová instrumentace prošla v posledních letech rychlým vývojem a i přes značnou konstrukční rozmanitost je možné u všech přístrojů identifikovat stejné základní jednotky. Mezi tyto primární jednotky patří vhodný vstup do zařízení, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a vyhodnocovací zařízení. Jelikož hmotnostní spektrometr pracuje za vakua, je další neodmyslitelnou součástí detektoru vakuový čerpací systém. Dosažení dostatečně nízkého tlaku je zvláště problematické u kombinovaných systémů, kdy se do iontového zdroje přivádí nadbytek mobilní fáze, který je nutné odstranit. Čerpací systém je většinou dvoustupňový – primární stupeň zabezpečují mechanické rotační pumpy, sekundární dočerpání na pracovní tlak poté zajistí difúzní nebo turbomolekulární pumpy. [20]

2.1.5.1 Vstup do detektoru

Většina ionizačních technik je konstruována spíše pro vzorky v plynné fázi, proto musí být vstup do zařízení schopen transformace analytu do plynné fáze. Pokud je analyt dostatečně těkavý či ve formě plynu, je dávkován přímo do oblasti iontového zdroje. Nejjednodušší formou převedení vzorku do prostoru iontového zdroje je přímý vstup plynu či těkavé kapaliny přes jehlový ventil. Další možný vstup do zařízení představuje plynová či kapalinová chromatografie. [22]

2.1.5.2 Iontový zdroj a nejběžnější ionizační techniky

Významným prvkem hmotnostního spektrometru je iontový zdroj, jenž převádí analyzované látky do iontového stavu. Proto se veškeré poskytované informace týkají pouze částic nesoucích kladný nebo záporný náboj. Proces ionizace zásadně ovlivňuje citlivost metody a dosažitelnou mez detekce. Jestliže energie dodaná molekule v průběhu ionizace výrazně převyšuje její první ionizační energii, může dojít ke spotřebování nadbytečné vibračně-rotační energie a parentální ion se rozštěpí. [20] Některé ionizační techniky jsou mírné a produkují pouze ionizované molekuly analyzované látky (měkké ionizační techniky) a jiné jsou účinnější a produkují rovnou fragmenty molekul (tvrdé ionizační techniky). Ionizační techniky je možné třídit také podle skupenství, ve kterém se látka nachází při ionizaci. Ionizace v plynné fázi se vyznačuje odpařením analyzované látky do vakua za předpokladu dostatečné těkavosti látky. Pro netěkavé látky je vhodná ionizace v kondenzované fázi, kde dochází k tvorbě iontů přímo ve fázi kapalné nebo tuhé. [20, 22]

V zásadě se používají následující typy ionizace: ionizace elektronem (electron ionization, EI), chemická ionizace (chemical ionization, CI), sprejové techniky, sekundární iontová hmotnostní spektrometrie (SIMS), fast atom bombardment (FAB) a ionizace laserem za účasti matrice (matrix assisted laser desorption MALDI). Elektronová a chemická ionizace jsou metody vhodné pro ionizaci pouze plynného analytu a ostatní techniky mohou být využívány i pro kapalné typy vzorků. [22]

Tvrde ionizační techniky

V současné době je nejlépe propracovanou metodou ionizace elektronem, která se používá v kombinaci s plynovou chromatografií. Získaná hmotnostní spektra mají velkou reprodukovatelnost a jsou používána pro tvorbu spektrálních knihoven. Z energetického hlediska se tato metoda řadí mezi tvrdou ionizaci. Pro zajištění maximálního množství iontů a dostatečnou fragmentaci se standardně používá energie 70 eV. Parentální molekula v tomto případě nemůže být pozorována, jelikož rozsah fragmentace je tak veliký, že štěpné produkty překryjí mnoho typů přítomných molekul. [20, 22]

Měkké ionizační techniky

Jak při ionizaci elektronem, tak i při chemické ionizaci, je primárním zdrojem proud urychlených elektronů. Energie je však přenášena na ionizované molekuly zprostředkovaně přes reakční médium (nízkovroucí kapalina nebo plyn). Reakční médium ve zdroji je ionizováno proudem elektronů za vzniku iontové mlhy, v níž jednotlivé ionty vzájemně reagují. [20, 22]

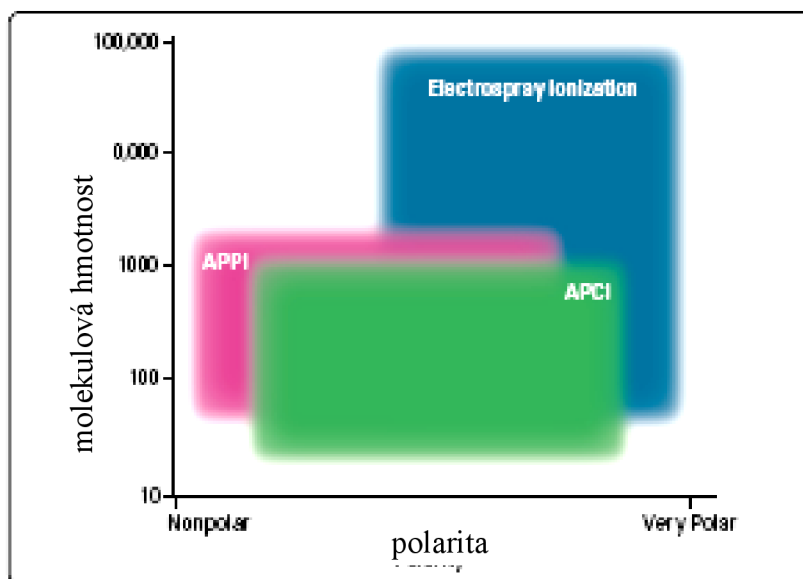
Pro analýzu extrémně velkých molekul (syntetické a přírodní polymery, proteiny a peptidy) s molekulovou hmotností větší než 200 000 Da slouží technika MALDI. Ionizaci a zároveň desorpci způsobují pulzy laserového paprsku, který je namířen přímo na vysušený vzorek, a energie jednotlivých pulzů vyřadí ionty analytu z povrchu matrice. Hmotnostní spektrum obsahuje záznamy všech jednotlivých pulzů, které generují molekulární ion, několikanásobné ionty a velmi mnoho fragmentů. [22]

Sprejové ionizační techniky – měkká ionizace

Sprejová ionizace je vhodná pro kombinaci s kapalinovou chromatografií či kapilární elektroforézou. V praxi je možné se setkat s několika různými variantami zařízení – termosprej (thermospray, TS), elektrosprej (electrospray, ES), chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric chemical ionisation, APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric photoionisation, APPI). [22]

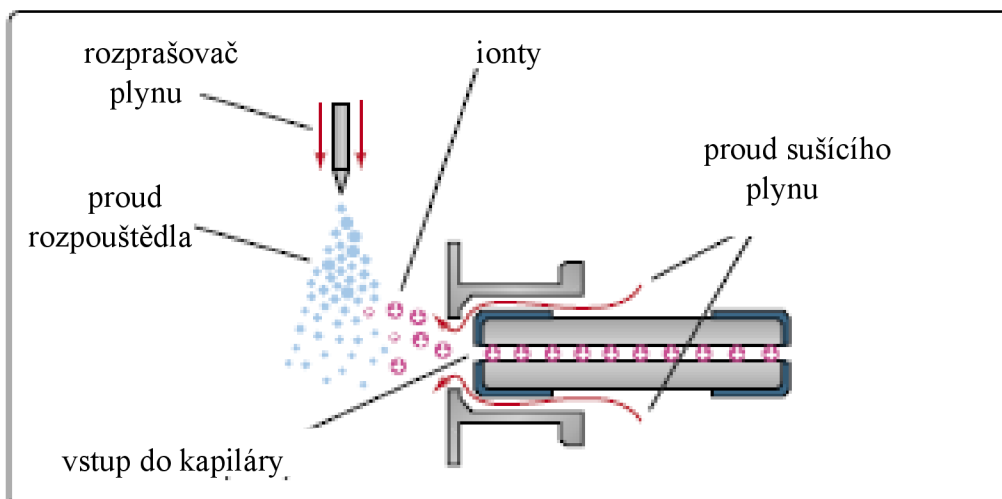
Termosprejová ionizace je nejstarší známou sprejovou ionizační technikou, kde dochází k tvorbě kladně i záporně nabitých iontů. Metoda je vhodná pro látky nepodléhající tepelné degradaci. Zařízení je konstruováno tak, že mobilní fáze s analytem je přiváděna z chromatografické kolony přímo do kovové kapiláry vyhřívané na 200 – 300 °C, čímž dochází k prudkému varu kapaliny a ta je následně rozprášena do velmi malých kapiček. Na kapičkách dochází k akumulaci povrchového náboje a vzrůstu intenzity elektrického pole. Tím, že se kapičky postupně odpařují a zmenšují, se intenzita pole neustále zvyšuje nad hodnotu solvatační energie látek disociovaných v kapalně fázi [20], které následně bez dodání vnější energie přecházejí do plynné fáze. Plynné ionty jsou poté pomocí elektrody vedeny přes vstupní štěrbinu a iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru. [20, 23]

Vynálezem ionizace za atmosférického tlaku (API) velmi vzrostl počet sloučenin, které mohou být pomocí těchto technik analyzovány. Pomocí API je analyzovaná látka ionizována za atmosférického tlaku a poté jsou ionty mechanicky nebo elektrostaticky separovány od neutrálních molekul. Mezi nejběžnější ionizace za atmosférického tlaku patří elektrosprejová ionizace, chemická ionizace a fotoionizace za atmosférického tlaku (obr. 3). [23]



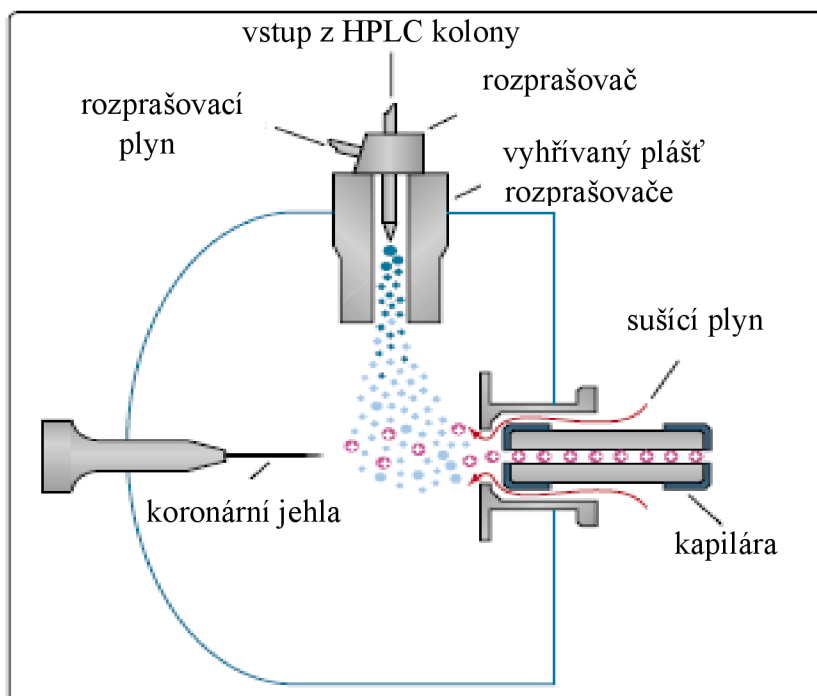
Obr. 3: Aplikace API technik [24]

Elektrosprejová ionizace, která byla vynalezena roku 1984 Yamashitou a Fennem, je v současnosti velmi používanou metodou a často se kombinuje s kapalinovou chromatografií. Tato ionizace je silně endotermická díky tomu, že přenáší ionty z roztoku do plynné fáze. Elektrosprejové zařízení se vyznačuje vznikem jak kladně tak záporně nabitých iontů v závislosti na polaritě vloženého napětí. Tato ionizační technika používá k rozprášení kapalně fáze velmi úzkou kovovou kapiláru, na kterou je přiváděno napětí v řádu jednotek kilovoltů, a vlivem nehomogenního elektrického pole mezi touto kapilárou a protielektrodou vznikají drobné kapičky s vysokou hustotou povrchového náboje. Kapičky jsou ihned vysušovány proudem inertního plynu, zmenšují se a hustota povrchového náboje rychle roste. Po překročení bodu, kdy je coulombická síla elektrického náboje větší než povrchová tenze držící kapku pohromadě, dojde k explozi a vzniku několikanásobně nabitých částic analytu a obsažené disociované látky tudíž přecházejí do plynné fáze. Poté jsou vedeny přes vstupní štěrbinu a iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru (obr. 4). Pomocí elektrosprejové ionizace je možné stanovovat polární až velmi polární sloučeniny a vysokomolekulární látky (obr. 3). [20, 22, 25]



Obr. 4: Elektrosprejová ionizace [24]

Zařízení pro APCI je charakteristické přítomností pneumatického rozprašovače, do kterého ústí chromatografická kolona (obr.5). Plášť rozprašovače je vyhříván na teplotu okolo 700 °C a tak dochází k efektivnímu rozprášení kapalné fáze. Kapalná fáze dále přechází do prostoru koronového výboje, jenž je generován na hrotu koronové jehly. Na tomto místě dochází k ionizaci par mobilní fáze a k tvorbě chemicko-ionizačního plazmatu. Analyzovaná látka je následně ionizována přenosem protonu (mechanismus chemické ionizace) a vznikají kvazi-molekulární typy iontů $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$. [20, 22, 23]

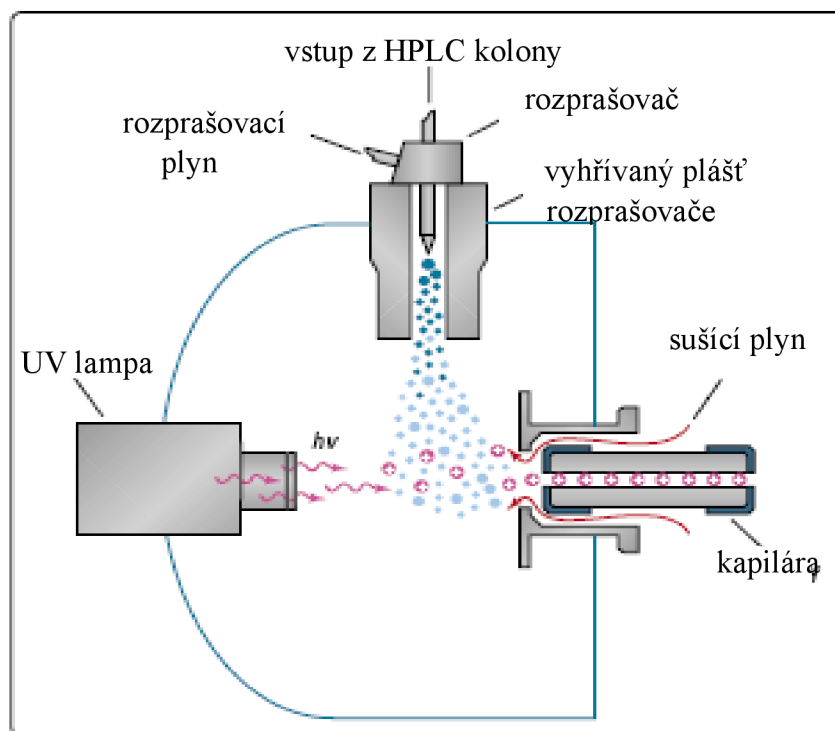


Obr. 5: Chemická ionizace za atmosférického tlaku [24]

Poslední a poměrně novou technikou ionizace za atmosférického tlaku je fotoionizace (obr.6). APPI je z konstrukčního hlediska velmi podobné APCI. Avšak místo koronární jehly

je v APPI UV lampa, která produkuje elektrony v úzkém energetickém rozsahu, jenž je volen tak, aby bylo ionizováno co nejvíce analyzovaných molekul a co nejméně molekul rozpouštědla. [22]

Aplikační oblast APPI a APCI jsou dosti podobné, avšak metoda fotoionizace je vhodná i pro látky vysoce nepolární a pro malý průtok mobilní fáze (méně než $100\mu\text{l}/\text{min}$), kde je citlivost APCI snížena. [22]



Obr. 6: Fotoionizace za atmosférického tlaku [24]

2.1.5.3 Typy hmotnostních analyzátorů

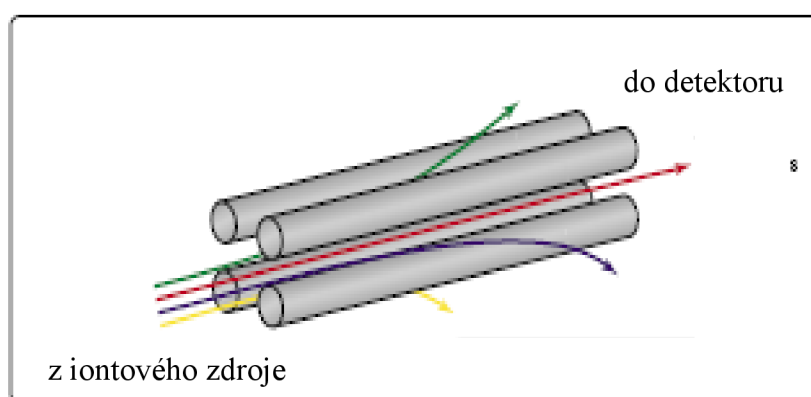
Poté, co je analyzovaná látka ionizována, postupuje do další části hmotnostního spektrometru, a tou je hmotnostní analyzátor. Slouží k rozlišení iontů produkovaných v iontovém zdroji podle poměru jejich hmotnosti a náboje – m/z . Hmotnostní analyzátor může pracovat v módu MS full scan, kdy jsou do analyzátoru vháněny všechny ionty a analyzátor skenuje celý rozsah hodnot m/z . Další možností je mód MS SIM (single ion monitoring), kde je vybrána jedna hodnota m/z a signál ostatních iontů je zanedbán. Poslední modifikací je analýza MS^n , kde n je celé reálné číslo a představuje počet nabití vybraného iontu. Na vybraný ion je aplikována určitá hodnota kolizní energie, která způsobí jeho štěpení ($n=2$). Na vzniklý fragment je aplikována další dávka kolizní energie a vznikají další fragmenty ($n=3$) a tak dále. [22, 17]

Magnetický hmotnostní analyzátor, kvadrupólový analyzátor, iontová past, průletový analyzátor patří mezi základní typy používaných analyzátorů. [20, 22]

Magnetický hmotnostní analyzátor byl součástí prvního hmotnostního spektrometru sestaveného v roce 1897 J. J. Thompsonem. Analyzátor má vysoké rozlišení a široký hmotnostní rozsah, a proto umožňuje kvalitní prostorové rozdělení monoenergetického

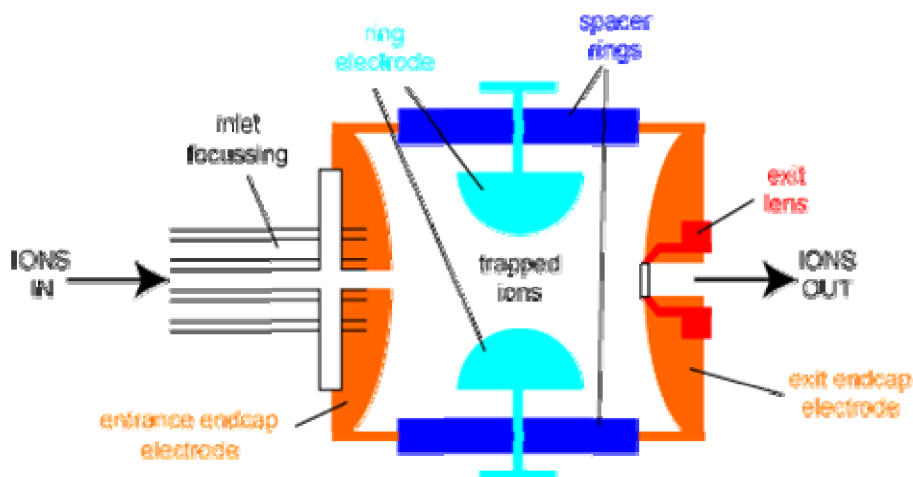
svazku iontů podle hodnoty m/z . Z praktického hlediska se jedná o elektromagnet, mezi jehož pólovými nástavci procházejí urychlené ionty. [20]

Hmotnostní analyzátor kvadrupólového typu (quadrupole, Q) je vhodný pro kombinace s plynovou a kapalinovou chromatografií či kapilární elektroforézou (obr. 7). Jeho kompaktní velikost, rychlost skenování, účinnost a příznivé požadavky na vakuum jsou ideálními předpoklady pro inkorporaci do malých levnějších zařízení. Tvoří jej čtyři kovové tyče s kruhovým nebo hyperbolickým průřezem, jež jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Při vhodně zvolených parametrech napětí se analyzátor chová jako filtr, jenž propouští pouze ionty o určitém m/z a ostatní ionty se dostanou do nestabilní dráhy a zachytí se na tyčích kvadrupólu nebo na stěnách přístroje. Postupnou změnou hodnot napětí je možné analyzovat požadovaný interval hodnot m/z . [20, 22]



Obr. 7: Kvadrupólový analyzátor [24]

Trojrozměrnou obdobou kvadrupólového uspořádání je iontová past (ion trap, IT) umožňující v ohraničeném prostoru uzavřít ionty díky střídavému elektrickému poli (obr. 8). Iontová past je sestavena ze tří elektrod – vstupní a výstupní kruhová elektroda s hyperbolickým průřezem a uzemněním a středová kruhová elektroda, na kterou je přiváděno vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Iontová past pracuje ve dvou fázích. V první fázi se otvorem ve vstupní kruhové elektrodě přivedou molekuly analyzované látky a provede ionizace pulzem elektronů. Během této fáze je možné v iontové pasti akumulovat dostatečné množství iontů. Obvykle se doba akumulace pohybuje v rozmezí $10 \mu\text{s} - 200 \text{ms}$, ale v případě, že je ve vzorku přítomno velmi malé množství žádané látky, může být akumulací doba až 1 sekundu. Ve druhé fázi se zvyšuje amplituda střídavého napětí a přímo úměrně jsou ionty s rostoucím m/z vypuzeny z pasti přes výstupní kruhovou elektrodu do detektoru. [20]



Obr. 8: Iontová past. [68]

Konstrukčně nejjednodušším hmotnostním analyzátozem tvořeným pouhou evakuovanou trubicí je průletový analyzátor (time of flight, TOF). U tohoto typu analyzátoru není potřeba magnetické pole, protože k rozdělení iontů dochází na základě odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru díky skutečnosti, že ionty s odlišným m/z mají při stejné kinetické energii rozdílnou rychlost. Hmotnost atomu je přímo úměrná rychlosti letícího iontu, takže hmotnější ion dorazí do detektoru později než ion lehčí. [20, 22]

2.1.5.4 Detektorové systémy

Ionty o vybraném m/z postupují do části zvané detektor. Používané detektory lze rozdělit do dvou základních kategorií. Do první kategorie patří detektory pro přímá měření, které detekují elektrický proud vznikající přímým dopadem iontů. Druhou skupinu tvoří detektory, které využívají efekt násobení elektronů (nebo fotonů) vzniklých po dopadu iontů a poskytují měřitelné signály dokonce pro jednotlivé ionty. [20] Při výběru typu detektoru je třeba zvážit aplikační oblast daného přístroje. Standardně se užívají elektro- a fotonásobičové [20]

2.1.6 Spojení hmotnostní spektrometrie s vybranými typy rozdělovacích technik, spektrálních metod

Správná volba spojení hmotnostní spektrometrie s vhodnou separační metodou (zejména plynovou a kapalinovou chromatografií) zvyšuje selektivitu metody a umožňuje provádět přesnou identifikaci jednotlivých složek v komplexní matici. Hmotnostní spektrometr zde vystupuje jako strukturně selektivní detektor, jenž umožňuje obvyklou registraci jednotlivých zón látek eluovaných z kolony, ale také jejich identifikaci na základě hmotnostního profilu směsi. [20]

Separční techniky jako jsou plynová chromatografie, kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza jsou metody použitelné pro studium celé potravinové matrice od přírodních látek až po xenobiotika. Tyto metody následované hmotnostní detekcí jsou v současné době dobře komerčně dostupné a jsou plně využitelné nejen v analytických potravinářských laboratořích. Jejich široká aplikovatelnost zasahuje do všech důležitých oblastí chemické analýzy. [20, 19]

2.1.6.1 Kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie (LC/MS)

Spojení kapalinové chromatografie, metody s vysokou separační schopností, a hmotnostní spektrometrie, vysoce citlivé identifikační techniky, přináší důležité výhody pro analýzu

potravinových extraktů. Jednou z nich je možnost analýzy netěkavých, vysoce polárních a/nebo termicky nestabilních látek, které pomocí chromatografie plynové ve spojení s hmotnostní detekcí není možné stanovit. [7, 17]

Tato kombinovaná technika je intenzivně používána až v posledních letech, kdy byl vyřešen základní problém s tlakem a objemem mobilní fáze v místě jejich spojení. Iontové zdroje pracují za vysokého nebo velmi vysokého vakua a tlak na výstupu z kolony je přibližně atmosférický. Tato nekompatibilita obou zařízení byla vyřešena díky ionizačním technikám, které transformují kapalnou mobilní fázi do aerosolu za atmosférického tlaku. [7,23]

Primárním požadavkem pro spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru je odstranění složek mobilní fáze před samotnou ionizací. Dříve bylo používáno ve spojení s EI/CI zdroji takzvané rozhraní s pohybujícím se kovovým páskem (moving belt interface), kde mobilní fáze se vzorkem byla nanášena na rotující kovovou smyčku a byla odpařena dříve, než pásek vstoupil do ionizačního prostoru. V dnešní praxi se prakticky výhradně používají sprejové ionizační techniky, které jsou konstrukčně vybaveny tak, aby byly schopny odvést co největší množství těkavých složek kapalně mobilní fáze ještě než se dostanou do hmotnostního analyzátoru. Při výběru ionizačního zařízení je hlavním kritériem typ analyzovaných látek. Pro analýzu nízkomolekulárních látek do $m/z < 1\ 000$ je vhodné použít zdroj typu APCI, naopak pro látky makromolekulární (bílkoviny, fragmenty nukleových kyselin) je lepší ESI. [20]

Kritéria pro volbu hmotnostního analyzátoru jsou pouze subjektivní, jelikož se řídí požadovaným hmotnostním rozsahem, rozlišením a pořizovacími a provozními náklady. Nejvíce používaným analyzátozem současnosti je kvadrupól, který je téměř univerzální, dostatečně citlivý (zejména v módu SIM) a má vysokou rychlost skenování. Ve spojení LC/MS je velmi rozšířeným analyzátozem iontová past. Tento typ analyzátoru dosahuje ve srovnání s kvadrupólem nižších mezí detekce a je vhodný zejména pro stopovou analýzu. Průletový hmotnostní analyzátor ve spojení s hmotnostní spektrometrií je velice žádaný pro analýzu biopolymerů, zejména bílkovin a fragmentů nukleových kyselin. [20]

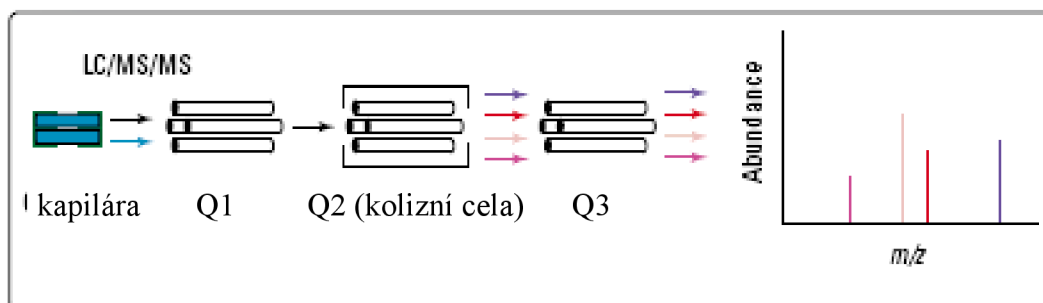
Výběr chromatografické kolony pro LC/MS se řídí především požadavky pro separaci daných látek. Nejčastěji se používá reverzní chromatografie s kolonami typu C8 a C18, dále vylučovací chromatografie na mikroporézních stacionárních fázích, afinitní či iontově výměnná chromatografie. V praxi jsou nejvíce využívány kratší kolony (5 – 15 cm) s menším vnitřním průměrem (2 mm) a drobnou stacionární fází (3 – 4 μm), kde je aplikován průtok mobilní fáze v řádech desetin ml/min. Díky malému průtoku kapaliny je možné celý objem mobilní fáze přivádět přímo do iontového zdroje. [20]

Složení mobilní fáze je omezeno z hlediska následné hmotnostní detekce minimalizací obsahu netěkavých složek a také odstraněním přítomných anorganických solí jako jsou sodné, draselné či fosfátové roztoky. Anorganické soli velmi rychle a nevratně zanášejí iontový zdroj a lze je nahradit těkavými solemi typu octanu či mravenčanu amonného. Pro lepší výtěžnost se rovněž doporučuje využívat u sprejových technik methanolovou mobilní fázi než acetonitril. [20]

2.1.6.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie v kombinaci s kapalinovou chromatografií (LC/MS/MS)

Použití systému s jedním hmotnostním analyzátozem omezuje analýzu na určení molekulové hmotnosti separované látky a to na základě molekulárního, kvazi-molekulárního či aduktového iontu, jelikož fragmentace parentálních iontů je u sprejových technik zanedbatelná. Pro komplexnější a podrobnější strukturní studie je zcela na místě použít zařízení tandemové hmotnostní spektrometrie, kde jsou umístěny dva hmotnostní spektrometry za sebou propojené kolizní celou (obr. 9). Pro tuto kombinaci se obvykle používají magnetické hmotnostní analyzátory. [20]

Pro kombinované systémy jsou vhodnější zařízení se třemi kvadrupóly anebo nejrůznější hybridní systémy, jež se vyznačují vysokým rozlišením a vysokou citlivostí. Hybridní systémy, které jsou sestaveny například ze dvou kvadrupólových a jednoho průletového analyzátozem jsou prospěšné především pro strukturní analýzy. [20]



Obr. 9: Tandemová hmotnostní spektrometrie [24]

Konkrétním příkladem použití tandemové techniky v praxi je analýza množství polyfenolického kvercetinu v cibuli, která je jeho bohatým zdrojem. Teoreticky je pro tento typ analýzy vhodná kombinace kapalinové chromatografie s ionizací APCI, ale v praxi se ukázala ionizace elektrosprejem pro kvercetin citlivější. Výhodnost použití kladného či záporného módu se v tomto případě liší s názory autorů experimentů. [3]

2.1.6.3 Plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie (GC/MS)

Při spojení plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem je závažným jevem tlaková nekompatibilita obou zařízení. Zvýšení tlaku v iontovém zdroji a následně v hmotnostním analyzátozem se projeví výrazným poklesem citlivosti, zhoršením charakteru spekter a případně se zkracuje životnost elektronizačního zařízení. Z tohoto důvodu je zapotřebí použít výkonný čerpací systém, který zajistí odčerpání nadbytečného množství nosného plynu z prostoru ionizačního zařízení. [20]

U běžně používaných způsobů propojení GC/MS je kolona spojena s kovovou nebo křemennou kapilárou, která je zahříváným prostorem vedena přímo do iontového zdroje. Z přímého spojení kolony s ionizačním zařízením vyvstává nevýhoda – přímá závislost okamžitého tlaku v iontovém zdroji na rychlosti nosného plynu. Možností jak tuto situaci odstranit je využít připojení s otevřeným děličem, který je vhodný pro systémy s méně výkonnými čerpacími systémy, s krátkými kolonami s velkým vnitřním průměrem a tedy s velkými průtoky nosného plynu. [20]

2.1.6.4 Kapilární elektroforéza – hmotnostní spektrometrie (CZE/MS)

Kapilární elektroforéza a hmotnostní spektrometrie je dalším spojením vysokoúčinné separační metody a hmotnostní identifikace. Nejčastějším typem iontového zdroje je většinou elektrosprej, i když propojení technik je poněkud problematické vzhledem k velmi malým průtokům mobilní fáze (nl/min) a realizaci vodivého prostředí potřebného pro elektroforetické dělení. Řešením je tzv. stínící kapalina (roztok těkavé soli a vhodného organického rozpouštědla), která navyšuje celkový objem kapalné fáze na $\mu\text{l}/\text{min}$. Stínící roztok slouží také jako vodivé spojení konce separační kapiláry a zemnicí elektroforetické elektrody. Pro lepší stabilitu proudu kapaliny a tvorbu spreje je do iontové cely přiváděn proud inertního plynu. [20]

S výhodou se v případě kombinace CZE/MS používá ionizační techniky zvané nanosprej (nanospray, NS), kde se rychlost průtoku mobilní fáze pohybuje okolo 10 nl/min. Tento typ ionizace se oproti ESI vyznačuje vyšší citlivostí, nízkým průtokem mobilní fáze a tedy i nízkou spotřebou vzorku a lepším poměrem signálu k šumu (S/N). [26]

2.1.6.5 Spojení ICP – hmotnostní spektrometrie (ICP/MS)

Velký potenciál je možné hledat také ve spojení indukčně vázané plazmy a hmotnostní spektrometrie (ICP/MS), kde indukčně vázané plazma vystupuje jako zdroj iontů pro hmotnostní spektrometrii. Je to technika se speciací na studium anorganických a organometalických sloučenin, jenž může být využívána i v analýze potravinových materiálů. Použití ICP jako iontového zdroje pro MS je velice dobrou koncovkou pro kapalinovou chromatografii (LC/ICP/MS). Kombinace detekční schopnosti ICP/MS s možnostmi kapalinové chromatografie tvoří dobrou základnu pro analýzu kovových a nekovových prvků a jejich chemických forem v potravinách. Toto spojení je tedy hlavním zájmem výzkumných prací týkajících se nutričních a toxikologických hodnot potravin. [19, 27]

2.1.7 Využití kombinovaných systémů s MS detekcí

Hmotnostní spektrometrie jako taková má široké pole aplikovatelnosti. Jednou z mnoha možností je analýza přirozeně se vyskytujících sloučenin v potravinách nebo naopak sloučenin vystupujících jako xenobiotika. [19]

2.1.7.1 Aplikace metody LC/MS

LC/MS technika je široce využívána v potravinářském průmyslu k charakterizaci a kvantifikaci netěkavých složek podmiňujících chuť, nutriční vlastnosti a možnou toxicitu. Analýze podléhají zejména umělá i přirozená barviva, růstový hormon v potravinách živočišného původu, dále jsou to peptidy, proteiny, lipidy, sacharidy, glykoproteiny, nejrůznější vitaminy, ale také případná xenobiotika. Velkou výhodou spojení je možnost sledování změn výše jmenovaných struktur během procesu tepelné úpravy a stárnutí vzorku. [20]

Mezi přirozeně se vyskytující sloučeniny v potravinách patří například směs neutrálních tuků, pro jejichž identifikaci se úspěšně využívá chemické ionizace za atmosférického tlaku. Zástupci přírodních esenciálních látek jsou vitaminy – netěkavé a termicky nestabilní sloučeniny, které lze analyzovat systémem LC/MS. [19] Zmíněná kombinovaná technika našla uplatnění také v identifikaci a charakterizaci peptidů a proteinů. Přesná, citlivá a rychlá analýza bílkovinných polymerů je získávána za použití elektrosprejového zdroje a kolizní energie aplikované přímo na daný polymer. [19]

V oblasti farmaceutického průmyslu se jedná hlavně o charakterizaci a kvantifikaci jednotlivých složek léčiv, nejrůznějších meziproductů a nečistot. Metoda je také často využívána pro studium rychlosti a mechanismu odbourání léčiv v organismu nebo k identifikaci a kvantifikaci polárních a netěkavých návykových látek v tělních tekutinách a též pro novodobé dopingové látky jako jsou steroidy, prostaglandiny, peptidy či proteiny. [20]

V environmentální analýze je LC/MS využívána ke stanovení nejrůznějších těkavých a polárních polutantů přítomných především ve vodě. [20]

2.1.7.2 Analytické využití spojení GC/MS

I přes to, že pomocí GC/MS je nemožné analyzovat látky netěkavé, vysokomolekulární a/nebo termicky nestabilní, pronikla tato technika téměř do všech oblastí analytických procesů, protože vyniká svojí rychlostí a citlivostí. Metoda je používána pro analýzu komplexních směsí látek a pro stopovou a ultrastopovou analýzu. [20, 7, 17]

V potravinářství se aplikace GC/MS zaměřuje především na charakterizaci acylglycerolových a sterolových frakcí. [19] Hmotnostní spektrometrie je také vhodná pro detekci sacharidických látek. Ve spojení s plynovou chromatografií je zvláště citlivá na oligosacharidy. [19]

Z xenobiotik jsou metodou GC/MS analyzovány převážně pesticidy a jejich degradované produkty, které mohou být z hlediska karcinogenity a toxicity nebezpečné pro lidské zdraví. Proto musí být jejich maximální přípustné hodnoty přísně stanoveny a hlídány. [19]

2.1.7.3 CZE/MS – aplikace

Tato kombinovaná metoda je vhodná zejména pro analýzy složitých matic, kde se uplatňuje vysoká účinnost separační metody a strukturně selektivní detekce. CZE/MS je velmi výhodná pro nejrůznější analýzy léčiv, speciálně pro peptidové druhy farmak kvůli možné toxicitě degradačních produktů. Dále pro analýzu biopolymerů typu peptidů, proteinů a fragmentů nukleových kyselin. [20, 25, 28]

2.2 Charakterizace vybraných přírodních fyziologicky aktivních látek

Ochranný efekt biologických aktivních látek přítomných v ovoci, zelenině, koření a bylinách je zkoumán jak z hlediska antikarcinogenního, tak z hlediska protizánětlivého či jako prevence chronických kardiovaskulárních onemocnění. Mezi hlavní producenty chronických nemocí patří volné radikály a reaktivní kyslíkaté sloučeniny jako například superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) a peroxylový radikál (ROO^{\cdot}). Příkladem mechanismu účinku volných radikálů je oxidace LDL cholesterolu, který je v této formě extrémně arterogenní a usnadňuje penetraci lipidů do cévních stěn. U konzumentů dostatečného množství ovoce a zeleniny byl prokázán značný pokles onemocnění a úmrtí způsobené kardiovaskulárními, ale i jinými chorobami. [1, 2, 3]

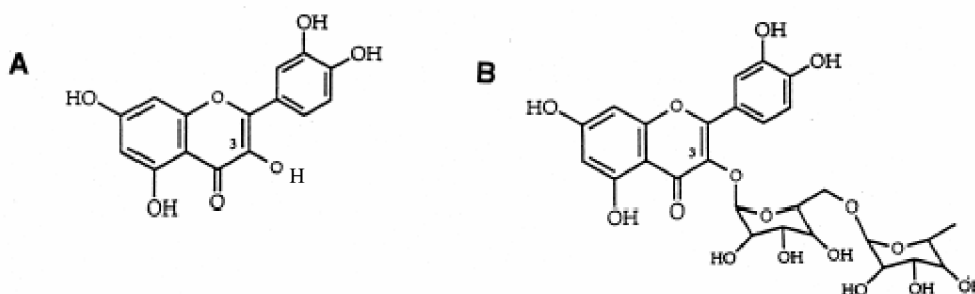
Esenciální význam v ochraně lidského organismu proti reaktivním kyslíkatým sloučeninám mají antioxidanty jako vitamin C a E, karotenoidy i polyfenolické sloučeniny, mezi které patří fenolické kyseliny či flavonoidy. Tyto látky jsou schopné volné radikály v těle vychytávat díky [1, 29] delokalizaci elektronů na aromatických jádrech a následně je stabilizovat. [1]

2.2.1 Flavonoidy

Název přírodních fyziologicky aktivních látek flavonoidů je odvozen od latinského slova *flavus* – žlutý. Tyto látky tvoří rozsáhlou skupinu strukturně podobných fenolických sloučenin. Rostlinné fenoly obsahují dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkatým řetězcem (uspořádání C₆-C₃-C₆). Obecně jsou flavonoidy odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny 2*H*-chromenu s fenolovým substituentem v C₂ nebo C₃ pozici. Strukturní příbuznost látek je dána možnou hydroxylací, methylací či acetylací jednotlivých pozic chromenového skeletu. [5] Svými vlastnostmi se velmi odlišují od jiných fenolových rostlinných pigmentů, a proto jsou vyčleněny jako samostatná skupina. [5, 30, 31]

Flavonoidy představují velkou skupinu sekundárních metabolitů, které hrají důležitou roli při odpovědi metabolismu na stresové situace způsobené UV-B zářením. Schopnost vázat těžké kovy spolu se schopností terminovat radikálové oxidační reakce propůjčuje flavonoidům vlastnosti antioxidantů. [31] Jejich použití rozšiřuje kromě jiného antimikrobiální a farmakologická aktivita. Flavonoidy také ovlivňují některé intracelulární enzymy (např. proteinkinázy). [5, 7]

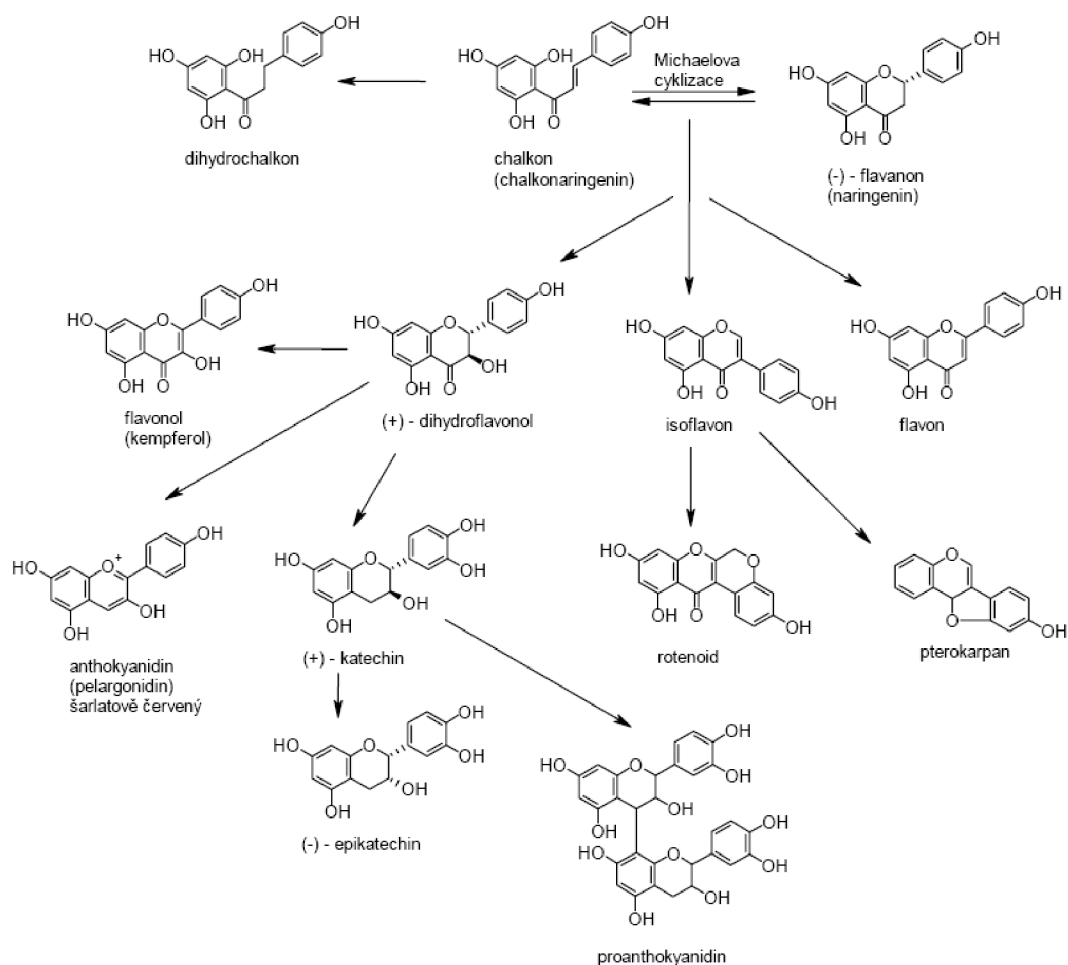
Flavonoidy se v přírodě mohou vyskytovat jako volné aglykony či mnohem častěji vázané na sacharidy (jako glykozidy) (obr. 10). Flavonoidové glykozidy bývají nejčastěji ve formě O-glykozidů, kdy je aglykonový kruh vázán na hydroxylovou skupinu nejčastěji v poloze 3 nebo 7. Méně se pak vyskytují jako C-glykozidy, kde je cukr vázán přes uhlík v poloze 6 nebo 8. Jako cukerná složka se vyskytují převážně arabinóza, glukóza, galaktóza či rhamnóza. Flavonoidy lze nalézt také ve formě diglykozidů. Typickým příkladem disacharidu ve flavonoidech je neohesperidóza (glukóza a ramnóza vázány 1, 6) či rutinóza (glukóza a ramnóza vázány 1, 2). [5, 7]



Obr. 10: Struktura (A) aglikonového kvercetinu a (B) glykozidového kvercetin-3-O- β -rutinozidu (rutinu) [32]

Klasifikace fenolických sloučenin není vždy jednoznačná. Na základě stupně oxidace C₃ řetězce je lze rozdělit do několika skupin – katechiny (flavan-3-oly), leukoanthokyanidiny (flavan-3,4-dioly), flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly anthokyanidiny (obr. 11). Katechiny a leukoanthokyanidiny jsou bezbarvé sloučeniny, ze kterých při reakcích barevného hnědnutí vzniká hnědý pigment. Používají se jako barvivo pro řadu potravin. [31] Flavanony a flavanonoly jsou bezbarvé nebo světle žluté sloučeniny, které jako barviva nemají téměř žádný význam, ale některé flavanony jsou důležitými hořkými složkami grapefruitů. Mezi flavony, flavonoly a anthokyaniny je možné identifikovat žlutě, oranžově,

červeně, fialově či modře zbarvené zástupce, kteří patří mezi důležitá potravinářská barviva. [31, 33, 34]



Obr. 11: Klasifikace flavonoidů [35]

2.2.2 Ostatní polyfenolické sloučeniny

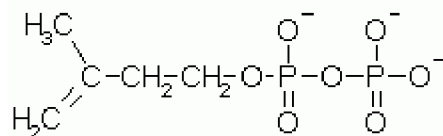
Polyfenolické látky jsou důležité pro kvalitu potravin a pochutin, mezi které patří například zelenina, potravinové doplňky stravitelné bílkoviny, víno nebo alkoholické nápoje. Polyfenolická kompozice je základní stavební kostrou ligninu a stravitelné bílkoviny, která určuje nutriční hodnotu zeleninových jídel. [7]

Do této skupiny látek lze zařadit hlavně fenolické kyseliny – kyselina kávová, kumarová, chlorogenová, siringová, vanilinová či sinapová. [7]

2.2.3 Karotenoidy

Velmi obsáhlá a pestrá skupina přírodních sekundárních metabolitů, jejíž zástupci jsou přítomni téměř v každé buňce, vzniká z „aktivního izoprenu“ (obr. 12) neboli izopentyldifosfátu (IPDP). Tyto látky se označují společným názvem izoprenoidy. [36]

Rostlinné izoprenoidy se skládají z nejrůznějšího počtu IPDP jednotek, které mohou být vázány do lineárních nebo cyklických struktur. Podle počtu C₅ stavebních jednotek je lze dělit na mono- až polyterpeny. [36]

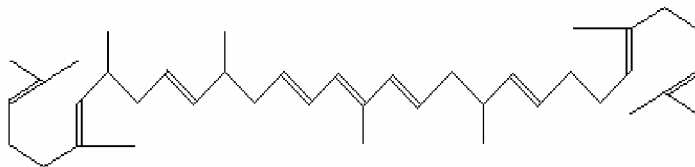


Obr. 12: Aktivní izopren –prekurzor biosyntézy izoprenoidů [37]

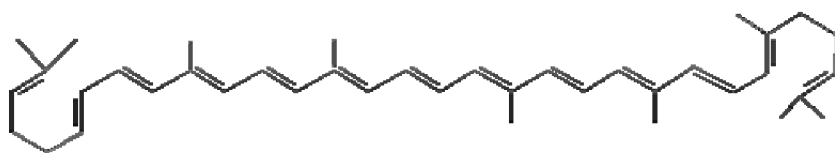
Mnohé terpeny jsou příjemně vonící látky, jiné obsahují systém jednoduchých a dvojných vazeb, což způsobuje jejich barevnost. [36] Tetraterpeny obsahují v molekule 8 IPDP jednotek a patří do skupiny látek důležitých pro proces vidění. Tvoří rozsáhlou skupinu žlutých, oranžových a červených pigmentů nazývaných karotenoidy se silně nenasyceným alifatickým a alicyklickým řetězcem. Karotenoidy jsou schopné vzhledem k systému konjugovaných vazeb ve struktuře vychytávat lipidické peroxyradikály, ale také singletové kyslíkaté intermediáty. Esenciální role karotenoidních látek jako hlavního zdroje vitamínu A je známa po mnoho let. [36]

Základní skupinu karotenoidů, zvaných karoteny, tvoří lykopen, α , β a γ -karoten a fytoen. Fytoen (obr. 13) je bezbarvý nenasycený uhlovodík, který je považován za prekurzor biosyntézy karotenoidů [36]. Od struktury lykopenu, který vzniká z fytoenu desaturací, je možné odvodit zbylé karoteny (obr. 14). Pouhou cyklizací koncových acyklických struktur lykopenu vzniká β -karoten. α a β -karoten v přírodní formě jsou nejdůležitějšími prekurzory vitamínu A pro lidský organismus. Požívání potravinových doplňků nahrazujících přirozený příjem však může vyvolat nejrůznější škodlivé efekty vzhledem k jejich akumulaci v tukové tkáni a játrech. Lykopen způsobuje červené zbarvení ovoce a zeleniny. V těle není sice převáděn na vitamin A, ale hraje důležitou roli při boji proti rakovině i jiným onemocněním, jelikož brání oxidaci LDL cholesterolu. [38]

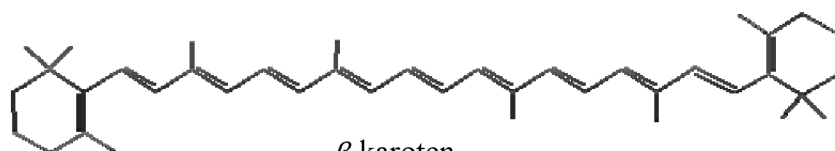
Kyslíkaté deriváty karotenoidů tvoří žluté a červené pigmenty, které se nazývají xanthofily. Ty mohou obsahovat až několik hydroxylových, etherových, aldehydových, ketonových nebo karboxylových substituentů. Mezi xanthofily patří lutein, astaxanthin či zeaxanthin, kryptoxanthin, kapsorubin či luteoxanthin. [36] Nejzajímavější sloučeninou této kategorie je lutein, který se v lidském těle vyskytuje v krevním séru, játrech, tukových tkáních a v sítnici. Dostatečná koncentrace luteinu a jeho doprovodného karotenoidu zeaxantinu v lidské sítnici (zvláště v oblasti ostrého a detailního vidění – žlutá skvrna) se velkou měrou účastní na ochraně zraku před ultrafialovými paprsky. Optimální množství luteinu jako potravinového doplňku je ovšem velmi těžké stanovit. U kuřáků mohou luteinové a β -karotenové doplňky způsobovat pro-oxidační chování zmíněných karotenoidů. [39]



Obr. 13: Fytoen [36]



lykopen



β -karoten

Obr. 14: Struktura lykopenu a β -karotenu [40]

2.2.4 Zdroje fenolických látek

Obecně se látky s antioxidační aktivitou vyskytují ve všech rostlinných zdrojích od čerstvého ovoce a zeleniny, přes ovocné nápoje až po kávu, pivo, rostlinný olej, čaj či nejrůznější džemy. [33]

Fenolické sloučeniny se obvykle biosyntetizují v rostlinných matricích jako komplexní směs látek. Jejich množství a kompozice jsou závislé na aktuálním stavu rostliny, které je ovlivněno okolním prostředím. Pro látky s flavonoidní strukturou jsou přirozeným místem výskytu listy a plody, odkud jsou distribuovány do ostatních částí rostliny. [19, 7].

Flavony jako chrysin, apigenin či rutin lze identifikovat v ovocných slupkách, petrželi, celeru, ve slupce od rajčete a v červeném pepři. Pór, brokolice, grapefruit, cibule, čaj, olivový olej a rajče jsou zdrojem převážně flavonolových sloučenin (kaempferol, kvercetin). Citrusové ovoce obsahuje hlavně flavanony, mezi které patří naringin, naringenin a hesperedin. Potraviny vyrobené ze sójových bobů a boby samy jsou zdrojem isoflavonů (genistin, daidzin). Zdrojem anthokyanidinů je potom barevné ovoce, jako jsou jahody, třešně a maliny. [33, 41]

2.2.4.1 Ovoce a zelenina

Ovoce a zelenina jsou jedním z hlavních zdrojů antioxidantů v naší potravě a mnoho klinických studií potvrzuje význam konzumace tohoto typu potravin pro lidský organismus [29].

Zástupci významné flavonoidní podskupiny anthokyanů jsou v rostlinách lokalizovány v buněčných vakuolách a stabilizovány iontovými interakcemi s organickými kyselinami (např. malonovou, jablečnou nebo citrónovou). Z ovocných zástupců jsou hlavními zdroji hrozny révy vinné. Evropské odrůdy révy *Vitis vinifera* obsahují pouze 3-monoglukozidy různých aglykonů. Převládajícím pigmentem červených hroznů révy je dříve zvaný oenin neboli malvidin-3- β -D-glukopyranozid, který je doprovázen řadou dalších anthokyanů a esterů fenolových kyselin. V nemalém množství se zde také vyskytuje kvercetin. Mezi ovocné zdroje anthokyanů patří třešně, švestky, maliny, jahody, ostružiny, jablka, hrušky, brusinky, borůvky, rybíz. Excelentním vychytávačem volných radikálů je ovoce čeledi hvězdčovitité (*Averrhoa carambola* L.). Je bohaté jak na vitamin C, tak hlavně

na proanthokyanidiny, které jsou tvořeny (+)katechinovými a (-)epikatechinovými konstitučními jednotkami se stupněm polymerizace dva až pět. [31, 29]

Citrusové plody jsou velmi bohaté na obsah askorbové kyseliny a polyfenolů flavanonového typu. V pomerančích a citronech je hlavním aglykonem hesperetin a glykozidem je ze 75-80 % hesperidin. Hlavním aglykonem vyskytujícím se v grapefruitu je naringenin a glykozidovou formu zastupuje z 90 % naringin. Obsah glykozidů v plodech stoupá s růstem plodu a v době zralosti se pohybuje okolo 1-6 g na jeden plod. Citrusové ovoce je též bohatým zdrojem ferulové, kumarové a sinapové kyseliny a v malém množství je zde přítomna i kyselina kávová. [31, 2]

Přirozeným prostředím pro výskyt flavonolů jsou jablka a to v množství závislém na odrůdě a jiných faktorech. Polyfenoly hrají důležitou roli v nutričních, organoleptických a komerčních vlastnostech tohoto ovoce a potravin vyrobených z něho. Flavonoidy se v jablkách vyskytují převážně v glykozidové formě. Dominantním antioxidantem v jablkách je kyselina chlorogenová, vyskytuje se zde v množství desítek miligramů na 100 g jablka. Dále jsou zde zastoupeny flavanoly (katechiny a prokyanidiny), dihydrochalkony, (glykozidy phloretinu), flavonoly (glykozidy kvercetinu a izorhamnetinu) a anthokyaniny (kvanidin) V menším množství jsou v jablkách zastoupeny i glukozidy kaempferolu a myricetinu. Jiným přirozeným zdrojem flavonolů aglykonového či glykozidického typu je bobulovité ovoce. Například v černém rybízu se nacházejí dva glykozidické typy myricetinu a jeden glykozid kaempferolu. [32, 31, 42, 43]

Mezi významné zeleninové zdroje anthokyanů se řadí lilek, červené zelí, brambory s červenou slupkou nebo ředkvičky. V cibuli, a to nejen v červené, je nezanedbatelné množství flavonolu kvercetinu. [31, 3]

2.2.4.2 Ořechy, semena, oleje

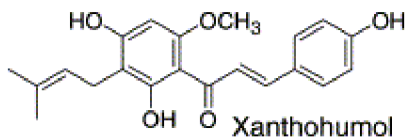
Nejrůznější druhy ořechů obsahují též ve svých strukturách odlišné polyfenolické sloučeniny, mezi které lze řadit například hydroxycinamové kyseliny, glykozidy kvercetinu a chlorogenovou, ferulovou a kávovou kyselinu. V těchto potravinách lze také identifikovat katechiny, epikatechiny a myricetin. [44]

Ořechy též obsahují nezanedbatelné množství α -tokoferolu. V lískových ořeších se vyskytuje velké množství tohoto vitamínu, na druhém místě jsou mandle, dále arašídy, pistácie, vlašské ořechy, Brazílské ořechy a na posledním místě jsou kešu ořechy. [45]

Polyfenolické sloučeniny lze identifikovat také v rostlinných olejích. Typickým představitelem je olej olivový. Hlavním polyfenolem je oleuropein, ale nachází se zde i tyrosol, kvercetin-3-rhamnosid, ligstrosid, izomery verbaskozidu a polyfenolické kyseliny – ferulová, homovanilinová a syringová. [19]

2.2.4.3 Mok století -pivo

Chmel (*Humulus lupulus L.*) je znám nejen jako pivovarská surovina, ale také jako léčivo s vysokou antioxidační aktivitou. V tradičních medicínách je používán pro své uklidňující účinky. Hlavní flavonoidní složkou přítomnou v chmelových extraktech, a tedy i v pivu, je strukturálně jednoduchý chalkon xanthohumol (obr. 15, 16). Xanthohumol má obecně širokospektrální účinky. Je vhodný proti (post-) menopauzním návalům horka a má protirakovinové účinky. Tento flavonoid působí též proti řídnutí kostí a je patentován jako léčivo proti osteoporóze. [46, 47, 48, 49]



Obr. 15: Struktura xantohumolu [46]



Obr. 16: Samičí květenství chmele – hořké kyseliny a flavonoidy se nacházejí ve žlutých žláznatých trichomech. [46]

Pivo je jedním z nejstarších nápojů na světě. Má mnoho příznivých účinků na lidské zdraví. V mnoha západních zemích je součástí dietní stravy a tvoří přibližně 4 – 6 % energetického příjmu. Obsahuje vitaminy skupiny B, dále polyfenolické sloučeniny, kvercetin a ve zvýšeném množství prokyanidiny, epikatechiny a kyselinu ferulovou. [19, 50, 51]

Pivo je kromě jiného také bohatým zdrojem organických a fenolických kyselin. Organické kyseliny způsobují kyselost a chuť piva (hořkost, sladkost) a mají pozitivní fyziologické efekty. V pivě jsou z této skupiny zastoupeny kyseliny mléčná, citrónová, octová, sukcinová, jablečná a fumarová. Fenolické kyseliny pocházejí z největší části ze sladu a chmele. Nejvíce se v pivě vyskytuje kyselina kumarová a ferulová, ale je možné identifikovat také kyselinu chlorogenovou, syringovou, gallovou, protokatechinovou a kávovou. [52, 53, 54]

2.2.4.4 Čaj a med patří neodmyslitelně k sobě

Na látky s flavanolovou strukturou (katechin, epikatechin) jsou bohaté především čajové nálevy. Keře čajovníku *Camellia sinensis* obsahují nejvyšší koncentrace zmíněných antioxidantů v listech. Flavonoidy se v čajích vyskytují převážně ve formě glykozidů, zejména 3-glukozidy, 3-galaktozidy a 3-rutinozidy. Během fermentace zelených čajů dochází k polymerizaci flavanolů na taniny (polyfenoly trpké svíravé chuti), jejichž základní stavební jednotkou je kyselina gallová. Nejbohatší na obsah flavonoidů jsou čaje bílé. V černých čajích je přítomno asi 0,4 – 1,7 % glykozidů, v zeleném asi 1,5 – 1,7 % a v instantních čajích asi 2,6 – 3,1 % v sušině. [31] Tyto glykozidy významnou mírou přispívají k trpké chuti čajových nálevů. [31, 33, 55]

Med a propolis patří též mezi zdroje polyfenolických kyselin. V extraktech medů lze obecně identifikovat kumarovou a kávovou kyselinu, kaempferol, chrysin, katechin a apigenin. Propolis je přírodní látka, kterou sbírají včely z pupenů a výpotků rostlin a stromů. Vyznačuje se řadou rozličných biologických aktivit (antibakteriální, antivirový, protizánětlivý

a protinádorový). [56] Propolis obsahuje mnoho chemických sloučenin, mezi které patří i polyfenoly – flavonoidy, phenolické kyseliny a jejich estery, dále obsahuje terpenoidy, steroidy a aminokyseliny. Procentuální kompozice těchto látek je závislá na vegetaci v místě sběru. [56, 57, 58]

2.2.5 Zdroje karotenoidních sloučenin

Karotenoidy reprezentují skupinu přirozených rostlinných a mikrobiálních pigmentů, které jsou zodpovědné za červené, žluté a oranžové zbarvení ovoce a zeleniny a mikrobiálních kultur. Tyto sloučeniny je možné identifikovat i v zelenině s tmavě zelenou barvou. [38]

2.2.5.1 Zelenina

Hlavní zdroj karotenoidů představuje zelenina. Patří sem převážně paprika, která obsahuje 60 – 70 % β -karotenu z celkového množství přítomných karotenoidů, dále mrkev a v neposlední řadě také zralé rajče, které je vynikajícím zdrojem lycopenu. Ještě nedozrálá rajčata ve svých strukturách akumulují látky xanthofilového původu, a proto jsou jejich tkáň zelené. [38, 59]

2.2.5.2 Ovoce

Červenou barvu vodního melounu, růžového grepu a červených hroznů způsobuje přítomnost lycopenu v jejich buněčné struktuře. Vodní meloun se obecně vyznačuje přítomností široké škály barevných derivátů karotenoidů, ale to až v době dobré zralosti tohoto plodu. Pokud je plod nezralý, obsahuje pouze stopové množství karotenoidů. Také citrusové ovoce, např. mandarinka či pomeranč, jsou zdrojem červených karotenoidních antioxidantů. [38, 59, 60]

2.2.5.3 Mikrobiální producenti karotenoidů

Třída Bazidiomycetes zahrnuje skupiny kvasinkovitých mikroorganismů, které jsou schopny produkovat červená karotenová barviva. Pigmenty jsou tvořeny na vnitřní stěně cytoplazmatické membrány poměrně složitým metabolismem za přítomnosti světla a kyslíku. V kvasinkách se převážně vyskytují karotenoidy jako β -karoten, γ -karoten, α -karoten, torulen a torularhodin, ale poměr jejich obsahu se mění v závislosti na podmínkách kultivace a na vlastnostech prostředí [61, 62].

Významnými producenty karotenoidních barviv jsou rody: *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Phaffia* [62].

2.3 LC/MS v analýze vybraných fyziologicky aktivních látek

Vitaminy, jako fyziologicky aktivní látky, lze v potravinách stanovovat pomocí reverzní chromatografie s hmotnostní detekcí a elektrosprejovou ionizací. K eluci jednotlivých složek jsou vhodné nepolární stacionární fáze a mobilní fáze typu směsi kyseliny octové a acetonitrilu. Ionitový zdroj APCI je vhodný pro vitaminy tokoferolového typu, na separačních mikrokolonách se stacionární fází C18 je dosahováno velmi dobré detekce. [19]

Velmi rozsáhlou skupinou fyziologických sloučenin jsou polyfenolické látky, o jejichž charakterizaci v potravinových produktech roste v poslední době zájem. Polyfenolické antioxidanty se nacházejí v potravinách ve formě komplexní směsi, a proto je zapotřebí

k jejich analýze využít více než jeden typ detekční techniky. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s refraktometrickou či UV-VIS detekcí nejsou dostatečně selektivní pro jednoznačnou identifikaci požadovaných flavonoidů. [7] Pro analýzu flavonoidů je tak výhodné flexibilní spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí s několika typy ionizačních zdrojů. Velmi často se používají elektrosprejové, chemické či laserové ionizační techniky. Jednou z předností hmotnostní detekce je kromě vysoké citlivosti také možnost objasnění glykozidové a aglykonové struktury flavonoidů bez předcházejících časově náročných purifikačních nebo derivatizačních kroků. [19, 7]

Pro separaci fenolických sloučenin a flavonoidů je vhodný výběr kolon s reverzní fází a binární rozpouštědlový systém obsahující „kyselou vodu“ a polární organické rozpouštědlo (methanol, acetonitril). K separaci jednotlivých složek se využívá izokratické, ale častěji gradientové eluce s vyšším stupněm separace jednotlivých látek. Pomocí gradientové eluce bylo separováno až 55 různých standardních polyfenolů, které jsou za normálních podmínek přítomny v ovocných džusech. [1, 63]

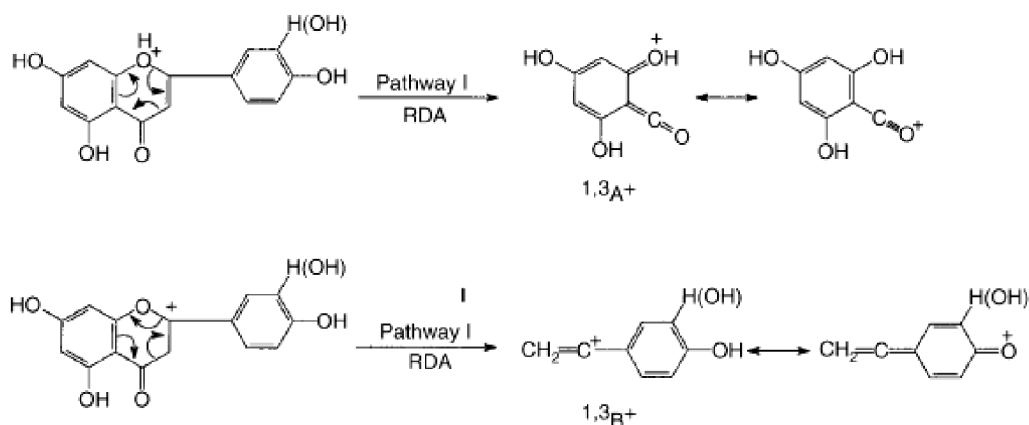
K identifikaci polyfenolických struktur je používána technika LC/MS, ale i LC/MS². Vhodné jsou sprejové ionizace za atmosférického tlaku (APCI a ESI), díky jimž je možné charakterizovat aglykonové, glykozidové a konjugované formy antioxidantů jako jsou například malonáty a acetáty. [30] Konkrétním příkladem aplikace je analýza oleuropeinu, jehož hlavním zdrojem je olivový olej. K jeho úspěšnému stanovení byla použita kombinace RP-HPLC/ESI/MS a to jak mód pozitivní tak i negativní či off-line analýza pomocí semipreparativní HPLC s následnou hmotnostní detekcí vybrané frakce. Informace o struktuře oleuropeinu byly získány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. [19] Jiná aplikace byla využita na charakterizaci polyfenolického spektra v pivu. Hlavní sledovanou skupinou byly prenylované flavonoidy, jejichž stanovení bylo realizováno kombinovanou technikou HPLC/APCI/MS/MS v podmínkách kladného módu. [19]

2.3.1 Identifikace a strukturální charakterizace pomocí fragmentace mateřského iontu

Charakterizace sloučenin pomocí techniky LC/MS² je v současné době velmi rozšířena. Způsob fragmentace sloučenin je závislý na typu ionizace (ESI, APCI) a na typu použitého hmotnostního analyzátoru (kvadrupól, iontová past). [5]

Nejdůležitější fragmentační reakcí flavonoidů jsou retro-Diels-Alderovy reakce. Retro-Diels-Alderovy (RDA) fragmenty jsou důležité především pro charakterizaci glykozidických a aglykonových šestičlenných cyklických struktur obsahujících dvojnou vazbu a 3 páry delokalizovaných elektronů. Pro snadnější orientaci ve štěpných produktech bylo navrženo názvosloví vzniklých fragmentů. Ionty vytvořené v kladném módu rozštěpením dvou vazeb na C-kruhu jsou označovány jako ^{*ij*}A⁺ a ^{*ij*}B⁺ v souvislosti s označením daného flavonoidního kruhu. Indexy *i* a *j* označují vazby na uhlíkatém kruhu, které byly přerušeny. V záporném módu se používá označení ^{*ij*}A⁻ a ^{*ij*}B⁻ se stejnou symbolikou jako v módu kladném. [5]

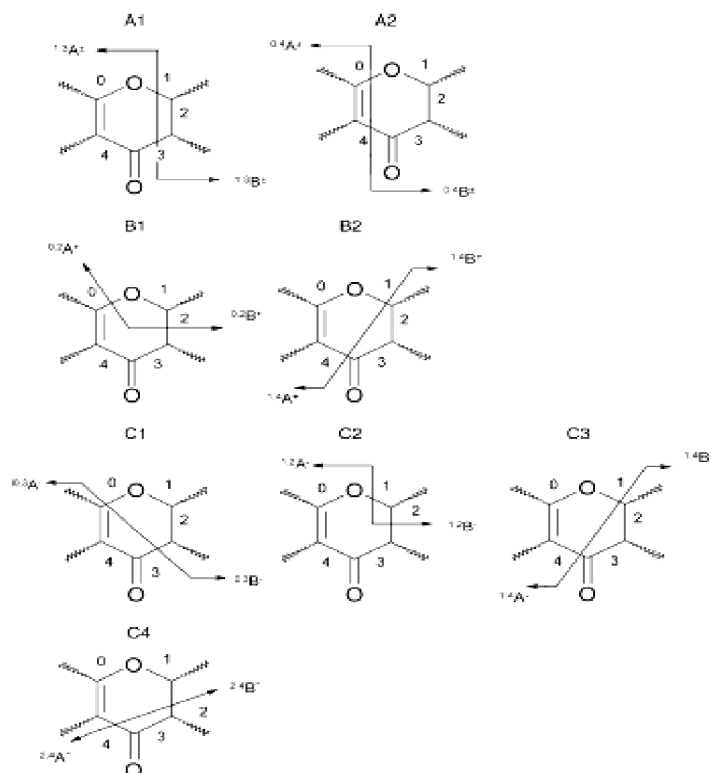
Ve výsledku dochází k rozštěpení dvou σ -vazeb a k vytvoření dvou π -vazeb. Příkladem může být štěpení luteolinu se substituentem -OH na benzenovém kruhu B ($m/z = 287$) či apigeninu se substituentem -H na stejné pozici kruhu B ($m/z = 269$) v kladném módu (obr. 17) – hodnota fragmentu ^{1,3}A⁺ je $m/z = 153$ a pro fragment ^{1,3}B⁺ je hodnota $m/z = 135$ pro luteolin resp. 119 pro apigenin. [5]



Obr. 17: Štěpení luteolinu a apigeninu v kladném módu. [5]

2.3.1.1 Fragmentace v kladném módu

Vybrané flavonoidní skupiny (flavony, izoflavony, flavonoly a flavanony) jsou charakteristické způsobem štěpení (obr. 18). Diels-Alderovo štěpení a vznik $^{1,3}A^+$ fragmentu je typické především pro flavony (luteolin a apigenin), dále pro flavonoly (kaempferol) a flavanony (naringenin a hesperetin). Fragment typu $^{1,3}B^+$ je u zmíněných struktur také pozorován, ale ve zvýšené míře pouze u flavanonu naringenin. U flavonů a flavonolů dochází také k štěpení $^{0,2}B^+$ a příslušný štěp $^{0,2}A^+$ se vyskytuje pouze u flavonolů, což může sloužit jako rozlišovací prvek. Štěpení vazeb 0, 4 není u těchto sloučenin příliš běžné. Diels-Alderova fragmentace u sloučenin s methoxy substituentem probíhá jen v omezené míře [5]



Obr. 18: Štěpení čtyř základních typů flavonoidů v kladném módu (flavony, izoflavony, flavonoly a flavanony). [5]

2.3.1.2 *Fragmentace v záporném módu*

RDA štěpení uhlíkatého skeletu v záporném módu poskytuje hlavně fragmenty typu $^{1,3}A^-$ a $^{1,3}B^-$ (speciálně u flavonolů). Vyskytují se i případy, kdy vzniklé štěpy jsou ve tvaru $^{0,3}A^-$ a/nebo $^{0,3}B^-$. Tento typ štěpení byl pozorován však pouze u izoflavonů (daidzein a genistein). Dalším možným typem je štěpení vazeb 0, 4, které však není typické pro všechny flavonoidy. Bylo pozorováno pouze u několika sloučenin – apigenin, kvercetin, kaempferol, naringenin či izosakurametin. Fragmenty typu $^{1,2}A^-$ jsou charakteristické pro spektrum kvercetinu, fisetinu. [5]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

3.1.1 Chemikálie

- Methanol pro LC-MS, Riedel-de Haën (SRN)
- Acetonitril pro LC-MS, Riedel-de Haën (SRN)
- Ledová kyselina octová, Sigma Aldrich (SRN)
- Hydroxid amonný 28%, Sigma Aldrich (SRN)
- Aceton p.a., Lachema (ČR)
- Diethylether p.a., Lachema (ČR)
- Kofein, Sigma Aldrich (SRN)
- Met-ARG-PHE-Ala, Research Plus, Inc., (USA)
- Ultramark, Lancaster (USA)
- Tunning mix for LC-MSD ion trap, Agilent (USA)
- Reserpin, Sigma Aldrich (SRN)
- β -karoten 95 %, Sigma Aldrich (SRN)
- Astaxantin 98 %, Sigma Aldrich (SRN)
- Rutin hydrát 95%, Sigma Aldrich (SRN)
- Morin, Sigma Aldrich (SRN)
- Kvercetin dihydrát 98%, Sigma Aldrich (SRN)
- Kyselina chlorogenová 95%, Sigma Aldrich (SRN)
- (+)-Katechin hydrát 98%, Sigma Aldrich (SRN)
- (-)-Epikatechin, Sigma Aldrich (SRN)
- Myricetin 96%, Sigma Aldrich (SRN)
- Phlorizin, Sigma Aldrich (SRN)
- Kaempferol 96%, Sigma Aldrich (SRN)
- Všechny ostatní běžné chemikálie byly standardní čistoty p.a.

3.1.2 Přístroje a pomůcky

- Sestava HPLC od firmy ECOM spol. s r.o. (ČR) s MS detektorem Thermo Finigan (USA)
 - Degazér, typ Degasys DG 1210
 - Gradientní čerpadlo typ BETA 10
 - Dávkovací ventil, typ D
 - Termostat kolony, typ LCO 101

- UV-VIS detektor procesový, typ LCD 2084
- Integrátor Clarity
- MS detektor Thermo FINNIGAN LCQ Advantage MAX, iontový zdroj elektrosprej, analyzátor iontová past (USA)
- Integrátor Thermo Finnigan Xcalibur™ (USA)
- SPE, SUPELCO (SRN)
- SPE kolonky typu SPEC C18 AR 3 ml Varian (USA)
- SPE kolonky typu Spe-ed Cartridges Amide-2 20 mg/3 ml Applied Separation (USA)
- Chromatografické kolony:
 - Polaris 3 μ m C18-A 150x2,0 mm Varian (USA)
 - Labio Biospher PSI 200 C18 7 μ m Labio a.s. (ČR)
 - Kromasil 100 –7 μ m C18 250x4,6 mm ECOM s r.o. (ČR)
 - Restek Ultra Aqueous C 18 5 μ m 250x4,6 mm Fisher Scientific (USA)
- Vodní vývěva Merci, a. s. (ČR)
- Rotační vakuová odparka IKA WERKE (SRN)
- Centrifuga 3-15, Sigma (SRN)
- Centrifuga, typ Hettich zentrifugen (SRN)
- Analytické váhy, typ BOECO (SRN)
- Kompaktní váhy, typ Scout PRO SPU402 (USA)
- pH-metr HI 9321, HANNA Instrunemts (Itálie)
- Běžné laboratorní sklo

3.2 Kalibrace a optimalizace (ladění) hmotnostního spektrometru

Veškerá měření s hmotnostní detekcí byla prováděna na hmotnostním spektrometru LCQ Advantage Max od firmy Thermo Finnigan, který je určen pro LC/MS analýzy. MS detektor byl vybaven elektrosprejem, coby iontovým zdrojem, iontovou optikou složenou ze tří oktapólů, analyzátozem iontovou pastí a elektronásobičem jako vlastním detektorem. Celý systém byl řízen softwarem Xcalibur. [64]

3.2.1 Kalibrace MS detektoru

Kalibrace přístroje byla provedena automaticky zadáním v řídicím systému Xcalibur pomocí kalibrační směsi, jejíž složky byly: kofein ($m/z = 195$), MRFA (Met-ARG-PHE-Ala o $m/z = 524$) a Ultramark ($m/z = 1\ 022, 1\ 122, 1\ 222, 1\ 322, 1\ 422, 1\ 522, 1\ 622, 1\ 722$ a $1\ 822$). Koncentrace roztoků a jejich příprava byla provedena podle doporučení výrobce a postup je uveden v příloze 1 [64].

Směs byla do MS detektoru dávkována kontinuálně pomocí integrované syringe pumpy.

3.2.2 Ladění přístroje komerčním standardem – reserpinem

Pro primární ladění přístroje byl využit komerční roztok reserpinu o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rozpuštěný v methanolu dávkovaný do přístroje kontinuálně pomocí syringe pumpy.

Ladění přístroje probíhalo automaticky zadáním v softwaru Xcalibur v kladném (kvazi-molekulární ion 609) i v záporném módu (kvazi-molekulární ion 607). Hodnoty optimalizovaných parametrů jsou uvedeny v tabulce 1.

| <i>parametr MS</i> | <i>kladný mód</i> | <i>záporný mód</i> |
|---|-------------------|--------------------|
| <i>množství sušícího plynu (arb)</i> | 20 | 45 |
| <i>napětí na kapiláře ESI (kV)</i> | 5 | 4 |
| <i>napětí na vstupní kapiláře (V)</i> | 3 | -11 |
| <i>teplota na vstupní kapiláře (°C)</i> | 250 | 250 |

Tabulka 1: Ladící parametry pro reserpin v kladném i záporném módu.

3.2.3 Optimalizace parametrů MS detekce pro vybrané standardní sloučeniny

Následná optimalizace parametrů přístroje probíhala automaticky nastavením v programu Xcalibru pomocí standardních sloučenin vybraných s ohledem na stanovované skupiny látek v biologických vzorcích.

3.2.3.1 Polyfenolické sloučeniny – kvercetin

Ze skupiny látek s flavonoidním typem skeletonu byl vybrán kvercetin, sloučenina se základní aglykonovou strukturou, od které lze ostatní látky odvodit pouhou záměnou substituentů na fenolických kruzích. Hodnoty proměnných parametrů analýzy byly optimalizovány pro kladný i záporný mód, koncentrace ladícího roztoku byla 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kvercetinu rozpuštěného v acetonitrilu a dávkovaného do přístroje pomocí syringe pumpy (tab. 2). V hmotnostním spektru byl v kladném režimu pozorován kvazi-molekulární ion o $m/z = 303$ a v záporném $m/z = 301$. Ladící metoda byla využívána pro stanovení jednotlivých MS full scan a MSⁿ full scan spekter standardních sloučenin s polyfenolickou strukturou (kap. 3.3.1.1, 3.3.1.2).

| <i>parametr MS</i> | <i>kladný mód</i> | <i>záporný mód</i> |
|---|-------------------|--------------------|
| <i>množství sušícího plynu (arb)</i> | 40 | 45 |
| <i>napětí na kapiláře ESI (kV)</i> | 5 | 4 |
| <i>napětí na vstupní kapiláře (V)</i> | 40 | -6 |
| <i>teplota na vstupní kapiláře (°C)</i> | 250 | 250 |

Tabulka 2: Ladící parametry pro kvercetin v kladném i záporném módu.

Pro následnou chromatografickou analýzu byl přístroj naladěn pomocí externího gradientového čerpadla a směšovače (T-kus). T-kus umožnil smíchání standardního roztoku dávkovaného syringe pumpou s mobilní fází dávkovanou pomocí čerpadla HPLC sestavy

před vstupem do iontového zdroje (ESI). Koncentrace ladícího roztoku kvercetin byla 10 $\mu\text{g/ml}$, průtok mobilní fáze byl 0,25 ml/min a složení acetonitril:1% kyselina octová 50:50 (kladný mód) nebo acetonitril:0,25% amoniak 50:50 (záporný mód). Optimální nastavení detektoru pro kladný i záporný mód je uvedeno v tabulce 3.

| <i>parametr MS</i> | <i>kladný mód</i> | <i>záporný mód</i> |
|---|-------------------|--------------------|
| <i>množství sušícího plynu (arb)</i> | 40 | 45 |
| <i>napětí na kapiláře ESI (kV)</i> | 5 | 4 |
| <i>napětí na vstupní kapiláře (V)</i> | 22 | -45 |
| <i>teplota na vstupní kapiláře (°C)</i> | 250 | 250 |

Tabulka 3: Ladící parametry pro kvercetin v kladném i záporném módu hmotnostního spektrometru pro chromatografické analýzy.

3.2.3.2 Chromatografické analýzy v záporném módu – ladící standard kyselina chlorogenová

Pro chromatografické analýzy v záporném módu byla následně vytvořena ladící metoda s využitím polyfenolické kyseliny chlorogenové (tab. 4). Koncentrace ladícího roztoku byla 10 $\mu\text{g/ml}$. Ladění bylo provedeno za použití směšovače a externího HPLC čerpadla. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril:1% kyselina octová 50:50. V hmotnostním spektru byl pozorován v záporném módu kvazi-molekulární ion 353.

| <i>parametr MS</i> | <i>záporný mód</i> |
|---|--------------------|
| <i>množství sušícího plynu (arb)</i> | 30 |
| <i>množství přidavného sušícího plynu (arb)</i> | 10 |
| <i>napětí na kapiláře ESI (kV)</i> | 4,0 |
| <i>napětí na vstupní kapiláře (V)</i> | -47,00 |
| <i>teplota na vstupní kapiláře (°C)</i> | 250 |

Tabulka 4: Ladící parametry kyseliny chlorogenové v záporném módu hmotnostního spektrometru pro chromatografické analýzy.

3.2.3.3 Karotenoidy

Pro látky ze skupiny karotenoidů byl vybrán standard β -karotenu rozpuštěného v methanolu o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Optimalizace detektoru byla provedena v kladném módu, kde byly pozorovány čáry o hodnotě $m/z = 538$ (tab. 5). V záporném módu byla citlivost detekce pozorovaných karotenoidů velmi nízká, a proto nebyly ladící metody vytvořeny.

| <i>parametr MS</i> | <i>β-karoten</i> |
|---|------------------|
| <i>množství sušícího plynu (arb)</i> | 30 |
| <i>napětí na kapiláře ESI (kV)</i> | 4,5 |
| <i>napětí na vstupní kapiláře (V)</i> | 42 |
| <i>teplota na vstupní kapiláře (°C)</i> | 260 |

Tabulka 5: Ladící parametry pro karotenoidní sloučeniny v kladném módu MS detektoru.

3.3 Analýza standardních látek

Dostupné standardní látky byly po naladění spektrometru podrobeny hmotnostní analýze ve vybraných módech, které nabízí kombinace analyzátoru iontové pasti a softwaru Xcalibur. Mód MS full scan umožňuje stanovení kompletního hmotnostního spektra. Rozsah hodnot m/z byl dán ve spektru typem používaného detektoru a pohyboval se v rozmezí 0 – 2000. Iontová past je schopná měřit i v režimu MSⁿ full scan.

3.3.1 Polyfenolické sloučeniny

3.3.1.1 Kompletní hmotnostní spektrum kvazi-molekulárních iontů (mód MS full scan)

Dostupné standardy polyfenolů (tab. 6) byly podrobeny analýze na MS detektoru v režimu MS full scan. Jako ladící metoda byla využita optimalizace na kvercetin (kap. 3.2.3.1, tab. 2). Roztoky standardních látek o koncentraci 10 ng/ml – 10 μg/ml byly do detektoru dávkovány jednorázově pomocí dávkovacího ventilu hmotnostního spektrometru s dávkovací smyčkou o objemu 2 μl. Pro polyfenolické sloučeniny byla použita mobilní fáze o složení acetonitril:1% kyselina octová (resp. 0,25% amoniak) 50:50 pro kladný (resp. záporný) mód. Příslušná spektra byla snímána pomocí programu Xcalibur a následně vyhodnocována.

| <i>standardy falvonoidy</i> | | | | |
|-----------------------------|------------------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| <i>rutin</i> | <i>kyselina chlorogenová</i> | <i>epikatechin</i> | <i>fisetin</i> | <i>myricetin</i> |
| <i>morin</i> | <i>kyselina gallová</i> | <i>kaempferol</i> | <i>naringenin</i> | / |
| <i>kvercetin</i> | <i>katechin</i> | <i>phlorizin</i> | <i>apigenin</i> | |

Obr. 6: Dostupné flavonoidní standardní látky.

3.3.1.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie (režim MSⁿ full scan)

Používaný hmotnostní detektor LCQ Advantage Max je vybaven analyzátozem iontovou pastí umožňující fragmentaci vzorků v MSⁿ full scan režimu. Vzhledem k elektrosprejevé ionizaci tak dochází ke štěpení kvazi-molekulárního iontu nebo jeho fragmentů a lze tak následně identifikovat izomerní nebo strukturně podobné látky na základě charakteristických štěpů.

Standardní roztoky (kap. 3.3.1.1, tab. 6) byly připraveny v koncentracích 10 ng/ml – 10 μg/ml. Fragmentace byla provedena jak v kladném tak i v záporném módu s využitím

ladění na kvercetin (kap. 3.2.3.1, tab. 2). Pro štěpení zvoleného iontu bylo nutné optimalizovat tři základní parametry: hodnota kolizní energie (E), aktivační koeficient (Q) a optimální doba, po kterou zvolená kolizní energie působila na vybraný ion (aktivační čas, T_{akt}).

Vhodná kombinace hodnot výše popsaných parametrů byla hledána manuálně, kdy byly na jednotlivé standardy aplikovány základní kombinace parametrů (tab. 7) od nejnižší energie po nejvyšší do té doby, kdy byl kvazi-molekulární ion dokonale rozštěpen.

| <i>základní kombinace parametrů</i> | <i>E (%)</i> | <i>Q</i> | <i>T_{akt} (ms)</i> |
|-------------------------------------|--------------|----------|-----------------------------|
| 1. | 20 | 0,5 | 60 |
| 2. | 30 | 0,45 | 50 |
| 3. | 40 | 0,4 | 45 |
| 4. | 50 | 0,35 | 40 |
| 5. | 60 | 0,25 | 30 |

Tab. 7: Primární kombinace volených parametrů pro fragmentaci iontů.

3.3.1.3 Optimalizace složení mobilní fáze pro chromatografickou separaci polyfenolů

Optimalizace složení mobilní fáze pro jednotlivé skupiny standardů byla provedena na univerzální koloně Polaris C18-A. Bylo měněno jednak přímo složení mobilní fáze a jednak její pH.

Jako základní mobilní fáze bylo zvoleno složení 1% kyselina octová : acetonitril : methanol v poměru 50:30:20 [30]. Analýza probíhala isokraticky na koloně Polaris se stacionární fází C18 o zrnitosti 3 μm a rozměrech 150x2,1 mm s předřazenou předkolonou se stejnou stacionární fází. Kolona byla temperována na 30 °C. Průtok mobilní fáze byl 0,15 ml/min. Na kolonu byly nastříkovány směsi vytvořené ze standardních látek (tab. 8) pomocí dávkovacího ventilu integrovaného v hmotnostním spektrometru a dávkovací smyčky o objemu 20 μl .

Pro jednodušší identifikaci složek vzorku byly použity dva typy detekce – fotometrická a hmotnostní. Vzorek procházející UV-VIS detektorem byl identifikován při vlnové délce 280 nm – směs 2 a 3 (resp. 370 nm – směs 1) a poté byl detekován hmotnostním spektrometrem na základě příslušné hodnoty m/z za pomínek ladící metody uvedené v kap. 3.2.3.2, tab.4.

Vzhledem k tomu, že separace standardů byla nedostatečná, bylo složení mobilní fáze modifikováno podle schématu v tabulce 9.

| <i>směsi standardů</i> | <i>složení</i> |
|------------------------|---|
| 1. | rutin, morin, kvercetin, kyselina chlorogenová |
| 2. | kaempferol, katechin, epikatechin, myricetin, phlorizin, kyselina chlorogenová |
| 3. | rutin, morin, kvercetin, kyselina chlorogenová, kaempferol, katechin, epikatechin, myricetin, phlorozin |

Tabulka 8: Vytvořené standardní směsi.

| <i>poměrové zastoupení</i> | <i>methanol</i> | <i>acetonitril</i> | <i>1% HAc</i> |
|----------------------------|-----------------|--------------------|---------------|
| 1. | 15 | 35 | 50 |
| 2. | 10 | 40 | 50 |
| 3. | 5 | 45 | 50 |
| 4. | 0 | 50 | 50 |

Tabulka 9: Poměrové složení mobilní fáze.

Dalším optimalizačním krokem bylo hledání nejvhodnější hodnoty pH mobilní fáze, při které by docházelo k optimální separaci směsi standardních polyfenolických sloučenin na koloně a zároveň by obsahovala dostatečné množství kyseliny/zásady potřebné pro ionizaci vzorku před vstupem do hmotnostního detektoru. Pro dosažení žádané hodnoty pH roztoku byly použity kyselina octová a amoniak ve směsi se základním typem mobilní fáze (AcN:H₂O v poměru 50:50). Celkem bylo připraveno 5 mobilních fází o pH 4, 5, 6, 8 a 10, které byly použity pro chromatografickou separaci směsi 3 (tab. 9). Směs byla aplikována na kolonu Polaris a podmínky separace a hmotnostní detekce byly shodné jako v případě optimalizace obsahu methanolu v mobilní fázi.

3.3.1.4 Gradientová eluce polyfenolických sloučenin

Pro separaci látek polyfenolického charakteru byl využit lineární gradient změny složení mobilní fáze. Bylo vyzkoušeno mnoho kombinací uvedených v odborné literatuře [63, 65, 66], které byly následně modifikovány. Optimální separace byla pak pozorována při nastavení gradientové eluce za podmínek uvedených v tabulce 10. Na vstupu A gradientového čerpadla byla dávkována 1% kyselina octová, na vstupu B byl dávkován acetonitril. Gradientové eluci byly podrobeny směsi 1, 2 a 3 (tab. 9) na koloně Polaris o průtoku mobilní fáze 0,15 ml/min. Detekce probíhala jak na UV/VIS ($\lambda = 280$ nm) tak na hmotnostním spektrometru za použití ladící metody pro chromatografické analýzy v záporném módu (kap. 3.2.3.2, tab. 4).

| krok | čas (min) | výchozí stav | | koncový stav | |
|------|-----------|--------------|----|--------------|----|
| | | A | B | A | B |
| 1. | 3 | 60 | 40 | 57 | 43 |
| 2. | 20 | 57 | 43 | 55 | 45 |
| 3. | 10 | 55 | 45 | 45 | 55 |
| 4. | ∞ | 45 | 55 | 45 | 55 |

Tabulka 10: Optimální gradient pro separaci polyfenolických sloučenin.

3.3.1.5 Výběr chromatografické kolony pro separaci směsí standardních látek

Optimální nastavení gradientu pro separaci standardních látek ze směsi (kap. 3.3.1.4) bylo aplikováno kromě HPLC kolony Polaris i na další dostupné chromatografické kolony, jejichž parametry jsou uvedeny v tabulce 11. S ohledem na tlak byl pro kolonu s vnitřním průměrem 2,1 mm (Polaris) nastaven průtok mobilní fáze na 0,15 ml/min a pro kolony s průměrem 4,6 mm 0,4 ml/min. Použitá ladící metoda pro hmotnostní detekci je uvedena v kap. 3.2.3.2, tab. 4.

| název kolony | typ stacionární fáze | rozměry (mm) | zrnitost (μm) | předkolona |
|--------------|----------------------|--------------|----------------------------|------------|
| Polaris | C18 | 150 x 2,1 | 3 | ano |
| Kromasil | C18 | 250 x 4,6 | 7 | ano |
| Restek | C18 Ultra Aqueous | 250 x 4,6 | 5 | ano |

Tabulka 11: Parametry použitých kolon pro separaci látek.

Pro další analýzy standardních i reálných vzorků polyfenolických látek byla vybrána kolona Restek vzhledem k nejlepší separaci složek směsi standardů za uvedených gradientových podmínek (kap. 3.3.1.4, tab. 10).

3.3.1.6 Off-line analýza

Na chromatografickou kolonu Restek byla aplikována směs standardů s označením 1 (kap. 3.3.1.3, tab. 9) za podmínek gradientové eluce (kap. 3.3.1.4, tab. 10). Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min a kolona byla vyhřívána na 30 °C. Separace složek byla detekována spektrofotometricky při 370 nm a jednotlivé frakce byly odchyťovány do zkumavek. Odseparované frakce byly následně aplikovány jednorázově do hmotnostního spektrometru a byla provedena jejich detekce za podmínek uvedených v kapitole 3.2.3.2, tab. 4. Jednotlivá hmotnostní spektra byla snímána a vyhodnocována pomocí programu Xcalibur.

3.3.1.7 Příprava kalibračních křivek standardních preparátů

Všechny dostupné standardní látky (tab. 12) pro analýzu polyfenolických sloučenin byly naředěny do koncentračních řad v rozmezí 0,1 – 100 $\mu\text{g/ml}$ (tab. 12) a aplikovány na kolonu Restek (kap. 3.3.1.5, tab. 11) za podmínek gradientové eluce (kap. 3.3.1.4). Kalibrační křivky

byly vyhodnoceny na základě plochy píku v chromatogramu dané sloučeniny pomocí softwaru Xcalibur. Kalibrace probíhala za podmínek ladící metody pro chromatografické separace v záporném módu (kap. 3.2.3.2, tab. 4)

| | <i>koncentrace (µg/ml)</i> | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|------|------|-----|-----|----|
| <i>apigenin</i> | 0,1 | 0,5 | 0,75 | 1 | 2,5 | 10 |
| <i>epikatechin</i> | 0,1 | 0,5 | 1 | 2,5 | 10 | |
| <i>fisetin</i> | 0,5 | 2,5 | 5 | 10 | | |
| <i>kaempferol</i> | 0,1 | 0,5 | 0,75 | 2,5 | 5 | |
| <i>katechin</i> | 0,1 | 0,5 | 2,5 | 5 | 10 | |
| <i>kvercetin</i> | 0,1 | 0,5 | 1 | 1,5 | | |
| <i>kyselina galová</i> | 0,1 | 0,5 | 1 | 5 | 10 | |
| <i>kyselina chlorogenová</i> | 0,1 | 0,5 | 1 | 2,5 | 10 | |
| <i>morin</i> | 5 | 25 | 37,5 | 50 | 75 | |
| <i>myricetin</i> | 0,1 | 0,5 | 1 | 5 | 10 | |
| <i>naringenin</i> | 0,1 | 0,5 | 0,75 | 2,5 | 5 | |
| <i>phlorizin</i> | 0,1 | 0,5 | 1 | 2,5 | 5 | |
| <i>rutin</i> | 1 | 3,13 | 12,5 | 25 | 50 | |

Tabulka 12: Koncentrační řady kalibračních roztoků jednotlivých standardů.

3.3.2 Karotenoidní látky

3.3.2.1 Komplettní hmotnostní spektrum kvasi-molekulárních iontů (mód MS full scan)

Standardy β -karoten a astaxanthin byly podrobeny analýze na MS detektoru v režimu MS full scan. Připravené roztoky látek o koncentraci 10 ng/ml – 10 µg/ml byly do detektoru dávkovány jednorázově pomocí dávkovacího ventilu hmotnostního spektrometru s dávkovací smyčkou o objemu 2 µl. Byla použita mobilní fáze o složení methanol:1% kyselina octová (resp. 0,25% amoniak) v poměru 80:20 pro kladný (resp. záporný) mód za použití ladící metody s parametry uvedenými v kap. 3.2.3.3, tab. 5 pro kladný a kap. 3.2.2, tab. 1 pro záporný mód. Příslušná spektra byla snímána pomocí programu Xcalibur a následně vyhodnocována.

3.3.2.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie (režim MSⁿ full scan)

β -karoten o koncentracích 10 ng/ml – 10 µg/ml byl podroben fragmentaci v kladném i záporném módu a byla na něj aplikována základní kombinace parametrů (kap. 3.3.1.2, tab. 7) od nejnižší energie po nejvyšší. Pro kladný a záporný mód byly nastaveny na hmotnostním detektoru ladící metody shodné jako v kap. 3.3.2.1.

3.3.2.3 Optimalizace složení mobilní fáze vhodné pro separaci karotenoidů

Pro optimalizaci složení mobilní fáze byla využita směs 1% kyseliny octové (0,25% amoniaku) s methanolem v poměru 20:80. Mobilní fáze byly aplikovány na kladný (HAc, ladící metoda: kap. 3.2.3.3, tab. 5) i záporný (NH₃ –ladící metoda: kap. 3.2.2, tab. 1) mód přístroje. Ani jedna mobilní fáze však nebyla pro separaci vhodná, proto byla použita směs čistého methanolu s přídavkem 0,5 % ledové kyseliny octové kvůli ionizaci vzorku a směs byla aplikována na kladný mód přístroje (ladící metoda: kap. 3.2.3.3, tab. 5).

Vhodnost mobilní fáze byla pro směs β -karotenu, astaxantinu a lykopenu ($c = 10 \mu\text{g/ml}$ methanolu) ověřena na koloně Polaris o zrnitosti $3 \mu\text{m}$ s předřazenou kolonou se stejnou stacionární fází (kap. 3.3.1.5, tab. 11) a Labio (stacionární fáze typu C18 o zrnitosti $7 \mu\text{m}$ s předkolonou se stejnými parametry). Chromatografická kolona byla temperována na 45°C a průtok mobilní fáze $0,25 \text{ ml/min}$ (Polaris) nebo $1,1 \text{ ml/min}$ (Labio). Směs byla aplikována na kolonu pomocí dávkovacího ventilu integrovaného v hmotnostním spektrometru a dávkovací smyčky o objemu $20 \mu\text{m}$.

Směs vycházející z chromatografické kolony byla podrobena dvojité detekci (UV/VIS a MS). Vlnová délka na UV/VIS detektoru byla 450 nm a detekce na hmotnostním spektrometru proběhla na základě příslušné hodnoty m/z v kladném módu (ladící metoda: kap. 3.2.3.3, tab. 5).

Pro další separace karotenoidů byla používána chromatografická kolona Polaris s lepší dělicí schopností.

3.3.2.4 Příprava kalibračních křivek standardních preparátů

Pro přípravu kalibrační křivky byl standard β -karotenu naředen do koncentrační řady v rozmezí $0,1 - 10 \mu\text{g/ml}$ (tab. 13) a aplikován na kolonu Polaris se stacionární fází typu C18 a s předkolonou stejného typu za podmínek izokratické eluce. Jednotlivé standardy byly na kolonu nastříkovány pomocí dávkovacího ventilu integrovaného v hmotnostním spektrometru a dávkovací smyčky o objemu $2 \mu\text{l}$. Kolona byla vyhřívána na 45°C za použití, jako mobilní fáze byla využita směs čistého methanolu s $0,5 \%$ kyseliny octové o průtoku $0,25 \text{ ml/min}$ za podmínek izokratické eluce. Byla použita dvojitá detekce se stejnými parametry jako v kap. 3.3.2.3.

Kalibrační křivka byla vyhodnocena na základě plochy píku v chromatogramu dané sloučeniny pomocí softwaru Xcalibur.

| | koncentrace ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | |
|------------------|----------------------------------|-----|-----|---|---|----|
| β -karoten | 0,3 | 0,3 | 0,6 | 3 | 6 | 10 |

Tabulka 13: Koncentrační řada kalibračního roztoku.

3.4 Optimalizace izolačního postupu

3.4.1 Látky polyfenolického typu

3.4.1.1 Optimalizace SPE extrakce pomocí standardní látky

Pro optimalizaci metody extrakce flavonoidních sloučenin z reálných vzorků byl vybrán právě kvercetin kvůli své aglykonové struktuře (kap. 2.2.1). Kvercetin byl rozpuštěn

v acetonitrilu na koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. K dispozici byly kolony se dvěma typy stacionární fáze – C18 AR a amid-2. Kolony byly nejprve promyty 3 ml H_2O (C18) nebo 2 ml MeOH (amid-2); kondicionovány 3 ml MeOH (C18) nebo 2 ml H_2O (amid-2), a poté na ně byl aplikován vzorek standardní sloučeniny. Kvercetin zachycený v koloně byl promyt 2 ml MeOH (C18) nebo 2 ml H_2O (amid-2). Pro eluci látky zadržované na kolonce C18 byl použit cyklohexan [67] pro kolony typu C18 nebo MeOH pro kolony amid-2 (doporučeno výrobcem). Schéma optimalizace je uvedeno v tab. 14, která shrnuje jednak množství aplikovaného vzorku a jednak optimalizaci objemu elučního činidla. Rozpuštědlo bylo následně odpařeno na vakuové rotační odparce a odparek byl znovu rozpuštěn ve 2 ml mobilní fáze bez ionizačního činidla ($\text{AcN}:\text{H}_2\text{O} = 50:50$). Rozpuštěný standard byl nakonec zcentrifugován (3 min, 15 000 rpm), přefiltrován přes jednorázový filtr typu PRE-CUT a poté nanášen na chromatografickou kolonu.

| <i>typ kolony</i> | <i>C18</i> | | <i>AMID</i> | |
|-----------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| <i>aplikace vzorku (ml)</i> | 1 | | 1 | |
| | 3 | | 3 | |
| | 6 | | 6 | |
| | 8 | | 8 | |
| <i>eluze</i> | <i>objem (ml)</i> | <i>rozpuštědlo</i> | <i>objem (ml)</i> | <i>rozpuštědlo</i> |
| | 2 | cyklohexan | 2 | MeOH |
| | 5 | | 5 | |
| | 10 | | 10 | |

Tabulka 14: Extrakce pevnou fází.

Kvercetin extrahovaný pomocí SPE byl podroben chromatografické analýze na koloně Polaris s předřazenou předkolonou se stejnou stacionární fází, s průtokem mobilní fáze 0,15 ml/min a složením $\text{AcN}:1\% \text{HAc} (50:50)$. Kolona byla kondicionována na 30 °C a vzorek byl detekován pomocí UV-VIS spektrometru při vlnové délce 370 nm.

Optimální kombinace typu SPE kolony, množství aplikovaného vzorku na kolonku a objemu elučního činidla byla – 3 ml kvercetinu aplikovaného na amidovou kolonu eluovaného 10 ml rozpuštědla. Zmíněný vzorek byl poté aplikován na hmotnostní spektrometr za podmínek kladné i záporné detekce (kap. 3.2.3.1, tab.2).

3.4.1.2 Optimalizace typu rozpuštědla a množství reálného vzorku aplikovaného na extrakční kolonku

Pro optimalizaci SPE extrakce z reálného vzorku bylo ze všech potravin vybráno jablko, jelikož podle dostupných literárních zdrojů [32, 31, 42, 43] obsahuje značné množství flavonoidních i ostatních polyfenolických látek. Čerstvá jablečná šťáva získaná z nastrouhaného jablka byla odstředěna (20 minut, 5 000 rpm) a zfiltrována přes skládaný filtr. Poté byla šťáva jako taková anebo s extrakčním činidlem (2% HCl, voda – tab. 15)

aplikována na SPE amidovou kolonu promytou 2 ml MeOH a kondicionovanou 2 ml H₂O. Zadržené polyfenolické látky byly na koloně promyty 2 ml H₂O a následně eluovány optimalizovaným množstvím elučního činidla – 10 ml methanolu (kap. 3.4.1.1).

| | šťáva samotná | šťáva + 2% HCl | | šťáva + H ₂ O | |
|------------|---------------|----------------|--------|--------------------------|------------------|
| | | šťáva | 2% HCl | šťáva | H ₂ O |
| objem (ml) | 1 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| | 3 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| | 6 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | 8 | 4 | 4 | 4 | 4 |

Tabulka 15: Různé kombinace extrakčních činidel a šťávy aplikovaných na SPE kolonky.

Eluát byl odpařen na vakuové rotační odparce, odparek byl rozpuštěn ve 2 ml směsi AcN a H₂O v poměru 50:50 a zcentrifugován 3 min při 15 000 rpm. Nakonec byl vzorek přefiltrován přes jednorázový filtr typu PRE-CUT a aplikován na kolonu pomocí dávkovacího ventilu hmotnostního spektrometru se smyčkou o objemu 20 μ l. Separace vzorku probíhala na koloně Polaris temperované na 30 °C, průtok mobilní fáze byl 0,15 ml/min a složení AcN:1% HAc (50:50). Vzorek byl podroben UV-VIS detekci při 280 nm.

Pro následnou optimalizaci množství vzorku vhodného pro SPE extrakci z hlediska hmotnostní detekce byla vybrána kombinace šťávy a kyseliny chlorovodíkové o celkovém množství 3 ml aplikovaných na extrakční kolonku.

3.4.1.3 Kombinace množství kyseliny chlorovodíkové a ovocné šťávy aplikované na SPE

Na SPE kolony připravené jako v kap. 3.4.1.2 byly aplikovány směsi šťávy a HCl podle tabulky 16. Eluce zadržovaných polyfenolů a jejich následná úprava před aplikací na chromatografickou kolonu probíhala za stejných podmínek jako v kap. 3.4.1.2.

| šťáva | 2% HCl |
|-------|--------|
| 0,5 | 0,5 |
| 0,5 | 2,5 |
| 1,5 | 1,5 |

Tabulka 16: Optimalizace množství šťávy a kyseliny chlorovodíkové pro SPE extrakci.

Purifikovaný vzorek byl aplikován na kolonu Restek (kap. 3.3.1.5, tab. 11) za podmínek gradientové eluce (kap. 3.3.1.4). Pro detekci žádaných sloučenin byly na hmotnostním spektrometru nastaveny parametry ladící metody pro chromatografické separace v záporném módu (kap. 3.2.3.2, tab. 4).

Pro reálné vzorky byla nadále používána kombinace 0,5 ml šťávy s 2,5 ml HCl.

3.4.2 Látky karotenoidního typu

3.4.2.1 Optimalizace SPE extrakce pomocí standardu

Pro optimalizaci extrakční metody izolace karotenoidů byl vybrán standard β -karotenu rozpuštěný v methanolu na výslednou koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Opět byly testovány oba typy SPE extrakčních kolonek – C18 AR a amid-2. Kolony byly promyty 3 ml H_2O (C18) nebo 2 ml MeOH (amid-2); kondicionovány 3 ml MeOH (C18) nebo 2 ml H_2O (amid-2), a poté na ně byly aplikovány různé kombinace objemu vzorku a rozpouštědla podle tabulky 14 (kap. 3.4.1.1). Zachycený β -karoten byl v SPE koloně promyt 2 ml MeOH (C18) nebo 2 ml H_2O (amid-2) a eluován z kolony cyklohexanem (C18) nebo MeOH (amid-2). Schéma optimalizace je uvedeno v tab. 14 (kap. 3.4.1.1), která shrnuje jednak množství aplikovaného vzorku a jednak optimalizaci na objem elučního činidla. Eluční činidlo bylo následně odpařeno na vakuové rotační odparce a odparek byl znovu rozpuštěn v 1-2 ml mobilní fáze (MeOH). Rozpuštěný standard byl nakonec zcentrifugován (3 min, 15 000 rpm), přefiltrován přes jednorázový filtr typu PRE-CUT a poté nanášen na chromatografickou kolonu.

β -karoten byl analyzován na koloně Polaris (tab. 11). Jako mobilní fáze byl použit 100% methanol při průtoku 1,1 ml/min. Pro lepší separaci byla kolona vyhřívána na teplotu 45 °C. Karotenoidy byly nejprve podrobeny spektrofotometrické detekci při vlnové délce 450 nm a optimální kombinace SPE extrakce – 3 ml β -karotenu eluovaného 2 ml cyklohexanu a kolony typu C18 byla aplikována na hmotnostní spektrometr s nastaveným kladným módem (ladící metoda kap. 3.2.3.3, tab. 5).

3.4.2.2 Optimalizace množství vzorku aplikovaného na extrakční kolonu

Pro optimalizaci extrakce karotenoidů z reálného vzorku byla vybrána mrkev, coby rostlinný zdroj s vysokým obsahem dominantního karotenoidu β -karotenu. Šťáva získaná z nastrouhané mrkve byla odstředěna (20 min, 5 000 rpm) a zfiltrována přes skládaný filtr. Extrakce karotenoidů byla provedena smícháním šťávy a testovaného rozpouštědla v určitém poměru (tab. 17) a následnou aplikací vzorku na SPE kolonu C18 AR postupem optimalizovaným v kap. 3.4.2.1. Karotenoidy zachycené na kolonce byly eluovány 2 – 10 ml cyklohexanu, dokud byl eluát zbarvený (kap. 3.4.2.1).

Vzorek byl poté odpařen, zcentrifugován (3 min, 15 000 rpm), přefiltrován přes jednorázové filtry typu PRE-CUT a aplikován na kolonu Polaris (kap. 3.3.1.5, tab. 11) pomocí dávkovacího ventilu integrovaného v hmotnostním spektrometru a dávkovací smyčky o objemu 20 μl za podmínek izokratické eluce (kap. 3.2.3.2). Pro hmotnostní detekci byla využita ladící metoda s parametry v kap. 3.2.3.3, tab. 5.

| | šťáva | šťáva + aceton | | šťáva + ethanol | |
|------------|-------|----------------|--------|-----------------|---------|
| | | šťáva | aceton | šťáva | ethanol |
| objem (ml) | 3 | 0,5 | 2,5 | 0,5 | 2,5 |
| | | 0,5 | 1,5 | 0,5 | 1,5 |
| | | 1,5 | 0,5 | 1,5 | 0,5 |
| | | 2,5 | 0,5 | 2,5 | 0,5 |

Tabulka 17: Různé kombinace extrakčních činidel a šťávy aplikovaných na SPE kolonky.

Pro extrakci karotenoidů z reálných vzorků bylo využíváno kombinace 2,5 ml šťávy a 0,5 ml acetonu.

3.5 Stanovení obsahu polyfenolických a karotenoidních látek v potravinách

3.5.1 Izolace polyfenolických látek z reálné matrice a jejich analýza metodou HPLC/ESI-MS

Polyfenolické sloučeniny byly analyzovány v reálných vzorcích uvedených v tabulce 18. Potravinu byly vybrány na základě literární rešerše obsahu flavonoidů v ovoci, zelenině a jiných potravinách (kap. 2.2.4). Podle materiálové konzistence vzorku byly zpracovány jednotlivé frakce (šťáva, dužina, slupka) zvlášť (tab. 18) a v nich analyzován stejný soubor polyfenolických sloučenin.

| <i>druh ovoce</i> | <i>zpracovávaná část</i> | <i>celková hmotnost (g)</i> | <i>množství vzorku</i> |
|-------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------|
| <i>jablko</i> | <i>šťáva</i> | 89,6 | 0,5 ml |
| | <i>dužina</i> | 28,6 | 25 g |
| | <i>slupka</i> | 17,9 | 17,9 g |
| <i>pomeranč</i> | <i>šťáva</i> | 59,2 | 0,5 ml |
| | <i>dužina</i> | 55,3 | 25 g |
| <i>citron</i> | <i>šťáva</i> | 52,6 | 0,5 ml |
| | <i>dužina</i> | 26,1 | 25 g |
| <i>grep</i> | <i>šťáva</i> | 151,3 | 0,5 ml |
| | <i>dužina</i> | 83,5 | 25 g |
| <i>mandarinka</i> | <i>šťáva</i> | 114 | 0,5 ml |
| | <i>dužina</i> | 53,4 | 25 g |
| <i>brambor</i> | <i>šťáva</i> | 45,1 | 0,5 ml |
| | <i>dužina</i> | 49,3 | 25 g |
| | <i>slupka</i> | 29,8 | 25 g |
| <i>česnek</i> | <i>celý</i> | 23 | 23 g |
| <i>cibule</i> | <i>celá</i> | 112,7 | 25 g |
| <i>paprika</i> | <i>celá</i> | 52,7 | 25 g |
| <i>rajče</i> | <i>celé</i> | 48,3 | 25 g |
| <i>mrkev</i> | <i>šťáva</i> | 50,8 | 0,5 ml |
| | <i>dužina</i> | 63,2 | 25 g |
| <i>káva</i> | <i>mletá</i> | 5,1 | 0,5 ml |
| | <i>zrnková</i> | 5,1 | 5,1 g |

| | | | |
|----------------------------|-------------|-----|--------|
| <i>pivo -Zlatopramen</i> | <i>celé</i> | | 0,5 ml |
| <i>pivo -Branik</i> | <i>celé</i> | | 0,5 ml |
| <i>slunečnicová semena</i> | <i>celá</i> | 5,0 | 5,0 g |
| <i>dýňová semena</i> | <i>celá</i> | 5,0 | 5,0 g |

Tabulka 18: Jednotlivé reálné vzorky a jejich navážky.

Pro primární úpravu vzorku byl vypracován základní postup (kap. 3.4.1.2), který byl podle potřeby částečně modifikován v závislosti na druhu matrice (pevná, kapalná).

V případě zpracování šťávy bylo na SPE kolonu aplikováno 0,5 ml šťávy extrahované 2,5 ml 2% HCl (kap. 3.4.1.3). Vzorek byl aplikován na SPE amidovou kolonu dle optimálních podmínek extrakce uvedených v kap. 3.4.1.1. Extrakt byl dále zpracováván postupem v kap. 3.4.1.2, aby mohlo dojít k jeho aplikaci na kolonu Restek (tab. 11, kap. 3.3.1.5), separaci za podmínek gradientové eluce (kap. 3.3.1.4) a následné MS detekci (kap. 3.2.3.2, tab. 4).

25 g dužiny bylo ve třecí misce rozetřeno s 10 ml 2% HCl. Vzorek byl zfiltrován přes gázu, zcentrifugován (20 min při 5 000 rpm) a přefiltrován přes skládaný filtr. 0,5 ml filtrátu bylo smícháno s 2,5 ml 2% HCl. Aplikace na kolonky SPE a následná analýza byla provedena stejným postupem jako při zpracování šťávy.

V případě možnosti využití slupky, byla tato rozmělněna v třecí misce s příslušným množstvím 2% HCl. Poté byla zpracována a detekována za stejných podmínek jako dužina.

3.5.2 SPE extrakce karotenoidů z reálné matrice

Pro izolaci karotenoidních látek byly vybrány 5 druhů zeleniny a 4 citrusové plody uvedené v tabulce 19. V závislosti na materiálové konzistenci vzorku byly zpracovány jednotlivé frakce zvlášť (šťáva, dužina) a v nich analyzován stejný soubor karotenoidních sloučenin.

| <i>druh ovoce</i> | <i>zpracovávaná část</i> | <i>celková hmotnost (g)</i> | <i>množství vzorku</i> |
|-------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------|
| <i>paprika</i> | <i>šťáva</i> | 32,4 | 2,5 ml |
| | <i>dužina</i> | 25,0 | 25 g |
| <i>rajče</i> | <i>celé</i> | 44,4 | 25 g |
| <i>mrkev</i> | <i>šťáva</i> | 50,8 | 2,5 ml |
| | <i>dužina</i> | 25,0 | 25 g |
| <i>cibule</i> | <i>dužina</i> | 112,7 | 2,5 ml |
| <i>brambor</i> | <i>šťáva</i> | 45,1 | 2,5 ml |
| <i>gřep</i> | <i>šťáva</i> | 151,3 | 2,5 |
| <i>pomeranč</i> | <i>šťáva</i> | 59,2 | 2,5 |
| <i>mandarinka</i> | <i>šťáva</i> | 114,0 | 2,5 |

| | | | |
|---------------|--------------|------|-----|
| <i>citrón</i> | <i>šťáva</i> | 52,6 | 2,5 |
|---------------|--------------|------|-----|

Tabulka 19: Analyzované druhy zeleniny a jejich navážky.

Pro primární úpravu vzorku byl vypracován základní postup (kap. 3.4.2.2), který byl podle potřeby částečně modifikován v závislosti na druhu zpracovávané matrice.

2,5 ml získané šťávy bylo následně extrahováno 0,5 ml acetonu a nanášeno na SPE kolonu typu C18 podle optimalizovaných podmínek uvedených v kapitole 3.4.2.1. Vzorek upravený podle kapitoly 3.4.2.2 byl aplikován na kolonu Polaris (kap. 3.3.1.5, tab. 11) za podmínek izokratické eluce a hmotnostní detekce uvedených v kap. 3.4.2.1.

25 g dužiny bylo ve třecí misce rozetřeno s 25 ml 2% HCl, směs byla zfiltrována přes gázu, 20 min centrifugována při 5 000 rpm a přefiltrována přes skládaný filtr. 2,5 ml filtrátu bylo extrahováno 0,5 ml acetonu a aplikace na SPE kolonu byla provedena stejným postupem jako při zpracování šťávy.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Analýza standardních látek – mód MS full scan a MSⁿ full scan

Všechny standardy byly podrobeny analýze MS full scan za podmínek uvedených v kapitole 3.3.1.1 pro flavonoidy a 3.3.2.1 pro karotenoidy. Získané výsledky byly zpracovány do tabulky 20, která shrnuje kvazi-molekulární ionty jednotlivých standardních látek v záporném a kladném módu. Příslušná hmotnostní spektra jsou v příloze 2 a3.

| <i>standard</i> | <i>m/z pro (-) mód</i> | <i>m/z pro (+) mód</i> |
|------------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>apigenin</i> | 269 | 271 |
| <i>β-karoten</i> | 536 | 538 |
| <i>epikatechin</i> | 289 | 291 |
| <i>fisetin</i> | 285 | 287 |
| <i>kaempferol</i> | 285 | 287 |
| <i>katechin</i> | 289 | 291 |
| <i>kvercetin</i> | 301 | 303 |
| <i>kyselina gallová</i> | 169 | 171 |
| <i>kyselina chlorogenová</i> | 353 | 355 |
| <i>morin</i> | 301 | 303 |
| <i>myricetin</i> | 317 | 319 |
| <i>naringenin</i> | 271 | 273 |
| <i>phlorizin</i> | 434 | 436 |
| <i>prokyanidin</i> | 577 | 579 |
| <i>rutin</i> | 609 | 611 |

Tabulka 20: Kvazi-molekulární ionty jednotlivých standardů.

Za podmínek uvedených v kapitole 3.3.1.2 pro flavonoidy a 3.3.2.2 pro karotenoidy byl na standardní látky aplikován mód MS² full scan. Charakteristické štěpy pro jednotlivé standardy byly shrnuty do tabulky 21 pro fragmentaci v záporném módu a 22 v kladném módu. Hmotnostní spektra s příslušnými fragmenty jsou v příloze 4 a 5.

| <i>standard</i> | <i>epikatechin</i> | <i>fisetin</i> | <i>kaempferol</i> | <i>katechin</i> | <i>kvercetin</i> | <i>kyselina chlorogenová</i> | <i>morin</i> | <i>myricetin</i> | <i>rutin</i> |
|----------------------------------|--------------------|----------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| $[M-H]^-$ | 289 | 285 | 285 | 289 | 301 | 353 | 301 | 317 | 609 |
| $^{0,4}A^-$ | - | - | - | - | 107 | - | - | - | - |
| $^{1,2}A^-$ | - | 163 | - | - | 179 | - | - | - | - |
| $^{1,2}B^-$ | - | - | - | - | 121 | - | - | 179 | - |
| $^{1,3}A^-$ | - | - | 151 | - | 151 | - | - | - | - |
| $[M-H-15]^- (-CH_3)$ | - | - | - | - | - | 339 | - | - | - |
| $[M-H-18]^- (-H_2O)$ | 271 | - | - | 271 | - | - | - | 299 | - |
| $[M-H-28]^- (-CO)$ | 217 | - | 257 | - | 273 | - | 273 | 289 | - |
| $[M-H-44]^- (-CO_2)$ | 245 | - | - | 245 | 257 | 309 | 257 | - | - |
| $[M-H-56]^- (-CO-CO)$ | - | 229 | 229 | - | - | - | - | - | - |
| $[M-H-62]^- (-CO_2-H_2O)$ | - | - | - | 227 | 239 | - | - | - | - |
| $[M-H-72]^- (-CO_2CO)$ | - | 213 | - | - | - | - | 229 | 245 | - |
| $[M-H-162]^- (-C_9O_3H_6)$ | - | - | - | - | - | 191 | - | - | - |
| $[M-H-308]^- (-C_{12}O_9H_{20})$ | - | - | - | - | - | - | - | - | 301 |

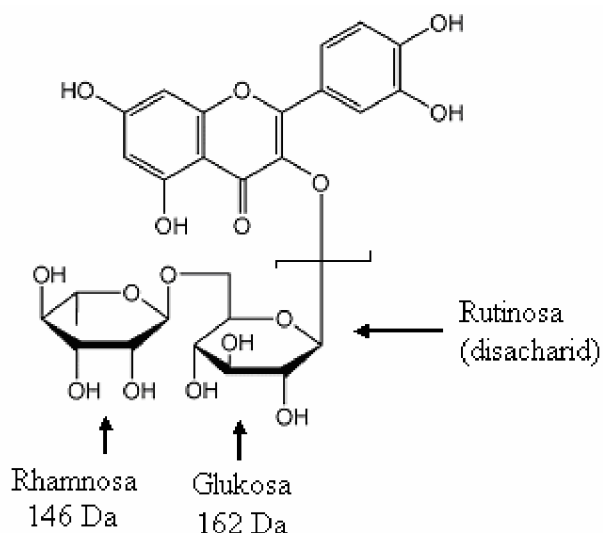
Tabulka 21: Kvasi-molekulární ionty a charakteristické fragmenty všech standardních látek v záporném módu.

| <i>standard</i> | <i>epikatechin</i> | <i>fisetin</i> | <i>kaempferol</i> | <i>katechin</i> | <i>kvercetin</i> | <i>morin</i> | <i>myricetin</i> |
|---------------------------|--------------------|----------------|-------------------|-----------------|------------------|--------------|------------------|
| $[M+H]^+$ | 291 | 287 | 287 | 291 | 303 | 303 | 319 |
| $^{0,2}A^+$ | 151 | - | 165 | - | 165 | - | 165 |
| $^{0,2}B^+$ | 139 | - | 121 | - | 137 | - | 153 |
| $^{1,3}A^+$ | - | - | 153 | - | 153 | 153 | 153 |
| $^{1,4}B^+$ | - | - | - | 165 | - | - | - |
| $[M+H-18]^+(-H_2O)$ | 273 | 269 | - | 273 | - | 285 | 301 |
| $[M+H-42]^+(-C_2H_2O)$ | - | - | - | 249 | - | - | - |
| $[M+H-46]^+(-CO-H_2O)$ | - | 241 | 241 | - | 257 | 257 | 273 |
| $[M+H-56]^+(-CO-CO)$ | - | - | 231 | - | 247 | - | 263 |
| $[M+H-74]^+(-CO-CO-H_2O)$ | - | - | 213 | - | 229 | - | 245 |

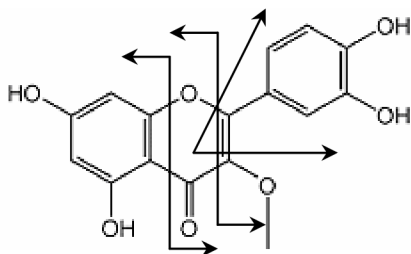
Tabulka 22: Kvazi-molekulární ionty a charakteristické fragmenty všech standardních látek v kladném módu.

Na základě nomenklatury pro fragmenty vzniklé z kvazi-molekulárních štěpů [5], byl vytvořen návrh štěpení pro jednotlivé standardy. Fragmentace látek byla provedena za účelem identifikace látek ve směsi a reálných vzorcích, a to především v případě, kdy by docházelo ke koeluci více látek o stejném poměru m/z .

Příkladem fragmentace provedené v záporném módu je štěpení diglykozidu kvercetinu – rutin. Po aplikaci kolizní energie na tuto sloučeninu byly odštěpeny dvě sacharidické jednotky (obr. 19), a proto byla hodnota m/z dominantního produktového iontu v MS/MS spektru rovna 301. Po aplikaci módu MS³ byl fragment 301 odpovídající m/z aglykonovému kvercetinu rozštěpen na produktové ionty odpovídající právě tomuto flavonolu (tab. 21; obr. 20).



Obr. 19: Návrh štěpení rutinu v módu MS².



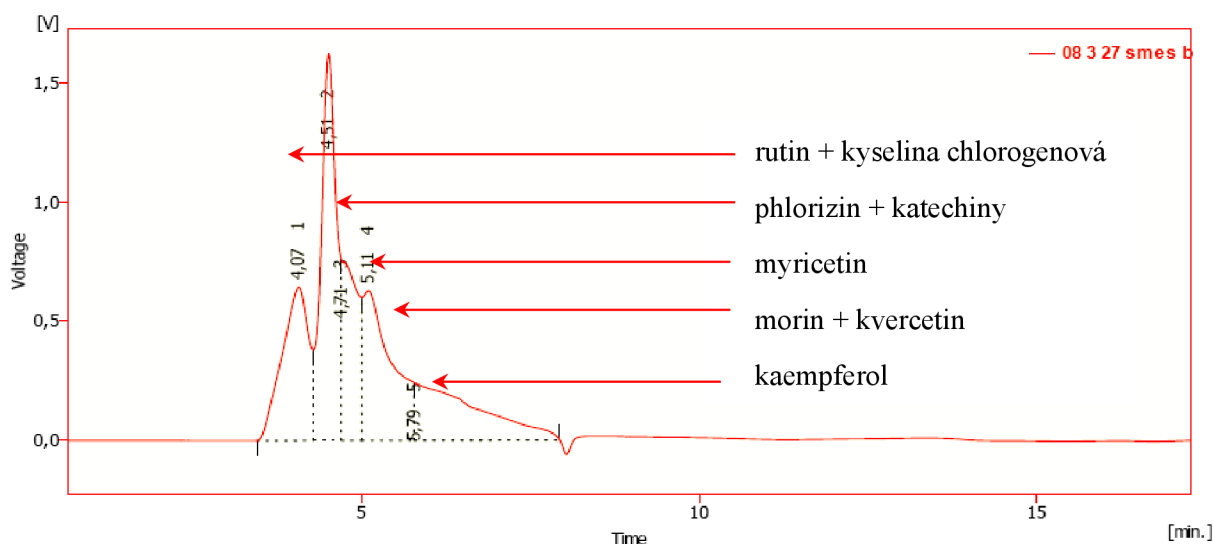
Obr. 20: Návrh štěpení kvercetinu v módu MS³.

4.2 Optimalizace chromatografické separace pro flavonoidní sloučeniny

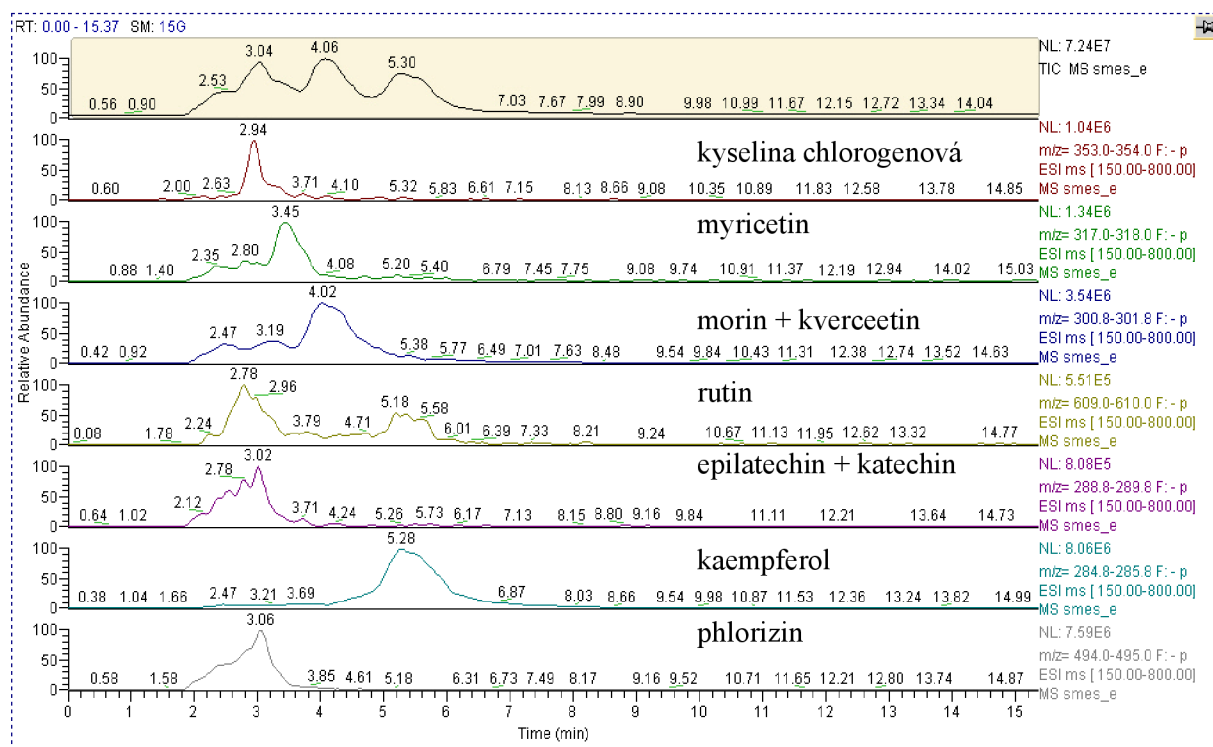
4.2.1 Změna složení mobilní fáze

4.2.1.1 Optimalizace poměru rozpouštědel v mobilní fázi

Mobilní fáze o různém poměru jednotlivých složek (schéma pokusu tab. 8, kap. 3.3.1.3) byly testovány za podmínek izokratické eluce na chromatografické koloně Polaris. Při použití mobilní fáze obsahující jakoukoliv koncentraci methanolu byly komponenty eluovány z kolony prakticky v jednom okamžiku (příloha 6). K nejlepší separaci standardů došlo při použití mobilní fáze 4, která neobsahovala methanol vůbec (obr. 21, 22). Pro další chromatografické separace byla tedy použita směs AcN:1% HAc v poměru (50:50).



Obr.21: Optimalizace složení mobilní fáze z hlediska obsahu methanolu – UV/VIS chromatogram při 280 nm s následnou MS detekcí

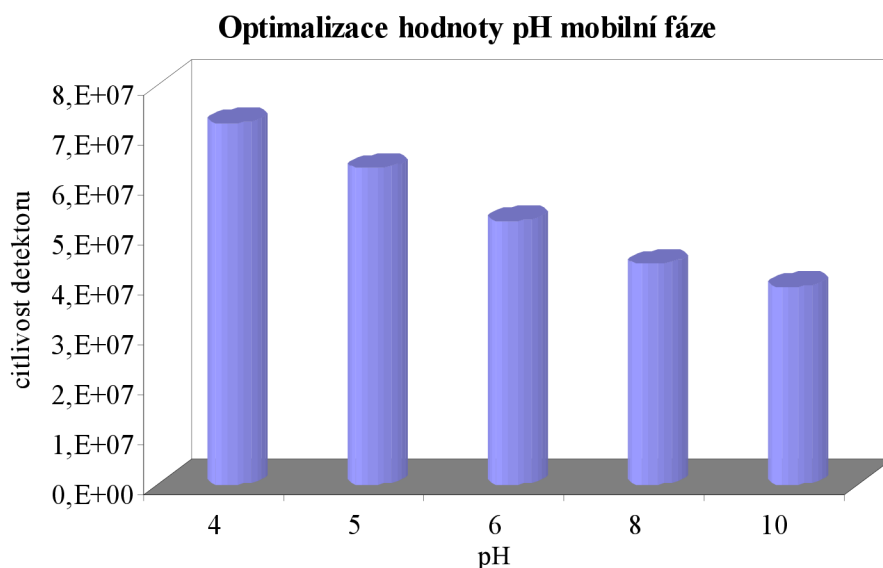


Obr. 22: Optimální složení mobilní fáze z hlediska obsahu methanolu.

4.2.1.2 Optimalizace pH mobilní fáze

Na chromatografickou kolonu Polaris byly aplikovány mobilní fáze o základním složení acetonitril:voda 50:50 o pH 4-10. Se vzrůstající hodnotou pH měly píky jednotlivých standardních látek neostrý průběh a docházelo k jejich rozmývání (příloha 7). Citlivost hmotnostního detektoru za použití ladící metody na kyselinu chlorogenovou (kap. 3.2.3.2)

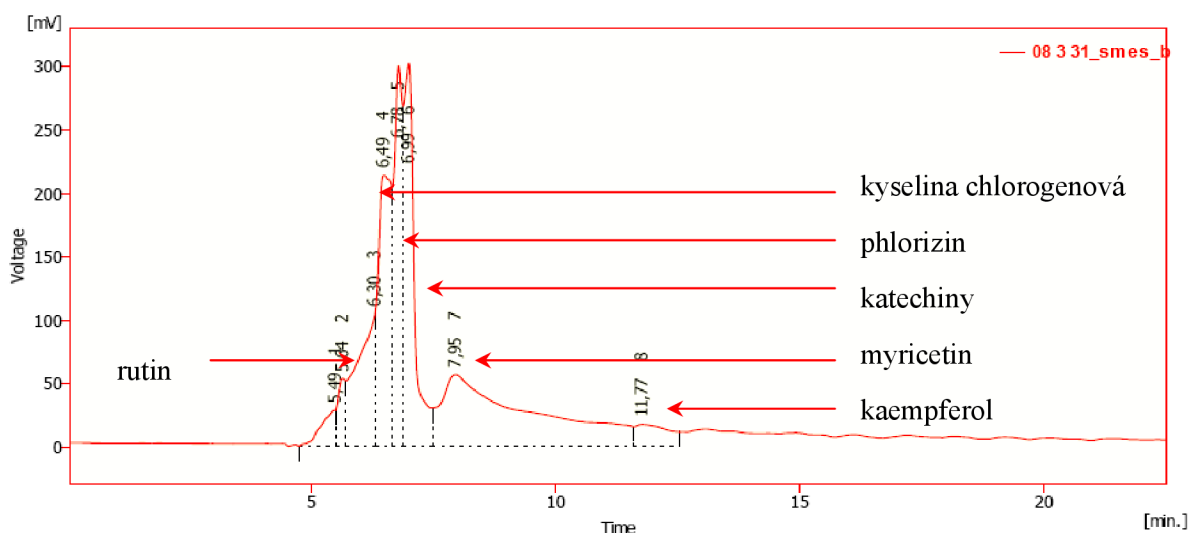
byla pro mobilní fázi o pH 4 nejvyšší (graf 1) a také proto byla tato mobilní fáze vybrána pro další separace.



Graf 1: Závislost citlivosti detektoru na hodnotě pH mobilní fáze

4.2.2 Gradientová eluce standardních látek

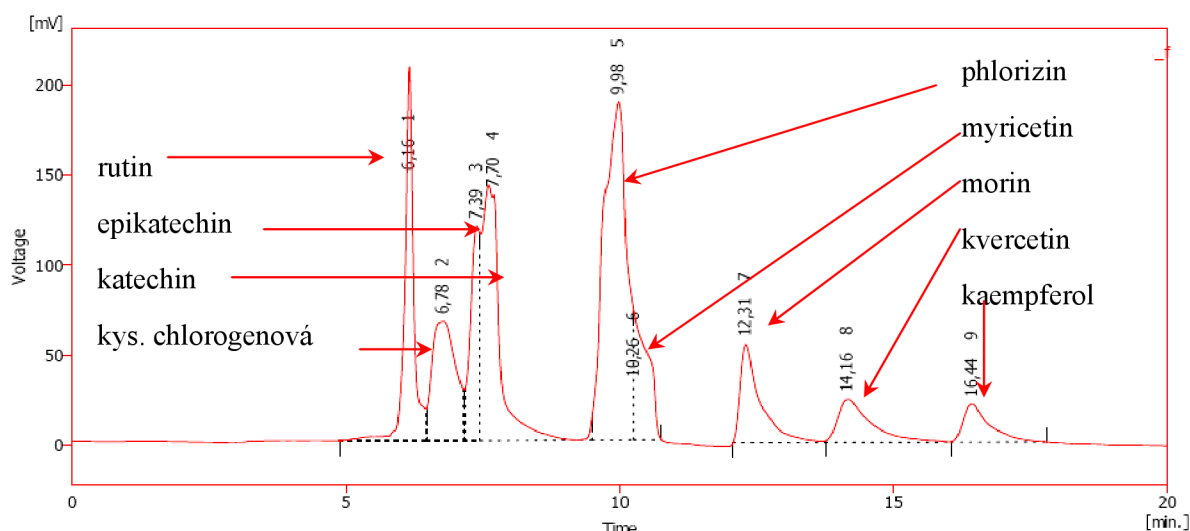
Pro optimalizaci separace jednotlivých látek bylo na chromatografickou kolonu aplikováno několik typů gradientů. Jako nejlepší byl vybrán gradient uvedený v kapitole 3.3.1.4, tabulka 10. Vybrané nastavení gradientové eluce směsi standardů umožnilo postupnou separaci jednotlivých sloučenin, jaké bylo možné dosáhnout na univerzálním typu chromatografické kolony Polaris C18-A (obr. 23). Detekce probíhala spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm.



Obr. 23: Gradientová eluce vybraných standardů aplikovaných na kolonu Polaris - UV-VIS detekce – (280 nm)

4.2.3 Výběr chromatografické kolony

Vzhledem k tomu, že separace i přes aplikovanou gradientovou eluci byla na koloně Polaris nedostatečná, byly voleny jiné typy chromatografických kolon o jiném zrnění, rozměrech a ve finále i s modifikovanou stacionární fází (kap. 3.3.1.5, tab. 11). Nejlepší rozdělení standardů bylo pozorováno na koloně Restek, což je patrné z chromatogramu UV-VIS detekce – obr. 24. Ostatní kolony neměly tak vysokou separační schopnost.

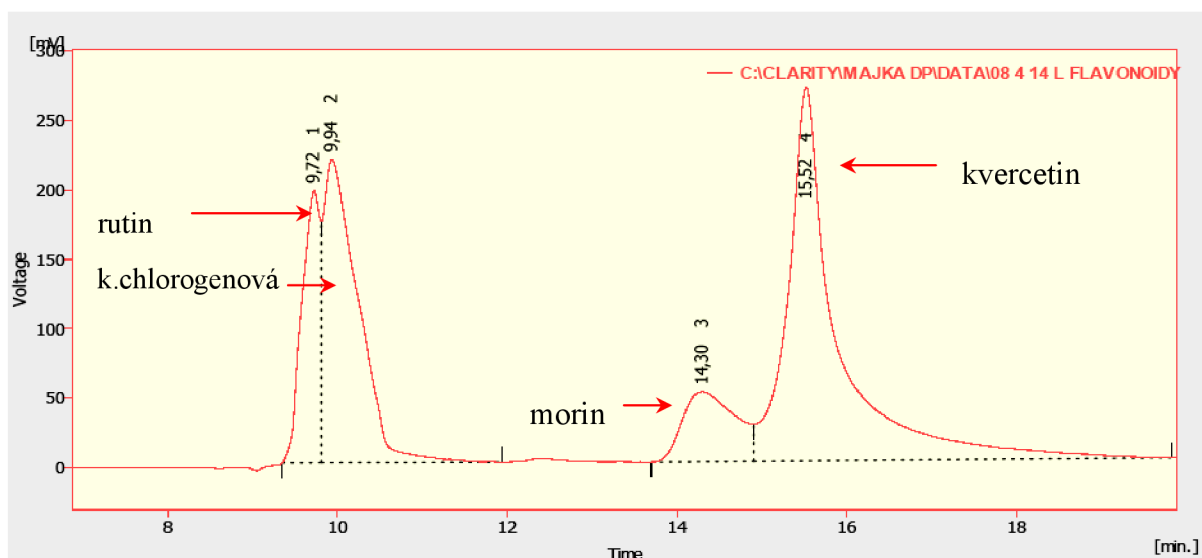


Obr. 24: Gradientová eluce na koloně Restek.- UV-VIS detekce (280 nm).

4.3 Konfrontace off-line a on-line separace

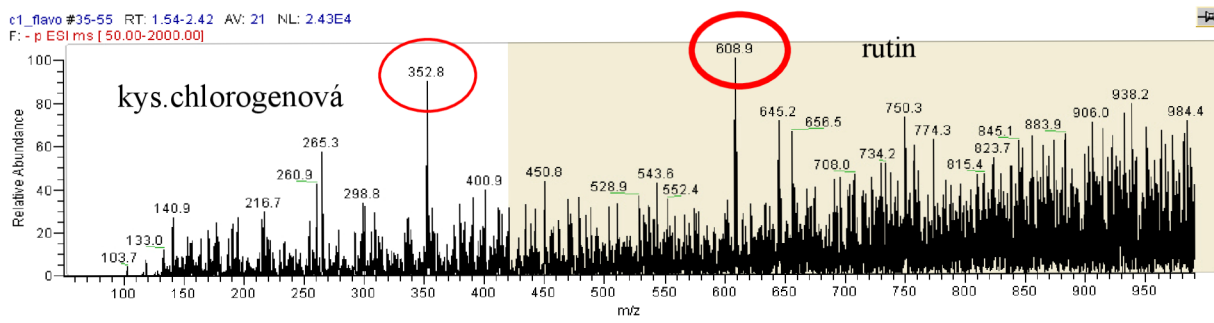
4.3.1 Off-line separace

Spektrofotometrická detekce 4 standardních látek separovaných pomocí gradientové eluce a kolony Restek (kap. 3.3.1.6) je znázorněna na obr. 23.

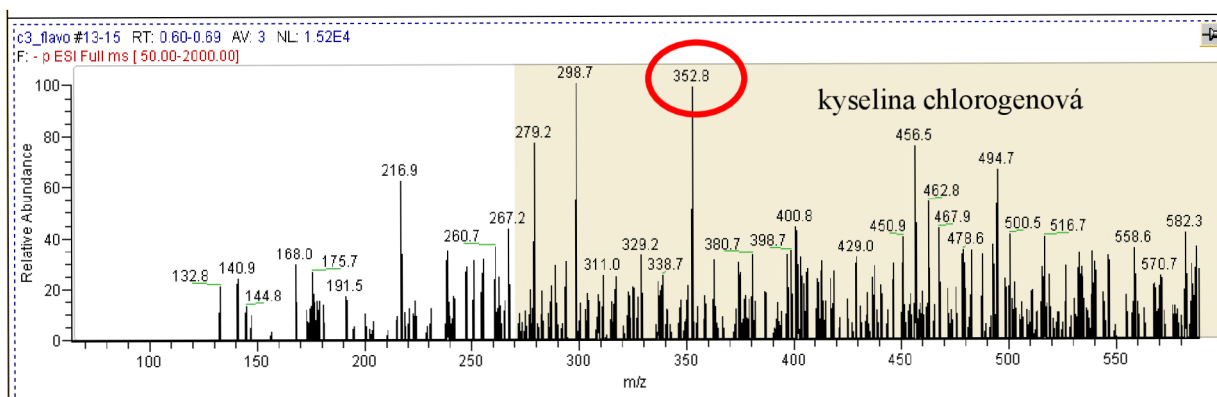


Obrázek 25: Off-line analýza rutinu, morinu, kvercetinu a kyseliny chlorogenové.

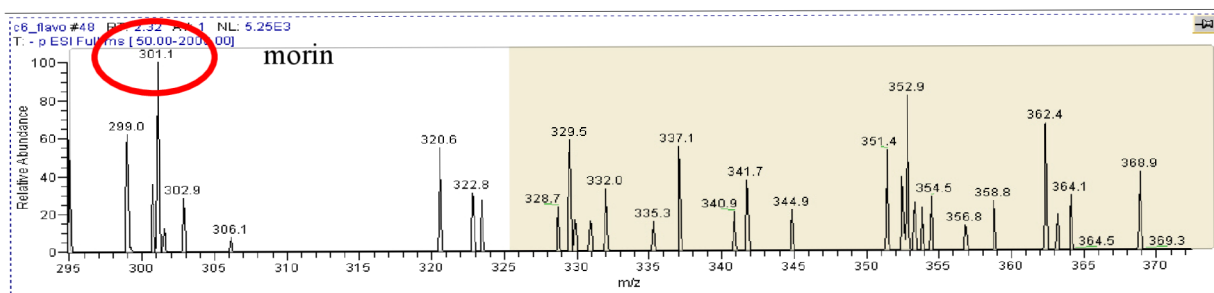
Z chromatogramu (obr. 25) je patrné, že došlo k částečnému oddělení rutinu ($R_t = 9,72$) a kyseliny chlorogenové ($R_t = 9,94$) a úplnému oddělení morinu ($R_t = 14,30$) a kvercetinu ($R_t = 15,52$). Hmotnostní spektra jednotlivých frakcí jsou na obr. 26-29.



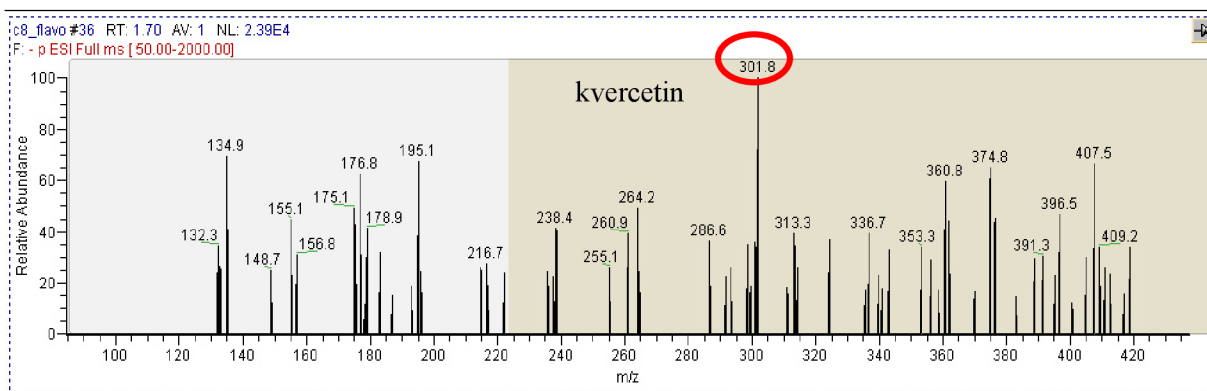
Obr. 26: Off-line analýza – rutin



Obr. 27: Frakce kyseliny chlorogenové.



Obr. 28: Frakce morinu

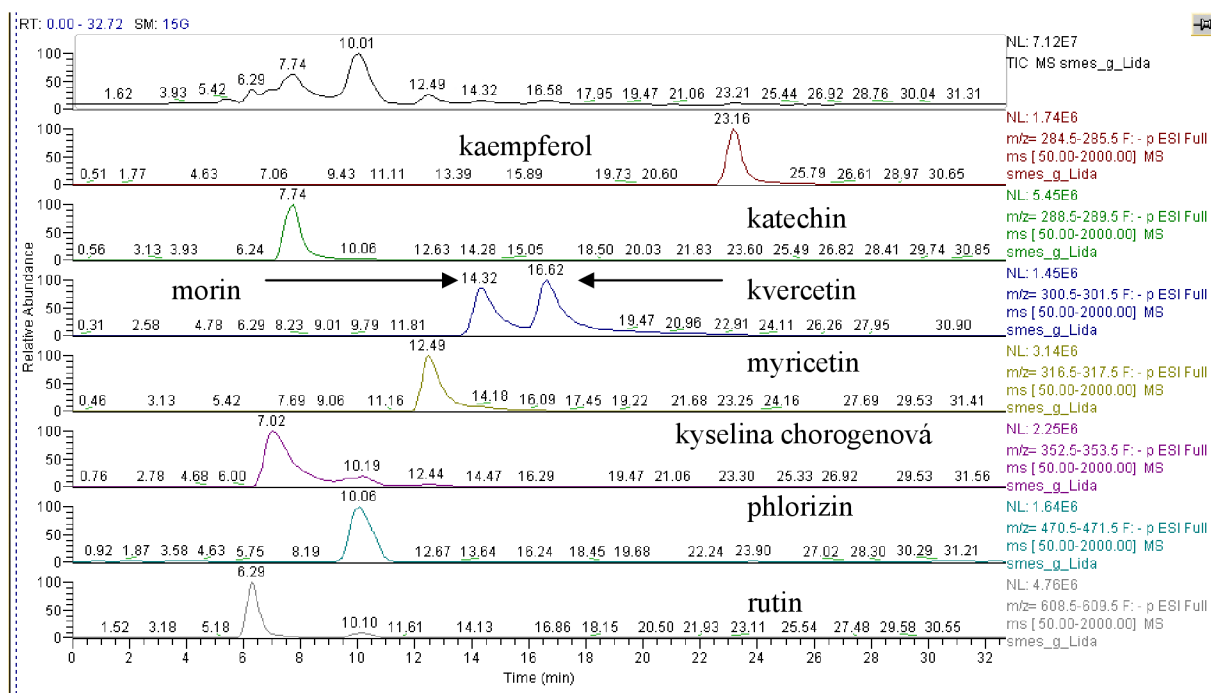


Obr. 29: Frakce kvercetinu.

Z hmotnostních spekter na obr. 26 - 29 je patrné, že off-line analýza neposkytla frakce s dostatečně oddělenými standardními látkami a kvalita a hlavně citlivost detekce byla velmi nízká. Silnou koeluci vykazovala hlavně kyselina chlorogenová s rutinem, což dokazuje i obr. 26. Ze zmíněných důvodů nebyla tato metoda dále rozváděna a přistoupilo se k on-line analýze flavonoidních látek i v případě analýzy reálných vzorků.

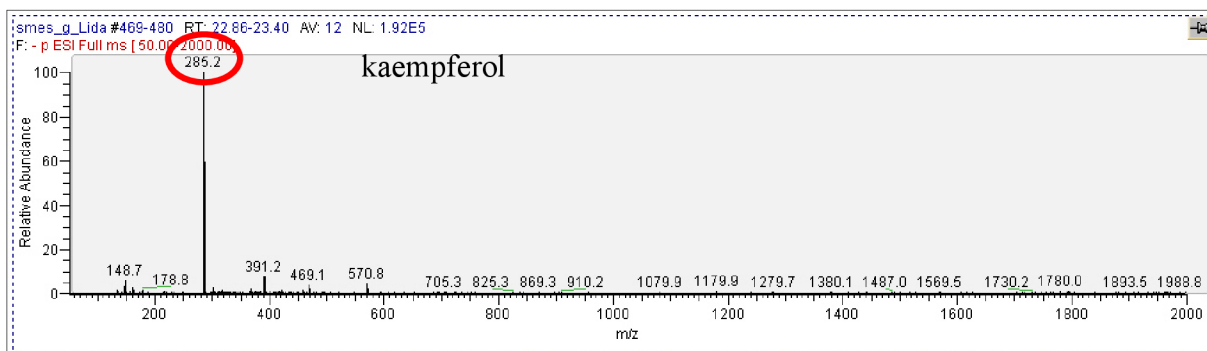
4.3.2 On-line separace sloučenin

Chromatografická separace sloučenin na koloně Restek s modifikovanou stacionární fází za podmínek gradientové eluce (kap. 3.3.1.4, tab. 10) a hmotnostní detekce v záporném módu (3.2.3.2) je znázorněna na obr. 30.

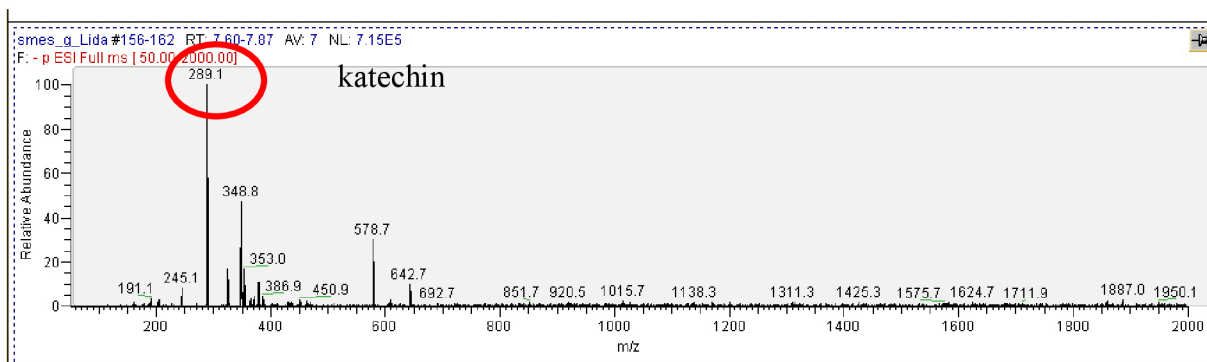


Obr. 30: Gradientová eluce polyfenolů na koloně Restek.

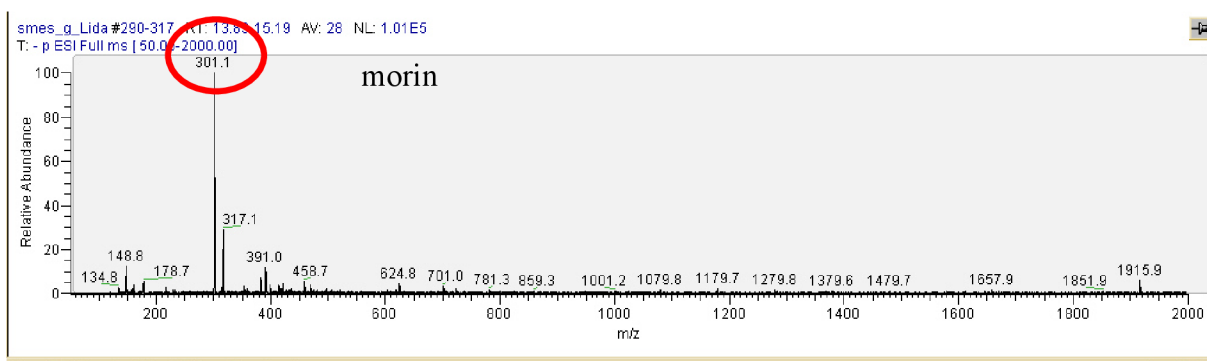
Z chromatogramu na obr. 30 je patrné, že jednotlivé složky byly dostatečně rozděleny a ke koeluci docházelo pouze v omezeném množství. Hmotnostní spektra jednotlivých standardů jsou znázorněna na obr. 31-38.



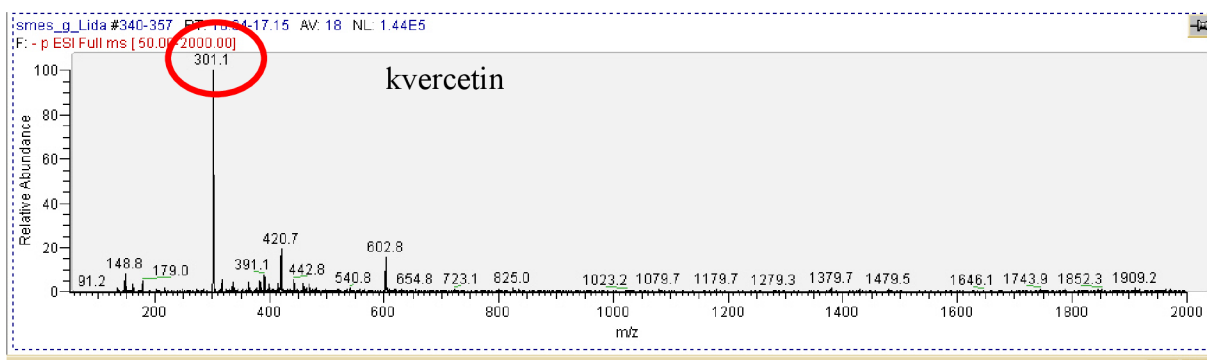
Obr. 31: On-line analýza v záporném módu –kaempferol.



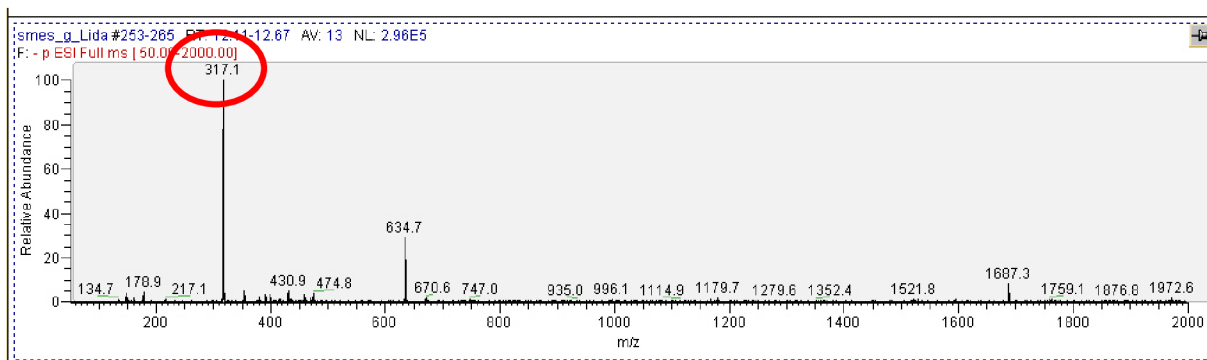
Obr. 32: On-line analýza v záporném módu –catechin.



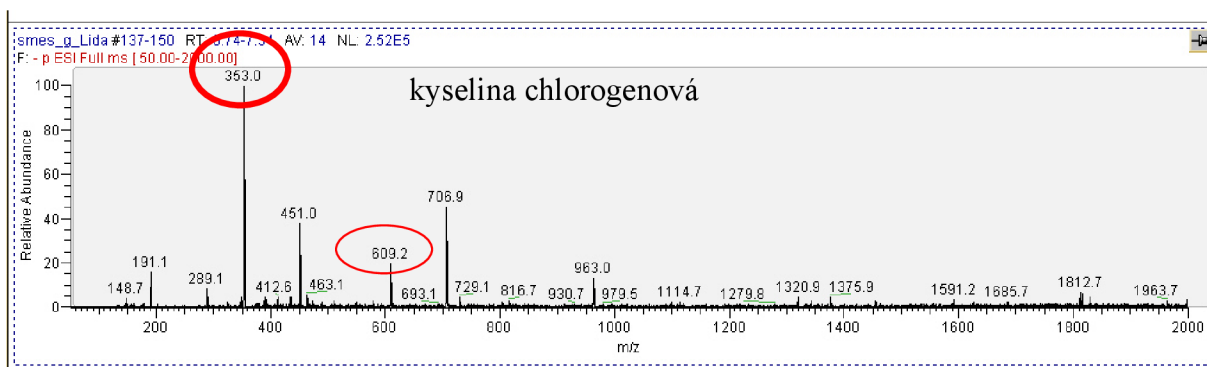
Obr. 33: On-line analýza v záporném módu –morin.



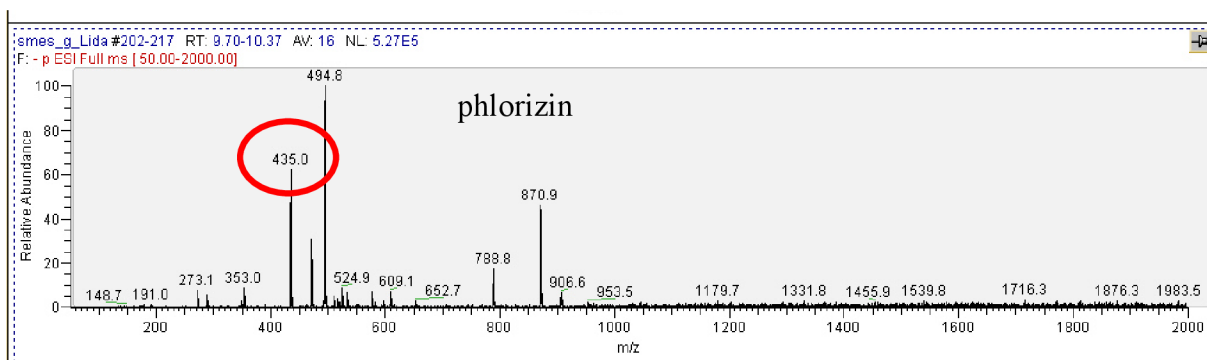
Obr. 34: On-line analýza v záporném módu –kvercetin.



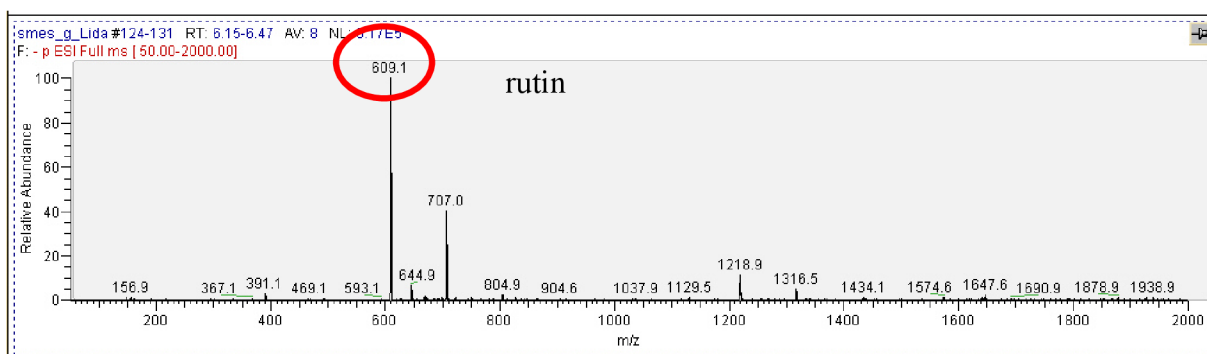
Obr. 35: On-line analýza v záporném módu –myricetin.



Obr. 36: On-line analýza v záporném módu –kyselina chlorogenová.



Obr. 37: On-line analýza v záporném módu –phlorizin.



Obr. 38: On-line analýza v záporném módu –rutin.

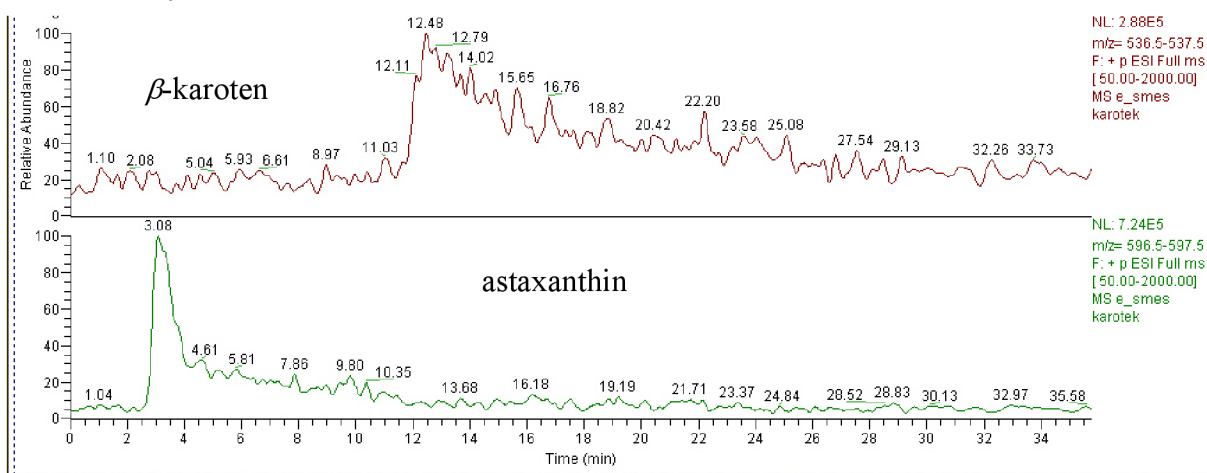
Přiložená hmotnostní spektra (obr. 31 – 38) vykazují mnohem vyšší citlivost a selektivitu pro jednotlivé standardní látky oproti off-line uspořádání. Koeluze sloučenin nebyla absolutně

vyloučena, což dokazuje například spektrum kyseliny chlorogenové (obr. 36), jelikož se její retenční čas je velmi podobný retenčnímu času rutinu. Byla však velmi silně potlačena oproti analýzám tytu off-line.

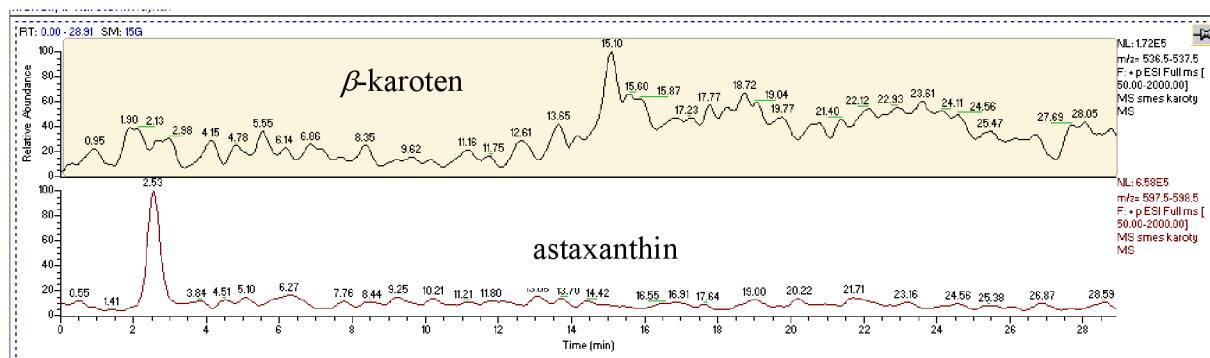
4.4 Chromatografická separace karotenoidních látek

4.4.1 Složení mobilní fáze

Separace karotenoidních sloučenin byla testována na koloně Labio a Polaris za izokratických podmínek (kap. 3.3.2.3). Při eluci karotenoidů mobilní fází obsahující jakékoliv procento vody byly sloučeniny zadržovány v koloně. Proto byla ze tří testovaných směsí (kap. 3.3.2.3) vybrána mobilní fáze obsahující čistý methanol a 0,5 % ledové kyseliny octové. Výsledné dělení je znázorněno na obr. 39 a 40, detekce byla provedena hmotnostně-spektrometricky.



Obr. 39: Separace karotenoidů – kolona Labio



Obr. 40: Separace karotenoidů – kolona Polaris

Pro nižší spotřebu mobilní fáze a lepší chromatografickou odezvu byla vybrána pro separaci karotenoidů z reálných vzorků kolona Polaris.

4.5 Kalibrační křivky standardních látek polyfenolů a karotenoidů a stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

Pro jednotlivé standardy polyfenolů byla změřena závislost plochy píku na koncentraci standardu v roztoku. Hodnoty byly zpracovány do grafické závislosti (příloha 8) a byly vypočteny jednotlivé regresní rovnice (tab. 23).

| <i>standard</i> | <i>regresní rovnice</i> | <i>mez detekce</i> | <i>mez stanovitelnosti</i> | |
|--------------------------|------------------------------------|------------------------|----------------------------|------|
| <i>morin</i> | $y = 1\,093\,164x + 2\,345\,599$ | $1,061 \cdot 10^{-03}$ | $3,538 \cdot 10^{-03}$ | (1) |
| <i>rutin</i> | $y = 2\,875\,307x + 9\,118\,675$ | $1,154 \cdot 10^{-03}$ | $3,848 \cdot 10^{-03}$ | (2) |
| <i>kvercetin</i> | $y = 56\,752\,067x + 10\,839\,003$ | $5,272 \cdot 10^{-03}$ | $1,757 \cdot 10^{-02}$ | (3) |
| <i>myricetin</i> | $y = 3\,359\,405x - 23\,822$ | $1,185 \cdot 10^{-03}$ | $3,951 \cdot 10^{-03}$ | (4) |
| <i>epikatechin</i> | $y = 5\,142\,570x + 6\,376\,674$ | $3,872 \cdot 10^{-03}$ | $1,291 \cdot 10^{-02}$ | (5) |
| <i>katechin</i> | $y = 2\,213\,171x + 681\,737$ | $3,123 \cdot 10^{-03}$ | $1,041 \cdot 10^{-02}$ | (6) |
| <i>kys. chlorogenová</i> | $y = 2\,744\,235x + 12\,381\,945$ | $3,831 \cdot 10^{-04}$ | $1,277 \cdot 10^{-03}$ | (7) |
| <i>kaempferol</i> | $y = 9\,257\,036x + 2\,929\,939$ | $3,903 \cdot 10^{-03}$ | $1,301 \cdot 10^{-02}$ | (8) |
| <i>phlorizin</i> | $y = 7\,904\,557x + 4\,539\,156$ | $1,101 \cdot 10^{-02}$ | $3,671 \cdot 10^{-02}$ | (9) |
| <i>kys. gallová</i> | $y = 55\,991x + 65\,664$ | $4,681 \cdot 10^{-03}$ | $1,560 \cdot 10^{-02}$ | (10) |
| <i>fisetin</i> | $y = 2\,301\,645x + 4\,438\,917$ | $1,606 \cdot 10^{-03}$ | $5,355 \cdot 10^{-03}$ | (11) |
| <i>apigenin</i> | $y = 5\,177\,363x + 6\,651\,359$ | $3,825 \cdot 10^{-03}$ | $1,275 \cdot 10^{-02}$ | (12) |
| <i>naringenin</i> | $y = 5\,493\,598x + 1\,090\,118$ | $4,721 \cdot 10^{-03}$ | $1,574 \cdot 10^{-02}$ | (13) |
| <i>b-karoten</i> | $y = 170087x + 821919$ | $2,262 \cdot 10^{-03}$ | $7,539 \cdot 10^{-03}$ | (15) |

Tabulka 23: Regresní rovnice, mez detekce a stanovitelnosti pro standardní látky.

Pro určení meze detekce a meze stanovitelnosti byly proměřeny výšky šumu na základní linii a z naměřených hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka, jejíž hodnota byla dále použita. Pro každou látku byly vypočteny meze detekce a meze stanovitelnosti a výsledky byly shrnuty do tabulky 23.

Průměrná výška – šumu na základní linii byla $y = (547,1 \pm 94,7)$ relativního množství. Mez detekce byla vypočtena podle vztahu $LOD = (3 \cdot h_n)/m$, $h_n = 94,7$ a $m =$ směrnice regresní přímky. Mez stanovitelnosti byla vypočtena podle vztahu $LOQ = (10 \cdot h_n)/m$ se symboly m , h_n se stejným významem.

Zvypočtených údajů vyplývá, že veškeré hladiny antioxidantů dosáhly koncentrací vyšších, než jsou limitní hodnoty, a proto lze považovat hmotnostní spektra za hodnotitelné.

4.6 Optimalizace SPE extrakce

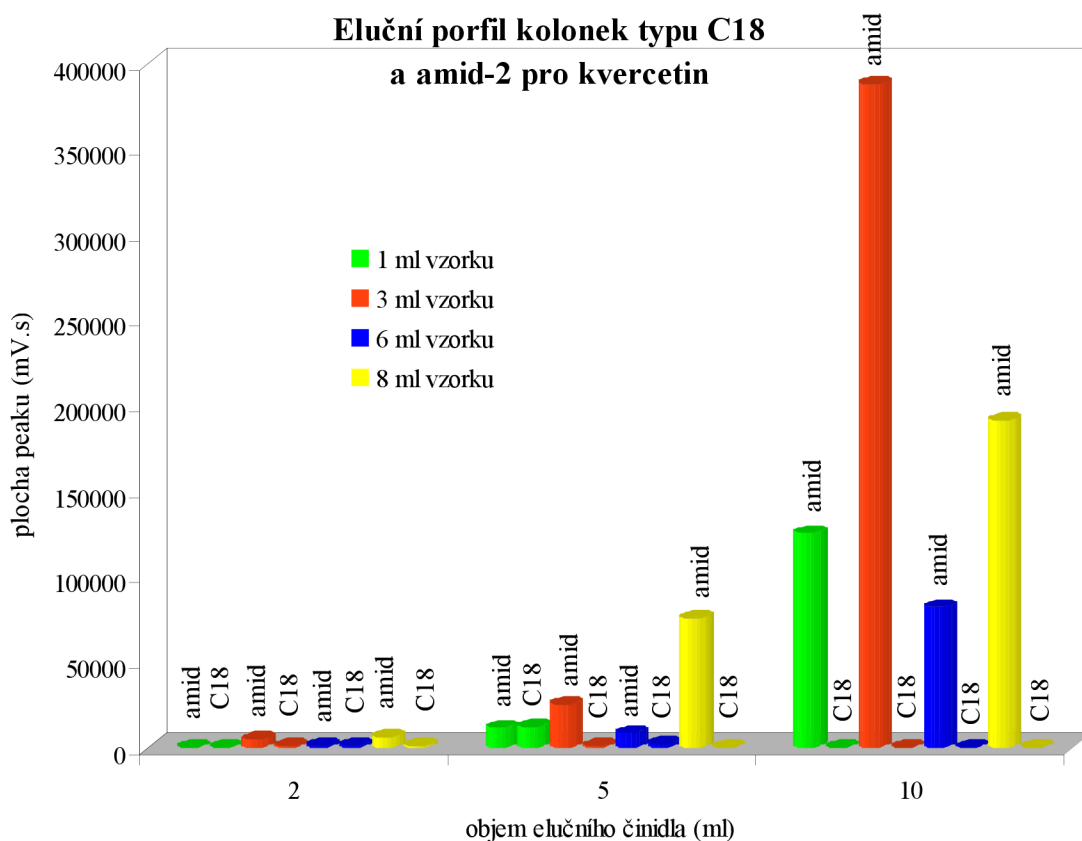
4.6.1 Polyfenolické sloučeniny

4.6.1.1 Standardní sloučenina - kvercetin

Pro optimalizaci extrakční metody byl aplikován kvercetin na dva typy SPE kolonek (kap.3.4.1.1). Z grafu 148 je zřejmé, že pro izolaci flavonoidních struktur jsou vhodné kolony s amidovým typem sorbentu, které byly schopny zadržet větší množství kvercetinu. Dalším kritériem byl objem elučního činidla, kde se ukázalo, že vymytí 2 a 5 ml rozpouštědla bylo zanedbatelné oproti eluci 10 ml. Posledním hlediskem byl objem aplikovaného vzorku

kvercetin na kolonu, jehož optimální hodnota byla 3 ml. Druhou nejvyšší hodnotou byl objem 8 ml.

Optimální se tedy ukázala být kombinace 3 ml kvercetin aplikovaného na SPE kolonu amid-2 eluovaného 10 ml methanolu. Proto byla pro následující optimalizaci množství ovocné šťávy vybrána právě kolonka typu amid-2 a eluce 10 ml činidla.



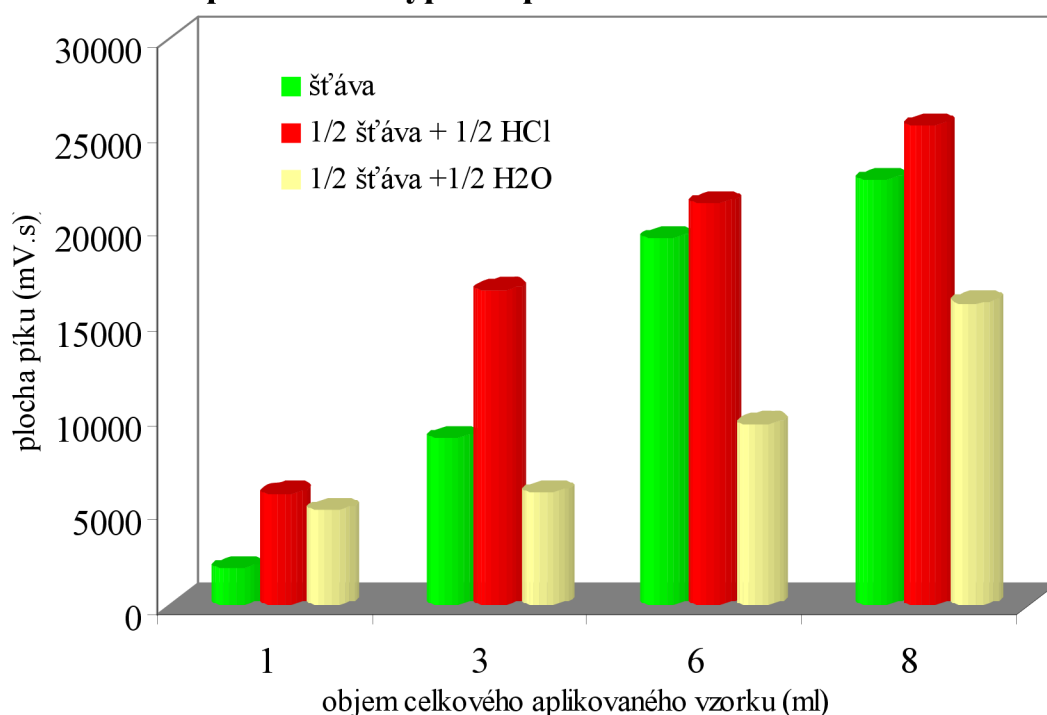
Graf 2: Různé objemy kvercetin aplikovaného na amidové SPE kolonky.

4.6.1.2 Optimalizace izolace polyfenolických látek z reálných vzorků

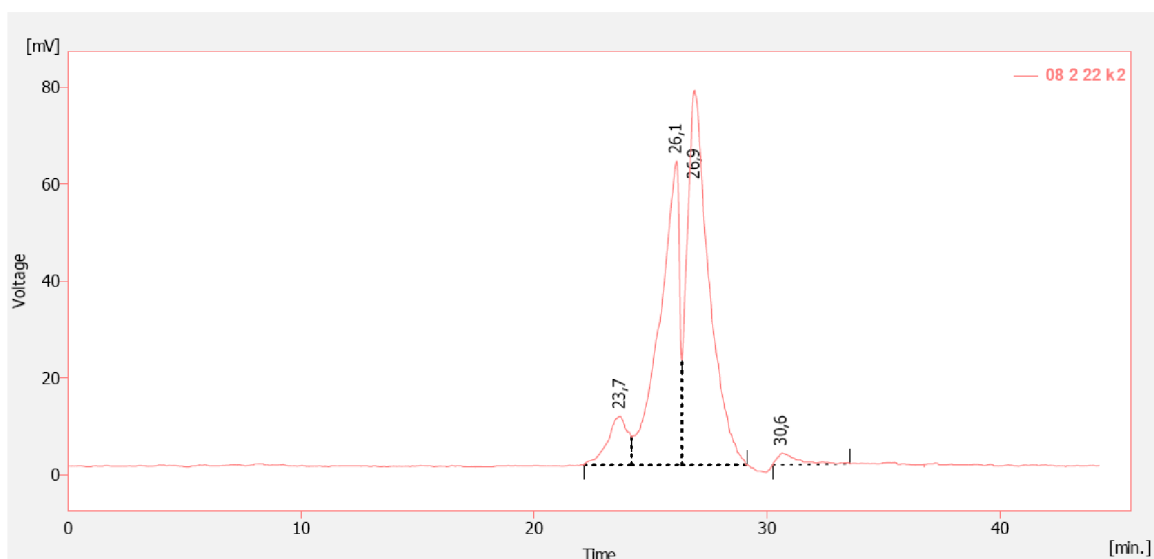
Pro optimalizaci extrakce reálných vzorků bylo vybráno jablko jako bohatý zdroj flavonoidních sloučenin. [32, 31, 42, 43] Schéma pokusu je uvedeno v kap. 3.4.1.2, následná analýza polyfenolických látek probíhala spektrofotometricky při 280 nm.

Pokud byla jako extrakční činidlo využita kyselina chlorovodíková, došlo zřetelně k lepší izolaci polyfenolů než při extrakci do vody nebo aplikaci surové šťávy. Největší rozdíl byl patrný u celkového objemu aplikovaného vzorku 3 ml. V případě aplikace 8 ml vzorku na extrakční kolonku je z grafu 3 patrné nejvyšší množství eluovaných složek detekovaných v UV oblasti, avšak z hlediska chromatografické separace byly vhodnější aplikace vzorků s nižším objemem. Kombinace 1,5 ml šťávy a 1,5 ml HCl byla z hlediska separace nejlepší (obr. 41).

Optimalizace typu rozpouštědla a množství ovocné šťávy



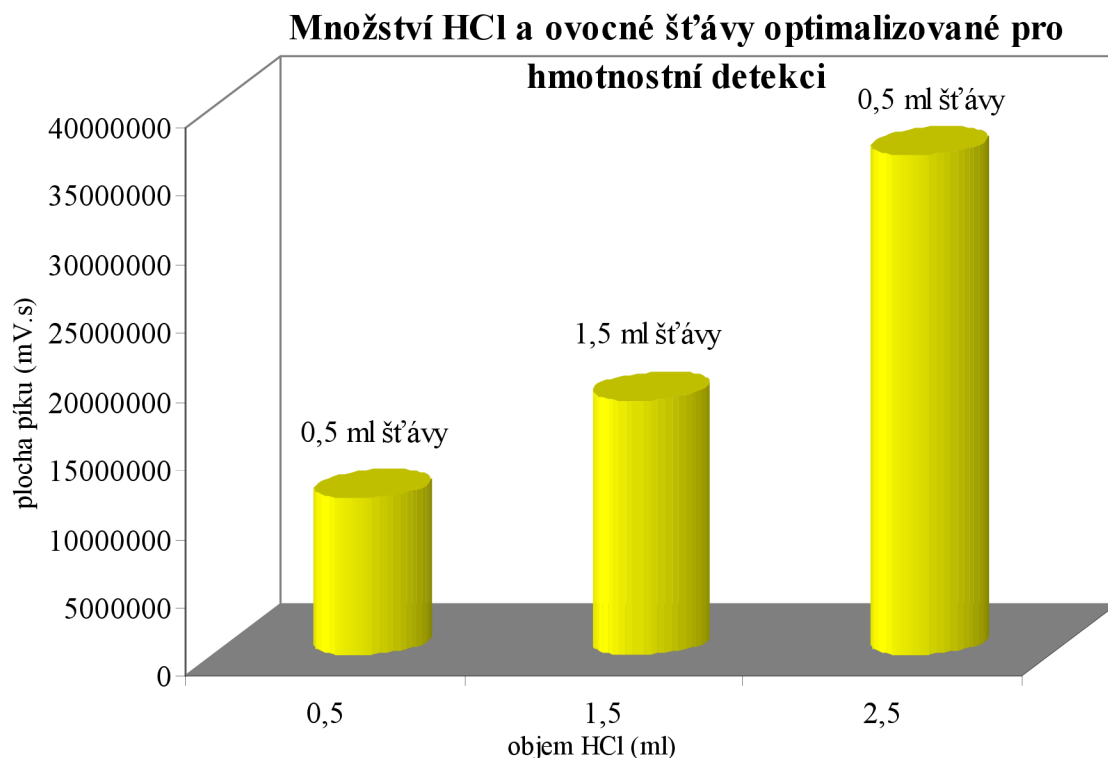
Graf 3: SPE extrakce jablečné šťávy.



Obr. 41: Optimalizace SPE extrakce pro flavonoidní sloučeniny –jablko.

Jelikož hmotnostní spektrometr dává možnost citlivější detekce, mohlo být na SPE kolonu aplikováno menší množství vlastního vzorku, což umožnilo kvalitnější extrakci polyfenolických sloučenin. Proto byl zvolen objem 3 ml vzorku, který rovněž koreluje s výsledkem optimalizace objemu flavonoidního standardu kvercetinu aplikovaného na amidovou kolonu (kap. 4.6.1.1, graf 2). Ke zvýšení výtěžku izolovaných látek byly dále voleny rozličné poměry rozpouštědla a šťávy. Z grafu (4) znázorňujícího závislost plochy píku na objemu kyseliny chlorovodíkové, jakožto nejlepšího extrahovačného rozpouštědla, a šťávy vyplývá,

že nejvhodnější kombinace rozpouštědla a ovocné šťávy byla v případě použití 0,5 ml šťávy a 2,5 ml HCl.

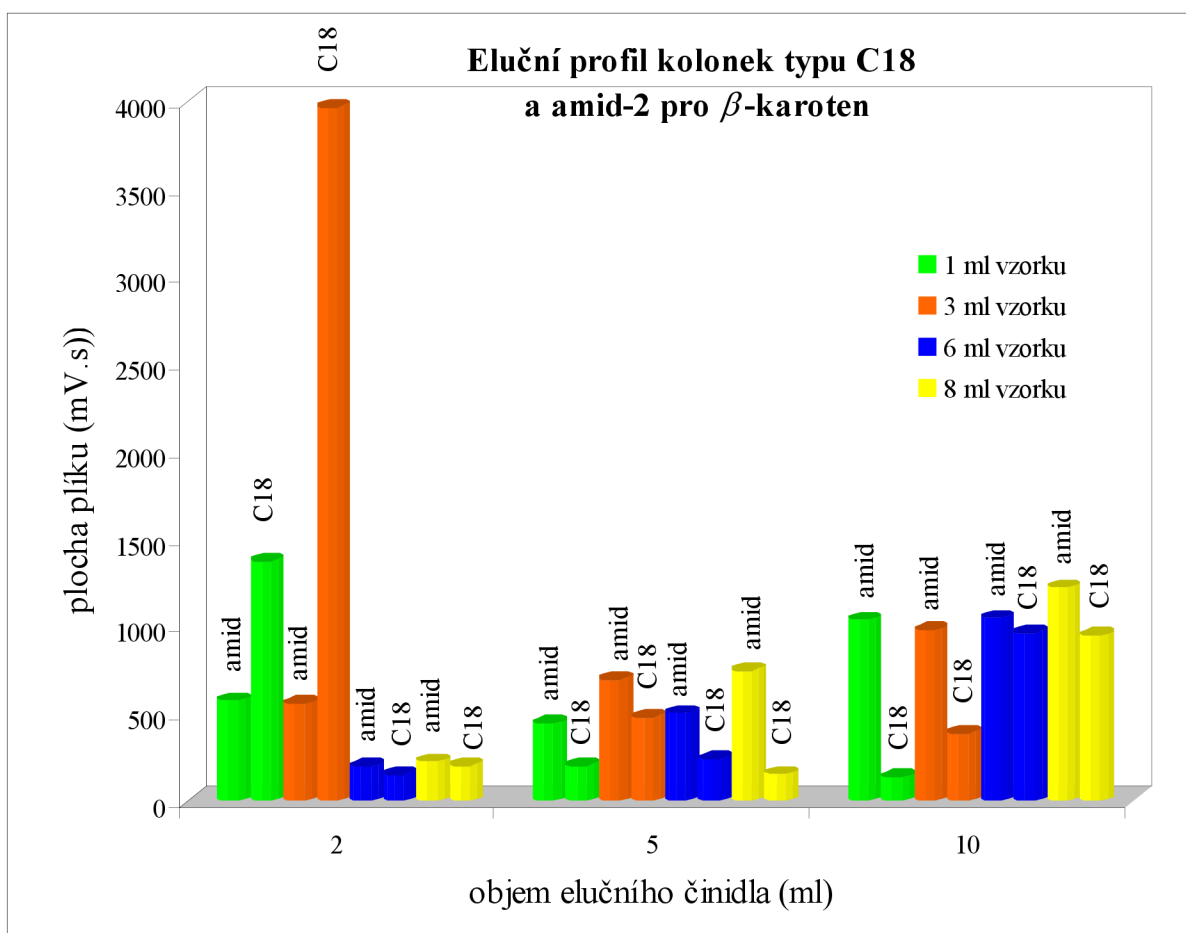


Graf 4: Závislost plochy píku na objemu přidané kyseliny chlorovodíkové.

4.6.2 Karotenoidy

4.6.2.1 β -karoten – standard pro optimalizace SPE karotenoidů

Jako zástupce karotenoidních sloučenin pro optimalizaci SPE extrakce byl vybrán β -karoten (kap. 3.4.2.1). Z grafu 5 je patrné, že oba typy kolon byly schopné zadržovat jisté množství látek tohoto typu. Pro kolony typu C18 byl optimální eluční objem 2 ml a pro kolony amid-2 10 ml. Vhodný objem testovaného karotenoidu nanášeného na kolonu C18 byl jednoznačně 3 ml a v případě amidové kolony 8 ml. Z uvedeného vyplývá, že ideální kombinací objemu elučního činidla a vzorku podrobenému SPE extrakci byly 3 ml β -karotenu eluovaného 2 ml cyklohexanu z kolony C18.



Graf 5: Různé objemy kvercetinu aplikovaného na kolonky typu C18.

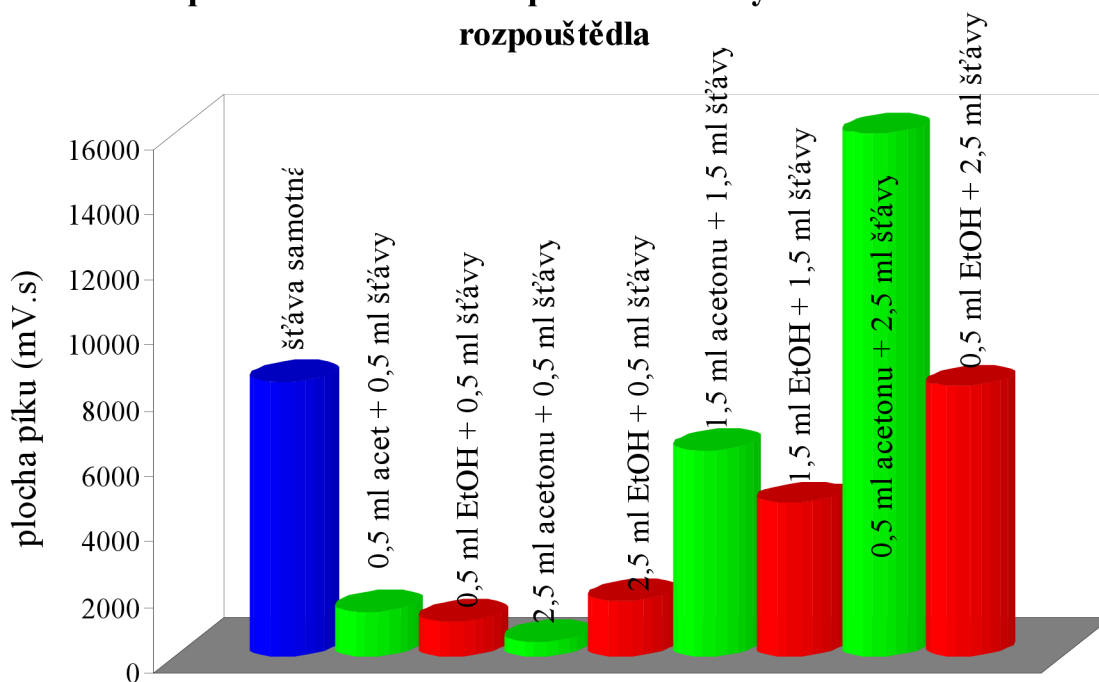
4.6.2.2 Optimalizace izolace karotenoidů z mrkve – zástupce reálných vzorků

Pro extrakci karotenoidních sloučenin z ovocných a zeleninových zdrojů bylo potřeba optimalizovat množství šťávy aplikované na SPE kolonu (kap. 3.4.2.2., tab. 17). Z elučního profilu kolonek (kap. 4.6.2.1, graf 5) bylo zřejmé použití 3 ml β -karotenu, proto byl pro optimalizaci extrakce karotenoidů z reálných vzorků vybrán právě tento objem. Navíc byla vyzkoušena kombinace 0,5 ml rozpouštědla a 0,5 ml šťávy.

Z grafické závislosti plochy píku na různých kombinacích objemů šťávy a rozpouštědla (graf 6) jasně vyplývá, že pro lepší extrakci žádaných sloučenin je vhodné použití acetonu. Ve většině případů byl schopen ze stejného množství zeleninové šťávy extrahovat větší množství karotenoidů.

Dále je nutné konstatovat, že optimální poměr rozpouštědlo:šťáva byl 0,5:2,5 ml, v ostatních případech nebyla extrakce karotenoidů dostatečná. Tento poměr byl využíván i v izolacích separacích karotenoidů z reálných vzorků.

Optimalizace množství aplikované šťávy a vhodného rozpouštědla



Graf 6: Množství šťávy a vhodného rozpouštědla.

4.7 Analýza obsahu polyfenolů ve vybraných potravinách a poživatinách

Vybrané druhy potravin a pochutin (kap. 3.5.1, tab.18) byly podrobeny izolaci postupem popsáním v kapitole 3.4.1.2 a následně HPLC/ESI/MS analýze za podmínek uvedených v kapitole 3.5.1.

4.7.1 Identifikace sloučenin pomocí standardů

V hmotnostních spektrech potravin a pochutin byly postupně identifikovány polyfenolické látky podle dostupných standardních sloučenin a byl analyzován jejich obsah v jednotlivých frakcích (šťáva, dužina, slupka). Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 24 – 37.

| <i>pomeranč šťáva</i> | | | | <i>pomeranč dužina</i> | | | |
|-----------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> | | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> |
| | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> | | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> |
| <i>naringenin</i> | 0,209 | 0,095 | 45,455 | <i>epikatechin</i> | 1,560 | 0,010 | 0,647 |
| <i>kaempferol</i> | 0,796 | 0,032 | 4,020 | <i>katechin</i> | 3,317 | 0,018 | 5,487 |
| <i>epikatechin</i> | 8,668 | 0,165 | 1,904 | <i>kvercetin</i> | 1,800 | 0,058 | 2,778 |
| <i>katechin</i> | 9,982 | 3,725 | 37,317 | <i>k.chlorogen.</i> | 6,672 | 0,280 | 4,194 |
| <i>k.chlorogen.</i> | 18,072 | 1,607 | 8,892 | <i>phlorizin</i> | 3,765 | 0,489 | 12,988 |
| <i>phlorizin</i> | 5,535 | 0,842 | 15,212 | <i>rutin</i> | 247,200 | 1,909 | 0,772 |
| <i>rutin</i> | 265,329 | 3,987 | 1,503 | | | | 0,647 |

Tabulka 24: Pofenoly v pomeranči.

| <i>citron šťáva</i> | | | | <i>citron dužina</i> | | | |
|---------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> | | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> |
| | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> | | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> |
| <i>naringenin</i> | 7,058 | 0,390 | 5,526 | <i>gallová</i> | 32,420 | 01,100 | 3,393 |
| <i>kaempferol</i> | 2,766 | 0,118 | 4,266 | <i>epikatechin</i> | 5,030 | 0,036 | 0,716 |
| <i>epikatechin</i> | 6,173 | 0,490 | 7,938 | <i>kvercetin</i> | 6,156 | 0,800 | 12,996 |
| <i>katechin</i> | 16,460 | 1,628 | 9,891 | <i>k.chlorogen</i> | 9,852 | 0,200 | 2,030 |
| <i>k.chlorogen.</i> | 47,400 | 0,340 | 0,720 | <i>phlorizin</i> | 21,700 | 0,620 | 2,857 |
| <i>phlorizin</i> | 14,400 | 0,653 | 4,538 | <i>rutin</i> | 99,970 | 1,359 | 1,359 |
| <i>rutin</i> | 119,500 | 4,060 | 3,397 | | | | |

Tabulka 25: Pofenoly v citrónu.

| <i>mandarinka šťáva</i> | | | | <i>mandarinka dužina</i> | | | |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> | | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> |
| | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> | | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> |
| <i>epikatechin</i> | 1,240 | 0,520 | 41,935 | <i>fisetin</i> | 0,043 | 0,004 | 8,645 |
| <i>katechin</i> | 2,260 | 0,430 | 19,027 | <i>epikatechin</i> | 0,079 | 0,012 | 15,121 |
| <i>morin</i> | 9,800 | 0,720 | 7,347 | <i>katechin</i> | 0,153 | 0,018 | 11,757 |
| <i>kvercetin</i> | 0,340 | 0,010 | 2,941 | <i>kvercetin</i> | 0,043 | 0,011 | 24,706 |
| <i>myricetin</i> | 11,030 | 0,900 | 8,160 | <i>k.chlorogen.</i> | 0,288 | 0,036 | 12,318 |
| <i>k.chlorogen.</i> | 106,200 | 9,800 | 9,228 | <i>phlorizin</i> | 0,073 | 0,006 | 7,438 |
| <i>phlorizin</i> | 7,910 | 0,360 | 4,551 | <i>rutin</i> | 4,030 | 0,178 | 4,417 |
| <i>rutin</i> | 4,940 | 0,160 | 3,239 | | | | |

Tabulka 26: Pofenoly v mandarince.

| <i>grep šťáva</i> | | | | <i>grep dužina</i> | | | |
|--------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> | | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> |
| | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> | | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> |
| <i>kaempferol</i> | 0,298 | 0,060 | 20,034 | <i>apigenin</i> | 1,803 | 0,135 | 7,489 |
| <i>epikatechin</i> | 5,573 | 0,116 | 2,081 | <i>naringenin</i> | 13,330 | 0,926 | 6,947 |
| <i>katechin</i> | 0,816 | 0,0618 | 7,575 | <i>katechin</i> | 4,160 | 0,669 | 16,082 |
| <i>morin</i> | 10,286 | 0,690 | 6,708 | <i>morin</i> | 20,470 | 0,350 | 1,710 |
| <i>kvercetin</i> | 0,395 | 0,0500 | 12,665 | <i>kvercetin</i> | 0,305 | 0,050 | 16,393 |
| <i>phlorizin</i> | 7,087 | 0,500 | 7,055 | <i>phlorizin</i> | 19,731 | 0,276 | 1,399 |
| <i>rutin</i> | 41,790 | 1,544 | 3,695 | <i>rutin</i> | 46,310 | 1,259 | 2,719 |

Tabulka 27: Pofenoly v grepu.

| <i>jablko štáva</i> | | | | <i>jablko dužina</i> | | | |
|---------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchyška</i> | <i>relativní směrodatná odchyška</i> | | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchyška</i> | <i>relativní směrodatná odchyška</i> |
| | <i>(mg/100 mg)</i> | | <i>%</i> | | <i>(mg/100 mg)</i> | | <i>%</i> |
| <i>kaempferol</i> | 0,139 | 0,019 | 13,430 | <i>apigenin</i> | 2,960 | 0,028 | 9,459 |
| <i>epikatechin</i> | 7,515 | 0,268 | 3,566 | <i>naringenin</i> | 1,213 | 0,026 | 2,143 |
| <i>katechin</i> | 35,053 | 0,773 | 2,205 | <i>epikatechin</i> | 82,075 | 0,502 | 0,612 |
| <i>k.chlorogen.</i> | 130,958 | 5,690 | 4,345 | <i>katechin</i> | 140,421 | 1,260 | 0,897 |
| <i>phlorizin</i> | 5,101 | 0,127 | 2,484 | <i>morin</i> | 6,012 | 0,980 | 16,302 |
| <i>rutin</i> | 6,473 | 0,462 | 7,140 | <i>kvercetin</i> | 0,143 | 0,001 | 0,699 |
| | | | 13,430 | <i>k.chlorogen.</i> | 974,300 | 2,359 | 0,242 |
| | | | 3,566 | <i>rutin</i> | 6,817 | 0,146 | 2,142 |

Tabulka 28: Pofenoly v jablku.

| <i>jablko slupka</i> | | | |
|----------------------|---------------------------|--|--|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchyška (mg/100 mg)</i> | <i>relativní směrodatná odchyška (%)</i> |
| <i>k.chlorogen.</i> | 543,690 | 28,270 | 5,200 |
| <i>rutin</i> | 69,210 | 1,8130 | 2,620 |

Tabulka 29: Pofenoly v jablku.

| <i>rajče dužina</i> | | | | <i>paprika dužina</i> | | | |
|---------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchyška</i> | <i>relativní směrodatná odchyška</i> | | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchyška</i> | <i>relativní směrodatná odchyška</i> |
| | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> | | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> |
| <i>gallová</i> | 4,522 | 0,294 | 6,502 | <i>gallová</i> | 3,226 | 0,005 | 0,155 |
| <i>apigenin</i> | 0,012 | 0,006 | 48,387 | <i>naringenin</i> | 0,010 | 0,0002 | 2,083 |
| <i>katechin</i> | 0,096 | 0,001 | 0,105 | <i>kaempferol</i> | 1,033 | 0,007 | 6,776 |
| <i>kvercetin</i> | 0,001 | 0,001 | 8,333 | <i>epikatechin</i> | 0,014 | 0,009 | 63,380 |
| <i>k.chlorogen.</i> | 7,775 | 0,435 | 5,597 | <i>katechin</i> | 0,008 | 0,0001 | 1,250 |
| <i>rutin</i> | 1,031 | 0,086 | 8,341 | <i>k.chlorogen.</i> | 0,027 | 0,001 | 3,704 |
| | | | 6,502 | <i>phlorizin</i> | 0,016 | 0,001 | 3,846 |
| | | | | <i>rutin</i> | 0,037 | 0,009 | 23,138 |

Tabulka 30: Polyfenoly v zelenině.

| <i>mrkev šťáva</i> | | | | <i>mrkev dužina</i> | | | |
|---------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|---------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchyška</i> | <i>relativní směrodatná odchyška</i> | | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchyška</i> | <i>relativní směrodatná odchyška</i> |
| | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> | | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> |
| <i>gallová</i> | 823,500 | 32,900 | 3,995 | <i>gallová</i> | 274,102 | 5,670 | 2,069 |
| <i>naringenin</i> | 1,717 | 0,095 | 5,534 | <i>kaempferol</i> | 1,266 | 0,090 | 7,112 |
| <i>epikatechin</i> | 1,488 | 0,050 | 3,361 | <i>epikatechin</i> | 0,225 | 0,027 | 11,817 |
| <i>katechin</i> | 2,402 | 0,280 | 11,657 | <i>katechin</i> | 0,555 | 0,024 | 4,324 |
| <i>myricetin</i> | 2,244 | 0,123 | 5,482 | <i>k.chlorogen.</i> | 68,900 | 2,963 | 4,300 |
| <i>k.chlorogen.</i> | 31,544 | 2,353 | 7,459 | <i>phlorizin</i> | 1,522 | 0,495 | 32,523 |
| <i>rutin</i> | 8,099 | 0,509 | 6,284 | <i>rutin</i> | 7,671 | 0,673 | 8,773 |

Tabulka 31: Polyfenoly v zelenině.

| <i>cibule</i> | | | | <i>česnek</i> | | | |
|---------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|---------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> | | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> |
| | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> | | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> |
| <i>kaempferol</i> | 3,18 | 0,26 | 8,176 | <i>epikatechin</i> | 0,165 | 0,0087 | 5,273 |
| <i>epikatechin</i> | 2,346 | 0,049 | 2,089 | <i>k.chlorogen.</i> | 1,0145 | 0,018 | 1,774 |
| <i>katechin</i> | 2,262 | 0,41 | 18,126 | <i>rutin</i> | 0,145 | 0,017 | 11,724 |
| <i>k.chlorogen.</i> | 3,939 | 0,14 | 3,554 | | | | |
| <i>phlorizin</i> | 0,4559 | 0,069 | 15,135 | | | | |
| <i>rutin</i> | 2,787 | 0,047 | 1,686 | | | | |

Tabulka 32: Polyfenoly v zelenině.

| <i>brambor šťáva</i> | | | | <i>brambor dužina</i> | | | |
|----------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> | | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> |
| | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> | | | <i>(mg/100 mg)</i> | <i>%</i> |
| <i>fisetin</i> | 2,907 | 0,674 | 23,185 | <i>epikatechin</i> | 3,336 | 0,211 | 6,325 |
| | 6,320 | 0,745 | 11,788 | <i>katechin</i> | 10,503 | 0,390 | 3,713 |
| | 3,312 | 1,717 | 51,842 | <i>kvercetin</i> | 2,151 | 0,050 | 2,325 |
| | 41,686 | 5,2 | 12,474 | <i>k.chlorogen.</i> | 33,800 | 0,433 | 1,281 |
| | 0,261 | 0,020 | 7,657 | <i>rutin</i> | 3,800 | 0,554 | 14,589 |
| | 13,120 | 0,034 | 0,259 | | | | |
| | 12,448 | 5,320 | 42,995 | | | | |

Tabulka 33: Polyfenoly v brambore.

| brambor slupka | | | |
|---------------------|---------------------------|---|--|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchyška (mg/ 100 mg)</i> | <i>relativní směrodatná odchyška (%)</i> |
| <i>k.chlorogen.</i> | 237,800 | 8,252 | 3,470 |
| <i>rutin</i> | 6,844 | 0,562 | 8,213 |

Tabulka 34: Polyfenoly v bramboře.

| Zlatopramen | | | | Braník | | | |
|--------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchyška</i> | <i>relativní směrodatná odchyška</i> | | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchyška</i> | <i>relativní směrodatná odchyška</i> |
| | | <i>(mg/ 100 mg)</i> | <i>%</i> | | | <i>(mg/ 100 mg)</i> | <i>%</i> |
| <i>gallová</i> | 307,200 | 1,410 | 0,459 | <i>gallová</i> | 372,800 | 8,027 | 2,153 |
| <i>naringenin</i> | 2,550 | 0,103 | 4,039 | <i>apigenin</i> | 1,491 | 0,647 | 43,402 |
| <i>kaempferol</i> | 1,139 | 0,016 | 4,869 | <i>naringenin</i> | 0,430 | 0,051 | 11,860 |
| <i>epikatechin</i> | 6,504 | 0,337 | 5,181 | <i>kaempferol</i> | 11,290 | 0,718 | 6,360 |
| <i>katechin</i> | 1,234 | 0,561 | 45,477 | <i>epikatechin</i> | 7,427 | 0,104 | 1,400 |
| <i>rutin</i> | 6,164 | 0,217 | 3,520 | <i>kvercetin</i> | 0,144 | 0,010 | 6,935 |
| | | | | <i>rutin</i> | 20,117 | 1,460 | 7,258 |

Tabulka 35: Polyfenoly v pivu.

| dýně | | | | slunečnice | | | |
|-----------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchyška</i> | <i>relativní směrodatná odchyška</i> | | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>odchyška odchyška</i> | <i>relativní směrodatná odchyška</i> |
| | | <i>(mg/ 100 mg)</i> | <i>%</i> | | | <i>(mg/ 100 mg)</i> | <i>%</i> |
| <i>gallová</i> | 1395,2 | 21,57 | 1,546 | <i>gallová</i> | 354,270 | 2,500 | 0,725 |
| <i>apigenin</i> | 4,399 | 0,6 | 13,640 | <i>naringenin</i> | 1,087 | 0,435 | 40,018 |

| | | | | | | | |
|---------------------|---------|-------|--------|---------------------|---------|-------|--------|
| <i>naringenin</i> | 7,067 | 0,713 | 10,089 | <i>katechin</i> | 12,242 | 1,668 | 13,625 |
| <i>epikatechin</i> | 24,398 | 0,747 | 3,062 | <i>kvercetin</i> | 0,103 | 0,006 | 1,647 |
| <i>katechin</i> | 13,670 | 0,393 | 2,877 | <i>k.chlorogen.</i> | 134,680 | 4,505 | 3,345 |
| <i>kvercetin</i> | 0,306 | 0,078 | 25,482 | <i>phlorizin</i> | 5,324 | 0,012 | 2,160 |
| <i>k.chlorogen.</i> | 385,451 | 2,68 | 0,695 | <i>rutin</i> | 9,787 | 0,721 | 2,258 |
| <i>phlorizin</i> | 38,540 | 0,909 | 2,359 | | | | |
| <i>rutin</i> | 29,601 | 0,497 | 1,678 | | | | |

Tabulka 36: Polyfenoly v semenech.

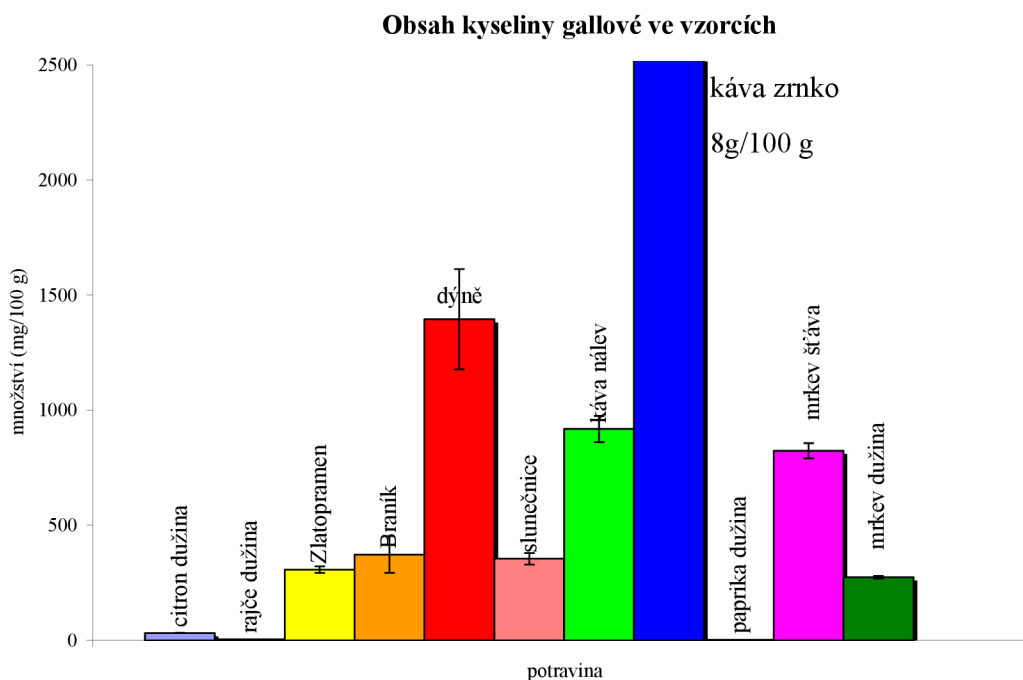
| <i>káva nálev</i> | | | | <i>káva zrnko</i> | | | |
|---------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|---------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> | | <i>množství (mg/100g)</i> | <i>směrodatná odchylka</i> | <i>relativní směrodatná odchylka</i> |
| | <i>(mg/100 mg)</i> | | <i>%</i> | | <i>(mg/100 mg)</i> | | <i>%</i> |
| <i>gallová</i> | 918,305 | 5,665 | 0,617 | <i>gallová</i> | 7929,7 | 89,579 | 1,130 |
| <i>kaempferol</i> | 4,8576 | 0,330 | 3,155 | <i>k.chlorogen.</i> | 4012,3 | 10,128 | 0,252 |
| <i>epikatechin</i> | 14,7695 | 0,466 | 2,932 | | | | |
| <i>katechin</i> | 24,250 | 0,711 | 1,240 | | | | |
| <i>k.chlorogen.</i> | 780,621 | 9,684 | 0,617 | | | | |

Tabulka 37: Polyfenoly v kávě.

Další podkapitoly jsou věnovány podrobnému rozboru jednotlivých identifikovaných polyfenolických sloučenin, především jejich distribuci v jednotlivých frakcích analyzovaných vzorků.

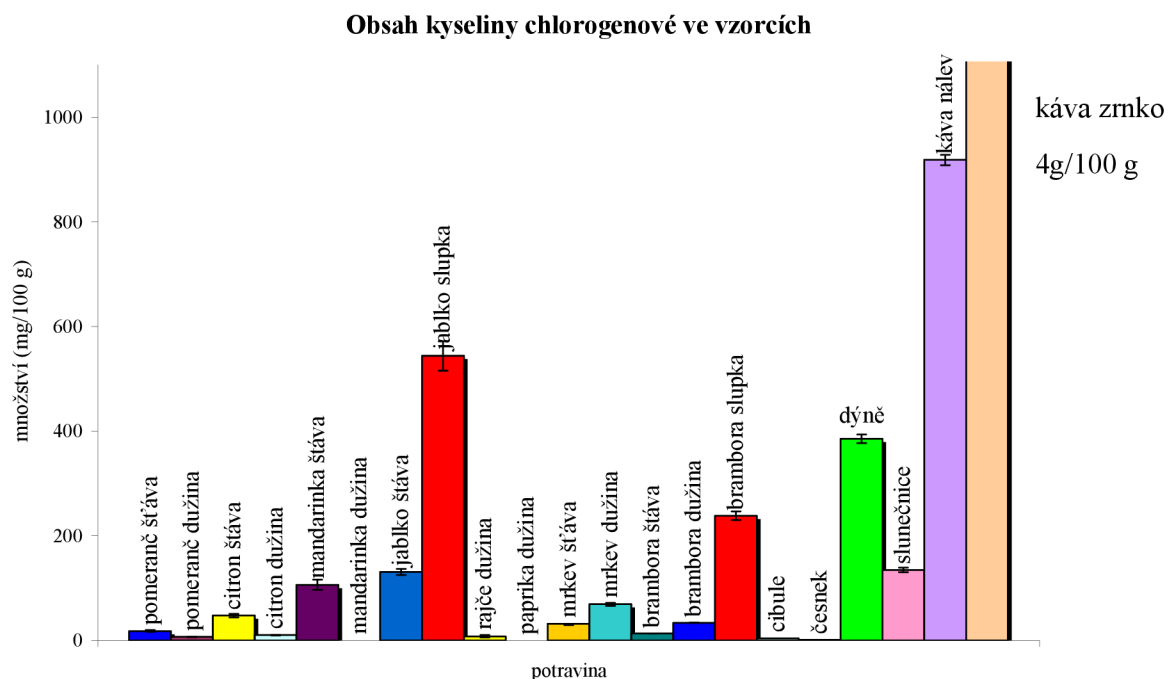
4.7.1.1 Polyfenolické kyseliny

Kyselina gallová byla identifikována jako polyfenolická kyselina akumulovaná ve vybraných vzorcích v nejvyšší koncentraci, a to především díky jejímu obsahu v zrnkové kávě (8 g/100 g) a dýňovém semínku (1,4 g/100 g) (graf 7). Dále byla kyselina gallová obsažena v obou druzích piva, mrkvi a ve slunečnicovém semeni. Minimální množství bylo stanoveno také v citrónu, paprice a rajčeti. V jablku, brambore, cibuli, česneku a ostatních citrusových plodech (mandarinka, pomeranč a grep) však kyselina gallová nebyla identifikována vůbec.



Graf 7: Kyselina gallová

Obecně velmi rozšířeným flavonoidem je kyselina chlorogenová, v analyzovaných vzorcích byla určena ve 14 případech (příloha 9). Jak je patrné z grafu 8, tak zrnková i mletá káva se vyznačovaly jejím vysokým obsahem (mletá – 781 mg/ 100 g kávy a zrnková – 4 g/100 g vzorku). Zvýšený obsah kyseliny byl identifikován také ve všech frakcích jablka (celkem 1,7 g/100 g vzorku), v dýni (386 mg/100 g vzorku) a ve slupce brambory (239 mg/100 g vzorku). Množství kyseliny chlorogenové v ostatních potravinách se pohybovalo do 70 mg/100 g potraviny.

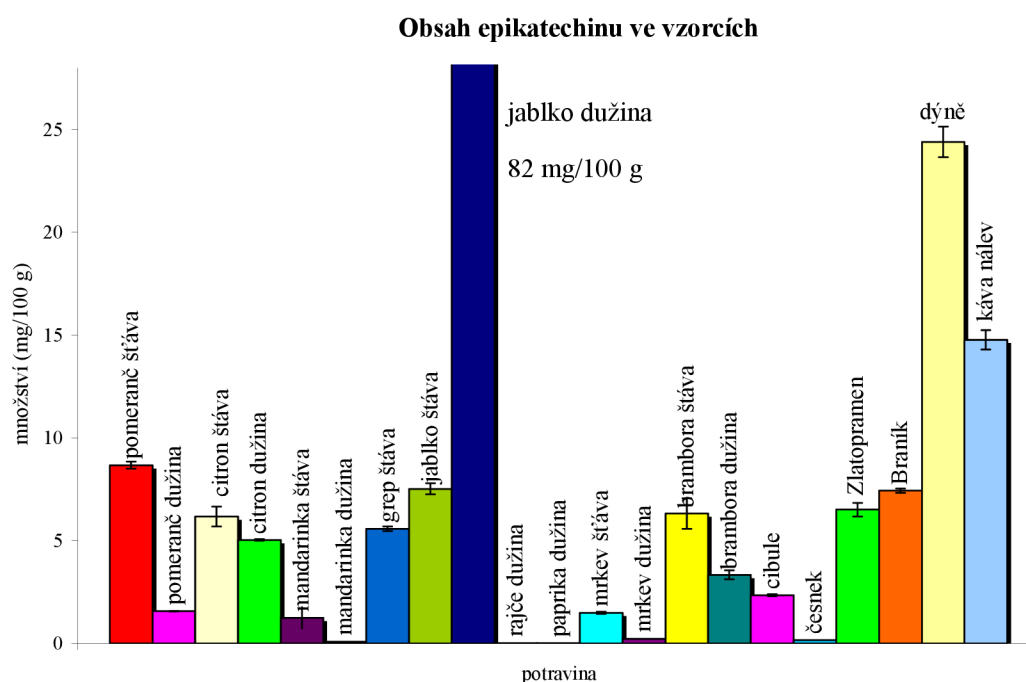


Graf 8: Kyselina chlorogenová.

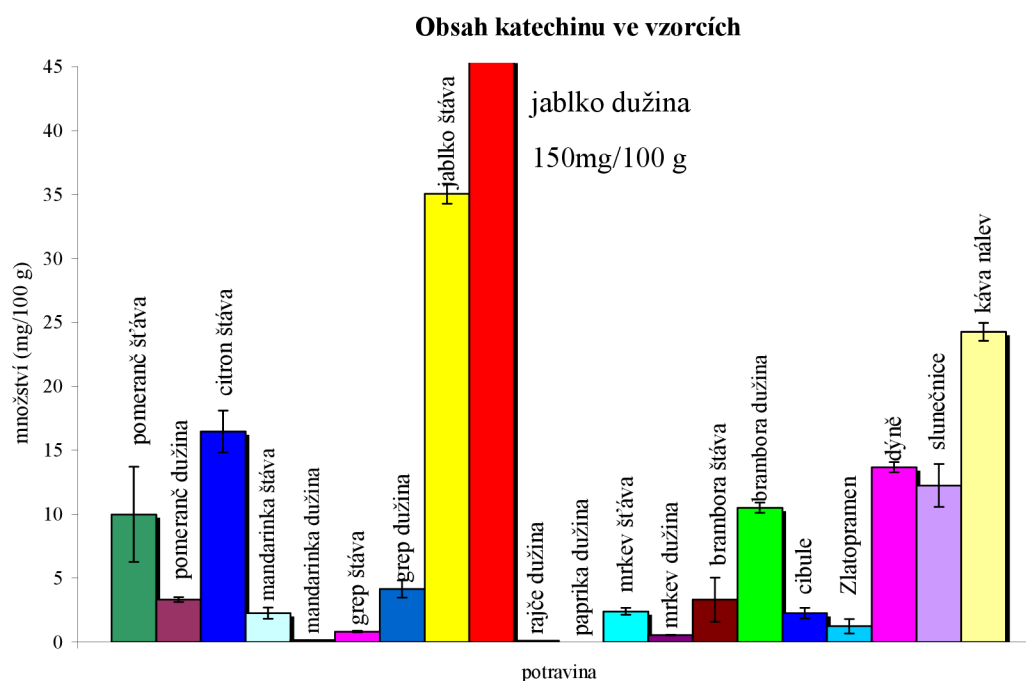
4.7.1.2 Zástupci katechinů – epikatechin a katechin

Katechiny spolu s fenolickými kyselinami byly identifikovány v téměř všech vybraných vzorcích (katechin 15 vzorků, epikatechin 13 vzorků). Obecně je prokázáno, že dobrým zdrojem katechinů jsou jablka (příloha 10, 11). [43] Tato skutečnost byla hmotnostní analýzou potvrzena po filtraci příslušné hodnoty m/z a porovnáním retenčních časů pro oba standardy, což ukazují i grafy 9 a 10. Celkový obsah epikatechinu byl 89,5 mg/100 g a katechinu 175,4 mg/100 g. Z grafické závislosti je též patrné, že přibližně 10 % katechinů bylo identifikováno ve šťávě a zbytek byl vázán na pevné struktury ovoce.

Vysoký obsah flavonoidů typu katechinů se vyskytuje v pochutinách jako je čaj a káva. [33] Tento fakt byl částečně potvrzen pro mletou kávu, ve které bylo ve 100 g identifikováno 14,7 mg epikatechinu a 24,3 mg katechinu, což není až tak mnoho, jak by se dle literárních zdrojů dalo očekávat [55; ~ 300 mg/100 g]. Určité množství těchto flavanolových sloučenin bylo stanoveno i v dýni (epikatechin – 24,4 mg/100g a katechin – 13,7 mg/100g) a citrónu (epikatechin – 6,2 mg/100g a katechin – 16,2 mg/100g). V ostatních potravinách se obsah katechinu a epikatechinu pohyboval v rozmezí 0,2 – 10 mg/ 100 g vzorku.



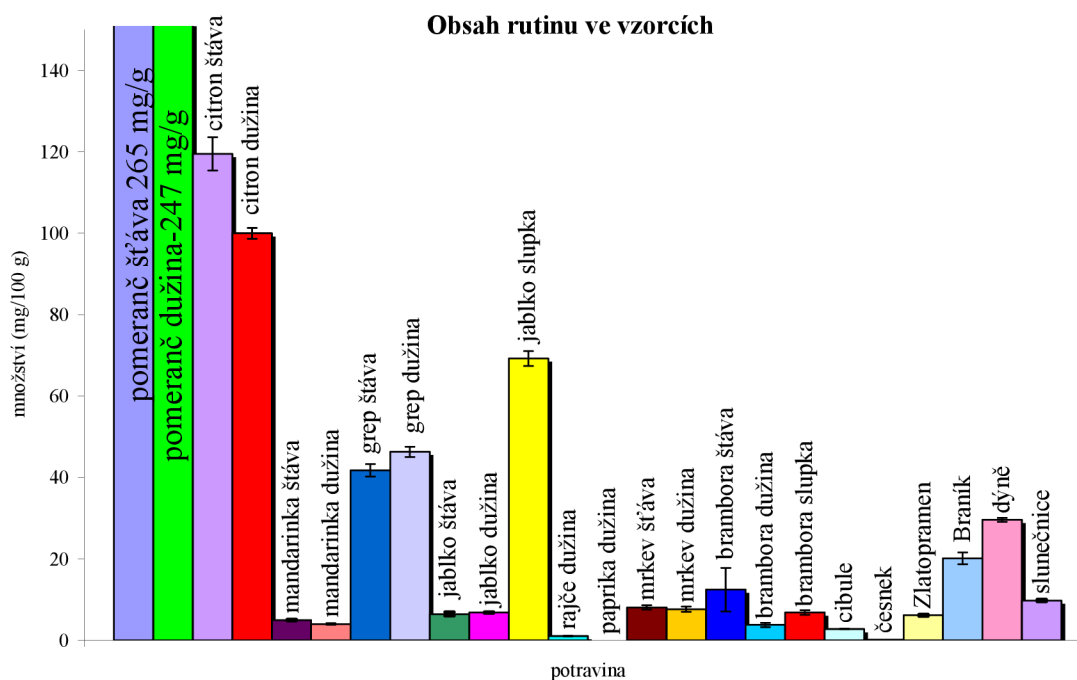
Graf 9: Epikatechin.



Graf 10: Katechin.

4.7.1.3 Diglykosid rutin

Rutin a jeho glykozidy se vyskytují převážně v červených hroznech, slupce rajčete a citrusech. [31, 33] Jak znázorňuje graf 11, byl rutin identifikován v 15 ze 16 studovaných druhů potravin a pochutin, stal se tak nejvíce zastoupeným stanoveným flavonoidem a právě v citrusových plodech byla jeho koncentrace poměrně vysoká (příloha 12).



Graf 11: Rutin.

Pomeranč obsahoval celkem 512 g/100 g, z čehož větší množství bylo přítomno ve šťávě. V případě citrónu bylo více rutinu obsaženo v dužině z celkového množství 148,8 mg/100 g vzorku. 88,1 mg/100 g byl celkový obsah tohoto flavonu v grepu, přičemž zastoupení v dužině a šťávě bylo téměř 1:1. Nejmenším množstvím rutinu z citrusových plodů se vyznačovala mandarínka, která obsahovala 10x menší koncentraci v porovnání s grepem.

Z ostatních potravin se ukázalo bohaté na rutin jablko s 69,2 mg/100 g ve slupce, kdežto v dužině a šťávě bylo množství téměř 10x menší, což je možné vysvětlit skutečností, že rutin tvoří vytváří pevnou ale i pružnou oporu pro buňky [31]. V ostatních potravinách byl rutin identifikován v množstvích do 50 mg/100 g vzorku.

Jedinou potravinou neobsahující žádné množství rutinu byla káva a to jak mletá tak i zrnková.

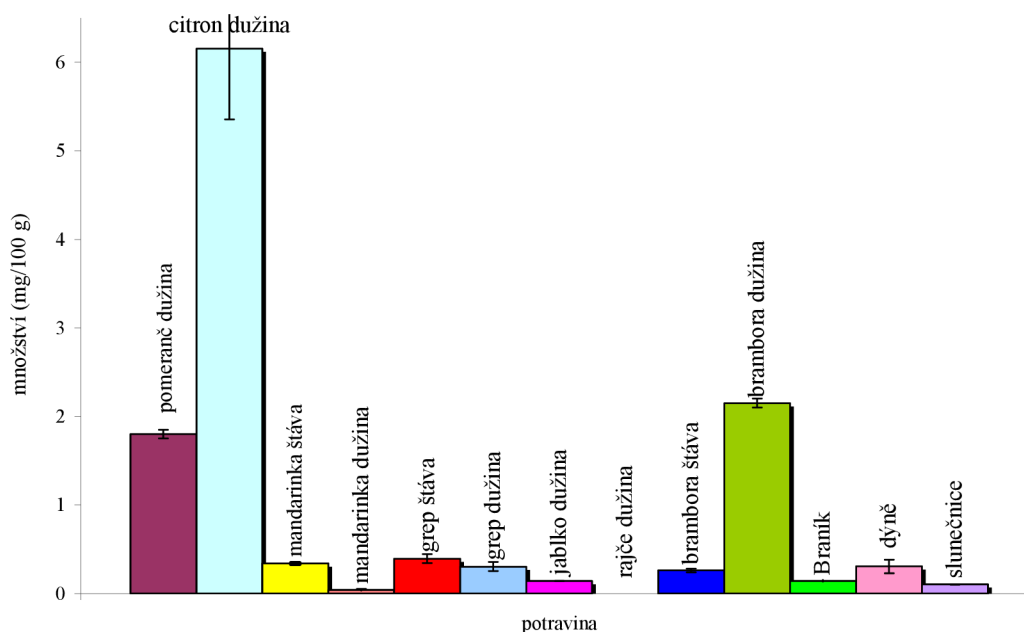
4.7.1.4 Flavonoidy identifikované ve většině analyzovaných vzorků

Další čtyři flavonoidní sloučeniny (kvercetin, phlorizin, naringenin a kaempferol) byly identifikovány ve většině analyzovaných preparátů (více než 8 vzorků).

Kvercetin patří mezi téměř univerzální flavonoly [31], což dokazuje také graf 12, ze kterého je patné, že byl identifikován ve 12 ze 16 druhů zkoumaných potravin. Kvercetin byl z větší části vázán na dužinu a zvýšená množství byla stanovena v citrónu (6,1 mg/100 g vzorku), brambore (2,1 mg/100 g vzorku) a pomeranči (1,7 mg/100 g vzorku). Ostatní studované potraviny obsahovaly tento antioxidant do 1 mg/100 vzorku, což je na flavonoid univerzálního typu překvapivě málo, a to hlavně pro cibuli, která je považována za dobrý zdroj. Jediné vysvětlení spočívá v tom, že se mnohem více vyskytuje ve formě glykosidů než

jako volný aglykon, což je možné potvrdit i poměrně vysokým obsahem diglykosidu kvercetin rutinu (nebo-li kvercetin-3-O-rutinosidu) [63]

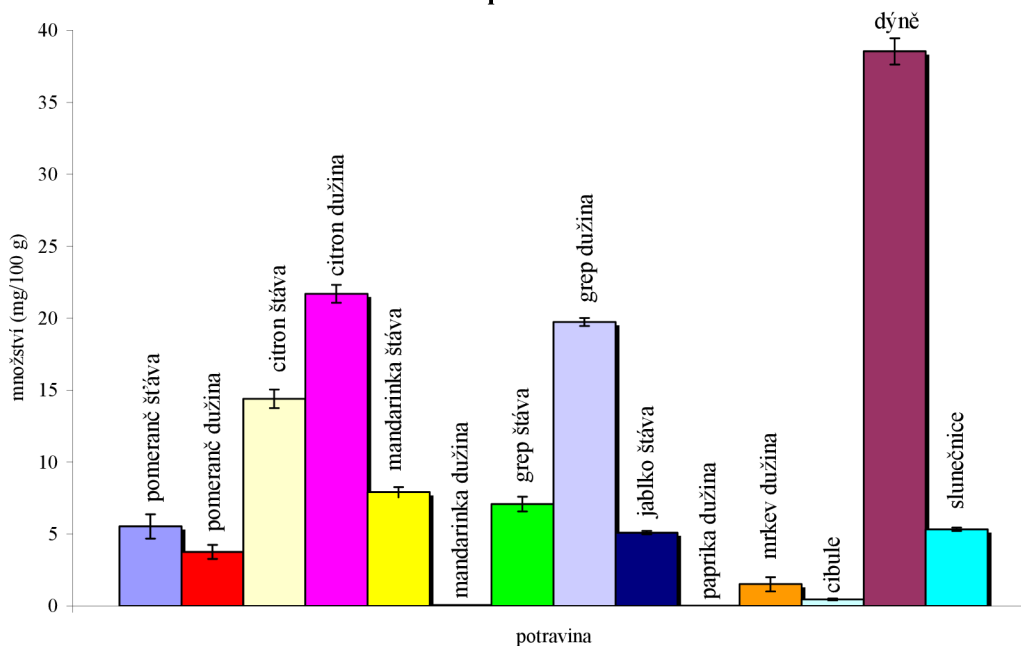
Obsah kvercetin ve vzorcích



Graf 12: Kvercetin.

V nejvyšších množstvích byl z diskutovaných polyfenolů této skupiny identifikován phlorizin. V dýni byl stanoven v koncentraci 38,54 mg/100 g suroviny. Z grafu 13 je patrné, že i dužina citrusových plodů obsahuje phlorizin v nezanedbatelném množství, v hmotnostním spektru byl identifikován ve všech 4 analyzovaných druzích. Koncentrace phlorizinu v celém citrusu byla 22,0 mg/100 g citrónu; 6,8 mg/100 g pomeranče; 27,0 mg/100 g grepu a 8,1 mg/100 g mandarinky.

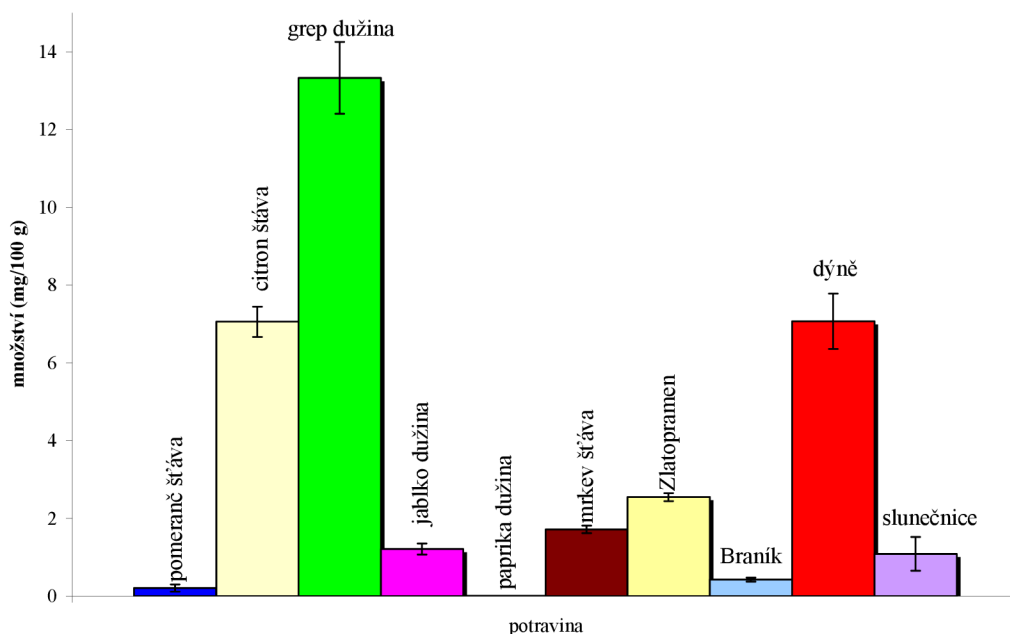
Obsah phlorizinu ve vzorcích



Graf 13: Phlorizin.

Naringenin funguje jako antioxidant především v citrusových plodech. [2] Ze studovaných potravin se vyskytoval v nejvyšší koncentraci v grepu v dužině (13,3 mg/ 100 g), v polovičním množství pak v citrónu ve šťávě (7,0 mg/ 100 g). Obdobně byla tato sloučenina identifikována v dýňovém semenu a v menší míře se vyskytovala v pomeranči, obou druhích piva, mrkvi, jablku, paprice a slunečnici. (graf.14).

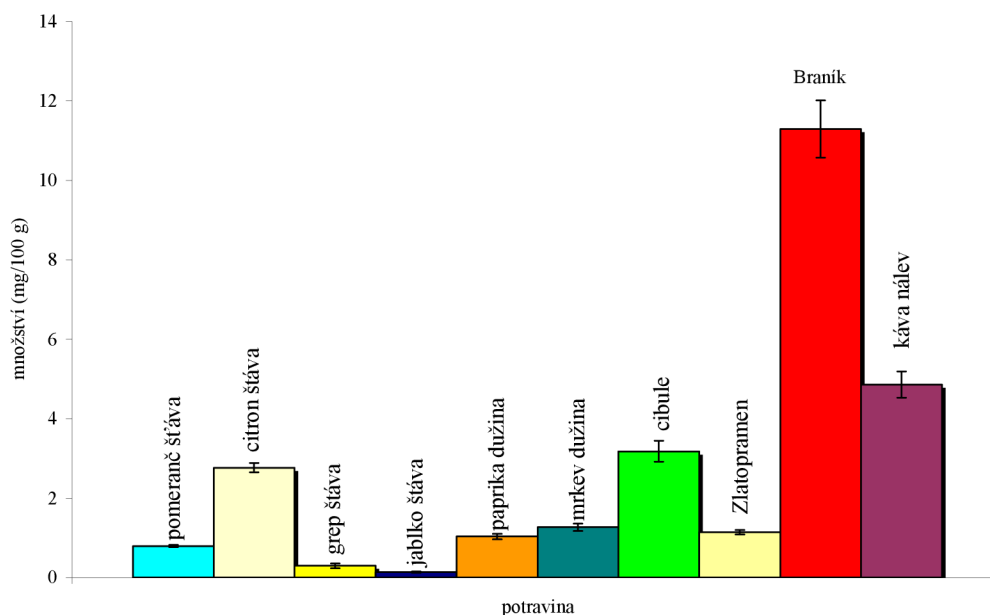
Obsah naringenu ve vzorcích



Graf 14: Naringenin

Dalším zástupcem flavonolových derivátů je kaempferol (příloha 13). Hojně byl zastoupen v pivu značky Braník (11,3 mg/100 g), zatímco v pivu Zlatopramen byla stanovena 10x nižší koncentrace (graf 15). Ve zvýšené míře se vyskytoval v kávě, dužině rajčete a cibule, což potvrzují i vědecké studie. [31, 33]

Obsah kaempferolu ve vzorcích

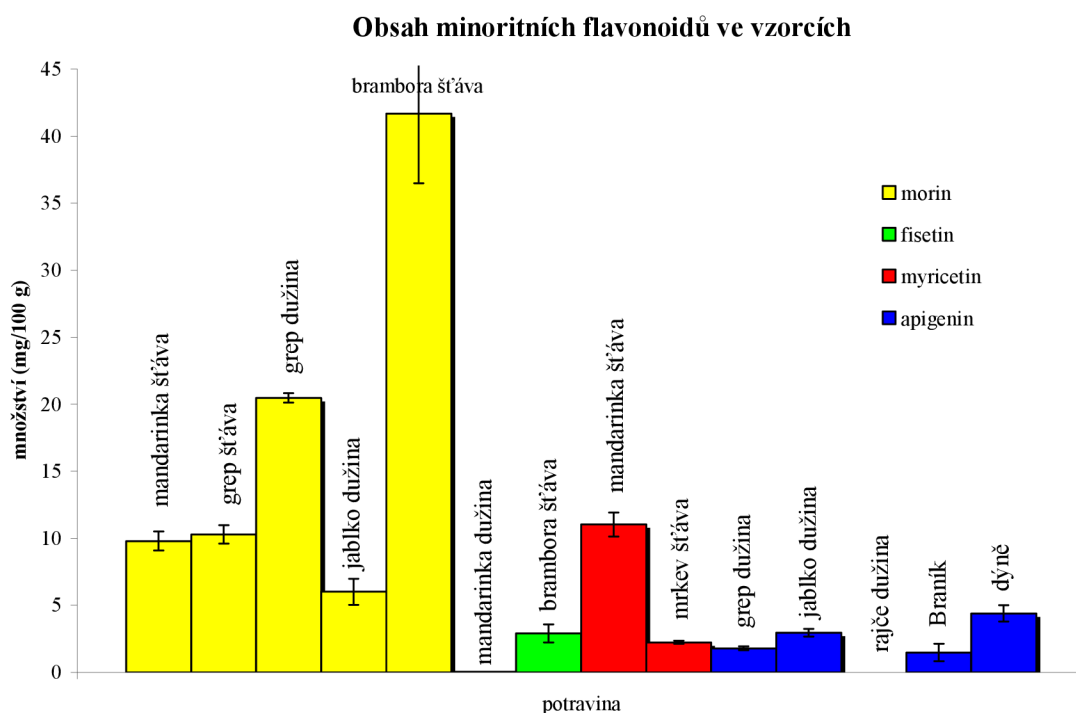


Graf 15: Kaempferol.

4.7.1.5 Minoritní flavonoidy

Mezi minoritní flavonoidní sloučeniny byly zařazeny látky, které byly identifikovány v méně než 8 vzorcích a navíc se většina z nich vyskytovala v celkem nízkých koncentracích. Tento fakt lze ovšem vysvětlit skutečností, že stejně jako u skupiny flavonoidů v kap. 4.6.1.4, se volné aglykonové struktury vyskytují v potravinách v poměrně malém množství a běžnější jsou glykozidové struktury. [31] Toto tvrzení také dokazuje např. mnohonásobně vyšší koncentrace rutinu, coby diglykosidu v kap. 4.6.1.3.

Morin byl spolu s fisetinem identifikován ve šťávě z brambory. Zatímco obsah morinu se pohyboval řádově v koncentraci desítek mg/100g vzorku (41,7 mg/100 g), fisetin se vyskytoval v opravdu zanedbatelném množství. Morin byl dále určen i v citrusech – mandarince (9,8 mg/100 g) a grepu (10,3 mg/100 g). Rovněž myricetin byl podle hodnoty m/z a příslušného retenčního času identifikován jen ve šťávě mandarinky (11,3 mg/100 g vzorku) a 10x menším množstvím ve šťávě z mrkve. Další sledovanou sloučeninou byl apigenin, který se vyskytoval i v 5 vzorcích, ale jeho koncentrace nepřekročily 5 mg/100g vzorku.



Obrázek 16: Zastoupení morinu, fisetinu, myricetinu a apigeninu v potravinách.

4.7.2 Ostatní polyfenoly

Z literární rešerše byl zjištěn celkový obsah, hodnota m/z a případně retenční čas ostatních možných polyfenolů, které mohou být přítomné ve vybraných typech vzorků v podstatném množství, a tak mohou být dobře identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Pro tyto sloučeniny nebyly k dispozici standardní preparáty, a proto jsou jejich množství srovnána pouze poměrově, v případě identifikovaných glykozidů standardních preparátů je pro přiblížení množství využita regresní závislost daného aglykonu (kap. 4.5). Identifikace z časových důvodů proběhla pouze jednostupňovou hmotnostní detekcí stanovením m/z , pro přesnější stanovení by mělo být využito i tandemové hmotnostní spektrometrie.

4.7.2.1 Citrusy

Citrusové plody by všeobecně měly být zdrojem chrysinu, taxifolinu, eriodyktiolu, naringinu, hesperedinu a hesperetinu a polyfenolických kyselin jako je kyselina ferulová, sinapová, kumarová, citrónová či kávová. [31, 2, 33]

V hmotnostním spektru pomeranče a mandarinky byl ze jmenovaných polyfenolů zřejmě identifikován taxifolin (příloha 14), a to jak v dužině tak i ve šťávě. Obsah taxifolinu byl dvakrát větší v pomeranči než v mandarince. Ve všech citrusových plodech kromě citrónu byl stanoven i eriodyktiol v poměru množství pomeranč:grep:mandarinka 4:2:1 (příloha 15).

Po filtraci m/z pro naringin, jenž je glykozidem naringenin (příloha 16), a aplikaci regresní rovnice (13) (kap. 4.5) na stanovenou plochu píku bylo zjištěno, že naringin byl obsažen ve všech citrusech. Ve velmi vysoké míře byl identifikován v grepu a to jak v dužině tak i ve šťávě (celkem 579,2 mg/100 mg). V ostatních citrusech byl přítomen v množství do 50 mg/100 g vzorku a dále již obsah nebyl specifikován. Z polyfenolických kyselin byla identifikována v citrusech kromě mandarinky kyselina kumarová (příloha 17) a to pouze v dužině. V nejvyšším zastoupení byla v grepu a nejméně se jí vyskytovalo v pomeranči. Druhou identifikovanou kyselinou byla kyselina kávová (příloha 18) a to pouze v mandarince.

Nejhojněji zastoupenou kyselinou byla kyselina citrónová (příloha 19), která sice nepatří mezi polyfenolické sloučeniny, ale byla identifikována ve všech druzích citrusů a ve šťávě ve dvojnásobném množství oproti dužině. V největším množství byla bezesporu v citrónu, v mandarince, v grepu a pomeranči byla oproti citrónu v poloviční koncentraci. Přítomnost kyseliny citrónové lze vysvětlit Krebsovým či glyoxilátovým cyklem přítomným ve všech rostlinách [36]

4.7.2.2 Zelenina

Zelenina by kromě polyfenolů, které již byly stanoveny, měla obsahovat navíc například flavonoid chrysin. [33] Ten byl však na základě příslušné hodnoty m/z identifikován pouze v dužině brambory (příloha 20). Jelikož pro tuto látku nebyl příslušný standard a byla nejspíše nalezena pouze v bramboru, nelze z žádného hlediska usuzovat na její případné množství.

4.7.2.3 Semena a káva

Slunečnicová semena obsahovala kromě jiného určité množství prokyanidinu (příloha 21). Obsah ve slunečnici byl 20x vyšší oproti dýňovému semínku.

I když kofein nepatří mezi flavonoidy, je významným alkaloidem v kávě, a proto byl rovněž v hmotnostním spektru filtrován (příloha 22). V obou druzích analyzovaných káv byl

identifikován, přičemž bylo pozorováno, že technologickým postupem zpracování kávy pro konzumaci klesl jeho obsah jen o 10 % z původní hodnoty.

4.7.2.4 Pivo

Významným zástupcem flavonoidů v pivu je xanthohumol [46, 47, 48, 49]. Jeho hodnota m/z je sice shodná s m/z kyseliny chlorogenové, avšak retenční čas obou sloučenin se významně liší, proto mohla být tato sloučenina bez nutnosti aplikace módu MS² jednoznačně identifikována (příloha 23). Xanthohumol se vyskytoval v obou druzích piva, přičemž v pivu značky Zlatopramen v trojnásobném množství, což je dáno zřejmě vyšším obsahem extraktu.

Dále byly v pivu identifikovány polyfenolická kyselina kumarová a rovněž kyseliny citrátového cyklu –jablečná (příloha 24) a citrónová, což se shoduje se studovanou literaturou [52, 53, 54]. Stanovené kyseliny byly v pivu Braník v koncentraci o polovinu větší než v pivu Zlatopramen.

4.7.3 Komplexní zdroj polyfenolických sloučenin

4.7.3.1 Celkový obsah flavonoidů

Tabulka 38 shrnuje celkový obsah flavonoidů identifikovaných v jednotlivých druzích potravin a pochutin, pro které byly vytvořeny regresní rovnice (1 – 13) a bylo tudíž možné určit jejich hmotnostní koncentraci.

| <i>vzorek</i> | <i>množství (mg/100 g)</i> | <i>vzorek</i> | <i>množství (mg/100 g)</i> | <i>vzorek</i> | <i>množství (mg/100g)</i> |
|-------------------|--------------------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <i>jablko</i> | 2 181 | <i>mrkev</i> | 1352 | <i>káva zrnková</i> | 13 684 |
| <i>pomeranč</i> | 542 | <i>brambora</i> | 381 | <i>káva mletá</i> | 2 059 |
| <i>citrón</i> | 273 | <i>cibule</i> | 15 | <i>dýně</i> | 1 898 |
| <i>mandarinka</i> | 148 | <i>paprika</i> | 35 | <i>slunečnice</i> | 517 |
| <i>gřep</i> | 172 | <i>rajče</i> | 12 | <i>pivo Braník</i> | 418 |
| | | <i>česnek</i> | 2 | <i>pivo Zlatopramen</i> | 324 |

Tabulka 38: Obsah flavonoidů v potravinách

Z tabulky 38 je patrné, že nejvyšší obsah celkových analyzovaných flavonoidů byl nalezen v zrnkové kávě. Tento výsledek však spočívá v obrovském množství přítomných polyfenolických kyselin – chlorogenová a gallová. Zastoupení ostatních polyfenolů bylo oproti jiným testovaným vzorkům zanedbatelné. Navíc tato forma kávy není obecně konzumována a po její úpravě vhodné pro spotřebu se množství přítomných polyfenolů rapidně snižuje na 14 % původní hodnoty.

Naopak poměrně vhodným komplexním zdrojem polyfenolických látek je jablko obsahující 2,2 g/100 g jablečné hmoty. Je v něm zastoupena převážná většina polyfenolických sloučenin (11), které byly identifikovány na základě dostupných standardních látek. 8 z těchto

komponent bylo vázáno hlavně v dužině a zbylé pak byly identifikovány ve šťávě a slupce. Z diskutovaných důvodů a z hlediska dostupnosti tohoto typu ovoce se jablko ukázalo jako hodnotný zdroj polyfenolických látek pro lidský organismus.

Nezanedbatelné množství antioxidačních látek bylo identifikováno také v jedlých semenech rostlin (dýňová semena 1,8 g/100 g). Tato hodnota je zřejmě dána malým obsahem vody a tedy vysokým zakoncentrováním chemických látek obsažených v semeni. (příloha 25)

Širokým spektrem přítomných polyfenolů se vyznačovaly také citrusové plody. Z hlediska obsahu bylo největší množství přítomno v pomeranči, ale nejvíce rozličných polyfenolických sloučenin bylo identifikováno v grepu (příloha 26). Mandarinka s citrónem se obsahově v podstatě rovnají zmíněným citrusům, z čehož je možné usoudit, že citrusové plody jsou velmi dobrým a také dostupným zdrojem flavonoidů.

Ze studovaných druhů zeleniny se ukázala především mrkev jako vhodný doplněk stravy (obsah flavonoidů 1,3 g/100 g). V ostatních druzích zeleniny bylo jak z hlediska množství tak z hlediska druhů polyfenolických sloučenin identifikováno překvapivě malé množství.

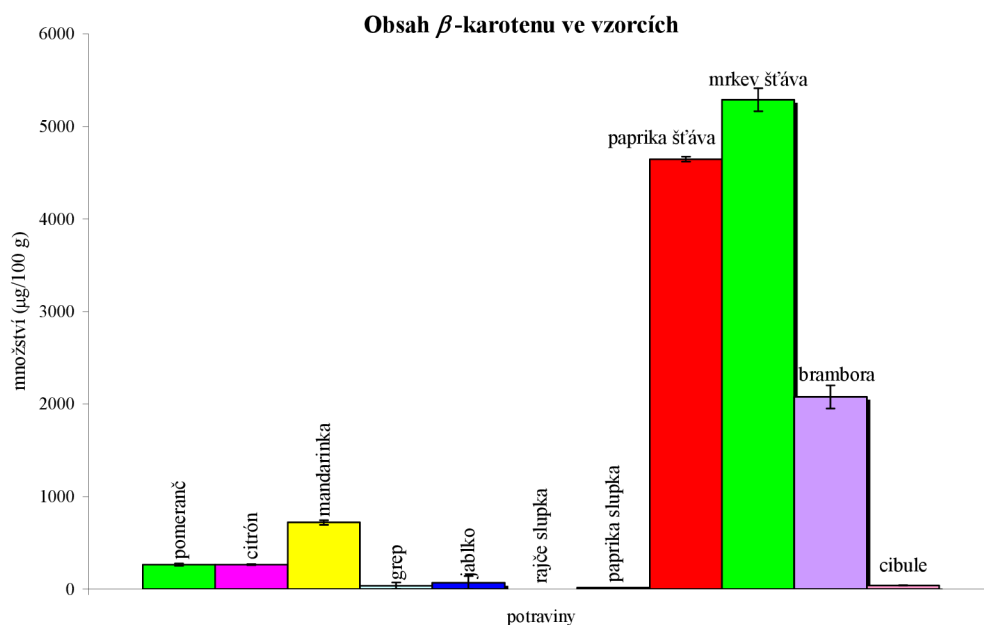
Oba studované druhy piva se vyznačovaly vyšším obsahem polyfenolických látek na úrovni semen a pomeranče. Tato skutečnost však může být vysvětlena vysokým obsahem kyseliny gallové v obou vzorcích.

4.8 Analýza obsahu karotenoidů

Vybrané druhy zeleniny a ovoce byly po vhodné izolaci karotenoidů z matrice (kap. 3.4.2.2) podrobeny chromatografické separaci s hmotnostní detekcí (kap. 3.2.3.2, tab. 4). Po filtraci příslušné hodnoty m/z v hmotnostním detektoru (příloha 27) byly plochy píků za pomoci regresní rovnice pro β -karoten (14) přepočteny na koncentraci v příslušné potravíně. Získané výsledky byly shrnuty do tabulky 39 a grafu 17.

| | <i>množství</i> ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) | <i>směrodatná odchylka</i> ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) | <i>relativní odchylka (%)</i> |
|-----------------------|---|--|-------------------------------|
| <i>pomeranč</i> | 264,3 | 1,228 | 4,646 |
| <i>citrón</i> | 217,75 | 7,610 | 3,495 |
| <i>mandarinka</i> | 719,97 | 25,253 | 3,507 |
| <i>gřep</i> | 713,75 | 35,762 | 5,010 |
| <i>jablko</i> | 0,593 | 70,007 | 11,797 |
| <i>rajče slupka</i> | 4,9855 | 1,012 | 20,299 |
| <i>rajče šťáva</i> | 9,1811 | 1,074 | 11,698 |
| <i>paprika slupka</i> | 14,971 | 0,920 | 6,145 |
| <i>paprika šťáva</i> | 4645,5 | 26,108 | 0,562 |
| <i>mrkev šťáva</i> | 5289 | 123 | 2,326 |
| <i>brambor</i> | 2076,7 | 127 | 6,115 |
| <i>cibule</i> | 40,051 | 1,880 | 4,694 |

Tabulka 522: Obsah β -karotenu v jednotlivých potravinách.



Graf 17: β -karoten.

Z grafické závislosti 17 obsahu β -karotenu na analyzovaném druhu ovoce či zeleniny vyplývá, že nejvyšší obsah sledované látky byl ve šťávě z mrkve a červené papriky, nemalé množství bylo identifikováno také v červené brambore, citrusových plodech či jablku. Téměř zanedbatelný obsah β -karotenu byl určen v rajčeti a cibuli.

Studované druhy zeleniny jsou obecně hodnotnými zdroji karotenoidních sloučenin. [38, 39] Z dostupných standardních látek však mohla být vypočtena pouze koncentrace pro β -karoten a ostatní karotenoidy byly zhodnoceny jen procentuálním zastoupením v analyzovaných vzorcích.

4.8.1.1 Zelenina

Hlavním karotenoidem přítomným v mrkvi a paprice je α a β -karoten. [38, 39] Vzhledem ke koeluci a jednotnému poměru m/z obou sloučenin (jedná se pouze o polohové izomery) byl pík, který reprezentoval obě sloučeniny brán jako β -karoten. (příloha 27) Šťáva získaná z mrkve a papriky byla velmi bohatá na množství karotenů, zatímco jejich množství ve slupce bylo zanedbatelné. Tato ztráta byla zřejmě způsobena nevhodnou extrakcí, jelikož např. slupka papriky obsahuje vysoký podíl rostlinných vosků, které mohou bránit kvantitativní izolaci karotenoidů. Dalším faktorem přispívajícím k malému výtěžku je také skutečnost, že ionizační technika elektrosprejového typu není vhodná pro stanovení sloučenin s více méně nepolárními vlastnostmi.

V hmotnostním spektru mrkve, rajčete, cibule i papriky byl kromě β -karotenu identifikován lutein (příloha 28) a ve velmi malém množství také lykopenu (příloha 29). Obsah luteinu v rajčeti byl však v přepočtu o 50 % vyšší oproti ostatním druhům zeleniny.

4.8.1.2 Ovoce

Podle literární rešerše jsou citrusové plody celkem dobrým zdrojem karotenoidních látek – [38, 59, 60] Z hmotnostních spekter bylo zjištěno, že větší množství β -karotenu je obsaženo v citrónu a mandarince. Dobrým zdrojem karotenoidních látek je také jablko obsahující 593,4 $\mu\text{g}/100$ g vzorku.

Citrusové plody by ve svých strukturách měly kromě karotenů obsahovat také xanthofily – neoxanthin, violaxanthin, β -kryptoxanthin či antheraxanthin. [38] Po filtraci příslušných hodnot m/z však nebylo možné bohužel žádané sloučeniny přesně identifikovat díky koeluci jednotlivých sloučenin a velmi podobným molekulovým hmotnostem.

5 ZÁVĚR

- V předložené diplomové práci byla zpracována podrobná literární rešerše týkající se techniky hmotnostní spektrometrie, kapalinové chromatografie, jejich spojení a také dalších kombinovaných metod (GC/MS, CZE/MS). Instrumentální techniky byly studovány rovněž z hlediska využití v analýze struktury nízkomolekulárních antioxidačních látek především karotenoidního a flavonoidního typu, byly popsány funkce sledovaných skupin sloučenin a jejich přirozené zdroje.
- V experimentální části práce byla stanovena hmotnostní spektra standardních sloučenin polyfenolických látek a karotenoidů v MS a MS² full scan uspořádání. Pro jednotlivé preparáty byly určeny poměry m/z kvazi-molekulárních iontů i případných charakteristických fragmentů, které byly dále využity pro identifikace komponent v reálných vzorcích.
- Pro směsi standardních sloučenin byly navrženy optimální podmínky chromatografické separace s využitím gradientové eluce.
- Optimalizace izolace vybraných skupin stanovovaných sloučenin proběhla s použitím extrakce pevnou fází (SPE). Pro polyfenolické sloučeniny byly jako optimální vybrány SPE kolony s navázanou amidovou fází, naopak lipofilní karotenoidy byly izolovány pomocí kolonek s C18.
- S použitím LC/MS techniky bylo v reálných vzorcích sledováno celkem 14 sloučenin, jejichž absorpční a MS spektra byla srovnávána s výsledky UV-VIS a MS detekce standardních sloučenin. Kromě toho byly ve vzorcích stanoveny i sloučeniny (celkem 11), pro které nebyly dostupné standardní preparáty, ale tyto látky byly charakteristické pro určitý typ matrice.
- Ze získaných výsledků lze říci, že nejlepším zdrojem polyfenolických látek ze zkoumaných potravin bylo ovoce. Obsahuje nejen poměrně velké procento nízkomolekulárních antioxidantů, ale navíc působí jako komplexní zdroj studovaných sloučenin. Optimálním a dobře dostupným zdrojem se jeví jablko, jelikož obsahuje významné množství různých polyfenolických sloučenin (celkově 2 g/100g) a zároveň je to vůbec nejvíce konzumované ovoce u nás. Také v citrusových plodech, hlavně pomeranči (542 mg/100g) bylo stanoveno nezanedbatelné procento polyfenolů. Z hlediska obsahu karotenoidů byl hodnocen pouze β -karoten vzhledem k dostupnému standardnímu preparátu. Bohužel ionizační technika elektrosprej převádí jen málo téměř nepolárních molekul na nabitě sloučeniny. Citlivost detektoru byla velmi nízká, a proto nebylo možné především látky ze skupiny karotenů dobře vyhodnotit.
- U vybraných druhů pochutin bylo stanoveno vysoké procento celkových polyfenolických látek (více než 8 g/100 g) především v kávě. Tato hodnota však byla ve většině případů ovlivněna obsahem kyselin gallové a chlorogenové a ostatní polyfenoly byly zastoupany velmi málo. Zdroje tohoto typu tak ztrácejí na komplexnosti dodávaných antioxidantů.
- Zkoumané druhy zeleniny, a to především mrkev (5 mg/100g) a paprika (4 mg/100g), se ukázaly být velmi dobrými zdroji karotenoidů, i když byl ze stejných důvodů jako u ovoce hodnocen pouze obsah β -karotenu.

- Při hodnocení obsahu biologicky funkčních potravin v jednotlivých frakcích ovoce a zeleniny bylo zjištěno, že vyšší procento polyfenolů bylo zastoupeno ve šťávě příslušné potraviny. Co se týká distribuce a množství polyfenolických sloučenin v dužině či slupce, ve většině případů byla identifikace vyššího počtu sloučenin provedena v dužině, což je zřejmě důsledkem nedostatečné extrakce jednotlivých komponent ze slupky a bude nutná její modifikace.
- Kapalinová chromatografie s hmotnostní koncovkou a ionizací typu ESI se ukázala poměrně vhodnou metodou pro stanovení obsahu flavonoidních látek v potravinách. Díky identifikaci sloučenin na základě poměru hmotnosti a náboje bylo možné analyzovanou potravinu charakterizovat i z hlediska obsahu látek, pro které nebyly dostupné standardy, avšak pouze kvalitativně či poměrově na základě plochy píku dané sloučeniny v porovnání s ostatními vzorky. Naopak pro karotenoidy jednoznačně není tento typ detektoru výhodný. Pro jejich analýzu by byla optimálnější chemická ionizace za atmosferického tlaku (APCI), která ovšem nebyla k dispozici, a proto není analýza karotenoidů dostatečně komplexní.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Tsao, R., Deng, Z.: *Separation procedures for naturally occurring*
- [2] Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y., Haruenkit, R., Lojek, A., Číž, M., Caspi, A., Libman, I., Trakhtenberg, S.: Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits, *Food Chemistry* **74**, str. 309-315, 2001.
- [3] Wang, L., Morris, M.E.: Liquid chromatography-tandem mass spectroscopy assay for quercetin and conjugated quercetin metabolites in human plasma and urine, *Journal of Chromatography B* **821**, str. 194-201, 2005.
- [4] Davídek J. a kol.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: SNTL, 1977.
- [5] Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.Th.: Analytical separation and detection methods for flavonoids, *Journal of Chromatography A* **1112**, str.31-63, 2006.
- [6] Sommer L. a kol.: *Základy analytické chemie II*. Brno: VUTIUM, 2000.
- [7] Careri, M., Mangia, A., Musci, M.: Overview of the applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: naturally occurring substances in food, *Journal of Chromatography A* **794**, str. 263-297,1998.
- [8] Příbela A.: *Analýza potravin*. Bratislava: STU, 1991.
- [9] Masák J, Pelechová J., Plachý J.: *Speciální mikrobiální technologie*. Praha: VŠCHT, 1992.
- [10] Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003.
- [11] Michalkiewicz, A., Biesaga, M., Pyrzyńska, K.: Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey, *Journal of Chromatography A* **1187** str. 18-24, 2008.
- [12] Sigma-Aldrich: *Guide to solid phase extraction* [online]. 1998, last revision 1998 [cit. 20. [4.2008]. Dostupné z: . Dostupné z:
< <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> >
- [13] Buszewski, B., Kawka, S., Suprynowicz, Z., Wolski, T.: Simultaneous isolation of rutin and esculin from plant material and drugs using solid-phase extraction, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* **3**, str. 211-215, 1993.
- [14] Xiao, H. B., Krucker, M., Albert, K., Liang, X. M.: Determination and identification of isoflavonoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A* **1032** str. 117-124, 2004.
- [15] Churáček J. a kol.: *Analytická separace látek*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1990.
- [16] Verner P: *LC/MS systémy* [online]. 2007, last revision 2007 [cit. 20.4 2008]. Dostupné z <<http://www.spectronex.cz/index.php?mm=2&sm=2>>.

[17] Hao, Ch., Zhao, X., Yang, P.: GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices, *Trends in Analytical Chemistry* **6**, str. 569-580, 2007.

[18] Groessl, M., Hartinger, Ch. G., Dyson, P. J., Keppler, B. K.: CZE-ICP-MS as a tool for studying the hydrolysis of ruthenium anticancer drug candidates and their reactivity towards the DNA model compound dGMP, *Journal of Inorganic Biochemistry* **102**, str. 1060-1065, 2008.

[19] Careri, M., Bianchi, F., Corradini, C.: Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis, *Journal of Chromatography A* **970**, str. 3-64, 2002.

[20] Štulík K.: *Analytické separační metody*. Praha: Nakladatelství Karolinium, 2004.

[21] Lanina, S., A., Toledo, P., Sampels, S., Kamal-Eldin, A., Jastrebova, J., A.: Comparison of reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization for analysis of dietary tocopherols, *Journal of Chromatography A* **1157** str. 159-170, 2007.

[22] Bramer S. E. V.: *An Introduction to Mass Spectrometry*. Chester: Widener University, 1997.

[23] Abian, J.: The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry, *Journal of mass spectrometry* **34**, str. 157-168, 1999.

[24] Agilent Technologies: *Basics of LC/MS*. USA: Agilent Technologies, 2001.

[25] Smyth, W. F.: The use of electrospray mass spectrometry in the detection and determination of molecules of biological significance, *Trends in analytical chemistry* **5**, str. 335-345, 1999.

[26] Ramanathan, R., Zhong, R., Blumenkrantz, N. Chowdhury, S., K., Alton, K., B.: Response normalized liquid chromatography nanspray ionization mass spectrometry, *Journal of the American society for mass spectrometry* **10**, str. 189,-1899, 2007.

[27] Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Praha: Karolinium, 1997.

[28] Wijk, A. M., Muijselaar, p. G., Stegman, K., Jong, G. J.: Capillary electrophoresis-mass spectrometry for impurity profiling of basic pharmaceuticals using non-volatile background electrolytes, *Journal of Chromatography A* **1059** str. 175-184, 2007.

[29] Shui, G., Leong, L. P.: Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **1022**, str. 67- 75, 2004.

[30] Rijke, E., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.Th.: Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments, *Journal of Chromatography A* **984**, str. 45-58, 2003.

[31] Velišek, J.: *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 2002.

[32] Häkkinen, S., Auriola, S.: High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of

flavonol aglycones and glycosides in berries, *Journal of Chromatography A* **829**, str. 91-100, 1998.

[33] Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J.: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, str. 572-584, 2002.

[34] Svedström, U., Vuorela, H., Kostianen, R., Laakso, I., Hiltunen, R.: Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis, *Journal of Chromatography A* **1112**, str. 103-111, 2006.

[35] Hofta, P., Dostálek, P., Basařová, G.: Xanthohumol – chmelová pryskyřice nebo polyfenol?, *Chemické listy* **98**, str. 825-830, 2004.

[36] Vodrážka, Z.: *Biochemie*. Praha: Academia, 2002.

[37] KODÍČEK, M. *Isopentenylidifosfát* [online].]. 2007, last revision 2007 [cit. 20.4 2008]. Dostupné z: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=isopentenylidifosfat>.

[38] Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M. M., Toth-Markus, M.: Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables, *Food Research International* **38**, str. 1023-1029, 2005.

[39] Lienau, A., Glaser, T., Tang, G., Dolnikowski, G. G., Grusak, M. A., Albert, K.: Bioavailability of lutein in humans from intrinsically labeled vegetables determined by LC-APCI-MS, *Journal of Nutritional Biochemistry* **11**, str. 663-670, 2003.

[40] Hagiwara T., Yasuno T., Funayama K., Suzuki S.: Determination of lycopene, α -carotene and β -carotene in serum by liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with selected-ion monitoring, *Journal of Chromatography B* **708**, str. 67-73, 1998.

[41] Cieřlik, E., Greda, A., Adamus, W.: Contents of polyphenols in fruit and vegetables, *Food Chemistry* **94**, str. 135-142, 2006.

[42] Salces, R. M. A., Ndjoko, K., Queiroz, E. F., Ioset, J. R., Hostettmann, K., Berueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F.: On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection, *Journal of Chromatography A* **1046** str. 89-100, 2004.

[43] Oszmiański, J., Wolniak, M., Wojdyło, A., Wawer, I.: Influence of apple purée preparation and storage on polyphenol contents and antioxidant activity, *Food Chemistry* **107**, str. 1473-1484, 2008.

[44] Solar, A., Colarič, M., Usenik, V., Stampar, F.: Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.), *Plant Science* **170**, str. 453-461, 2006.

[45] Kornsteiner, M., Wagner, K. H., Elmadfa, I.: Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types, *Food Chemistry* **98**, str. 381-387, 2006.

-
- [46] Stevens, J. F., Page, J. E.: Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health ! *Phytochemistry* **65**, str. 1317-1330, 2004.
- [47] Yilmazer, M., Stevens, J. F., Buhler, D. R.: In vitro glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes, *FEBS Letters* **491**, str. 252-256, 2001.
- [48] Lermusieau, G., Liégeois, C., Collin, S.: Reducing power of hop cultivars and beer ageing, *Food Chemistry* **72**, str. 413-418, 2001.
- [49] Bamforth, Ch. W.: Nutritional aspects of beer –a review, *Nutrition Research* **22**, str. 227-237, 2002.
- [50] Gorinstein, S., Caspi, A., Zemser, M., Trakhtenberg, S.: Comparative contents of some phenolics in beer, red and white wines, *Nutrition Research* **1**, str.131-139, 2000.
- [51] Onate-jaén, A., Bellido-milla, D., Hernández-artiga, M. P.: Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing, *Food Chemistry* **97**, str. 361-369, 2006.
- [52] Montanari, L., Perretti, G., Natella, F., Guidi, A., Fantozzi, P.: Organic and phenolic acids in beer, *Lebensm.-Wiss.u.-Technol* **32**, str. 535-539, 1999.
- [53] Ghiselli, A., Natella, F., Guidi, A., Montnari, L., Fantozzi, P., Scacni, C.: Beer increases plasma antioxidant capacity in humans, *Journal of Nutritional Biochemistry* **11**, str. 76-80, 2000.
- [54] Nardini M., Ghiselli, A.: Determination of free and bound phenolic acids in beer, *Food Chemistry* **84**, str. 137-143, 2004.
- [55] Almajano, M. P., Carbó, R., Jiménez, J. A. L., Gordon, m. H.: Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions, *Food Chemistry* **108**, str. 55-63, 2008.
- [56] Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T.: Antioxidant activity of propolis of various geographic origins, *Food Chemistry* **84**, str. 329-339, 2004.
- [57] Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P. R., Čeksterytė, V.: Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts, *Food Chemistry* **101**, str. 502-514, 2007.
- [58] Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M. P., Piatti, E.: Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells, *Food Chemistry* **104**, str. 1635-1640, 2007.
- [59] Tadmor, Y., King, S., Levi, A., Davis, A., Meir, A., Wasserman, B., Hirschberg, J., Lewinsohn, E.: Comparative fruit colouration in watermelon and tomato, *Food Research International* **38**, str. 837-841, 2005.
- [60] Abeyasinghe, D. C., Li, X., Sun, Ch. D., Zhang, W., Zhou, Ch., Chen, K.: Bioactive compounds antioxidant capacities different edible tissues of citrus fruit of four species, *Food Chemistry* **104**, str. 1338-1344, 2007.

-
- [61] Šilhánková L.: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Praha: Academia, 2002.
- [62] Kocková-Kratochvílová A.: *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. Praha: Academia, 1986.
- [63] García, B. A., Berrueta, L. A., López-Márquez, D. M., Crespo-Ferrer, I., Gallo, B., Vicente, F.: Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices, *Journal of Chromatography A* **1154** str. 87-96, 2007.
- [64] Thermo Finnigan: *Getting started*. USA: Technical publications, 2003.
- [65] Lourdes, M., Bilfao, M., Andrés-Lacueva, C., Jaurégui, O., Lamuela-Raventós, M.: Determination of flavonoids in a citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS, *Food Chemistry* **101**, str. 1742-1747, 2007.
- [66] Charrouf, Z., Hilali, M., Jauregui, O., Soufíaoui, M., Guillaume, D.: Separation and characterization of phenolic compounds in argan fruit pulp using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectroscopy, *Food Chemistry* **100**, str. 1398-1401, 2007.
- [67] Kočí, R: Diplomová práce Brno: FCH VUT, 2001.
- [68] Obrázek - iontová past [online] [cit. 20.4 2008]. Dostupné z: <www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/qit-massspec.html>.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|----------|--|
| APCI | chemická ionizace za atmosférického tlaku |
| API | ionizace za atmosférického tlaku |
| APPI | fotoionizace za atmosférického tlaku |
| CI | chemická ionizace |
| CZE | kapilární zónová elektroforéza |
| EI | ionizace elektronem |
| ES (ESI) | elektrosprej |
| FAB | fast atom bombardment |
| FID | plamenový ionizační detektor |
| FT-ICR | Fourierova transformace – iontová cyklotronová rezonance |
| GC | plynová chromatografie |
| GC | plynová chromatografie |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatopgrafie |
| ICP | indukčně vázané plazma |
| IPDP | izopentenylidifosfát |
| IT | iontová past |
| LC | kapalinová chromatografie |
| LDL | low density lipoprotein |
| MALDI | ionizace laserem za účasti matrice |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| MSPD | extrakce disperzní tuhou fází |
| NS (NSI) | nanosprej |
| PC | papírová chromatopgrafie |
| PLOT | kolony s vrstvou pevného aktivního sorbentu na vnitřní straně kapiláry |
| Q | kvadrupól |
| RDA | Retro-Diels-Alderovy reakce |
| SCOT | kolony se zakotvenou kapalnou stacionární fází |
| SIM | single ion monitoring |

| | |
|----------|---|
| SIMS | sekundární iontová hmotnostní spektrometrie |
| SPE | extrakce pevnou fází |
| SPME | mikroextrakce pevnou fází |
| TCD | tepelně vodivostní katarometr |
| TLC | tenkovrstvá chromatopgrafie |
| TOF | průletový analyzátor |
| TS (TSI) | termosprej |
| UV | ultrafialové světlo |
| VIS | viditelné světlo |
| WCOT | kolony s kapalnoustacionární fází |

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Příprava kalibračního roztoku.

Příloha 2: MS full spektra standardů v záporném módu.

Příloha 3: MS full spektra standardů v kladném módu.

Příloha 4: MS² full spektra standardů v záporném módu.

Příloha 5: MS² full spektra standardů v kladném módu.

Příloha 6: Optimalizace složení mobilní fáze –UV/VIS chromatogram při 280 nm

Příloha 7: Optimalizace pH mobilní fáze (UV/VIS, 280 nm)

Příloha 8: Kalibrační křivky pro dostupné standardy polyfenolů a karotenoidů.

Příloha 9: Kyselina chlorogenová v jablku.

Příloha 10: Epikatechin v dýni.

Příloha 11: Katechin v jablku.

Příloha 12: Rutin v pomeranči

Příloha 13: Kaempferol v dýni.

Příloha 14: Taxifolin v pomeranči.

Příloha 15: Eriodyktiol v pomeranči.

Příloha 16: Naringin v grepu.

Příloha 17: Kyselina kumarová v citrusech.

Příloha 18: Kyselina kávová v mandarince.

Příloha 19: Kyselina citrónová v grepu.

Příloha 20: Chrysin v brambore.

Příloha 21: Prokyanidin v grepu.

Příloha 22: Kofein v kávě.

Příloha 23: Xanthohumol v pivě.

Příloha 24: Kyselina jablečná.

Příloha 25: Komplexní zdroj –dýně.

Příloha 26: Komplexní zdroj –grep.

Příloha 27: β-karoten v mrkvi.

Příloha 28: Lutein v rajčeti.

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Příprava kalibračního roztoku.

B.1 Caffeine, MRFA, and Ultramark 1621 Stock Solutions

For tuning and calibrating the ESI system, you use a solution of caffeine, MRFA, and Ultramark 1621 in an acetonitrile / methanol / water solution containing 1% acetic acid. You prepare the calibration solution from each of the following:

- Caffeine stock solution
- MRFA stock solution
- Ultramark 1621 stock solution

Note. Vials of caffeine, MRFA, and Ultramark 1621 are included in the API accessory kit. To order more of these compounds, write or call:

Sigma Chemical Company
P. O. Box 14508
St. Louis, Missouri, USA 63178-9916
(800) 325-3010 (in the USA or Canada)
(314) 771-3750 (outside the USA or Canada)

CAUTION. AVOID EXPOSURE TO POTENTIALLY HARMFUL MATERIALS. Always wear protective gloves and safety glasses when you use solvents or corrosives. Also, contain waste streams and use proper ventilation. Refer to your supplier's Material Safety Data Sheets (MSDS) for procedures that describe how to handle a particular solvent and/or corrosive substance.

Stock Solution: Caffeine

A 1 mg/mL stock solution of caffeine in 100% methanol is provided with your LCQ system.

Stock Solution: MRFA

Prepare a 1 mL stock solution of 5.0 nmol/ μ L MRFA in 50:50 methanol / water as follows:

1. Obtain the vial of L-methionyl-arginyl-phenylalanyl-alanine acetate•H₂O (MRFA) in your accessory kit. In this form, the MRFA sample has an average molecular weight of 607.7 u. Carefully weigh 2.6 mg of the MRFA sample.
2. Make up the MRFA solution to a total volume of 1.0 mL with a mixture of 50:50 methanol / water. Mix the solution thoroughly.
3. Label the vial "MRFA stock solution."

Stock Solution: Ultramark 1621

Prepare a 10 mL stock solution of 0.1% Ultramark 1621 in acetonitrile as follows:

1. Obtain the vial of Ultramark 1621 in your accessory kit.
2. Using a syringe, measure out 10 μ L of Ultramark 1621, and dissolve it in 10 mL of acetonitrile. Mix the solution thoroughly.
3. Label the vial Ultramark 1621 stock solution.

Go to the next topic: **ESI Calibration Solution: Caffeine, MRFA, Ultramark 1621.**

B.2 ESI Calibration Solution: Caffeine, MRFA, Ultramark 1621

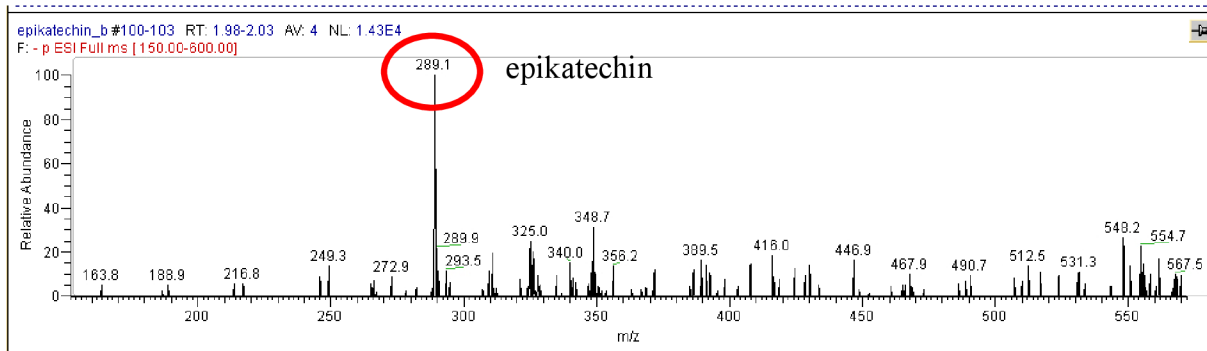
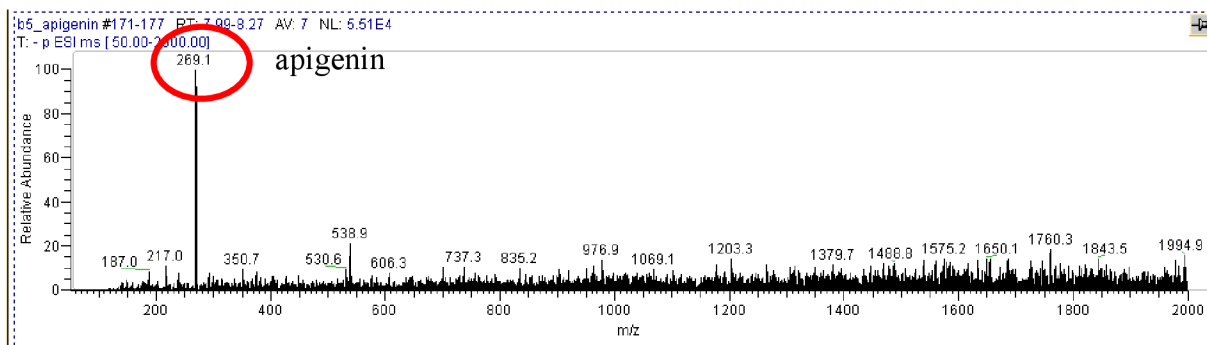
Prepare 5 mL of the calibration solution, as follows:

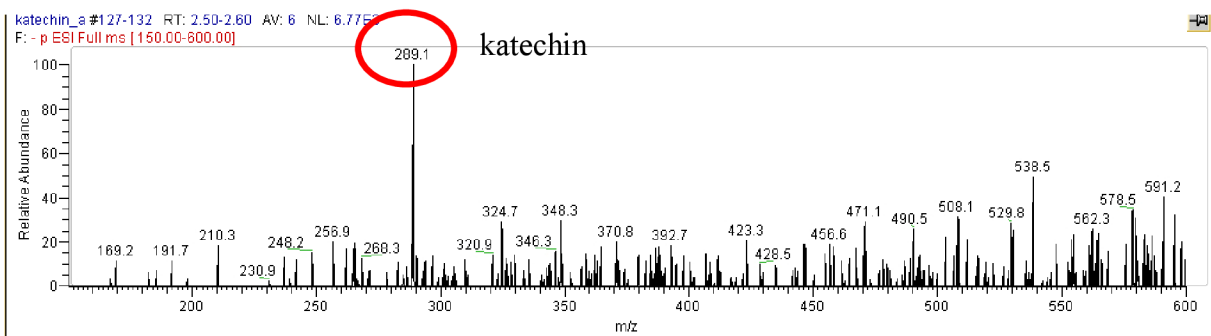
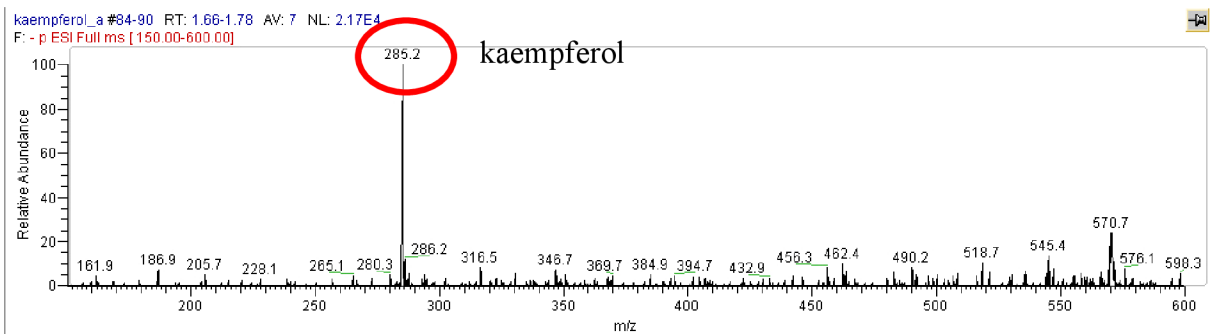
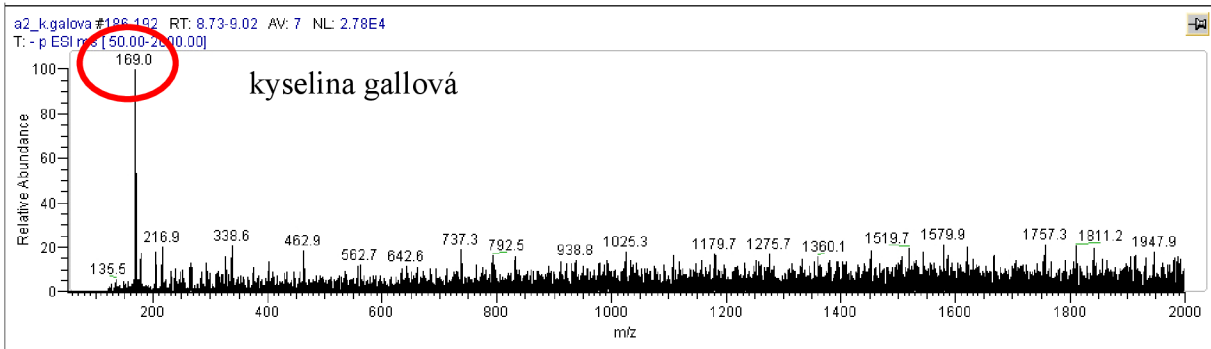
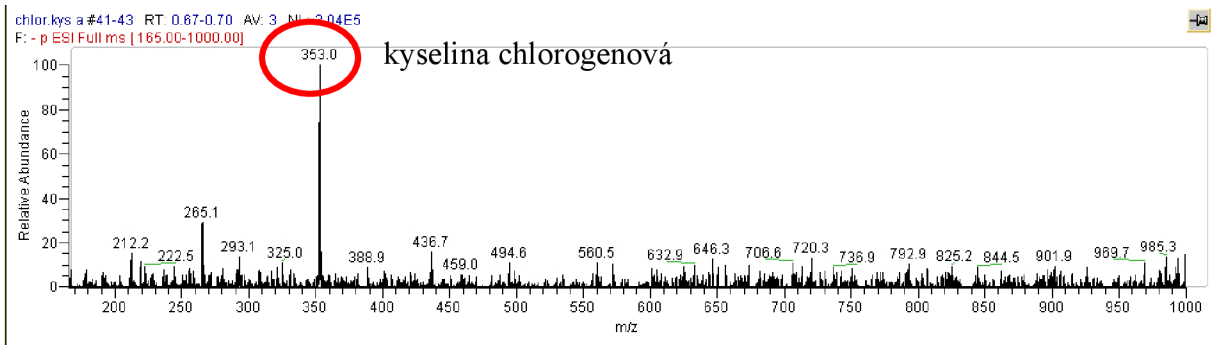
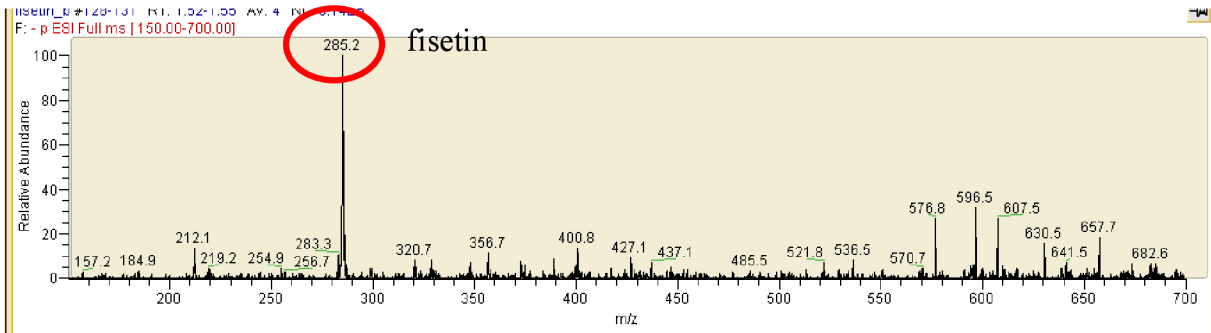
1. Pipet 100 μL of the stock solution of caffeine into a clean, dry vial.
2. Pipet 5 μL of the stock solution of MRFA into the vial.
3. Pipet 2.5 mL of the stock solution of Ultramark 1621 into the vial.

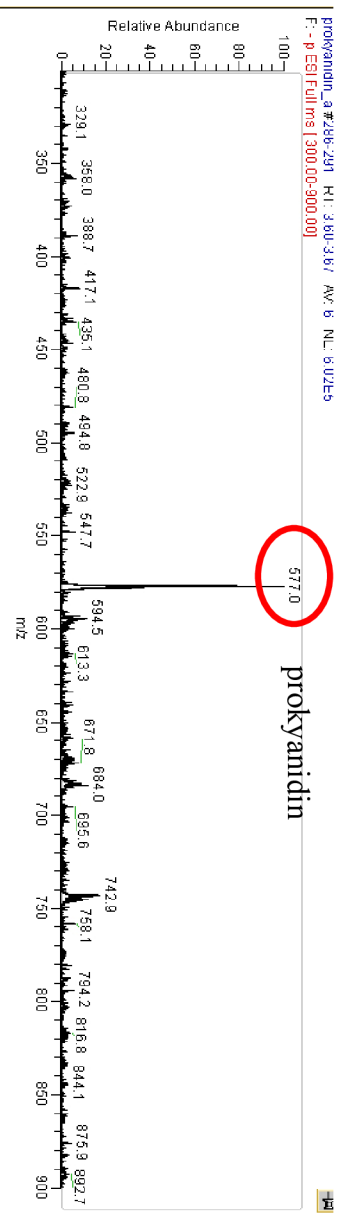
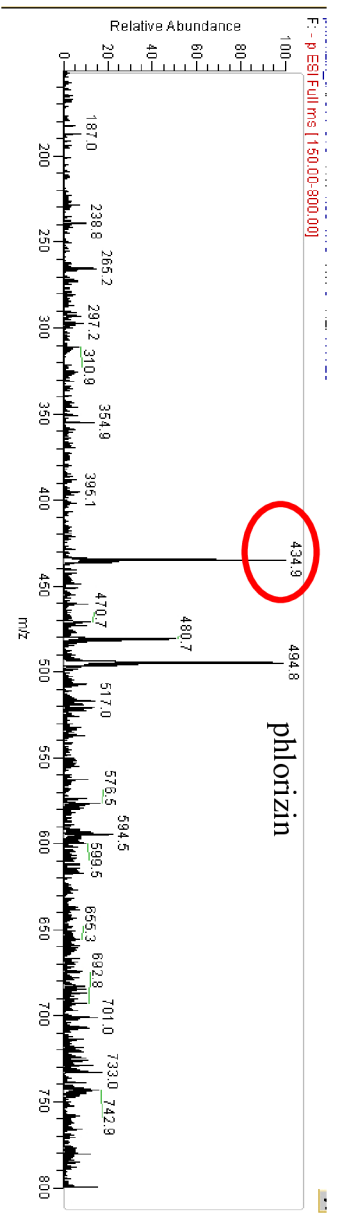
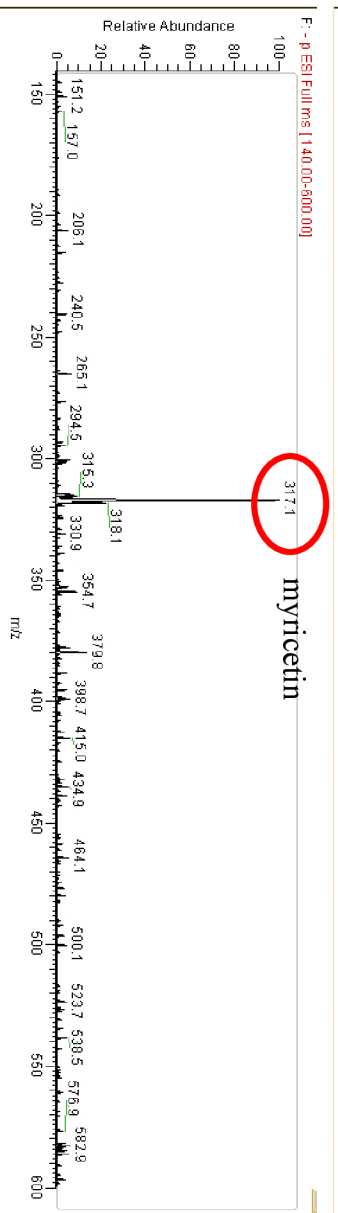
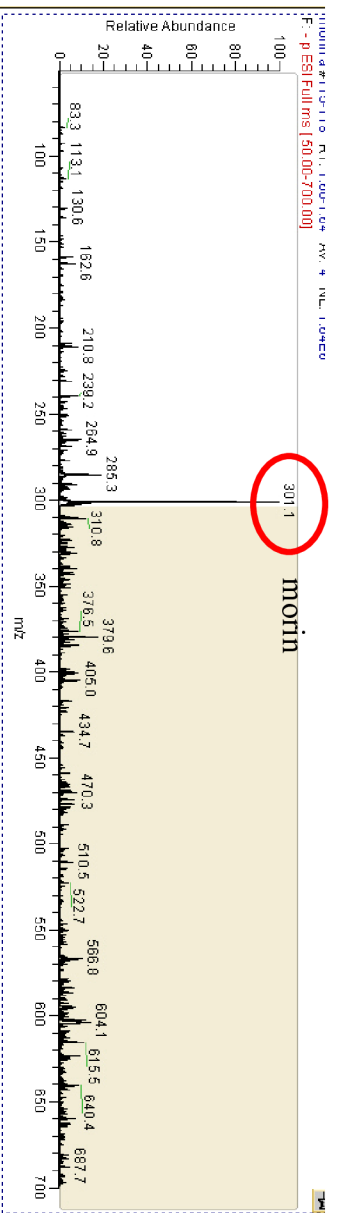
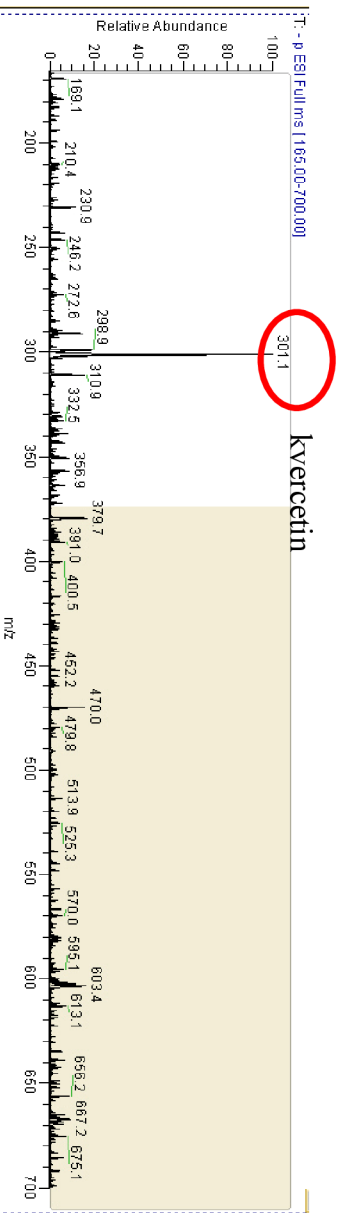
Note. Use only glass pipets or stainless steel syringes when measuring glacial acetic acid. Using plastic pipet tips causes contamination of acid stock solutions, which can introduce contaminants in the calibration solution.

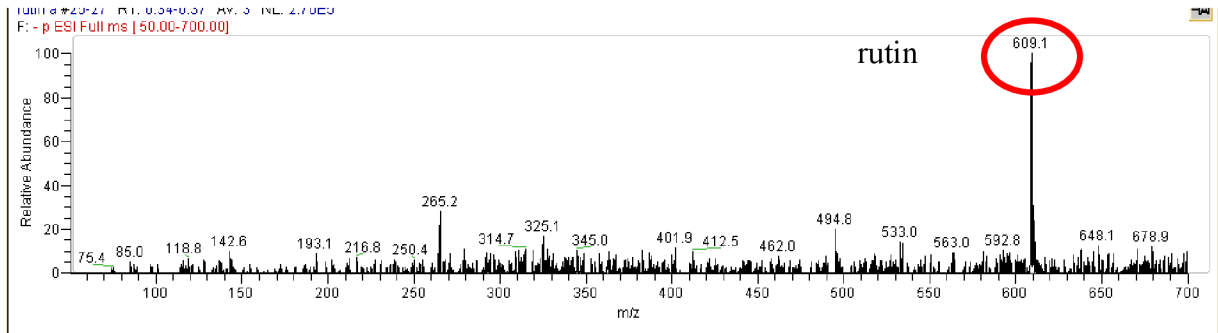
4. Pipet 50 μL of glacial acetic acid into the vial.
5. Pipet 2.34 mL of 50:50 methanol / water into the vial, and then mix the solution thoroughly.
6. Label the vial and store it in a refrigerator until it is needed.

Příloha 2: MS full spektra standardů v záporném módu.

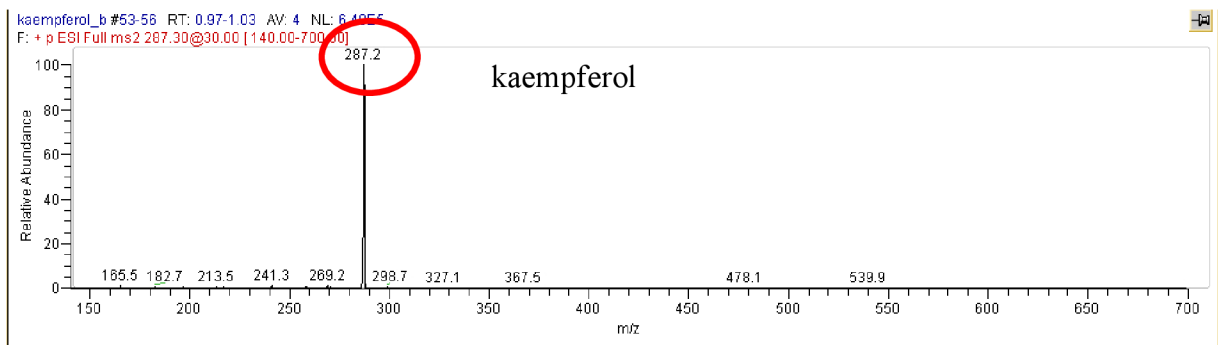
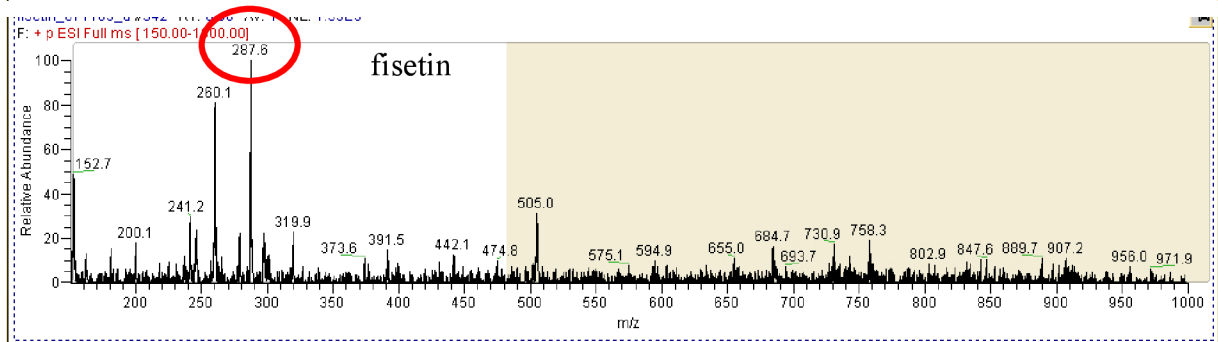
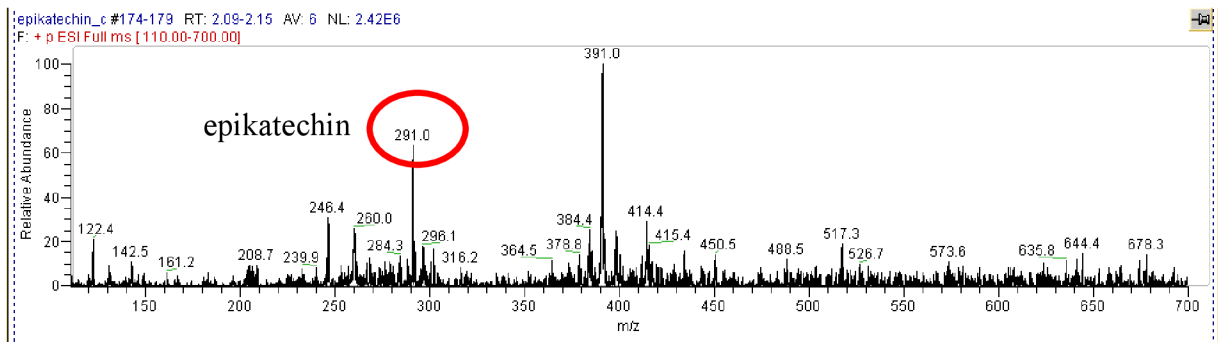


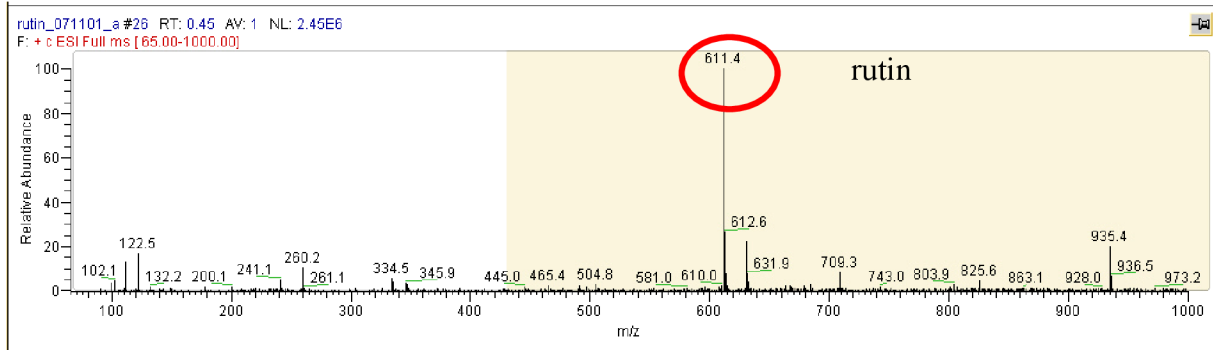
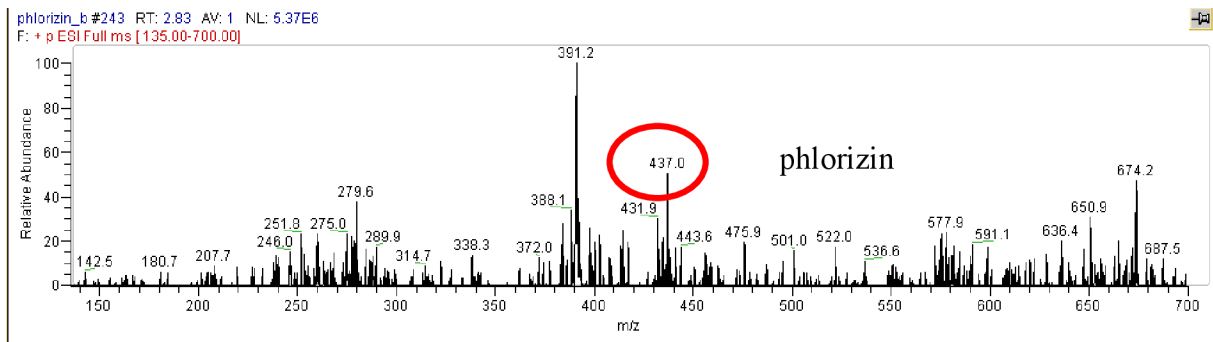
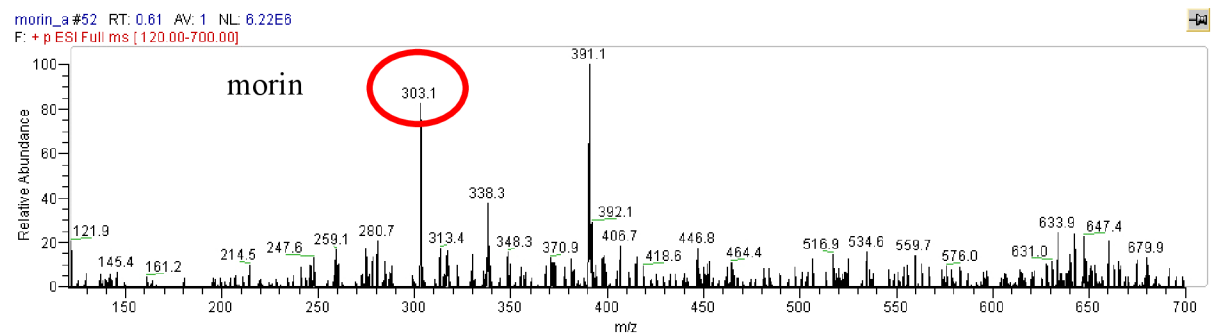
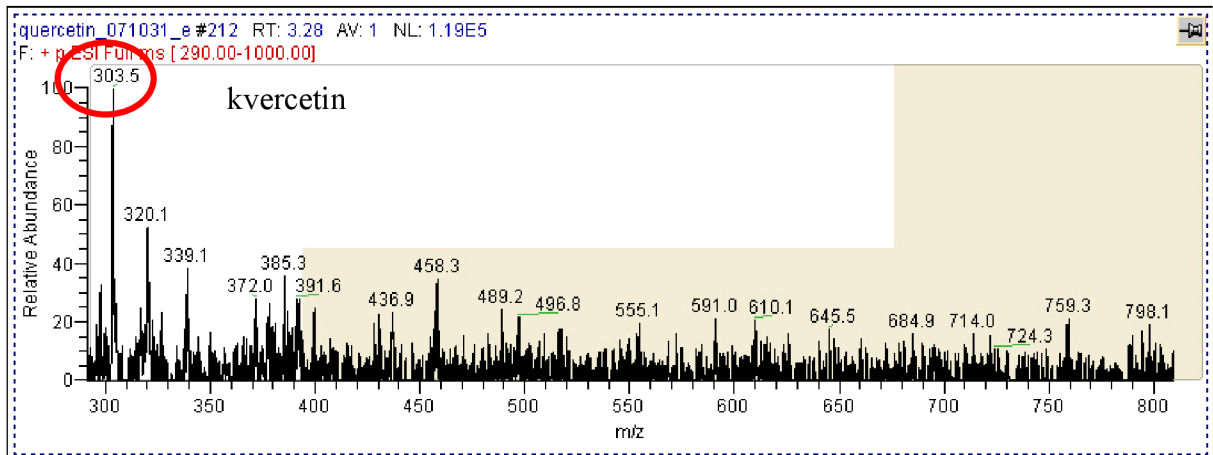


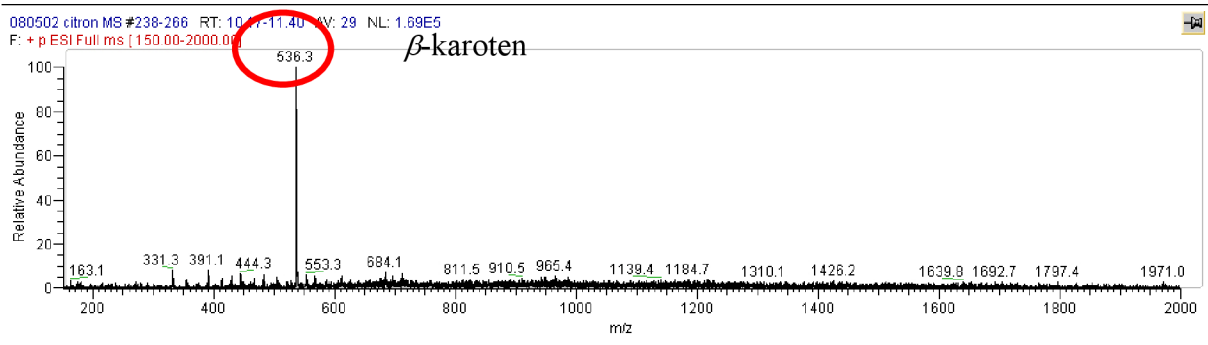




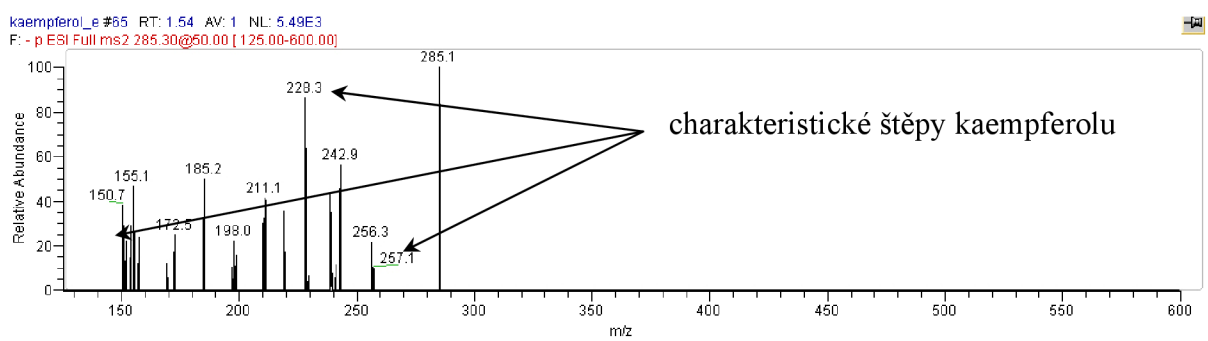
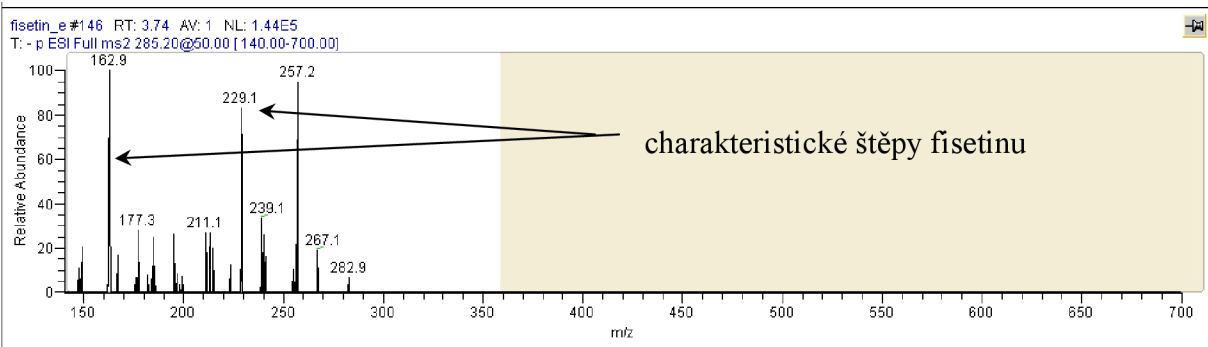
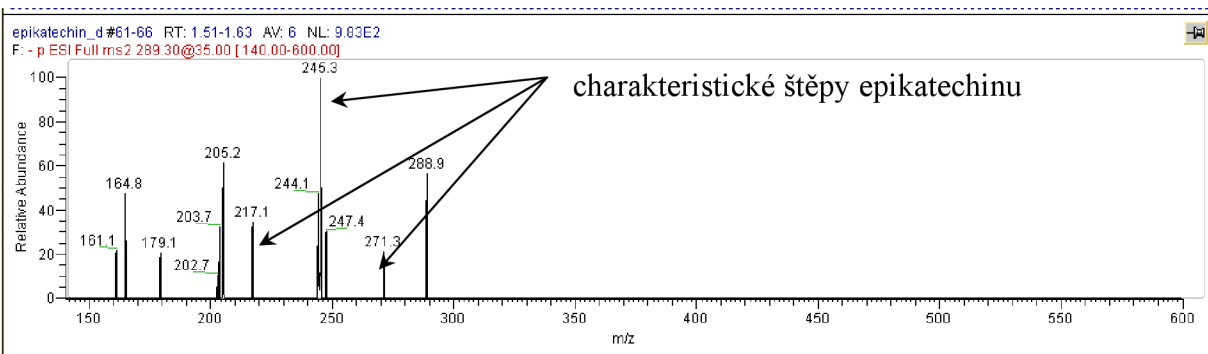
Příloha 3: MS full spektra standardů v kladném módu.

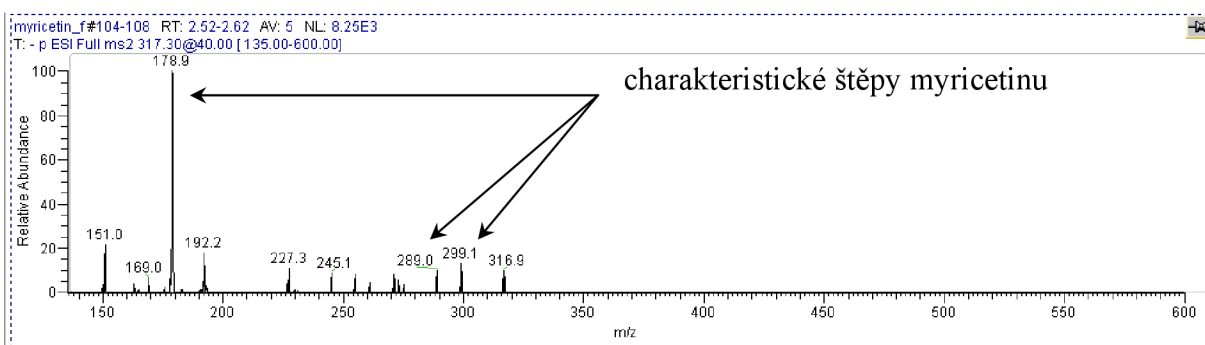
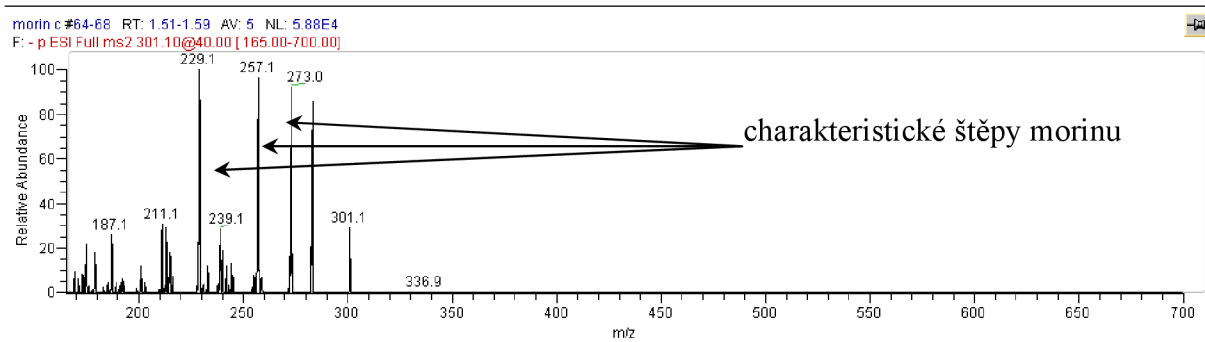
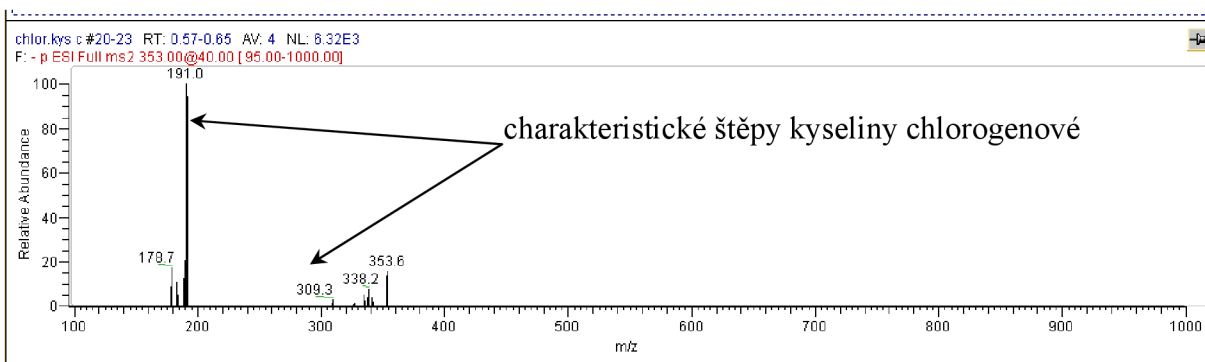
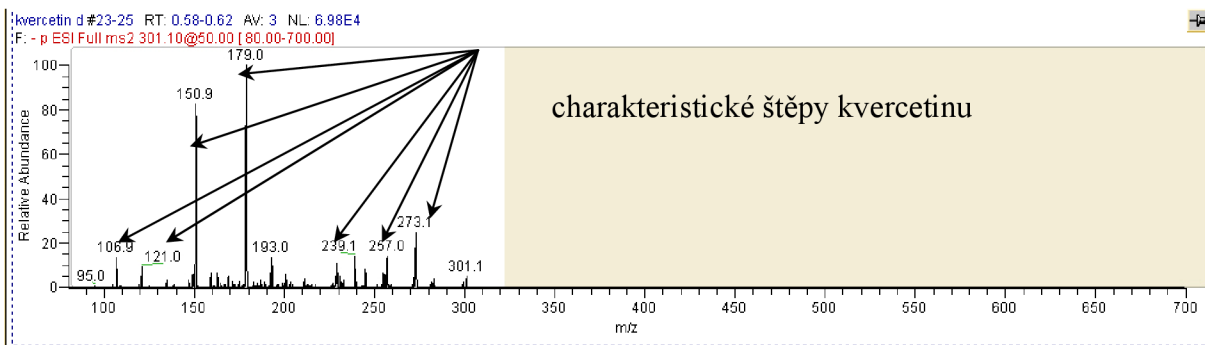
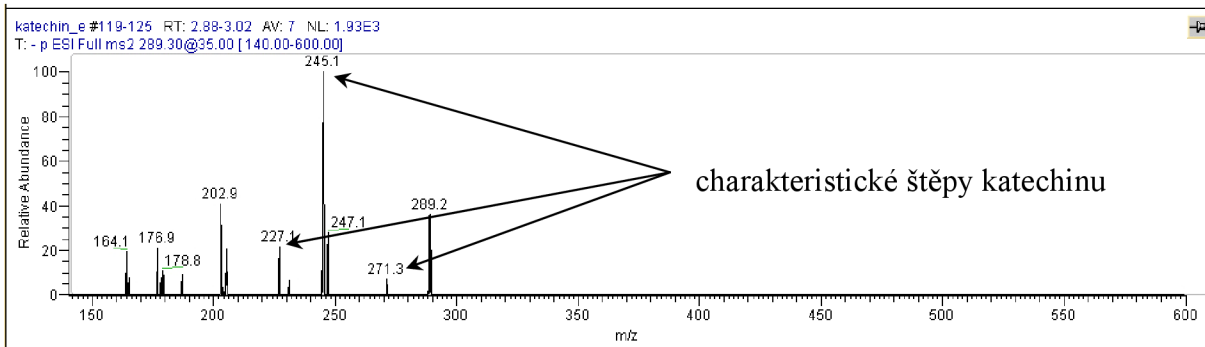


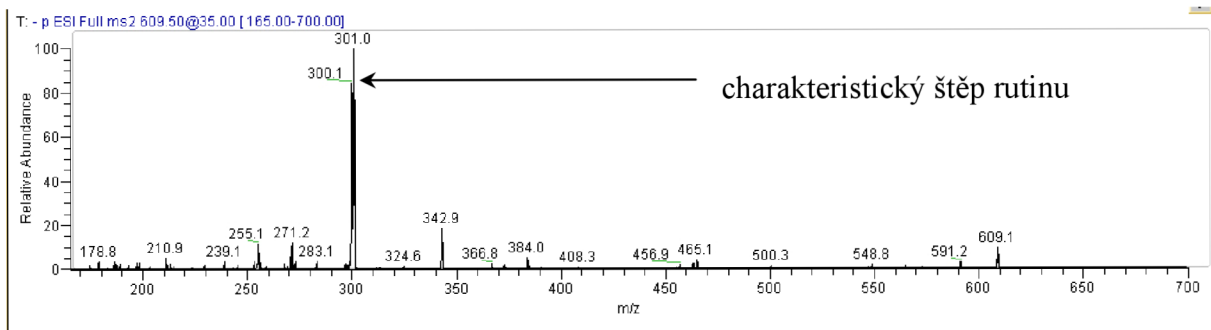




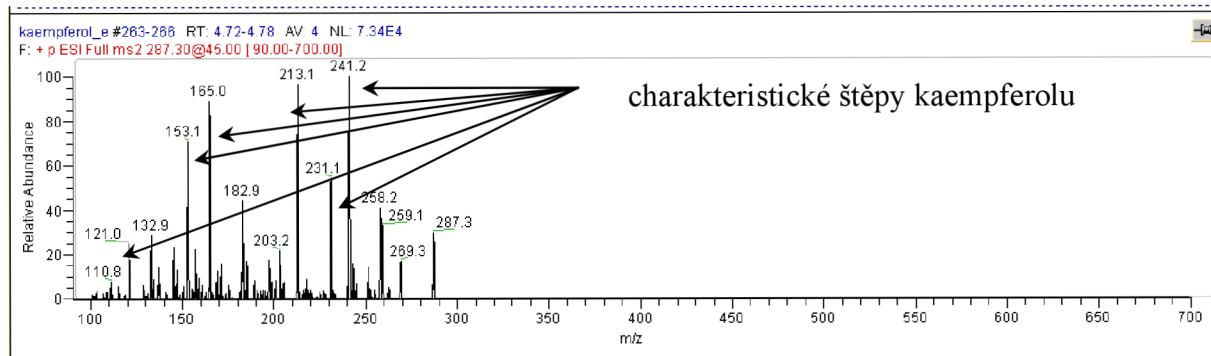
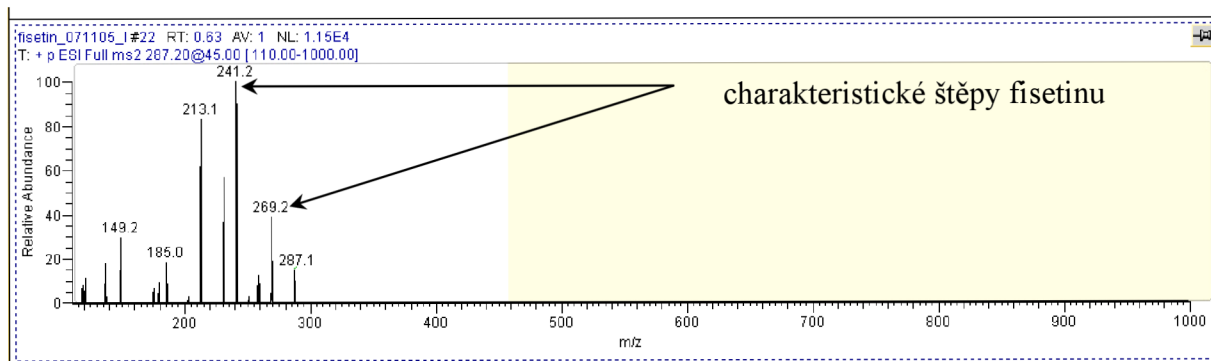
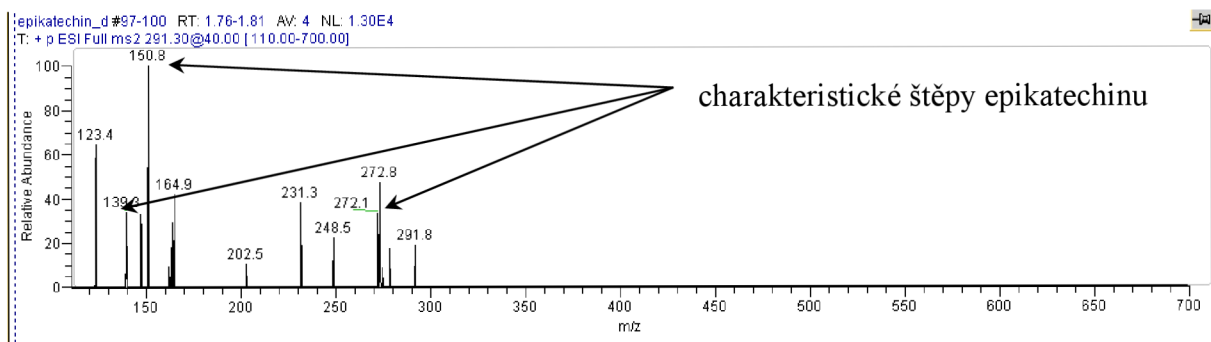
Příloha 4: MS² full spektra standardů v záporném módu.

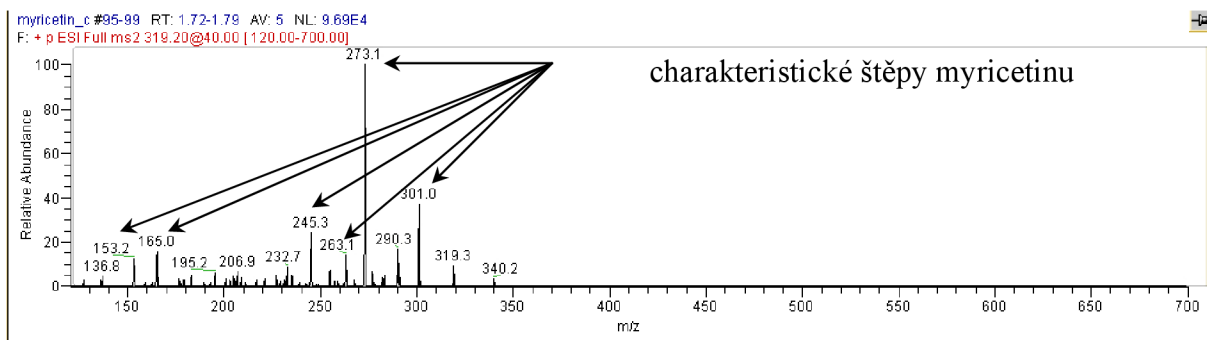
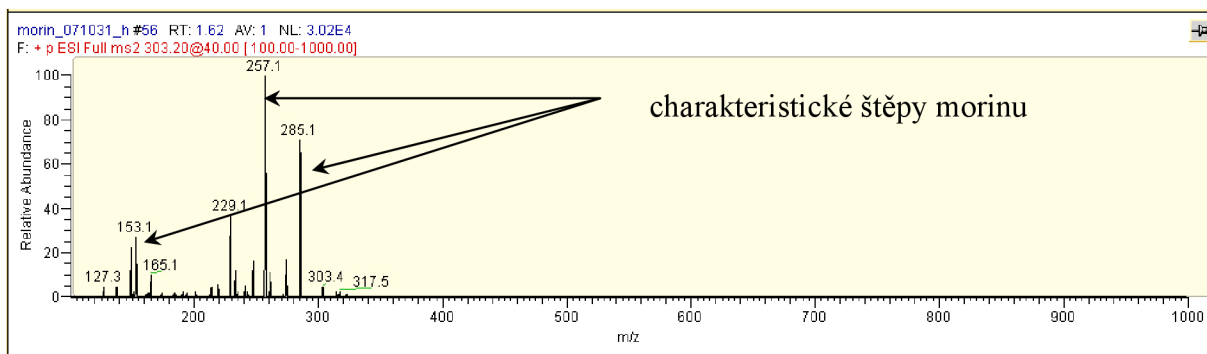
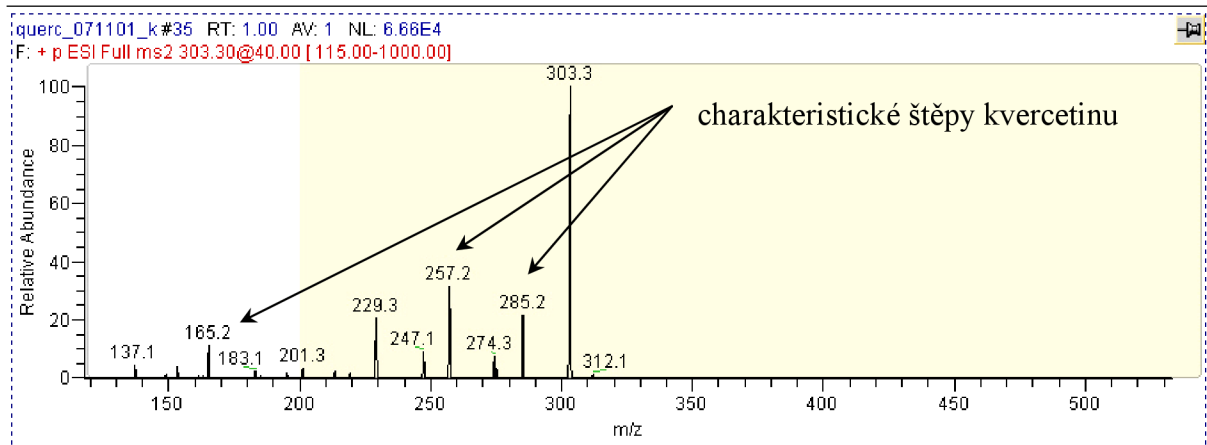
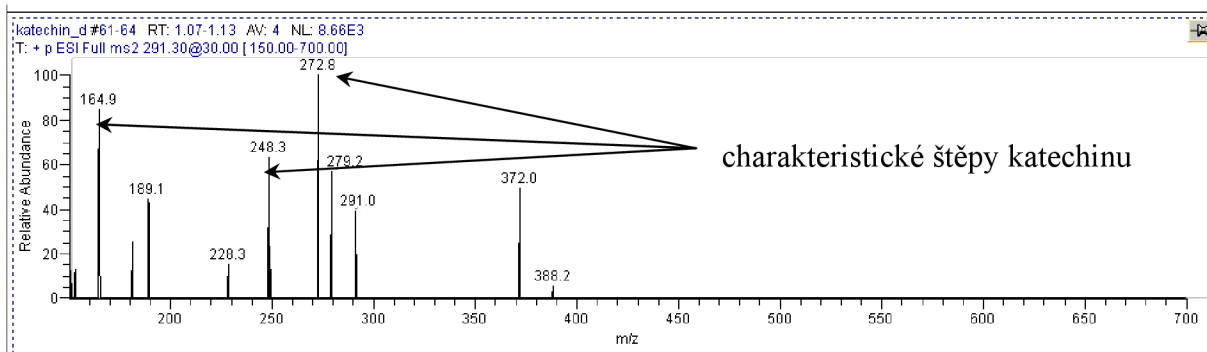




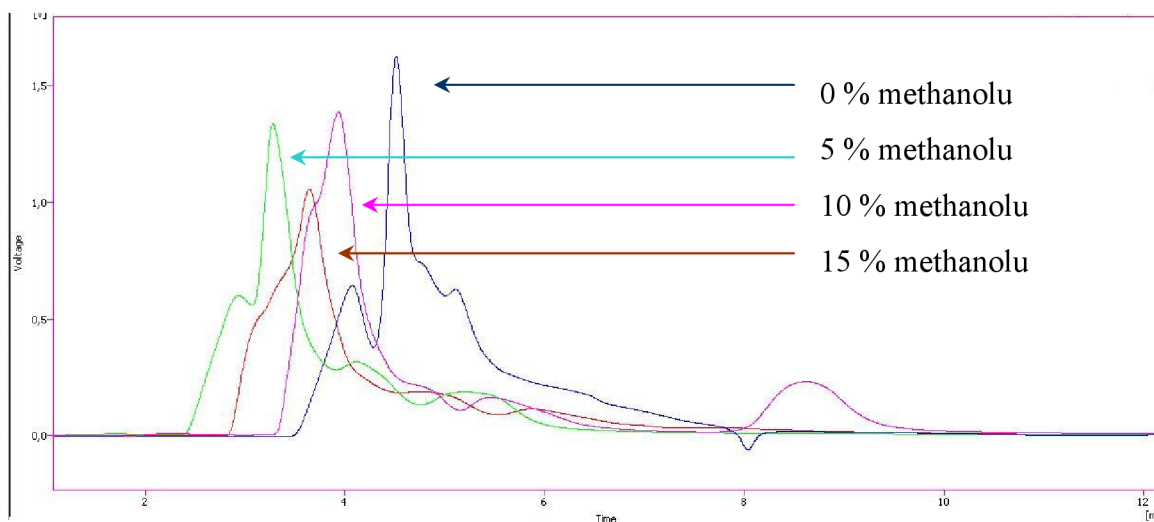


Příloha 5: MS² full spektra standardů v kladném módu.

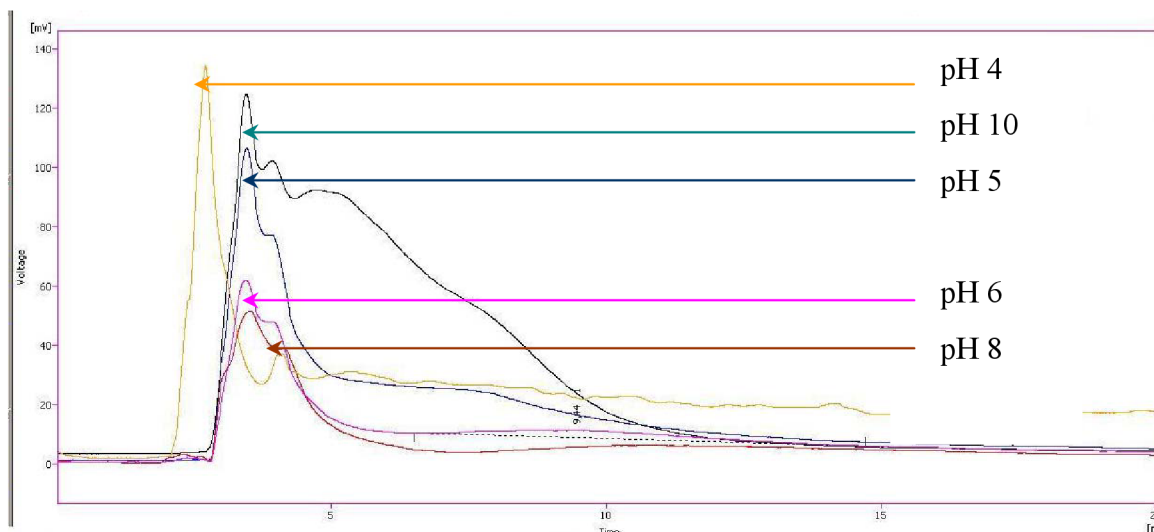




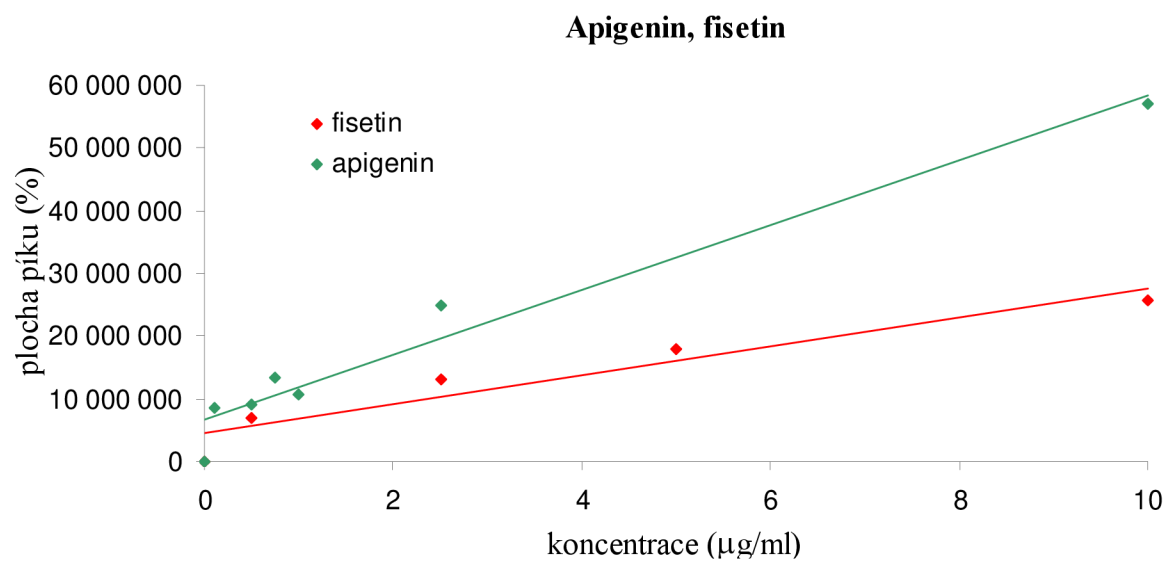
Příloha 6: Optimalizace složení mobilní fáze –UV/VIS chromatogram při 280 nm



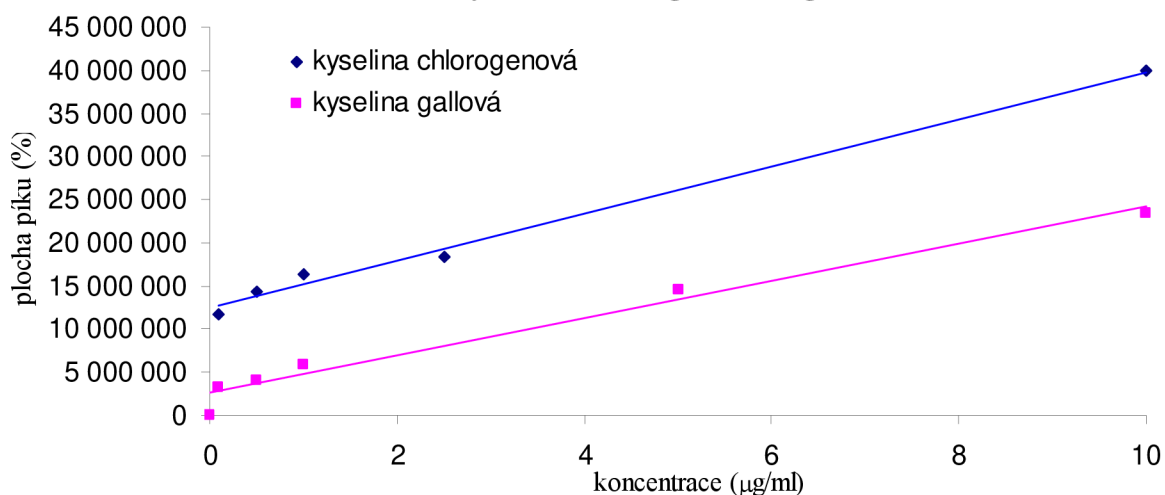
Priloha 7: Optimalizace pH mobilni fáze (UV/VIS, 280 nm)



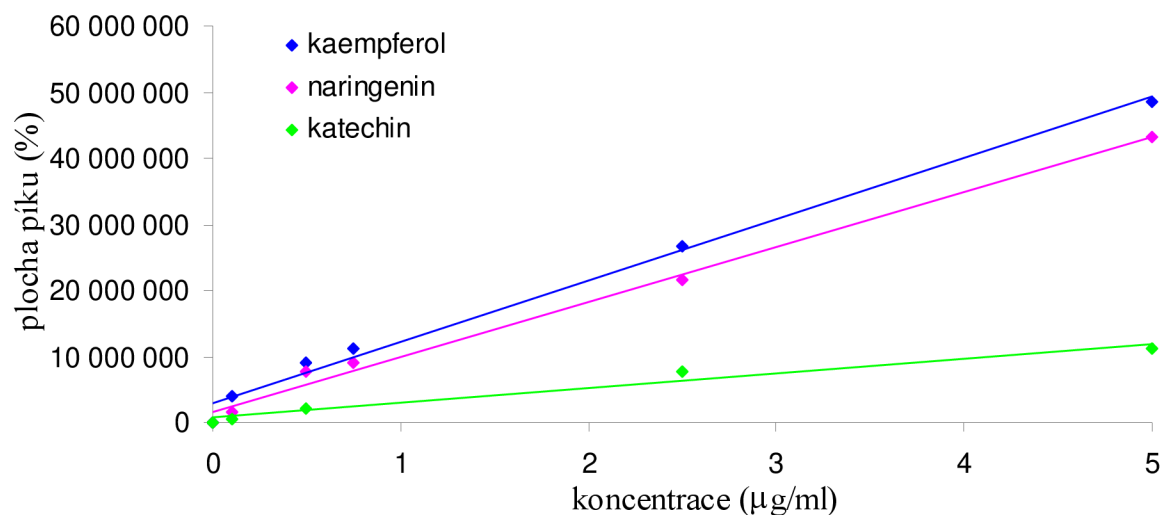
Priloha 8: Kalibrační křivky pro dostupné standardy polyfenolů a karotenoidů.



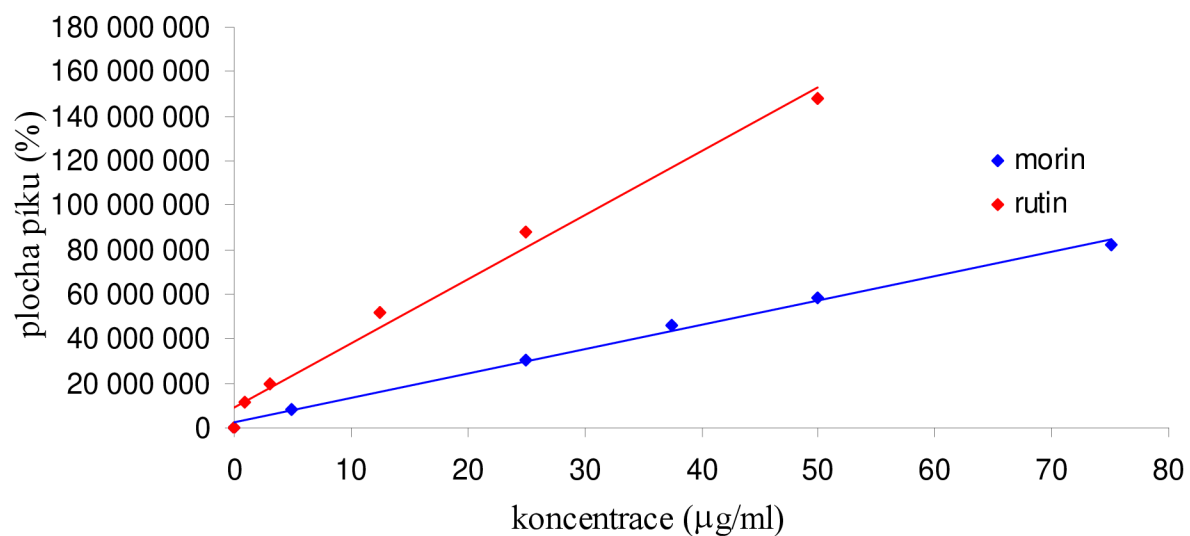
Kyselina chlorogenová a gallová



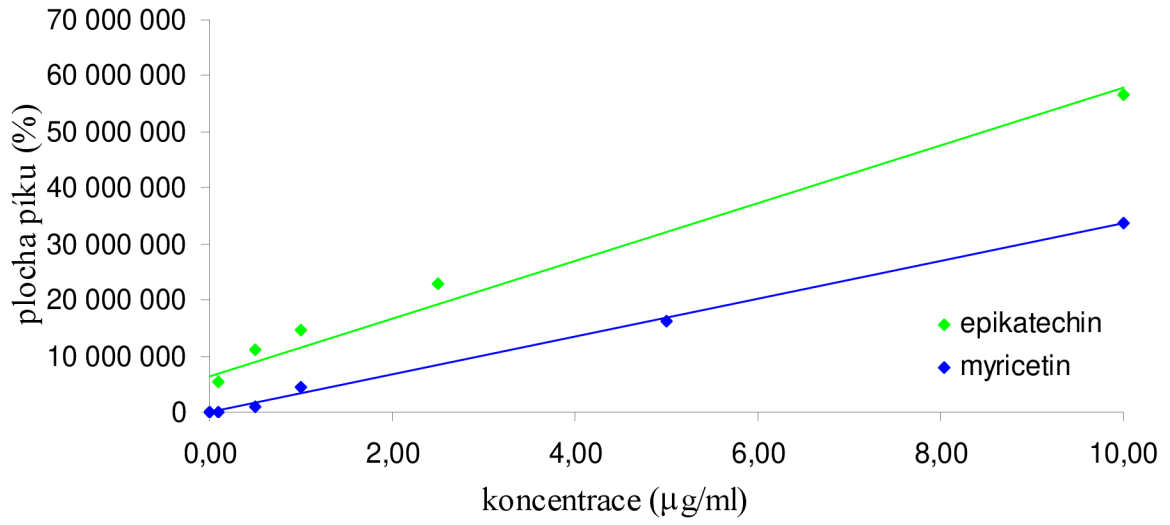
Naringenin, kaempferol



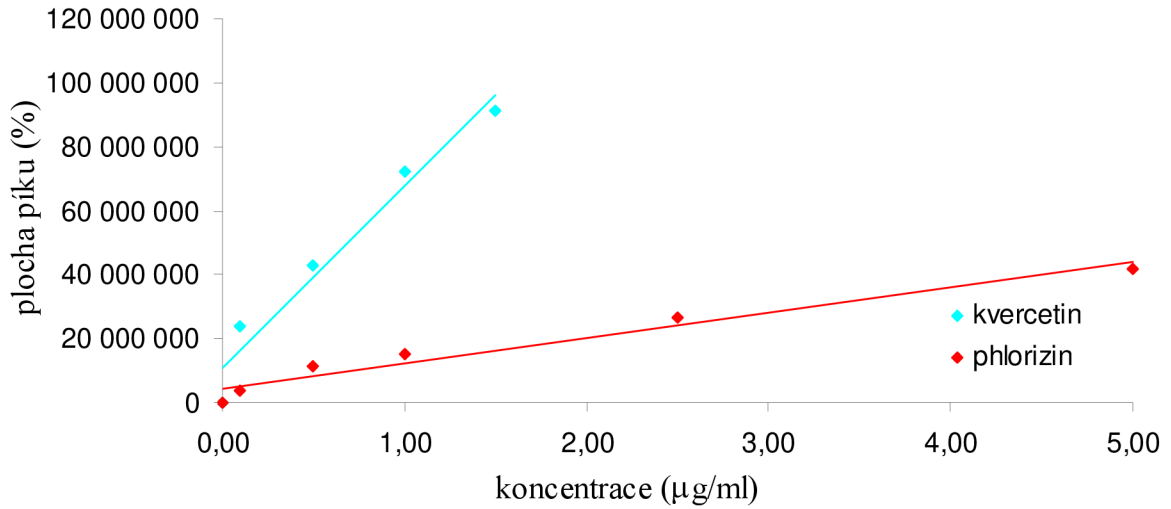
Rutin, morin



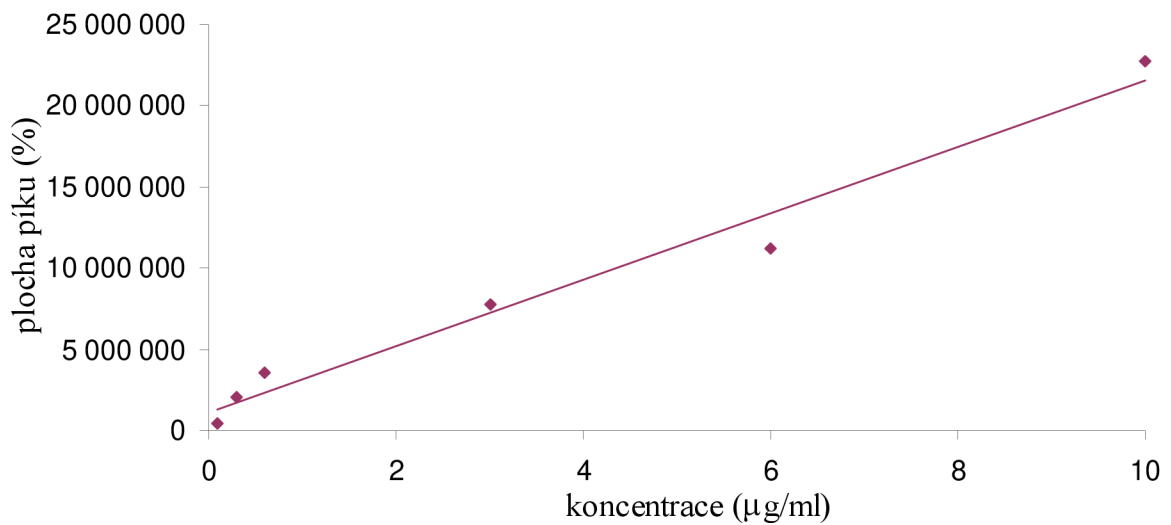
Myricetin, epikatechin



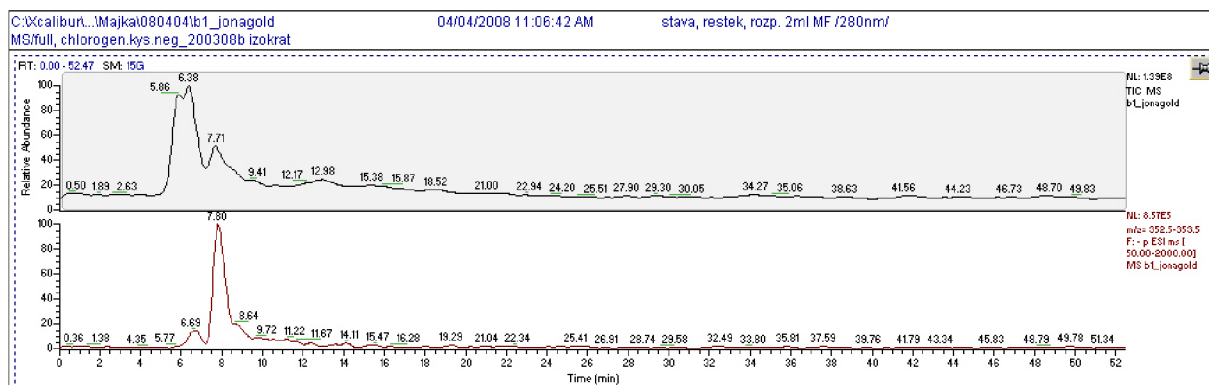
Kvercetin, phlorizin



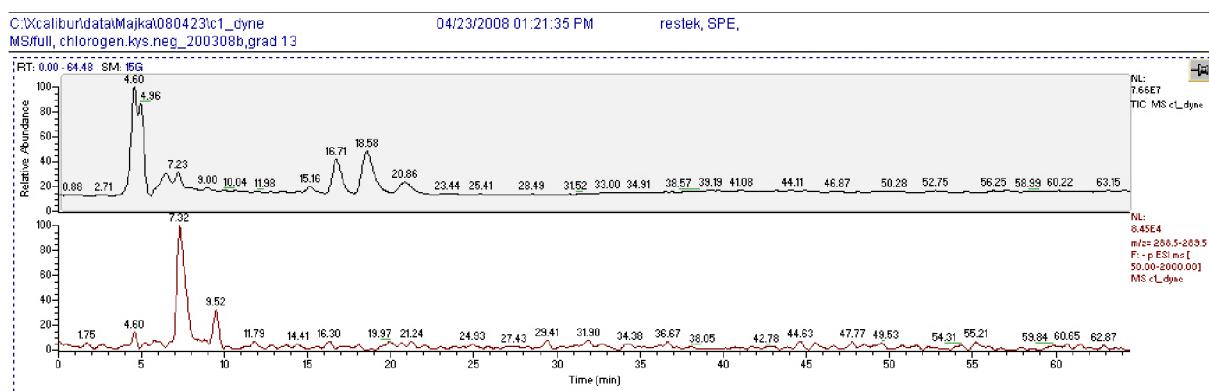
β -karoten



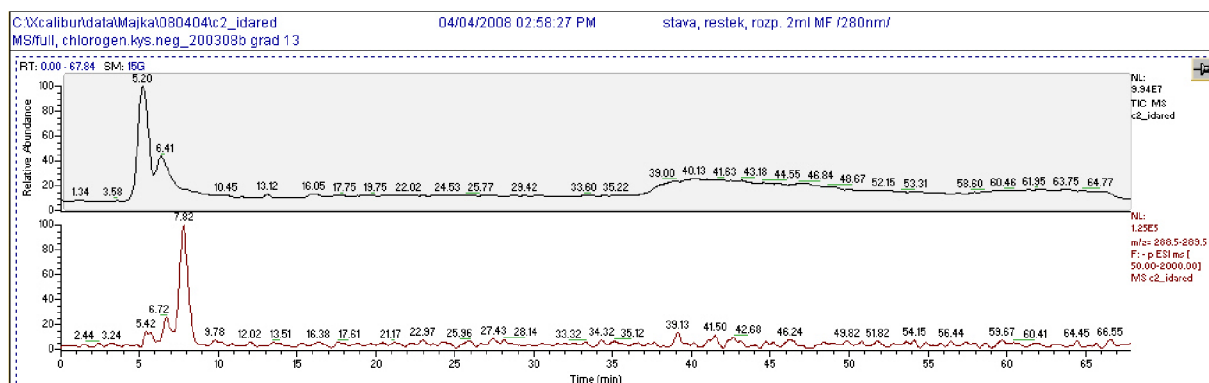
Příloha 9: Kyselina chlorogenová v jablku.



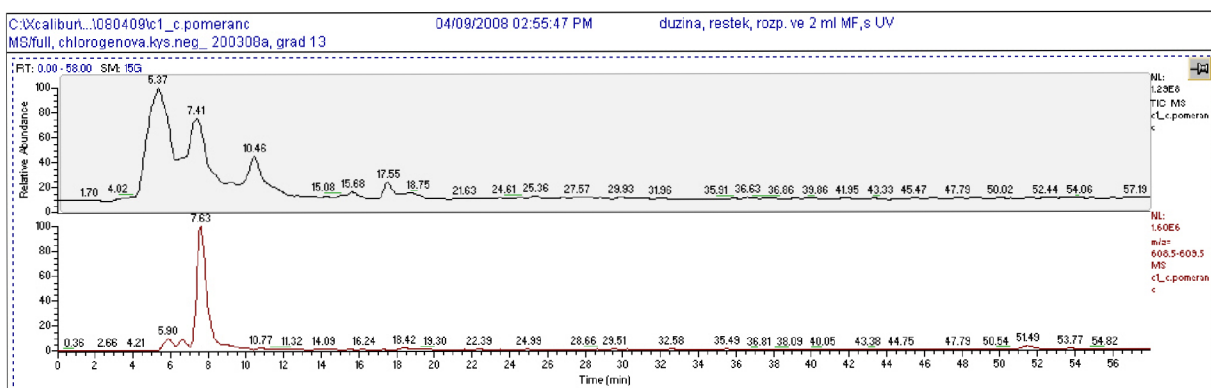
Příloha 10: Epikatechin v dýni.



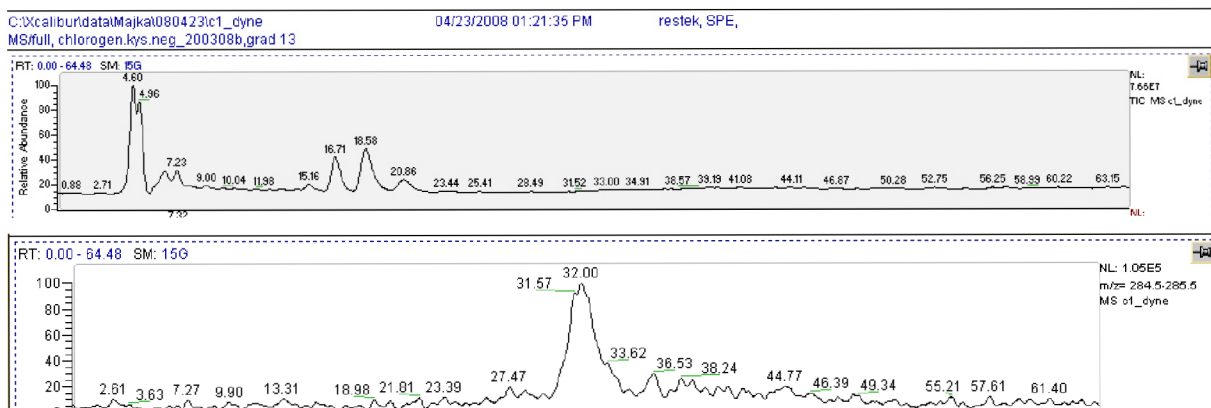
Příloha 11: Katechin v jablku.



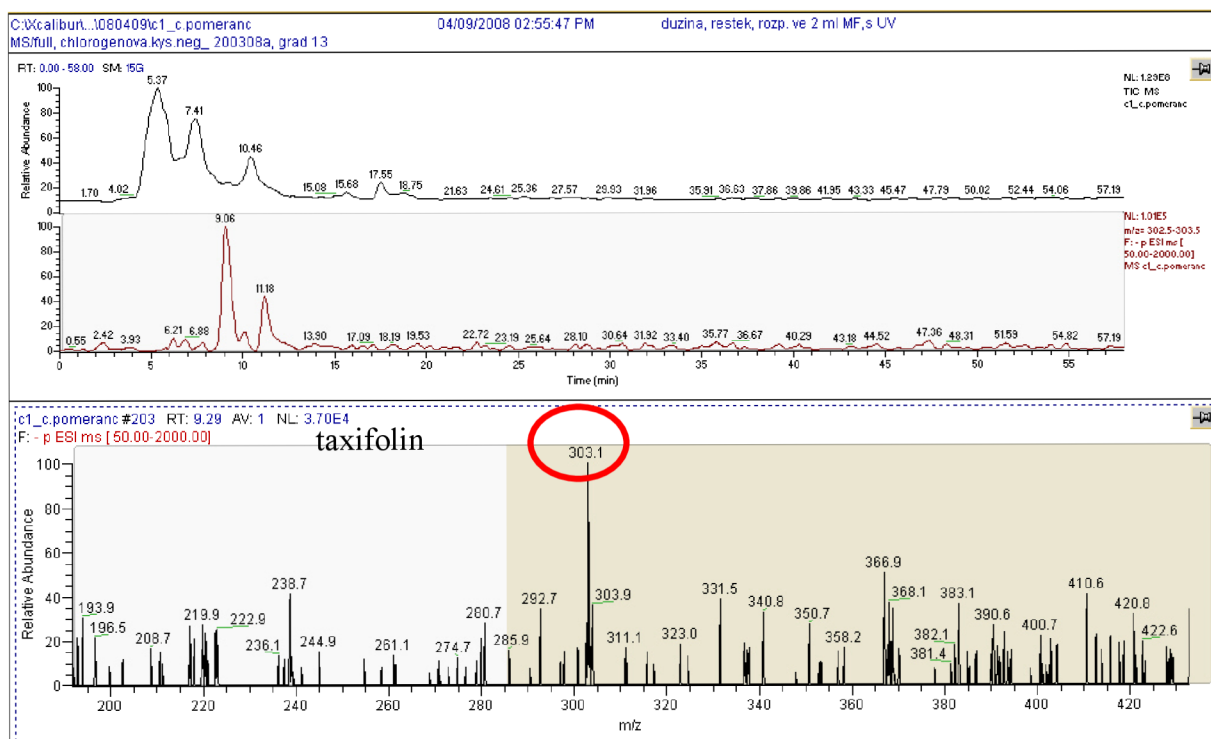
Příloha 12: Rutin v pomeranči



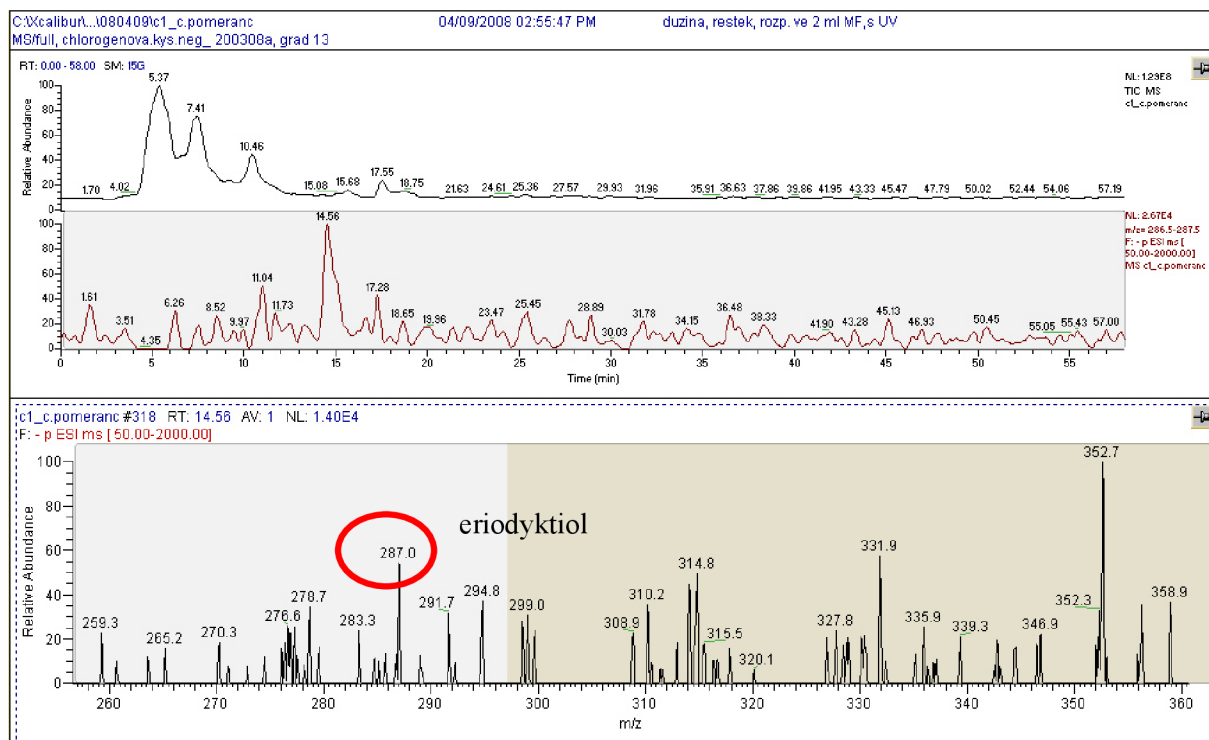
Příloha 13: Kaempferol v dýni.



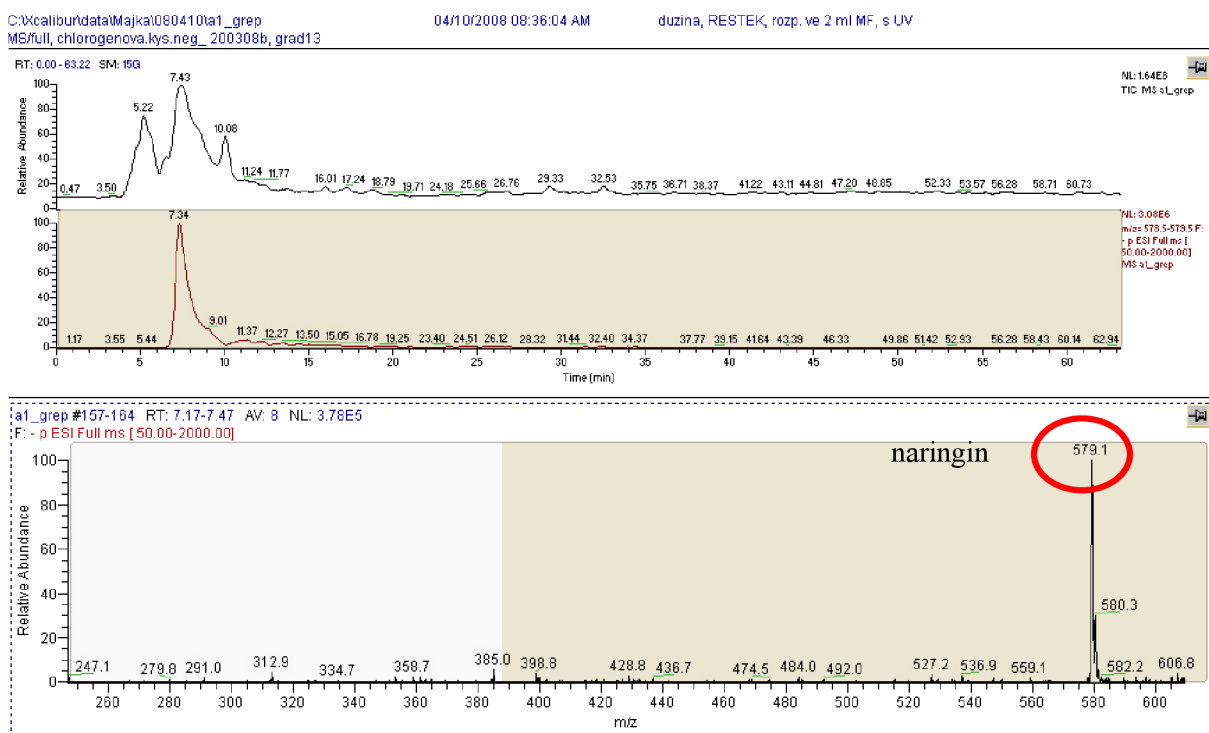
Příloha 14: Taxifolin v pomeranči.



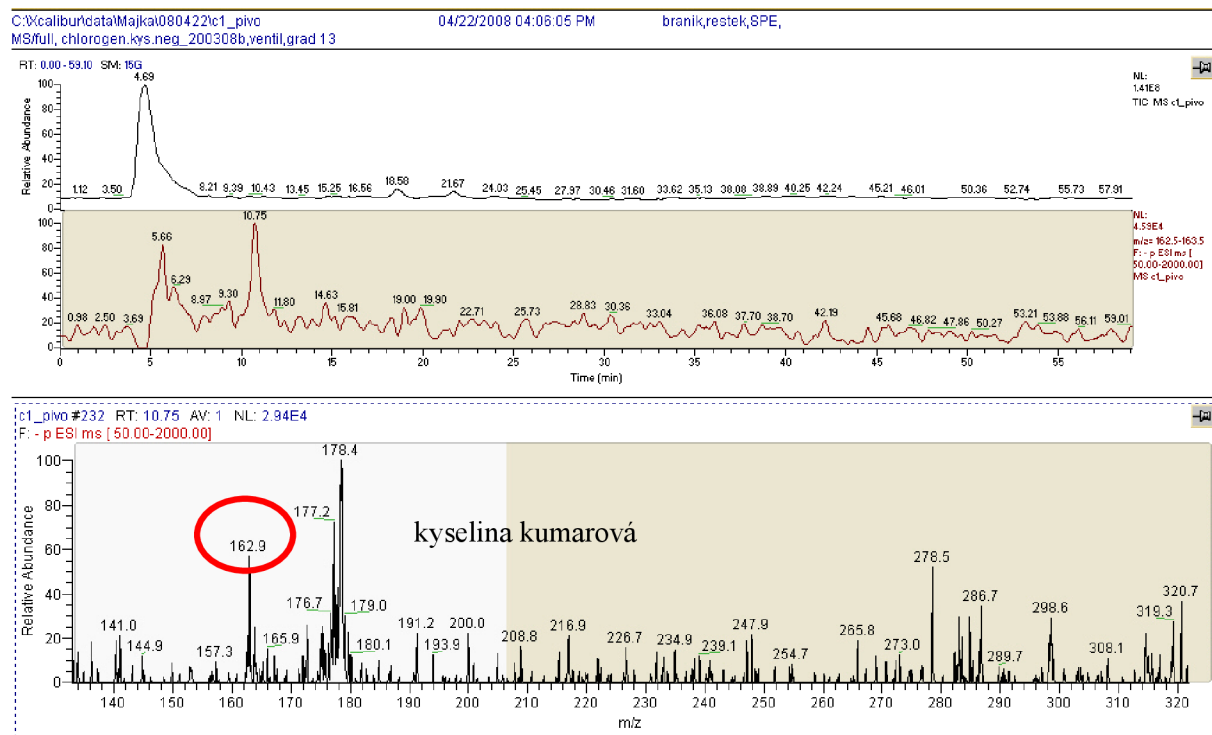
Příloha 15: Eriodyktiol v pomeranči.



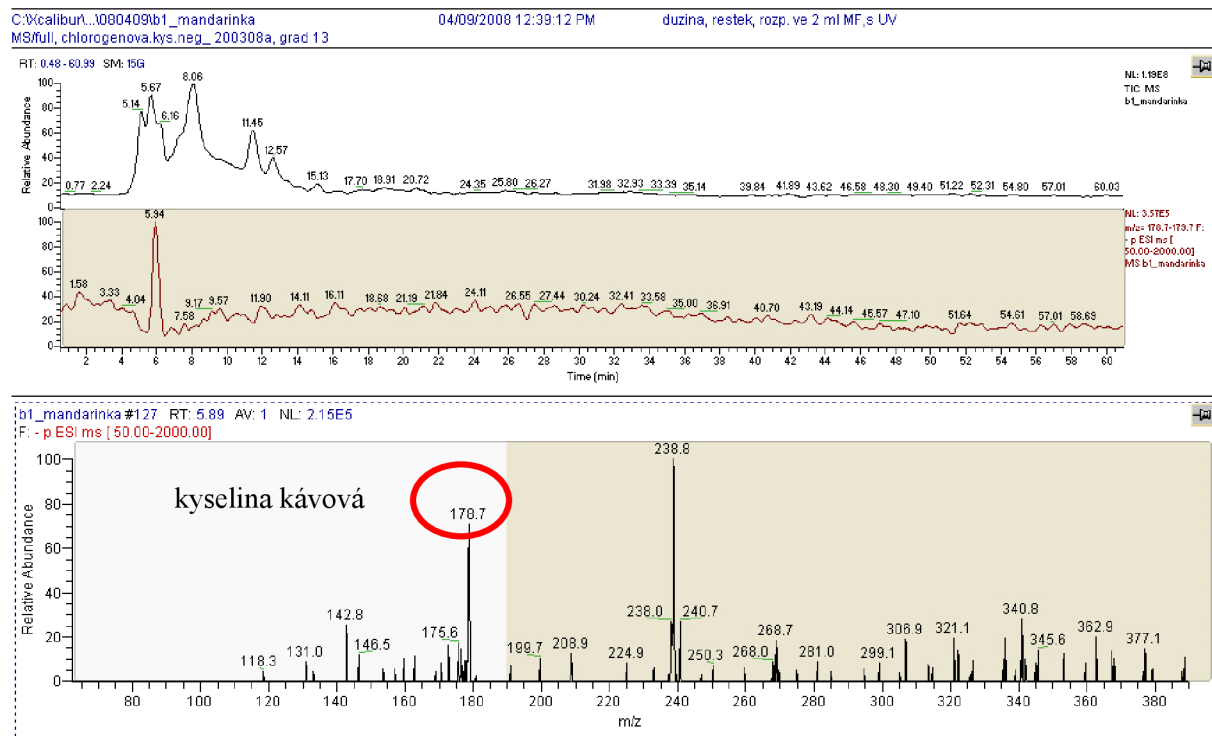
Příloha 16: Naringin v grepu.



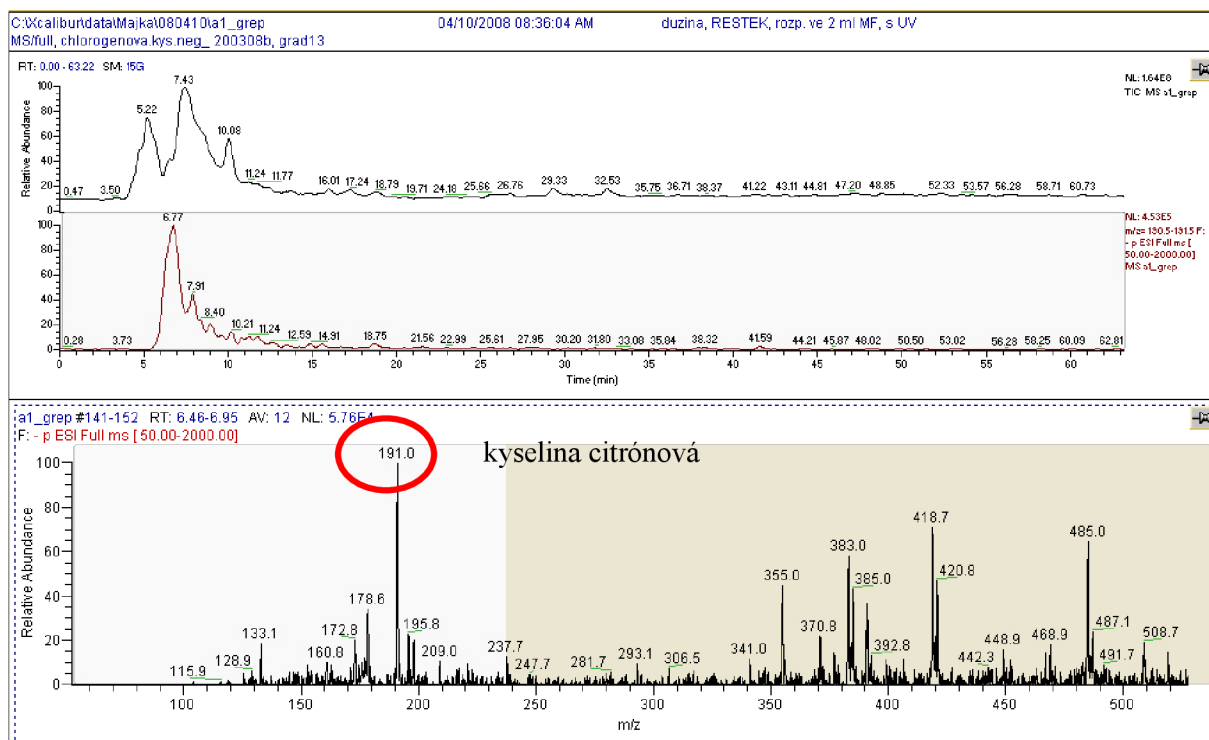
Příloha 17: Kyselina kumarová v citrusech.



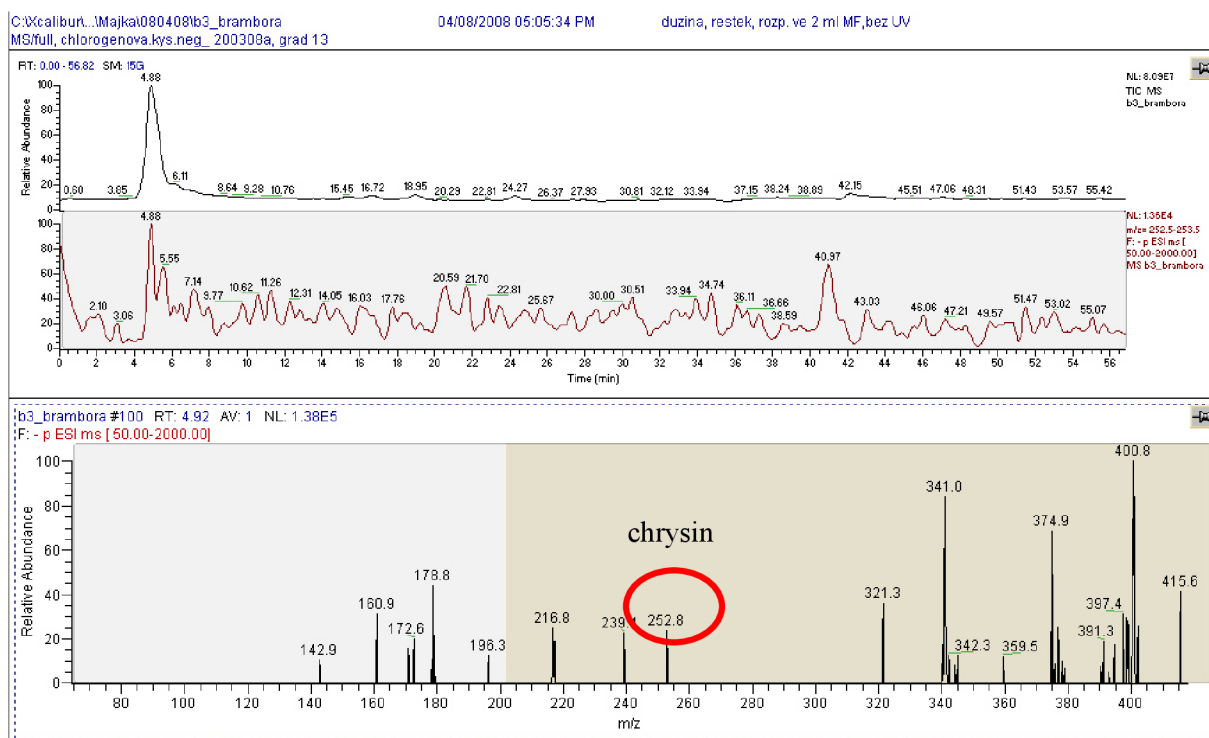
Příloha 18: Kyselina kávová v mandarince.



Příloha 19: Kyselina citrónová v grepu.



Příloha 20: Chrysin v brambore.

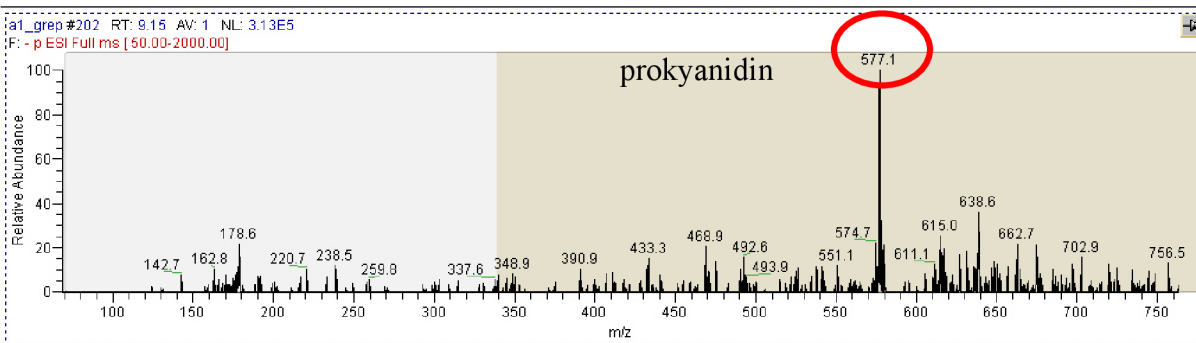
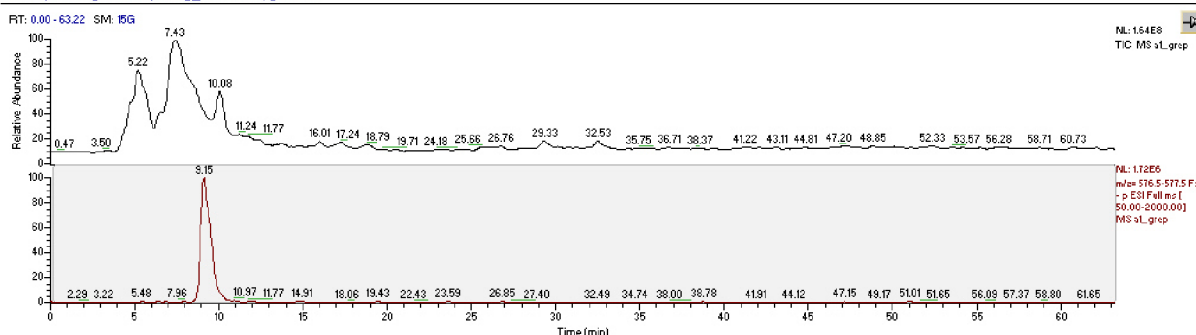


Příloha 21: Prokyanidin v grepu.

C:\Xcalibur\data\Majka\080410\la1_grep
MS/full, chlorogenova.kys.neg_200308b_grad13

04/10/2008 08:36:04 AM

duzina, RESTEK, rozp. ve 2 ml MF, s UV

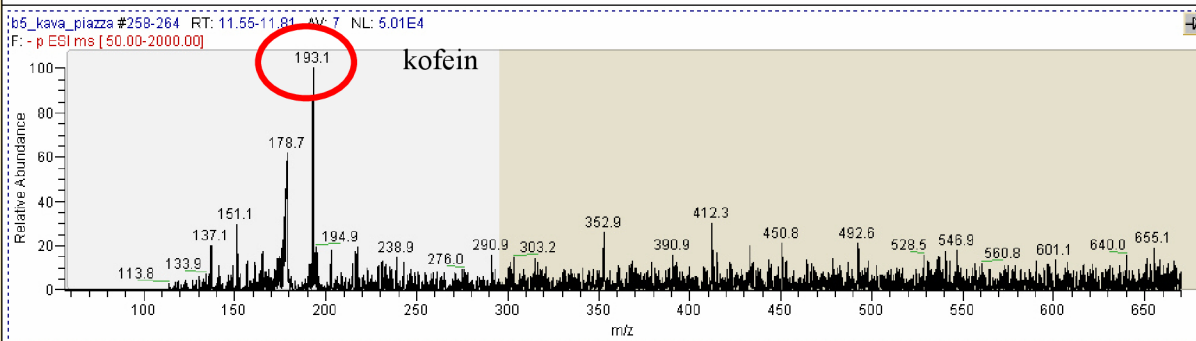
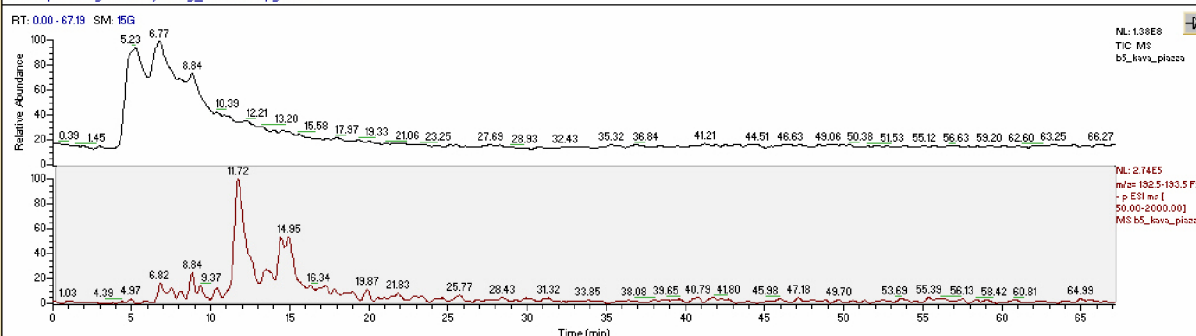


Příloha 22: Kofein v kávě.

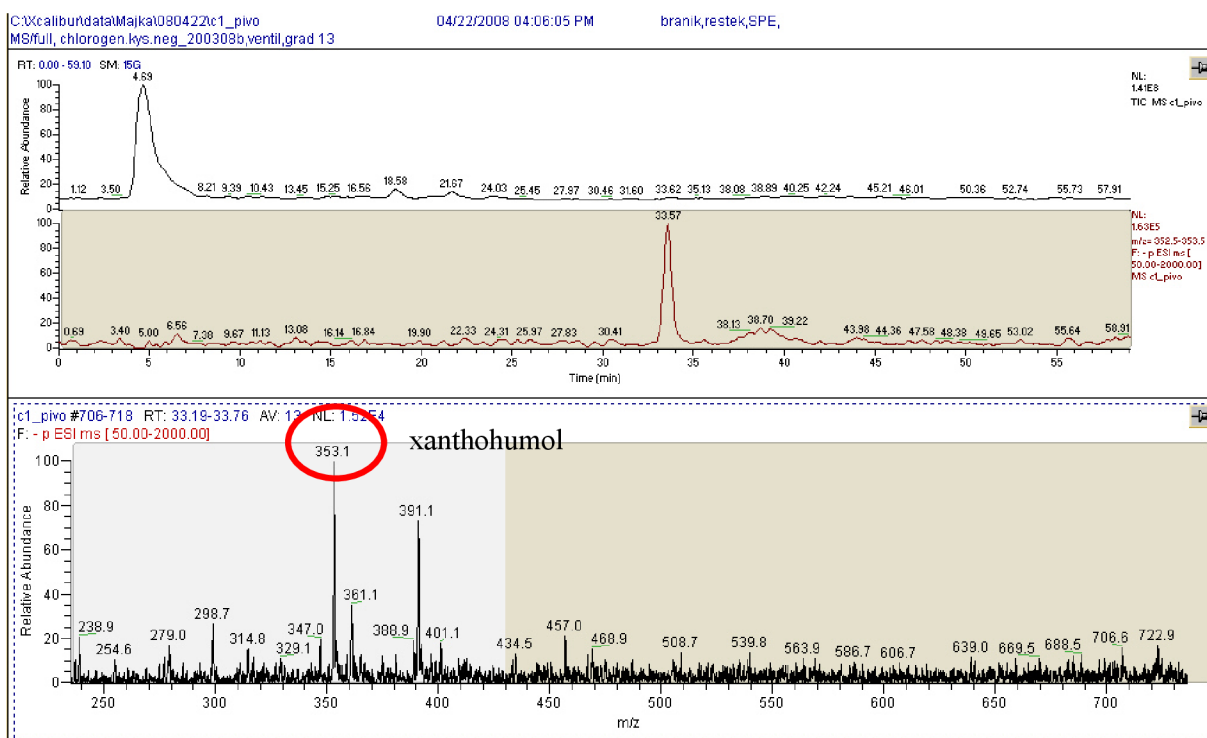
C:\Xcalibur\...1080410\b5_kava_piazza
MS/full, chlorogenova.kys.neg_200308b_grad13

04/10/2008 03:41:09 PM

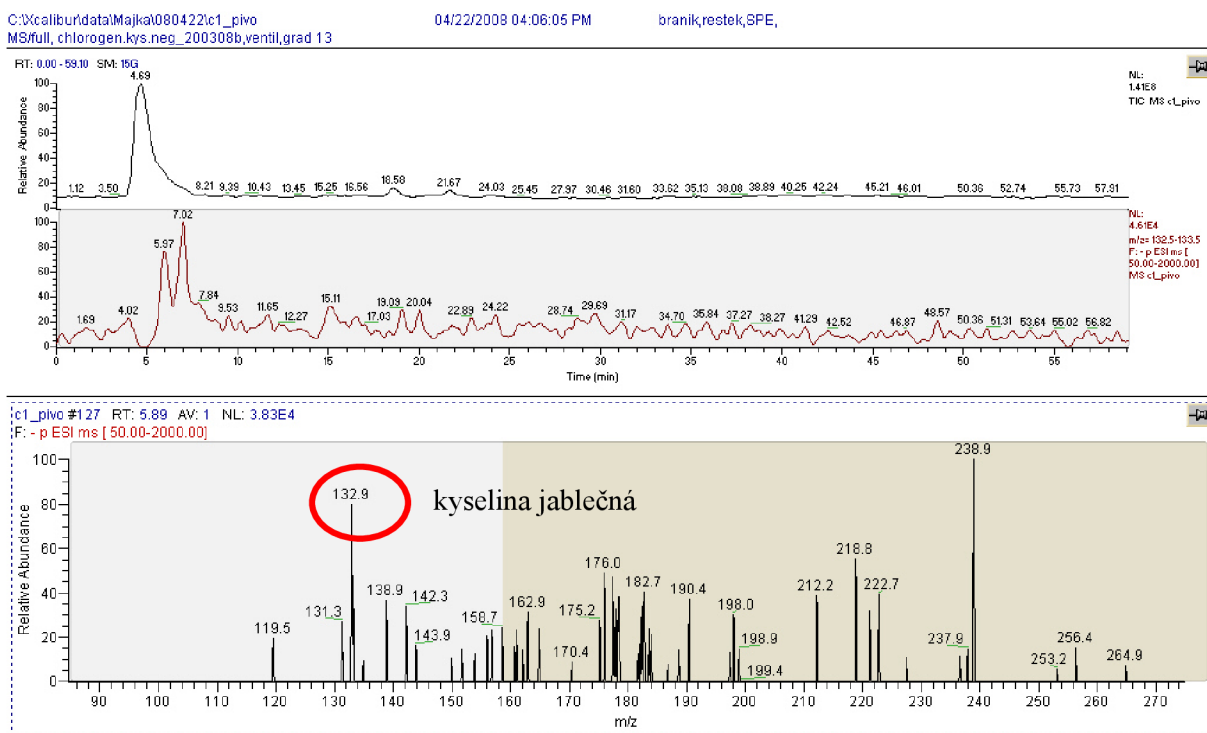
RESTEK, s SPE, s UV, zrnka



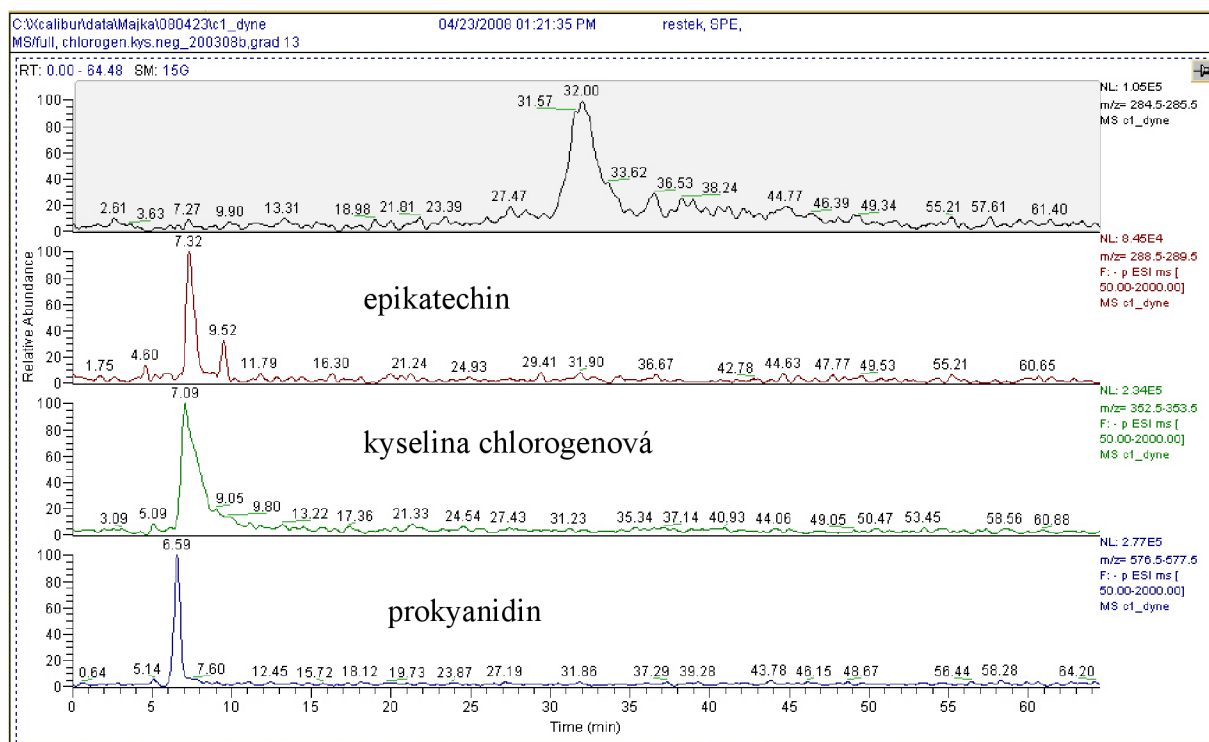
Příloha 23: Xanthohumol v pivě.



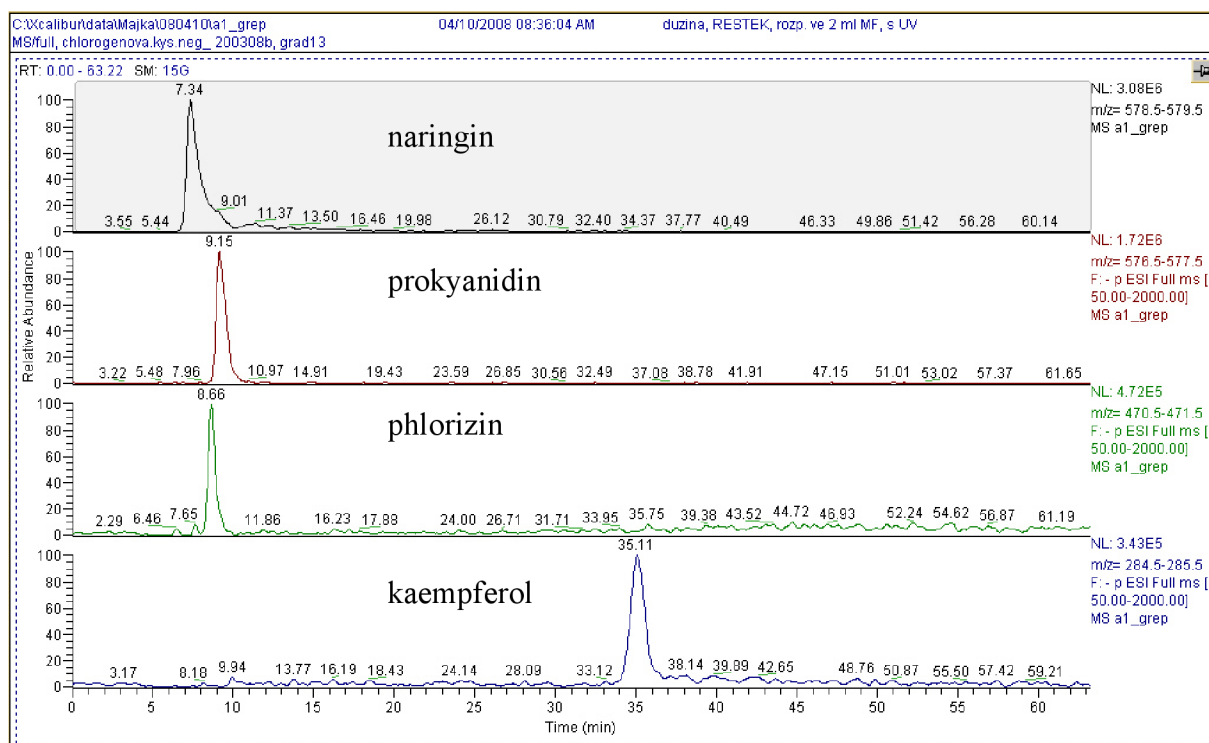
Příloha 24: Kyselina jablečná v pivu.



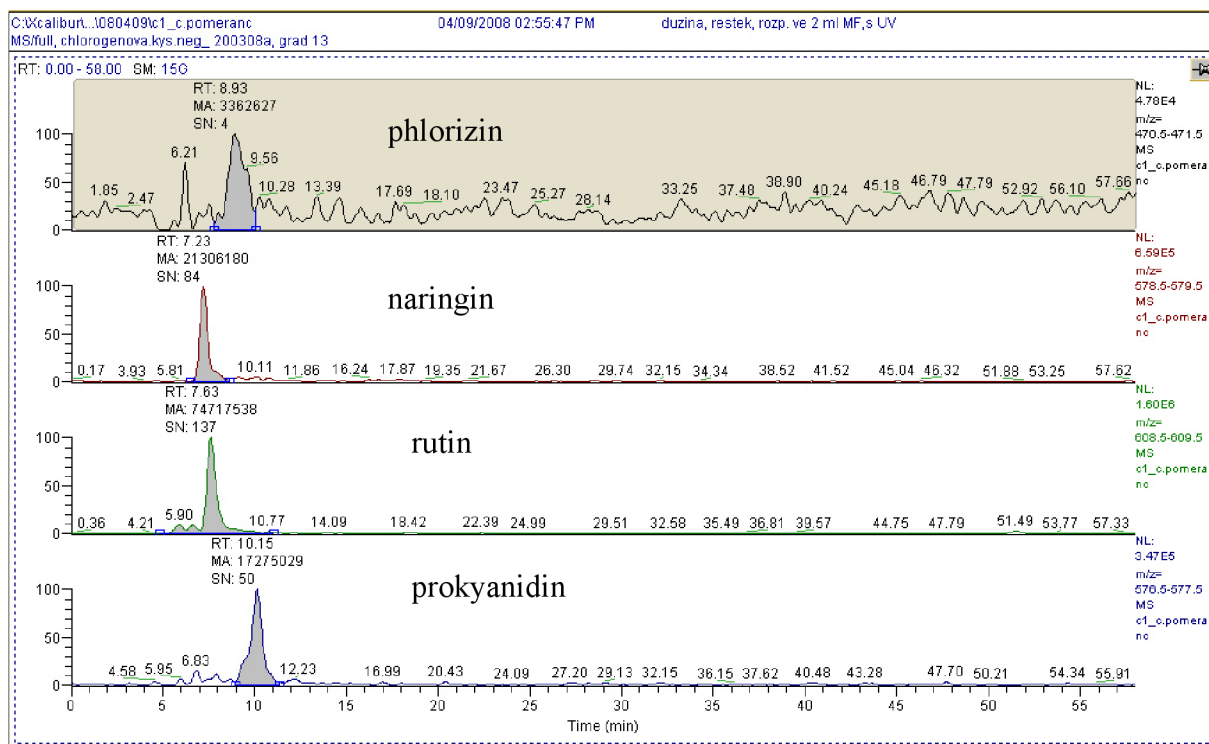
Příloha 25: Obsah polyfenolů v dýni.



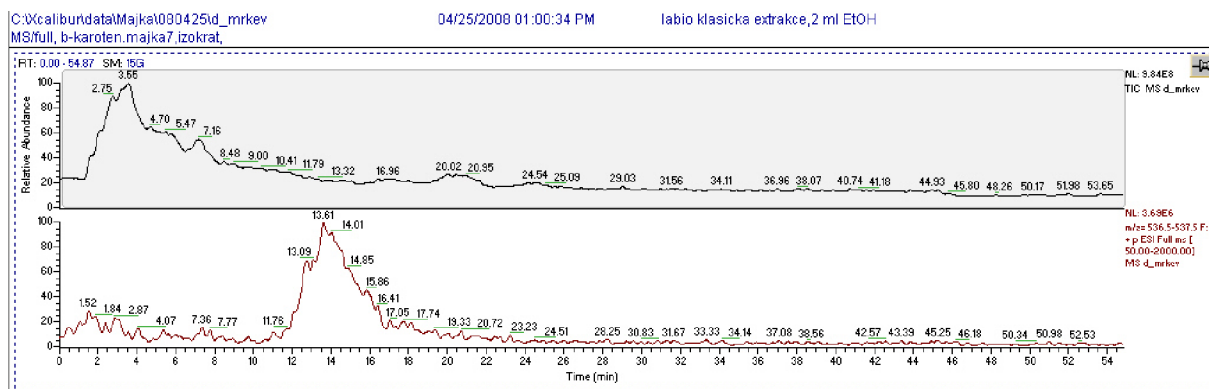
Příloha 26: Obsah polyfenolů v grepu.



Příloha 27: Obsah polyfenolů v pomeranči.



Příloha 28: Obsah β-karotenu v mrkvi..



Příloha 28: Obsah luteinu v rajčeti.

