

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**CHROMATOGRAFICKÁ FRAKCIONACE
ROSTLINNÝCH EXTRAKTŮ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:	Bc. Pavla Vyslyšelová
Studijní obor:	Analytická chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Bednář Ph.D.

OLOMOUC 2012

SHRNUTÍ

Předložená práce se zabývá problematikou frakcionace anthokyaninů obsažených ve vzorcích červeného vína s přídavkem acetaldehydu a kyseliny pyrohroznové v klasickém chromatografickém sloupcovém uspořádání. Teoretická část shrnuje dosud získané informace o těchto přírodních látkách a jejich prospěšné účinky na lidském zdraví. Jsou zde důkladněji popsány možnosti semipreparativní chromatografie využívané pro frakcionaci rostlinných extraktů.

Experimentální část je věnována studiu vhodnosti různých sorbentů pro frakcionaci vzorků červených vín ve sloupcovém uspořádání. Byly zkoumány sorbenty Sepra SDB-L, Amberlit XAD 16, silikagel v systému HILIC a reverzní fáze C18. Bližší prozkoumání jednotlivých frakcí bylo provedeno metodou UV/VIS spektrofotometrie a ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) ve spojení s UV detektorem (DAD) a hmotnostní spektrometrií. Z naměřených výsledků vyplývá, že vhodnými sorbenty pro frakcionaci anthokyaninových barviv v červeném víně s přídavkem acetaldehydu se jeví reverzní fáze C18, Amberlit XAD 16 i SDB-L. Umožňují efektivní preseparační krok před detailní LC/MS analýzou i izolací přítomných barviv. Naopak nejméně vhodným sorbentem se jeví silikagel v módu HILIC. U vína obohaceného pyrohroznovou kyselinou lze při frakcionaci na sorbentu SDB-L, silikagelu v módu HILIC či reverzní fázi C18 získat jednotlivé frakce výrazně obohacené o různé deriváty vitisinu A. Tyto sorbenty vykazují selektivitu pro preseparaci pyranoanthokyaninů podle typu acylace na cukerném zbytku. V případě frakcionace na reverzní fázi C18 lze izolovat vitisin A ve vysokém stupni čistoty. Naopak sorbent Amberlit XAD 16 se jeví jako nejméně vhodný.

Klíčová slova: anthokyaniny, acetaldehyd, pyrohroznová kyselina, UPLC, MS, ESI, QqTOF, sloupcové uspořádání, frakcionace, Sepra SDB-L, Amberlit XAD 16, HILIC, C18

SUMMARY

Presented thesis deals with the fractionation anthocyanins contained in samples of red wines artificially enriched with acetaldehyde or pyruvic acid by a conventional chromatographic column arrangement. Theoretical part summarizes the informations obtained about these natural substances and their beneficial effects on human health. There are also discussed potential of semipreparative chromatography for fractionation of plant extracts.

The experimental part is devoted to study the suitability of different types of sorbents for the fractionation of samples of red wines in the classical column arrangement. Investigated sorbents were Septra SDB-L, Amberlite XAD 16, silica gel in HILIC mode and reverse phase C18. Examination of obtained fractions was performed by UV/VIS spectrophotometry and ultra performance liquid chromatography (UPLC) coupled with UV detector (DAD) and mass spectrometry. Obtained results show that reversed phase C18, Amberlite XAD 16 and SDB-L seems to be very effective sorbents for the fractionation of red wines enriched with acetaldehyde. On the other hand, silica gel in HILIC mode is not suitable sorbent. Red wines with the addition of pyruvic acid can be effectively fractionated using Septra SDB-L, silica gel in HILIC mode or reversed phase C18. Obtained fractions contain greatly enriched derivatives of vitisin A. Those phases are selective to pre-separate pyranoanthocyanins with regard to a type of acylation on the sugar residue. Fractionation using reversed phase C18 allows isolation of vitisin A with a high degree of purity. On the other side, Amberlite XAD 16 is not suitable sorbent.

Keywords: anthocyanins, acetaldehyde, pyruvic acid, UPLC, MS, ESI, QqTOF, column arrangement, fractionation, Septra SDB-L, Amberlite XAD 16, HILIC, C18

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze uvedené zdroje a literaturu. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Děkuji vedoucímu své práce doc. RNDr. Petru Bednářovi Ph.D. za ochotu při vedení mé diplomové práce, za jeho vstřícný přístup, trpělivost při řešení problémů s experimenty, cenné podněty a poskytnutý materiál.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
TEORETICKÁ ČÁST	
2. KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE.....	2
2.1. Sloupcová chromatografie.....	2
2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie a její využití pro preparativní dělení.....	5
2.3. Typy separačních systémů (módů).....	6
2.4. Typy stacionárních fází.....	8
2.4.1. Silikagel a jeho modifikace.....	8
2.4.2. Polymerní sorbenty.....	9
3. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	11
3.1. Ionizace molekul.....	11
3.2. Separace iontů.....	13
3.3. Detekce iontů.....	14
3.4. Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	15
4. PŘÍRODNÍ BARVIVA.....	16
5. ANTHOKYANINY.....	19
5.1. Výskyt, vlastnosti anthokyaninů a jejich působení na lidský organismus.....	20
5.2. Anthokyaniny ve víně.....	21
5.3. Extrakce anthokyaninů a purifikace získaných extraktů.....	23
5.4. Frakcionace.....	24
5.5. Možnosti identifikace.....	27
6. CÍLE PRÁCE.....	29

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7. MATERIÁL A METODY.....	30
7.1. Chemikálie a sorbenty.....	30
7.2. Použité přístroje.....	30
7.3. Parametry použitých kolon.....	30
7.4. Použité stacionární a mobilní fáze.....	30
7.5. Příprava vzorků.....	31
7.6. Příprava sloupcové kolony.....	31
7.7. Průběh frakcionace v klasickém sloupcovém uspořádání.....	32
7.8. Parametry hmotnostního spektrometru Q-TOF Premier.....	32
7.9. Parametry semipreparativního chromatografu Smartline Knauer.....	32
8. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	33
8.1. Vzorek vína obohacený acetaldehydem.....	33
8.1.1. Frakcionace na sorbentu Sepra SDB-L.....	33
8.1.2. Frakcionace na silikagelu v systému HILIC.....	40
8.1.3. Frakcionace na sorbentu Amberlit XAD 16.....	46
8.1.4. Frakcionace na reverzní fázi C18.....	60
8.1.5. Frakcionace na reverzní fázi C18 pomocí MPLC na koloně Bioline.....	72
8.2. Vzorek vína obohacený pyrohroznovou kyselinou.....	74
8.2.1. Frakcionace na sorbentu Sepra SDB-L.....	74
8.2.2. Frakcionace na silikagelu v systému HILIC.....	82
8.2.3. Frakcionace na sorbentu Amberlit XAD 16.....	91
8.2.4. Frakcionace na reverzní fázi C18.....	98
9. ZÁVĚR.....	103
10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	105
11. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	108

12. PŘÍLOHA.....	110
12.1. Fotografie pořízené během frakcionace vzorku vína s přídavkem acetaldehydu na reverzní fázi C18 pomocí MPLC na koloně Bioline.....	110
12.2. Fotografie pořízené během frakcionace vzorku vína s přídavkem acetaldehydu na reverzních fázích C18 ve sloupcovém uspořádání.....	112

1 ÚVOD

Anthokyaniny jsou významné látky přírodního původu, které se podílí na důležitých procesech nejen v rostlinné říši. Jsou zodpovědné za červené, modré a purpurové zbarvení rostlin a ovoce. Jsou důležitou součástí lidské stravy díky svým prospěšným účinkům na zdraví. Jelikož se jedná o přírodní látky, jsou anthokyaniny potenciálními náhražkami zakázaných barviv - to je jeden z hlavních důvodů, proč o tato barviva v posledních letech roste zájem potravinářského průmyslu. Výtažky z rostlin, které jsou bohaté na anthokyaniny, se používají v lidovém léčitelství, protože mají stejně pozitivní účinky jako antiflogistika (protizánětlivé léky).¹

Anthokyaniny patří mezi hlavní složky červeného vína, určují do značné míry jeho kvalitu a organoleptické vlastnosti (barvu a chuť), avšak v procesu zrání a stárnutí vína vznikají (kondenzačními reakcemi) složitější barviva s odlišnými vlastnostmi. Kondenzační reakce jsou výrazně urychlovány při zvýšených koncentracích řady malých reaktivních sloučenin (pyrohroznové kyseliny, řady aldehydů a ketonů atp.), které mohou vznikat změnou technologie výroby vína nebo jeho skladováním. Tato práce se zabývá červeným vínem uměle obohaceným pyrohroznovou kyselinou a acetaldehydem pro zvýšení výtěžku kondenzovaných barviv za účelem jejich izolace a studia jejich vlastností.

Hlavním cílem práce bylo nalézt vhodné frakcionační postupy pro izolaci a/nebo frakcionaci kondenzovaných barviv těchto vín.

2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Kapalinová chromatografie (LC) je separační technika, která využívá dělení složek analytu mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna fáze je mobilní (kapalina) a druhá stacionární (pevná). Separace je docílena na základně ustavování různých typů rovnováh mezi analyty, mobilní a stacionární fází.

Za zakladatele kapalinové chromatografie je považován ruský botanik Michail Semjonovič Cvet (1872 – 1919), který jako první rozdělil na sloupci sorbentu listová barviva. Termín chromatografie vznikl složením dvou slov: chroma = barva a graphein = psaní. Tvrdí se, že Cvet do názvu metody zakomponoval své jméno, protože „cvět“ v ruštině znamená barva. Jeho práce položila základ všem chromatografickým technikám. V roce 1952 byla A. J. P. Martinovi a R. L. M. Syngemu udělena za kapalinovou chromatografii Nobelova cena. Sloupcová chromatografie umožňovala separovat i složité směsi, byla však téměř zapomenuta, protože měla řadu nedostatků. Do popředí se načas dostala chromatografie papírová (PC), na tenké vrstvě (TLC) a plynová (GC). Moderní vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se začala vyvíjet až počátkem 40. let 20. století.^{2,3}

2.1 Sloupcová chromatografie

Klasická kolonová chromatografie se hojně využívala především na počátku 20. století, kdy ještě nebyla vyvinuta vysokoúčinná kapalinová chromatografie. V dnešní době slouží sloupcová chromatografie především k preparativním účelům, zejména k získání čisté substance (látky).

Klasická kolonová chromatografie používala kolony naplněné velkými částicemi o průměru 100 – 200 μm . Mobilní fáze protékala kolonou díky gravitační síle a eluát se odebíral ručně po frakcích, v nichž byla koncentrace látek stanovována klasickými či kolorimetrickými metodami. Tato technika byla velmi pracná a zdlouhavá a její účinnost dělení byla nízká.^{3,4}

V průběhu času doznala tato technika řadu technických vylepšení, ale základní rys si zachovává – je díky instrumentální nenáročnosti realizovatelná prakticky v každé laboratoři. V dnešní době se nejhojněji používají skleněné trubice, komerčně dostupné jsou i polyakrylátové. Trubice jsou dostupné v různých rozměrech, nejčastější však o průměru 2-70 mm a o délce 15-150 cm. Rozměry kolon se volí podle množství vzorku, které má být separováno. Větší rozměry kolony a hrubší zrnění stacionární fáze zhoršují účinnost a

rozlišení separace.⁵ Mrtvý objem trubice se musí zmenšit na minimum. Na obou koncích sloupce ho můžeme eliminovat např. pomocí pístových adaptérů. Původně se využívala trubice celoskleněná se skleněnými zábrusy. Postupem času se skleněné zábrusy nahradily šroubovatelnými uzávěry vyrobenými z chemicky a mechanicky odolného plastu.

Nejstabilnější retence se získá při konstantní teplotě, proto se v některých případech kolona obalí pláštěm s proudící vodou z termostatu, který eliminuje výkyvy teplot. Dno kolony se nejčastěji pokrývá Wittovou destičkou, smotkem vaty, skelnou vatou, kuličkou s malým filtrem nebo skleněnou fritou jako prevence proti odplavování stacionární fáze. Tyto materiály se mohou také nahradit syntetickými plasty (polyuretan, polyamid).^{4,6}

Základní a nejpracnější operací je příprava sloupce. Pouze s precizně naplněným sloupcem se dosáhne úspěšné separace. Existují dvě možnosti, jak chromatografický sloupec připravit – plnění suchým sorbentem nebo plnění suspenzí sorbentu ve vhodném rozpouštědle (plnění na suché nebo mokré cestě).

Metoda na suché cestě je považována za jednodušší, může však vést ke tvorbě bublinek, což má za následek nehomogenní separační lože a nekvalitní separaci. Kolona se plní tak, že se do sloupce nasype suchá stacionární fáze a následně se nechá sloupec prolít vhodným rozpouštědlem.⁴

Druhá metoda je poněkud zdoluhavější, vede však často k reprodukovatelnějším separacím. Nejdříve se připraví suspenze stacionární fáze ve vhodném rozpouštědle (zde může docházet ke změně objemu sorbentu) a takto připravená směs se opatrně vlije do kolony. Dochází k postupnému usazování sorbentu až do naplnění požadované výšky sloupce. Výhodou metody plnění na mokré cestě je eliminace tvorby vzduchových bublinek. U obou metod plnění nesmí nikdy rozpouštědlo klesnout pod okraj stacionární fáze, aby se nevysušila. Kolona se následně kondicionuje promytím mobilní fází.⁴ Vrstva stacionární fáze je většinou zakončena malou vrstvou písku nebo skelné vaty, aby během zavádění vzorku a doplňování mobilní fáze nedocházelo k víření stacionární fáze.

Existují 4 metody zavedení vzorku na kolonu – na vrchol stacionární fáze, pod mobilní fází, pomocí dávkovače nebo v úzké vrstvě společně se sorbentem. První postup dávkování vzorku je klasický a nejpoužívanější. Nejprve se musí nechat odtéct mobilní fáze na okraj stacionární, následně se vzorek zavádí obvykle stříkačkou či pipetou na celý povrch stacionární fáze. Zavedení vzorku pod mobilní fází má však více výhod. V této metodě není nutné čekat, až mobilní fáze klesne na okraj fáze stacionární. Je samozřejmé, že roztok vzorku musí mít pro tento způsob dávkování větší hustotu než mobilní fáze.

Automatické zavádění vzorku pomocí dávkovače nebo dávkovací smyčky se využívá především v preparativní HPLC. ⁴

V preparativní chromatografii dochází ve srovnání s chromatografií analytickou k velké spotřebě mobilní fáze. Tím je ovlivněna i volba způsobu eluce. Izokratická eluce je používána při separaci menšího počtu látek, jejichž retenční charakteristiky se příliš neliší. Výhodou izokratické eluce je, že umožňuje recyklaci mobilní fáze. V případě velkých rozdílů retenčních charakteristik analytů (např. polarity) je často nezbytné měnit eluční sílu v průběhu separace a použít tedy gradientovou eluci, zde je nutno počítat s další spotřebou mobilní fáze na reekvilibraci stacionární fáze před následující separací. ⁴ Rychlejší průtok mobilní fáze minimalizuje čas analýzy, minimalizuje difúzi, což vede k lepší separaci. Rychlejšího průtoku lze dosáhnout pomocí pumpy nebo stlačeného plynu. Nicméně není vhodné volit maximální průtok, protože je nutné, aby se analyt stihl „vyvážit“ mezi mobilní a stacionární fází. K volbě mobilní fáze se používají předběžné testy na TLC za použití stejné stacionární fáze. ⁷

Eluát, který vytéká z kolony, je sbírán do jednotlivých frakcí. Objem frakcí se volí podle cíle separace. Pokud slouží preparativní separace jako první stupeň chromatografické analýzy (off-line vícedimenzionální chromatografie) a zejména v případě komplexních vzorků, u kterých je objektem zájmu více látek s různými chemickými vlastnostmi, je třeba jímát velké množství poměrně malých (0,5-20 ml) frakcí a tím dosahovat jejich co možná nejjednoduššího složení (v ideálním případě budou frakce obsahovat jen jedno chemické individuum). V oblasti preparativní chromatografie není výjimkou, že jeden vzorek se eluuje i několik dní, proto byla konstruována řada zařízení umožňující automatický sběr frakcí (frakční kolektory). Nejjednodušší sběrač frakcí se skládá z několika nádob umístěných na kruhové desce, která je poháněna mechanickou či elektrickou silou. ^{4,6}

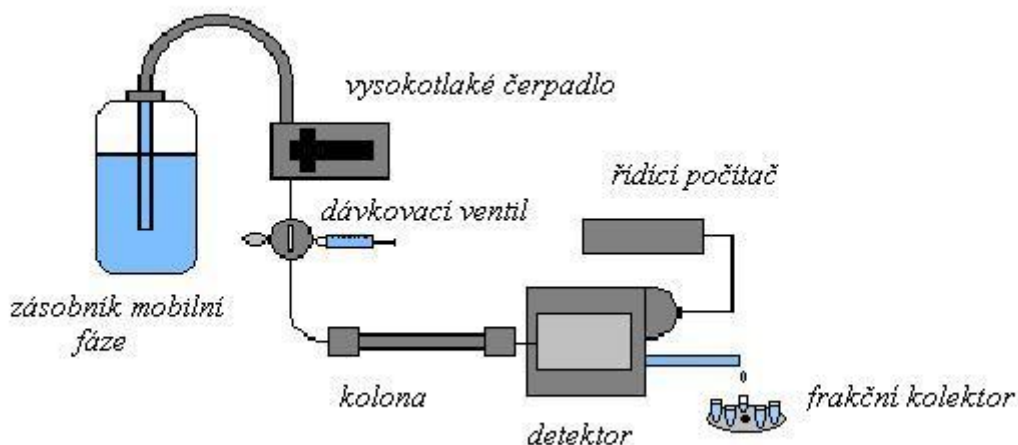
Jak již bylo řečeno, sloupcová chromatografie je velmi časově náročná, proto několik výrobců vytvořilo automatizované systémy LPLC (low pressure liquid chromatography), které minimalizují lidskou účast v procesu čištění. Automatizované systémy obsahují některé stejné komponenty jako HPLC – čerpadlo, automatický nástřik vzorku, UV detektor, sběrač frakcí. Rozlišení oproti preparativní HPLC je však vždy o něco nižší. ⁷

Kompromisní řešení mezi sloupcovou chromatografií a HPLC je středotlaká sloupcová chromatografie (MPLC). Pracuje se při tlacích do 3 MPa a výhodou oproti gravitační sloupcové chromatografii je rychlejší analýza. V rámci své experimentální práce jsem prováděla separaci s využitím středotlaké chromatografie na zařízení Bioline od firmy

Knauer. Kolony jsou vyrobené z borosilikátového skla a jsou k dispozici v různých průměrech (1, 2 a 3 cm) a délkách (30, 60 a 100 cm).⁸

2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie a její využití pro preparativní dělení

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se dostala do popředí v 60. letech 20. století. Vysoké rychlosti a účinnosti separace se dosahuje díky poměrně velkým průtokům mobilní fáze a použitím kolon, které jsou plněny velmi jemnými částicemi o velikosti 3-15 μm . Z těchto důvodů se požaduje použití vysokotlakých čerpadel a takových konstrukcí, které by odolávaly tlakům do 30 – 60 MPa.⁵ Vysokoúčinný kapalinový chromatograf se skládá z několika důležitých komponent (Obr. 1).



Obr. 1 Základní schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu

Požadavky kladené na čerpadla jsou náročné – musí být zkonstruována z materiálů odolných vůči korozi a agresivním mobilním fázím, dále mají být schopna dávkovat mobilní fázi plynule bez kolísání a pod vysokým tlakem.⁵ Pro semipreparativní a preparativní účely se prakticky výlučně používají pístová čerpadla s malým objemem činné části.

Vzorek lze nadávkovat třemi způsoby – přímým nástřikem injekční stříkačkou přes septum (dnes se prakticky nepoužívá), ručně dávkovacím ventilem se smyčkou nebo pomocí automatického dávkovače. V dnešní době se nejčastěji využívají šesticestné

dávkovací ventily se smyčkou.⁵ Pro automatizované dávkování velkých objemů bývá dávkovací zařízení často doplněno o malé čerpadlo plnící dávkovací smyčku vzorkem.

Volba vhodné kolony má rozhodující význam, protože výsledek separace je určen především kvalitou kolony a její náplně. Kolona musí odolávat vysokým tlakům a chemickému působení mobilních fází a analytů, rovněž nesmí působit katalyticky, aby nedošlo během analýzy k rozkladu vzorku. Nejčastěji se používají trubice z kvalitní antikorozivní oceli nebo z borosilikátového skla. Délka kolon se nejčastěji pohybuje v rozmezí 5-30 cm, s rostoucí délkou kolony se zvyšuje účinnost separace, ale i doba analýzy. Nejběžnější vnitřní průměr kolony je pro analytické účely 2 – 5 mm, pro semipreparativní účely kolem 10 mm a pro preparativní práce přibližně od 20 mm výše (v průmyslovém měřítku však bývá vnitřní průměr i daleko větší).^{5,9}

V HPLC existuje řada detektorů, mezi nejběžněji používané patří spektrofotometrický, fluorimetrický, elektrochemický, refraktometrický a vodivostní. Ve svých HPLC analýzách jsem využívala spektrofotometrický UV/VIS detektor. Je poměrně citlivý, má široký lineární rozsah, je málo citlivý na změny teploty a je vhodný pro gradientové eluce. Principem je zaznamenávání látek, které absorbují ultrafialové nebo viditelné světlo. Detektor měří absorbanci eluátu, proto musí být absorbance mobilní fáze co možná nejmenší.⁹ Na rozdíl od analytické HPLC, kde je hlavním úkolem kvalitativní a kvantitativní stanovení sloučenin, je úkolem preparativní HPLC, jak již bylo řečeno, čištění, separace a izolace látek. Z tohoto důvodu jsou na detektory kladené jiné požadavky. Není kladen důraz na kvantitativní stanovení, celá detektoru musí mít dostatečně velký vnitřní průměr, aby nedošlo vlivem větších průtoků k prasknutí detekčního okénka. Nebo se před detekční celou zařazuje splitr, pak je možné pracovat s běžnou analytickou celou. Nejběžněji používanými detektory pro preparativní HPLC jsou spektrofotometrické a refraktometrické detektory.

2.3 Typy separačních systémů (módů)

V závislosti na zvolené kombinaci mobilní a stacionární fáze rozlišujeme v kapalinové chromatografii několik druhů separačních systémů.

V systému *normálních fází (NP)* je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. Retence analytu je způsobena rozdílem polárních sil působících mezi povrchem adsorbentu a separovanou látkou a polárních sil působících mezi povrchem adsorbentu a složkami mobilní fáze. Separace probíhá díky konkurenční rovnováze – analyzovaná látka na

povrchu stacionární fáze je vytěšňována molekulou rozpouštědla a naopak. Typickou mobilní fází je např. hexan či benzen s malým množstvím organické polární složky, typickou stacionární fází je např. silikagel či alumina. Separaci výrazně ovlivňuje i malé množství vody, která způsobí pokrytí aktivních míst na sorbentu. Retence separovaných látek roste od nepolárních k polárním látkám.^{3,10}

Za modifikaci separace na normálních fázích je považována metoda *HILIC*, neboli chromatografie hydrofilních interakcí. Jako mobilní fáze se používá směs vody a polárního organického rozpouštědla (např. acetonitril, methanol), stacionární fáze je nemodifikovaný silikagel. Díky definovanému obsahu vody v jednotkách až desítkách procent v mobilní fázi se na povrchu silikagelu vytváří vodní film, který funguje jako stacionární fáze (rozdělování mezi organicko-vodnou mobilní fází a vodnou fází zakotvenou na sorbentu). Retence separovaných látek roste od nepolárních k polárním látkám.⁹

Dalším typem je systém *reverzních fází (RP)*, kde se využívá polární mobilní fáze - voda s přídavkem organické polární složky. Stacionární fáze je méně polární, nejčastěji se využívají chemicky modifikované fáze. Jako nosič pro přípravu těchto fází se nejčastěji používá silikagel. Na povrchu silikagelu jsou volné silanolové skupiny s aktivním vodíkovým atomem, který lze snadno nahradit různými organickými skupinami. Tak lze připravit stacionární fáze o různých vlastnostech. Nejčastěji používané stacionární fáze jsou tvořeny kovalentně navázanými oktylovými (C8) a oktadecylovými (C18) řetězci. Retence separovaných látek roste od polárních k nepolárním látkám. Odhaduje se, že až 80% všech separačních problémů lze řešit právě v systému reverzních fází.^{3,10}

Iontově výměnná chromatografie (IEC) je druh chromatografie, která využívá jako stacionární fáze ionex. Podle druhu zvoleného ionexu dochází k výměně různých druhů iontů. Jednotlivé měniče lze charakterizovat výměnnou kapacitou, tj. množstvím iontů, které může měnič svými výměnnými skupinami poutat. Čím mají měniče iontů větší kapacitu, tím větší množství vzorku lze separovat. Pokud jsou nenabitě látky převedeny do vhodného komplexu, lze je také na měničích iontů separovat.⁵

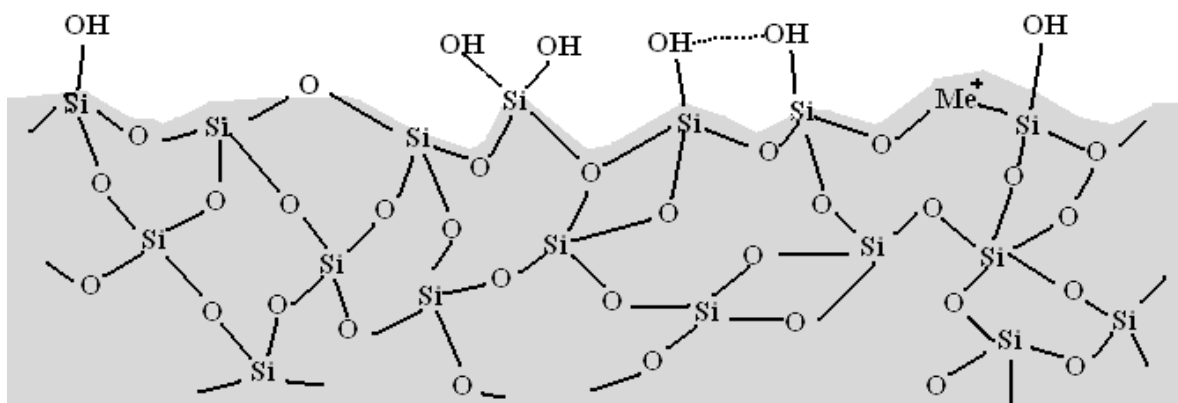
Gelová chromatografie, známá také pod názvem vylučovací kapalinová chromatografie, patří mezi nejčastěji používané metody v molekulární biologii. V moderní gelové kapalinové chromatografii se jako stacionární fáze používají semirigidní a tuhé náplně. Principem gelové chromatografie je separace dle velikosti molekul. Velké molekuly nemohou díky svým rozměrům pronikat do pórů stacionární fáze a putují přes kolonu stejnou rychlostí jako fáze mobilní. Molekuly menších rozměrů naopak do pórů pronikají.¹⁰

2.4 Typy stacionárních fází

Existuje řada stacionárních fází, které se ve sloupcové chromatografii používají. V zásadě lze říci, že v průběhu času byly testovány možnosti všech materiálů, které jsou nerozpustné v mobilních fázích a odolávají tlakům, umožňujícím transport mobilní fáze s prakticky využitelným průtokem. V této kapitole je pozornost věnována zejména těm fázím, které byly využity v experimentální části diplomové práce.

2.4.1 Silikagel a jeho modifikace

Silikagel je xerogel kyseliny křemičité, má amorfni strukturu, pórovité částice a jeho povrch je slabě kyselý. Chemicky je stabilní pouze do pH 8. Připravuje se hydrolyzou alkalických křemičitanů nebo tetraalkoxysilanů. Dochází k polykondenzaci a zrání gelu, který se nakonec promyje a vysuší. Silikagel bývá označován různými číselnými hodnotami, které udávají desetinásobek velikosti pórů v nm.⁵ Chemická struktura silikagelu je znázorněna na obrázku 2.⁹

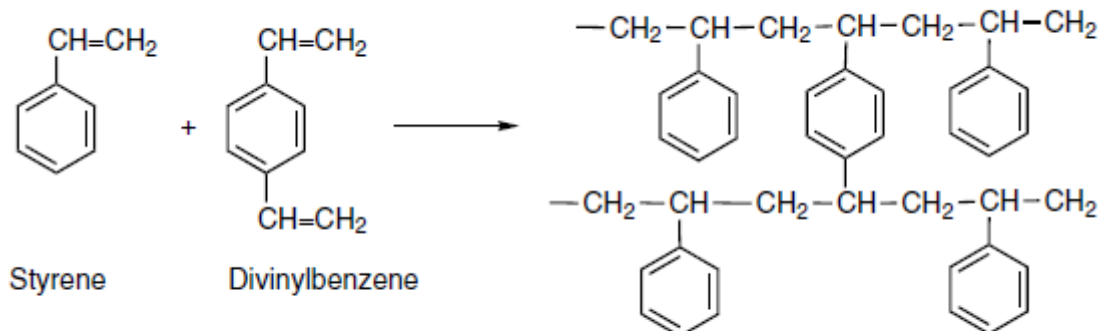


Obr. 2 Chemická struktura silikagelu

Jak již bylo řečeno, navázáním alkylového řetězce na aktivní vodík hydroxylové skupiny vzniknou sorbenty o různých vlastnostech. Kromě zmíněných reverzních fází C8 a C18 existuje i řada dalších, např. hexylové, propionitrilové, fenylové, aminové atd.⁹

2.4.2 Polymerní sorbenty

Mezi zástupce aromatických polymerních sorbentů patří styren-divinylbenzenové kopolymery (např. materiál s označením Strata SDB-L vyráběný firmou Phenomenex). Styren-divinylbenzenové kopolymery jsou stabilní v silně kyselém i zásaditém prostředí. Využívají se jako stacionární fáze pro extrakci tuhou fází a chromatografickou separaci v systému reverzních fází. Nejčastěji se aplikují pro separaci hydrofobních a aromatických sloučenin. Jedná se o bílý sypký prášek, který je k dostání v různých velikostech částic a pórů. Syntéza styrendivinylbenzenu je schematicky znázorněna na obrázku 3.⁹



Obr. 3 Syntéza kopolymeru styren-divinylbenzen

Amberlit je obchodní název pro celou řadu polymerních sorbentů. V rámci své experimentální práce jsem používala Amberlit s označením XAD. Pod touto zkratkou se skrývají polymerní absorbenty s vysoce porézní strukturou, které nachází uplatnění při analýze fenolů, antibiotik, chlorovaných pesticidů a různých aromatických či dusíkatých sloučenin. Přehled nejčastěji používaných Amberlitů XAD je uveden v tabulce I.^{11, 12}

Tab. I Přehled vybraných druhů Amberlitu XAD

Amberlit	Plocha povrchu [m²/g]	Průměr pórů [Å]	Aplikace
XAD - 2	300	90	Detekce a identifikace omamných látek a environmentálních organických polutantů ¹¹
XAD - 4	725	40	Detekce a identifikace omamných látek a environmentálních organických polutantů ¹¹
XAD - 7	450	90	Adsorpce hydrofobních molekul z vody ¹¹
XAD - 16	800	150	Adsorpce hydrofobních molekul z polárních roztoků, adsorpce organických látek malých až středních molekulových hmotností ¹³
XAD - 18	800	150	Čištění antibiotik, přírodních produktů, aminokyselin a proteinů ¹²
XAD - 761	200	600	Čištění rostlinných výtažků, enzymů a peptidů ¹²

Je patrné, že sorbenty typu Amberlit umožňují separaci širokého spektra látek s různou molekulovou hmotností.

3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie (MS) patří v současnosti mezi jednu z nejpoužívanějších analytických metod, která nám poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace o analyzovaném vzorku. Metoda je založena na stanovení relativní četnosti iontů v závislosti na poměru hmotnosti ku náboji iontů (hodnota m/z). Základními procesy analýzy jsou tvorba iontů, separace iontů podle hodnoty m/z a následně jejich detekce. Výsledkem experimentu je hmotnostní spektrum. Pík, který odpovídá molekulové hmotnosti původní molekuly, je označován jako molekulární pík, za základní pík ve spektru se považuje pík s nejvyšší relativní četností. Hmotnostní spektrometrie patří mezi metody destrukční, avšak spotřeba látky k analýze je velmi malá.^{14,15}

3.1 Ionizace molekul

Prvním krokem hmotnostně spektrometrického experimentu je ionizace molekul analytu. Existuje řada ionizačních technik, každá má své výhody i nevýhody a je použitelná pro jiný druh látek. Podle množství dodané energie lze ionizační techniky rozdělit na tvrdé, při níž dodaná energie postačuje k rozsáhlejší fragmentaci a na měkké, při níž je pravděpodobnost fragmentace menší.¹⁵

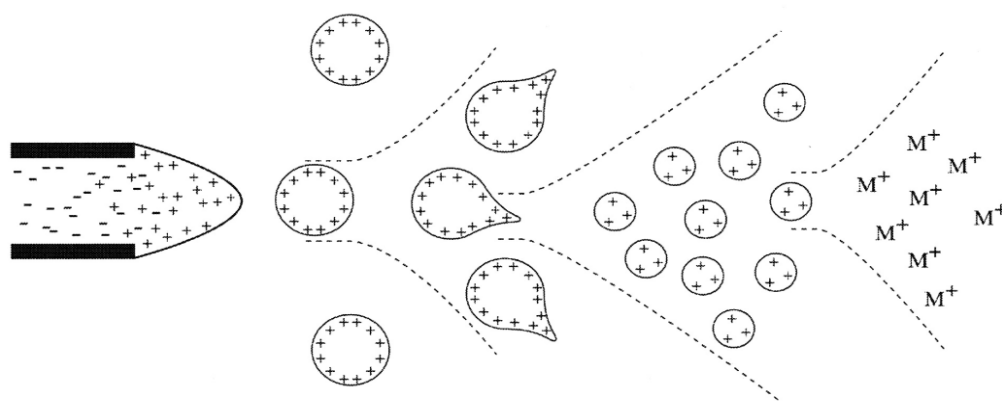
Ionizace elektronem (EI) je založena na interakci urychlených elektronů s neutrální molekulou za vzniku iontu s lichým počtem elektronů. Řadí se mezi tvrdé ionizační techniky a uplatňuje se především ve spojení s GC.^{14,15}

Chemická ionizace (CI) je příkladem měkké ionizační techniky a podobně jako EI se používá nejčastěji ve spojení s GC. Zdrojem energie je opět proud urychlených atomů, jejich energie však není přenášena na molekulu přímo, ale zprostředkovaně přes reakční plyn, např. přes methan či isobutan.^{14,16}

Termosprej (TSP) patří mezi nejstarší ionizační techniky. Eluát z kolony je přiveden do kapiláry vyhřívané na teplotu až 300 °C, dojde k prudkému varu mobilní fáze a kapalina je rozprášena do malých kapiček. Postupným zmenšováním kapiček dojde k uvolnění iontů.¹⁶

Ionizace elektrosprejem (ESI) je v dnešní době nejčastěji používanou technikou pro zavádění kapalných vzorků do hmotnostního spektrometru. Je to vysoce účinná ionizační technika, která má široké aplikační možnosti (analýza středně polárních až iontových analytů v širokém rozmezí molekulových hmotností od malých organických molekul až po proteiny, nukleové kyseliny atd.). Principem je zmlžování a nabíjení roztoku vzorku na konci sprejovací kapiláry, na kterou je vloženo vysoké napětí. Proces zmlžování bývá

podpořen proudem zmlžovacího plynu koaxiálně přiváděného kolem sprejovací kapiláry. V důsledku odpařování rozpouštědla dochází ke zmenšování nabitých kapiček, jejich rozpadu opakovanými Coulombickými explozemi a následnému uvolnění iontů. Mechanismus ionizace je znázorněn na obrázku 4.¹⁵ ESI dovoluje vzniku i vícenásobných iontů, což může být využito např. při kvalitativní analýze vysokomolekulárních látek. Mohou vznikat záporně i kladně nabité ionty v závislosti na polaritě napětí. ESI se nejčastěji používá ve spojení s HPLC.^{14, 15}



Obr. 4 Mechanismus ionizace elektrosprejem

U *chemické ionizace za atmosférického tlaku* (APCI) je zdrojem ionizace výboj z jehly. Nejprve je ionizován reakční plyn, který následně ionizuje analyt. APCI se používá nejčastěji ve spojení s HPLC a v porovnání s ESI je použitelná pro méně polární látky.¹⁷

U *fotoionizace za atmosférického tlaku* (APPI) se analyt dává společně s dopantem, což je látka zprostředkující ionizaci. Zdrojem energie pro ionizaci jsou fotony z různých typů výbojek. Díky APPI lze analyzovat široké spektrum látek včetně nepolárních, které jsou problematické pro ESI či APCI.¹⁷

Další možností ionizace analytu je *desorpce laserem za účasti matrice* (MALDI), která byla poprvé představena v roce 1987. Kapalný vzorek se smíchá s velkým množstvím matrice (cca 10 000:1), směs se nanese na destičku z nerezové oceli, nechá se odpařit a následně se vzorek s matricí ionizuje za pomoci výkonného laseru. Primárně dochází k ionizaci matrice, která je v nadbytku. Matrice slouží také ke zmenšení termální fragmentace vzorku způsobené laserem a to tak, že absorbuje většinu dopadající energie. Matrice potom předává svůj náboj a svoji energii vzorku, čímž dochází k velmi šetrnému uvolnění iontů z analyzovaného materiálu. Tato technika má řadu výhod – umožňuje

rychlou přímou analýzu povrchů a vzorků nanesených na povrch. Stejně jako ESI je metoda MALDI vhodná na analýzu vysokomolekulárních látek, avšak oproti ESI umožňuje MALDI vznik pouze jedné nabitých iontů (je třeba tedy použít analyzátor s dostatečným pracovním rozsahem měřených hodnot m/z). Analyt lze ionizovat v prostředí vakua, existuje však i MALDI, při které vznikají ionty za atmosférického tlaku (tzv. AP-MALDI).^{17,18}

Při *desorpci bombardováním rychlými atomy* (FAB) se energie dodává bombardováním analytu společně s matricí paprskem rychlým atomů vhodných plynů, např. argonem. Metoda je vhodná na peptidy a malé proteiny. Modifikací FAB je *desorpce bombardováním rychlými ionty* (FIB). Vzorek se po smíchání s matricí bombarduje rychlými ionty, např. cesnými.¹⁴

Mezi další metody ionizace vzorku lze zařadit *ionizaci polem* (FI) nebo *desorpci polem* (FD).¹⁸

3.2 Separace iontů

Po ionizaci molekul analytu následuje druhý krok, tj. separace vzniklých iontů. K tomuto účelu slouží hmotnostní analyzátoři, které separují ionty na základě různých principů podle hodnot m/z . Vhodnou kalibrací je možno potom přiřadit určitému nastavení analyzátoru hodnotu m/z iontů, které analyzátořem projdou na detektor.

Prvním typem hmotnostních analyzátořů jsou *sektorové přístroje* využívající magnetické a/nebo elektrické pole. Manipulací s parametry těchto polí lze ovlivnit trajektorii iontů a provést separaci.¹⁸

Dalším typem analyzátořů je *kvadrupól*. Je poměrně rozšířený, robustní a je vhodný pro rutinní spojení se separačními metodami. Kvadrupól se skládá ze 4 paralelních tyčí, nejlépe hyperbolických, na které se vkládá stejnosměrné a vysokofrekvenční střídavé napětí.¹⁷ Vhodnou volbou těchto parametrů projdou kvadrupólem pouze ionty o určité m/z , ostatní se dostanou na nestabilní dráhy a zachytí se na tyčích kvadrupólu.¹⁶

Iontová past (IT) se skládá ze dvou koncových a z jedné středové elektrody. Do iontové pasti se přivedou molekuly analytu a následně se provede ionizace pulsem elektronů. Další možností je provést ionizaci v externím zdroji a do iontové pasti přivést analyt v iontovém stavu. Následně se vhodnou volbou napětí vypudí ionty ven směrem k detektoru.¹⁶

Dalším typem analyzátořů je *průletový analyzátoř* (TOF) K separaci iontů s různou m/z hodnotou dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru.

Později dorazí do detektoru hmotnější ionty, protože se pohybují pomaleji. V současnosti se průletový analyzátor často používá v kombinaci s kvadrupólovými filtry u hybridních tandemových přístrojů.¹⁶

Mezi další používané analyzátoři patří *iontová cyklotronová rezonance* (ICR) a *orbitální past* (Orbitrap).¹⁷

3.3 Detekce iontů

Mezi nejdůležitější charakteristiky každého detektoru patří citlivost, přesnost, rozlišení, doba odezvy, stabilita, široký dynamický rozsah a nízký šum.¹⁸

Mezi nejběžnější detektory patří Faradayova klec, elektronásobič, mikrokanálová destička a fotonásobič.

Faradayova klec zaznamenává změnu proudu, kterou po dopadu iontů na sběrnou elektrodu způsobí jejich vybití. Faradayova klec je jednoduché a robustní zařízení, které umožňuje přesné izotopické měření.¹⁸

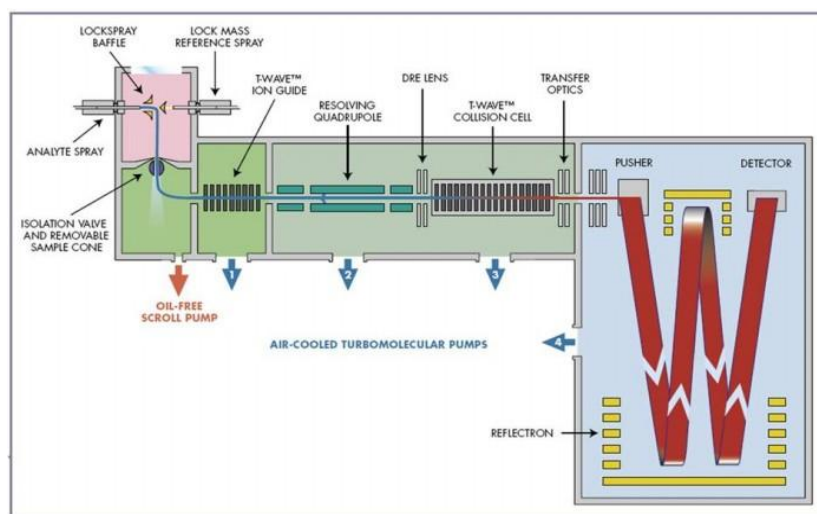
Princip elektronového násobiče je založen na sekundární emisi elektronů. Proud iontů proudící z hmotnostního separátoru je fokusován na první dynodu, která emituje elektrony v množství, které je přímo úměrné počtu dopadajících iontů. Sekundární elektrony z první dynody jsou urychleny a fokusovány na druhou dynodu, kde se emitují další sekundární elektrony ve větším počtu oproti populaci elektronů primárních. Tento kaskádovitý proces se opakuje na 10-20 dynodách a výsledkem je zesílený signál, který poskytuje o dva řády větší odezvu než Faradayova klec. Přesnost se však pohybuje v řádu desetin procent.¹⁴ Nejběžněji používaným elektronovým násobičem je mikrokanálová destička (microchannel plate, MCP). MCP je zařízení, které zesiluje elektronový signál. MCP má několik milionů nezávislých kanálů a každý kanál pracuje jako nezávislý elektronový násobič. Obsahuje dvoudimenzionální periodické pole tvořené z tenkých skleněných kapilár (kanálků) stavených dohromady a rozřezaných na tenké plátky. Jednotlivá dopadající částice (v případě hmotnostní spektrometrie ion) vstupuje do kanálku a emituje elektron ze stěny kanálku. Sekundární elektrony jsou urychleny elektrickým polem vloženým přes oba konce MCP. Tyto elektrony potom putují kanálkem po parabolických trajektoriích do doby, než narazí na povrch kanálku a vyrazí z něj více sekundárních elektronů. Tento proces se mnohokrát opakuje a výsledkem této kaskády je oblak několika tisíc elektronů, které vystupují na zadní straně MCP. Protože jednotlivé kanály omezují (ohraničují) puls, prostorový profil pulsů elektronů na zadní straně destičky zachovávají profil (obraz) částic dopadajících na přední povrch MCP. Výstupní signály

jsou nejčastěji sbírány kovovými nebo polymetalickými anodami, odporovou anodou, výstupem se zpožďovací linkou nebo fosforovou mřížkou deponovanou na vláknové optice. Toto zařízení se nejčastěji používá pro TOF analyzátory.¹⁸

Fotonásobič (PMT) je zařízení skládající se ze scintilační destičky, citlivé fotokatody, dynod a anody. Nejprve jsou ionty na scintilační destičce přeměněny na fotony, které dopadají na fotokatodu a na základě fotoelektrického jevu způsobí na anodě emisi elektronů, která je často dynodami pro zvýšení citlivosti dále zesílena.¹⁸

3.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie, zkráceně MS/MS, je technika, která zahrnuje nejméně dva stupně hmotnostní analýzy. Hmotnostní spektrometr obsahuje zpravidla dva hmotnostní analyzátory. První analyzátor izoluje určitý ion, který poté podstoupí fragmentaci – spontánní nebo energií aktivovanou. Dojde k rozpadu mateřského iontu na fragmenty, které jsou sledovány druhým analyzátozem (nebo může jít o jeden analyzátor provádějící tandemové měření v čase, např. iontová past). MS/MS analýzy mají velké využití, slouží např. k objasnění struktur, ke studiu fragmentačních mechanismů nebo mohou být použity ke zvýšení citlivosti při stanovení.¹⁷ Existuje celá řada tandemových analyzátorů, např. trojitý kvadrupól (QqQ) či TOF/TOF analyzátor. Spojením kvadrupólu a průletového analyzátoru vzniká analyzátor označovaný jako QqTOF (obr. 5)¹⁹, na kterém jsem v rámci experimentální práce prováděla analýzu anthokyaninových barviv.



Obr. 5 Schéma hmotnostního analyzátoru Q-TOF Premier s hybridním analyzátozem typu QqTOF

4 PŘÍRODNÍ BARVIVA

Rostlinná barviva ovlivňují celkový barevný ráz přírody, který je patrný na jaře, kdy se nevýrazné barvy mění v širokou škálu odstínů, v létě nastupují barvy květů a na podzim se po degradaci chlorofylu mění barvy listů. Pigmenty mají v životě rostlin obrovský význam. Uplatňují se při fotosyntéze, při pohybech rostlin a dále v procesu opylování.²⁰

Z chemického hlediska se barviva dělí do pěti skupin – pyrrolová, karotenoidní, chinonová, indolová a pyranová.²⁰

Mezi pyrrolová barviva se řadí chlorofyly a fykobiliny. Chlorofyly jsou nejdůležitější fotosynteticky aktivní pigmenty rostlin. V současné době je známo 7 typů – chlorofyl a, b, c, d, e, bakteriochlorofyl a bakterioviridin. Chlorofyly a a b hrají při fotosyntéze nejdůležitější roli, vyskytují se ve všech autotrofních organismech, s výjimkou pigmentů bakterií. Chlorofyl a je modrozelený, chlorofyl b je žlutozelený. Ostatní chlorofyly se nacházejí jen v řasách a to v kombinaci s chlorofylem a. Molekula chlorofylu má porfyrinovou strukturu s 10 dvojnými vazbami, tvořenou 4 pyrrolovými jádry, která jsou spojena methinovými můstky. V centru molekuly je hořčík. Fykobiliny jsou fotosyntetické pigmenty sinic, ruduch a skrytěnek. Mají lineární tetrapyrrolovou strukturu a neobsahují hořčík ani jiný další kov.²⁰

Karotenoidní barviva jsou v přírodě hojně rozšířená, vyskytují se v široké barevné škále od žluté, přes oranžovou až po červenou. Pokud jsou vázané na proteiny, mohou získat barvu zelenou, fialovou nebo modrou. Jsou to tetraterpeny, které mají ve svých molekulách nejčastěji 40 atomů uhlíku. Karotenoidy jsou prekurzorem vitamínu A, jsou potřebné pro morfogenezi a složí jako regulátory růstu.^{20,21}

Chinonová barviva patří v přírodě mezi nejrozšířenější, přitom k celkovému zabarvení přispívají méně než ostatní, protože se vyskytují v kořenech a kůře stromů. Bývají současně překryty i jinými barvivy. Příkladem chinonových barviv je červený alizarin.²⁰

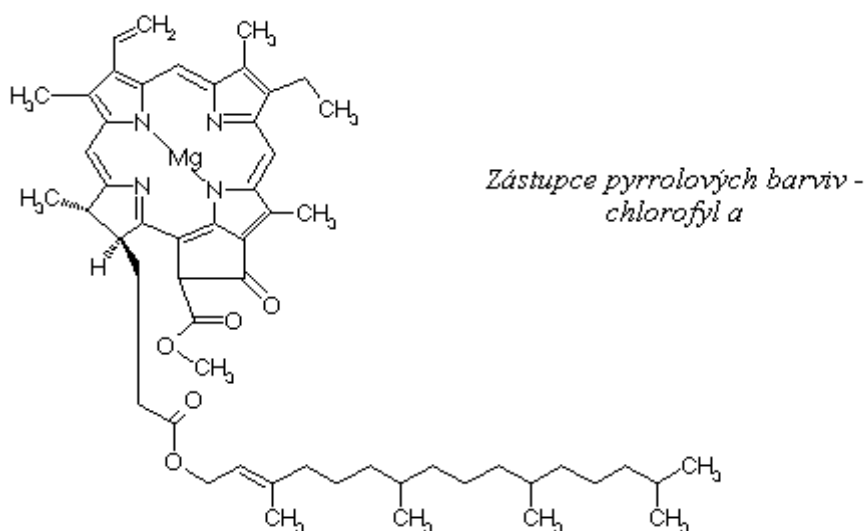
Nejvýznamnějším indolovým barvivem je indigo. K indolovým barvivům patří také betalainy, které se v přírodě vyskytují v červených, fialových a žlutých barvách. Jsou obsaženy v klobouku muchomůrky červené, v bulvě řepy salátové nebo v květech kaktusů. Podobně jako anthokyaniny se vyznačují antioxidačními vlastnostmi.^{20,22}

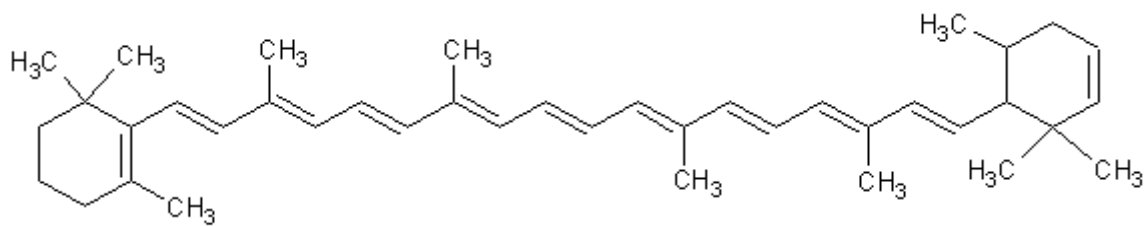
Pyranová barviva jsou převážně žlutá, červená nebo modrá. Jsou odvozena od základního skeletu flavanu. Rozdělují se podle toho, od které základní sloučeniny jsou odvozena: xantonová barviva, flavony a isoflavony, flavonoly, anthokyaniny a složitější

pyranová barviva.²⁰ Flavony, isoflavony, flavonoly a anthokyaniny patří do skupiny flavonoidů. V současné době je známo více než 4000 flavonoidních látek a stále se nacházejí další sloučeniny. Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů, obsahují tedy ve své molekule necukernou část (aglykon) a cukernou složku. Volné aglykony se vyskytují pouze zřídka. V některých případech (při technologickém zpracování při vyšších teplotách a v kyselém prostředí) může docházet k hydrolýze glykosidů a vzrůstu koncentrace aglykonů. Flavonoidy jsou významnou součástí antioxidantního systému, zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály a přispívají k ochraně DNA.^{20, 23} Flavony a isoflavony jsou převážně žlutá barviva. Patří sem apigenin, který je přítomný v petrželi zahradní nebo v miříku celeru. Dalším zástupcem je genistin, který se dříve využíval v barvářství. Flavonoly jsou v přírodě velmi rozšířené, patří k nim i jedno z nejrozšířenějších barviv v přírodě – oranžově-hnědý kvercetin, který lze izolovat z dubové kůry nebo z chmelu obecného.²⁰

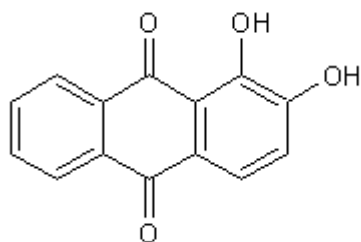
Anthokyaniny jsou barviva, která jsou předmětem experimentální části, proto jim byla věnována samostatnou kapitola.

Na obrázku 6 jsou znázorněny zástupci vyjmenovaných skupin barviv.

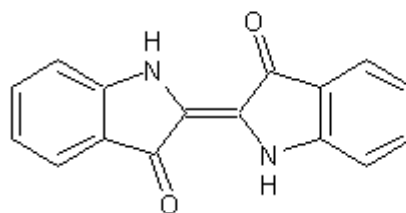




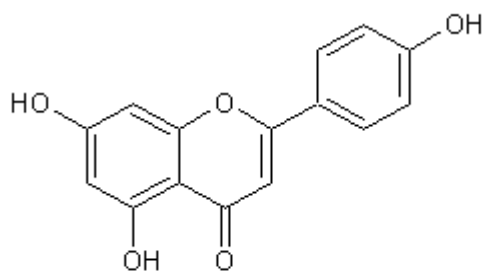
Zástupce karotenoidních barviv - karoten



Zástupce chinonových barviv - alizarin



Zástupce indolových barviv - indigo

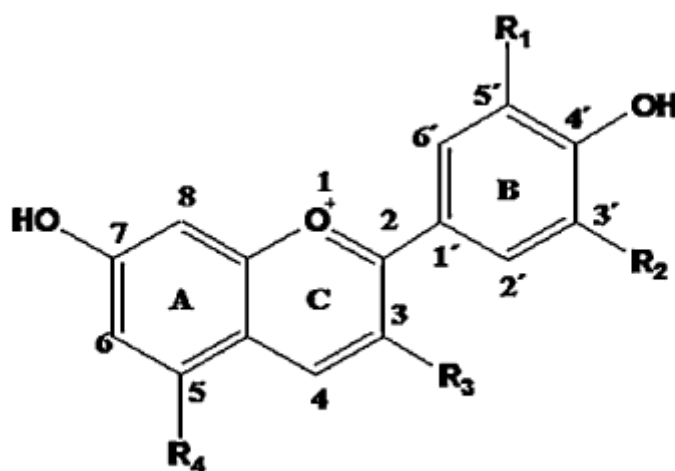


Zástupce indolových barviv - apigenin

Obr. 6 Struktury vybraných rostlinných pigmentů

5 ANTHOKYANINY

Anthokyaniny patří mezi důležitá přírodní rostlinná barviva, která způsobují oranžovočervené až modré zbarvení vyšších rostlin. Nachází se především v plodech, květech a listech, ale mohou se vyskytovat i v kořenech, hlízách a stoncích.²³ Tvoří největší skupinu ve vodě rozpustných pigmentů v rostlinné říši. Hrají důležitou roli ve fyziologii rostlin a vizuálně přitahují opylovače. Býložravá zvířata živící se ovocem hodnotí podle barvy jejich požitelnost a posuzují stupeň zralosti.^{24, 25 26} Barevnost těchto molekul byla poprvé zdůvodněna v roce 1939 Paulingem, který zjistil, že intenzitu jejich zbarvení způsobuje rezonanční struktura flavyliového kationtu (Obr. 7).²⁷



Obr. 7 Struktura flavyliového kationtu a jeho číslování pro názvoslovný popis substituce

Základní struktura anthokyaninů je odvozena právě od flavyliového kationtu. Po chemické stránce jsou anthokyaniny glykosylované nebo acetylglykosylované anthokyanidiny.²⁵ Dosud je známo 27 anthokyanidinů, mezi šest nejběžnějších patří malvidin, cyanidin, pelargonidin, peonidin, petunidin a delphinidin (Tab. II).²⁷

Anthokyaninů se přírodě nachází obrovské množství, přičemž hlavním rozdílem mezi jednotlivými typy je počet hydroxylovaných skupin, povaha a množství sacharidů vázaných na jejich strukturu. Mezi nejběžnější sacharidy patří glukosa, dále galaktosa, arabinosa, xylosa nebo rhammosa.^{24, 25} Nejběžněji přirozeně se vyskytující anthokyaniny jsou 3-O-glykosidy a 3,5-O-diglukosidy.²⁸

Tab. II Přehled nejběžnějších anthokyanidinů

Název	Zkratka	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Malvidin	Mv	-OCH ₃	-OCH ₃	-OH	-OH
Cyanidin	Cy	-OH	-H	-OH	-OH
Pelargonidin	Pg	-H	-H	-OH	-OH
Peonidin	Pn	-OCH ₃	-H	-OH	-OH
Petunidin	Pt	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH
Delfinidin	Dp	-OH	-OH	-OH	-OH

5.1 Výskyt, vlastnosti anthokyaninů a jejich působení na lidský organismus

Anthokyaniny se nachází zejména v bobulovitém ovoci, granátových jablkách, červeném zelí, ficích, v modrých hroznech Révy vinné či v červeném víně, jsou tedy významnou součástí stravy. Společně s karoteny jsou anthokyaniny nejpoužívanější barviva v potravinářském průmyslu.²⁴

Anthokyaniny patří mezi přírodní antioxidanty, které hrají důležitou roli v prevenci nervových a kardiovaskulárních onemocnění, Alzheimerovy choroby, diabetes a rakoviny. Důvodem jejich antikarcinogenity je fakt, že dovedou zachytit volné radikály, které se následně rozloží do celé flavyliové struktury a jsou stabilizovány.^{24,25} Kromě výše vyjmenovaných pozitivních účinků byla prokázána i antimikrobiální a protizánětlivá aktivita.²⁸ Vhodný způsob stravování a příjem potravin s vyšším obsahem anthokyaninů by mohl pomoci při prevenci rozmanitých chorob. V dnešní době existují i komerčně dostupné potravinové doplňky bohaté na anthokyaniny, např. extrakty z bobulovitých plodů (borůvek, brusinek atd.). U anthokyaninů byla dokonce prokázána větší antioxidační schopnost než u vitamínů C a E.^{24,25}

Uvádí se, že denní příjem těchto látek ve Spojených Státech Amerických je 12,5 mg/osobu.²⁹ Výzkum prováděný na dobrovolnících ukázal, že přes 98% požitých anthokyaninů je v těle biotransformováno a pouze necelé 2% je z těla vyloučeno močí beze změny.²⁵ I přes značný rozsah dostupné literatury o příznivých účincích anthokyaninů nebyly v západní medicíně nikdy použity ke standardním léčebným postupům, avšak potravinové doplňky obsahující velké množství anthokyaninů bývají často doporučovány jako léky podpůrné.²³

Na počátku 90. let 20. století se vynaložilo úsilí použít anthokyaniny jako přírodní potravinářská barviva. Nevýhodou pro jejich použití je však jejich nestabilita při působení

enzymů, světla a kyslíku, při výrazném zvýšení a snížení pH a při zvýšení teploty. Anthokyaniny degradují za vzniku chalkonu a následného rozkladu na fenolické kyseliny a floroglucinaldehyd. Dalšími procesy probíhajícími v roztoku je kondenzace barviv vzájemně mezi sebou a s dalšími flavonoidy. Strukturální změny mají poté přímý vliv na barvu pigmentů a kvalitu potravin. Řada kondenzovaných produktů je vzhledem k jejich větší stabilitě oproti nativním anthokyaninům považována za zajímavou alternativu pro potravinářské barvení k umělým barvivům.^{30,31}

Anthokyaniny existují v řadě acidobazických forem podle acidity roztoku. Při pH 1-4 dominuje barva červená, protože se anthokyaniny nachází ve formě flavyliového kationtu, při pH 4-6 jsou anthokyaniny bezbarvé díky převládající přítomnosti karbinolové pseudobáze. Při pH 7-8 jsou anthokyaniny fialové až modré, což je způsobeno chinoidní bází. V zásaditém prostředí dochází, jak již bylo zmíněno, k otevření heterocyklického kruhu a k tvorbě žlutého chalkonu a následně k degradaci anthokyaninů.³¹

Anthokyaniny a další přírodní barviva mohou podléhat tzv. kopigmentaci. Při tomto jevu dochází ke tvorbě komplexů pigmentů, bezbarvých organických molekul a/nebo kovových iontů doprovázených změnou barevného tónu nebo intenzity barvy. Tento jev je v chemii potravin považován za velmi důležitý, protože barva je jedním z hlavních faktorů kvality výrobku. Některé výzkumy naznačují, že kopigmentace anthokyaninů s jinými sloučeninami je hlavním mechanismem stabilizace barev u rostlin.²⁴

5.2 Anthokyaniny ve víně

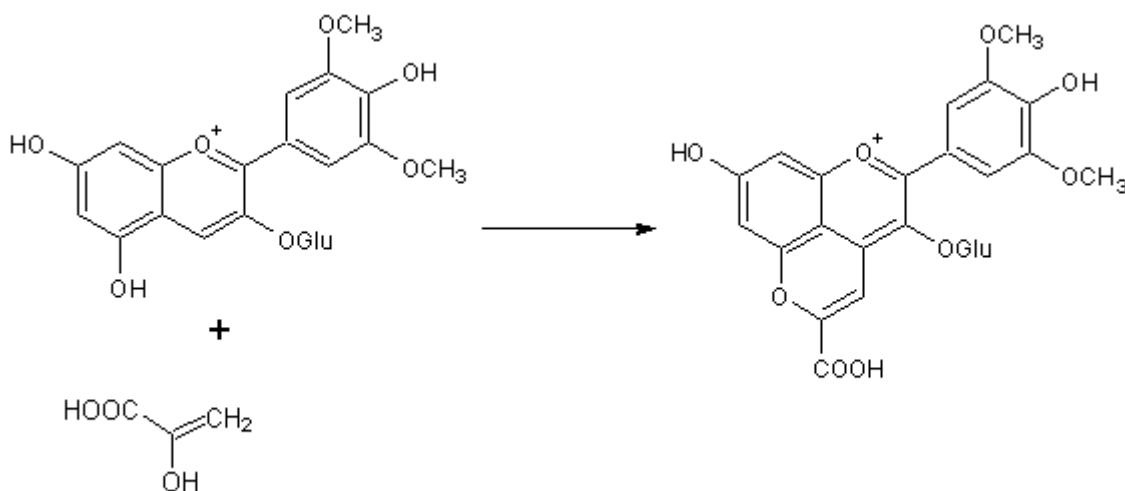
Jedním z hlavních faktorů kvality vína je přítomnost fenolických skupin. Na fenolické složení hroznů má vliv mnoho faktorů, např. odrůda hroznů, klimatické podmínky, kulturní či technické procesy. Většina anthokyaninů je nestabilní a během procesu stárnutí vína se tyto látky rychle transformují na různé složitější pigmenty.³² Vývoj barvy červených vín je složitý proces, který je částečně přičítán kopigmentaci a tvorbě nově vznikajících pigmentů.^{33,34}

Ve víně se mohou uskutečňovat kondenzační reakce flavonoidů a anthokyaninů buď přímo, nebo prostřednictvím acetaldehydu, přičemž reakce s acetaldehydem vedou ke stabilnějším sloučeninám. Další možností je kondenzace flavonoidů a anthokyaninů se sloučeninami o nižší molekulové hmotnosti, např. s kyselinou pyrohroznovou, glyoxylovou či vinylfenolem. Všechny tyto reakce mění nejen barvu vína, ale způsobují i změnu v jeho chuti (ovlivňují trpkost a hořkost).^{32,34}

Pyrohroznová kyselina i acetaldehyd jsou látky, které běžně vznikají v procesu fermentace vína. Acetaldehyd je nejdůležitější karbonylová sloučenina, která vzniká při kvašení nebo oxidací ethanolu, a představuje více než 90% celkového obsahu aldehydů.³⁵

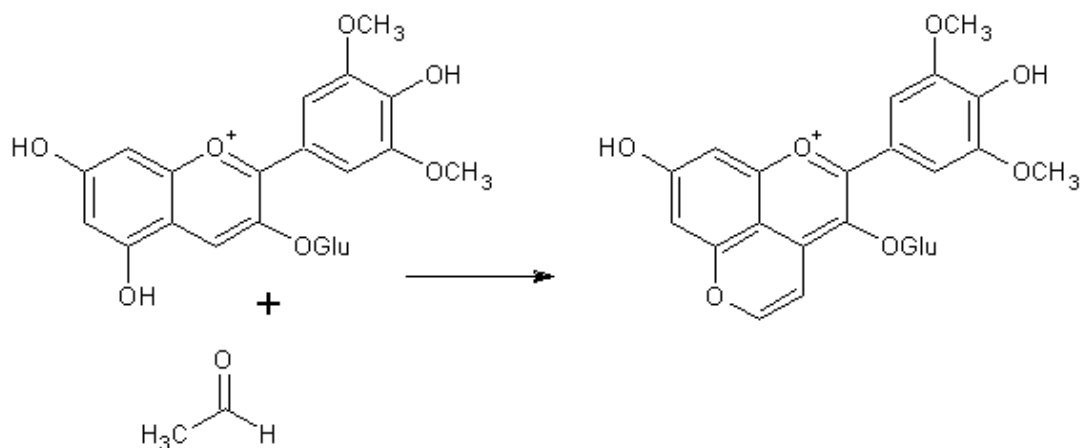
Produkce acetaldehydu byla zaznamenána po celou dobu kvašení, přičemž jeho nejvyšší koncentrace byla naměřena v poslední části procesu kvašení. Naopak produkce pyruvátu dosáhne maxima v prvních dnech kvašení a poté jeho koncentrace postupně klesá. Je to způsobeno tím, že pyruvát je důležitý metabolický meziprodukt v pozdějších fázích fermentace a je tedy dále přeměňován.^{36,37}

V červeném víně se ve velkém množství nachází především anthokyanin malvidin-3-glukosid (dále jen Mv-3-Glu) a až 60% přítomných pigmentů je odvozeno právě od Mv-3-Glu. Reakcí Mv-3-Glu s kyselinou pyrohroznovou vzniká pigment 5-karboxypyranomalvidin-3-glukosid, označován jako vitisin A (Obr. 8)³⁶ s absorpčním maximem při vlnové délce 518 nm.³⁶ Vitisin A byl izolován a identifikován v roce 1997, k identifikaci byla použita MS a nukleární magnetické rezonance (NMR).³⁵



Obr. 8 Vznik vitisinu A

Reakcí Mv-3-Glu s acetaldehydem se tvoří pigment pyranomalvidin-3-glukosid, označován jako vitisin B (Obr. 9)³⁶ s absorpčním maximem při vlnové délce 498 nm.³⁶



Obr. 9 Vznik vitisinu B

V řadě experimentálních výzkumů se acetaldehyd či kyselina pyrohroznová přidává k modelové směsi anthokyaninů záměrně a v nadbytku, aby se zvýšila produkce vznikajících barviv. V modelové směsi Mv-3-Glu, peonidin-3-glukosidu (Pn-3-Glu) a cyanidin-3-glukosidu (Cy-3-Glu) měl přídavek acetaldehydu za následek výraznou změnu barvy vína, která se posunula směrem do fialova. Acetaldehyd pravděpodobně reaguje jako elektrofil v pozici č. 6 nebo č. 8. Je patrné, že může existovat mnoho typů těchto polymerů, protože u anthokyaninů jsou obě dvě pozice aktivní. Dále bylo zjištěno, že Mv-3-Glu reaguje s acetaldehydem mnohem pomaleji, než ostatní anthokyaniny v připravené modelové směsi.³⁸

Kromě Mv-3-Glu se ve víně nachází, i když v menším množství, i Pn-3-Glu, Cy-3-Glu či petunidin-3-glukosid (Pt-3-Glu). Reakcí s acetaldehydem a kyselinou pyrohroznovou vznikají odpovídající pyrano a 5-karboxypyrano deriváty.

Další důležitou složkou vína jsou organické kyseliny, mezi které patří např. kyselina octová, vinná, jablečná, citronová či jantarová. Jejich koncentrace a poměr mezi nimi je velmi důležitý, protože ovlivňují sensorické vlastnosti vína a jeho stabilitu. Na rozdíl od acetaldehydu a pyrohroznové kyseliny se po přidavku většího množství těchto organických kyselin netvoří nové pigmenty.³⁵

5.3 Extrakce anthokyaninů a purifikace získaných extraktů

Nejpoužívanější extrakční technika je extrakce rozpouštědlem. Anthokyaniny jsou polární látky, proto nejběžněji používaná rozpouštědla jsou vodné směsi methanolu (dále jen MeOH), ethanolu (dále jen EtOH) nebo acetonu.²⁴ Volba extrakčního rozpouštědla je

klíčová pro účinné uvolnění anthokyaninů z rostlinného materiálu nebo potravinových vzorků. Nejpoužívanější rozpouštědlo je MeOH. Řada studií uvádí, že extrakce MeOH má mnohem větší účinnost než extrakce jinými rozpouštědly.²⁷ Jeho oblíbenost souvisí i s tím, že se jedná o kapalinu s nízkým bodem varu, kterou lze při zkoncentrování extraktu snadno odstranit. V potravinářském průmyslu se avšak dává přednost EtOH před MeOH vzhledem k jeho zdravotní nezávadnosti. V ovoci a zelenině jsou anthokyaniny umístěny v buňkách, které je nutné rozbít a anthokyaniny uvolnit. Z tohoto důvodu se používají okyselená rozpouštědla, která umožňují extrakci stabilní flavyliové formy. Nejčastěji používanou kyselinou je kyselina chlorovodíková, která ovšem může způsobit degradaci acylovaných anthokyaninových barviv. Degradaci lze zabránit použitím organických kyselin, např. mravenčí, octovou, citronovou nebo vinnou, z nichž ale řada může způsobovat acylaci anthokyaninů.³⁸

Ve většině případů je po extrakci dalším krokem purifikace, protože běžně používané extrakční rozpouštědla nejsou pro anthokyaniny specifická a současně se extrahují i jiné látky, jako jsou cukry, organické kyseliny, soli nebo bílkoviny.²⁴ Nejběžněji používanou metodou je extrakce tuhou fází, která umožňuje použití různých fází. Mezi nejběžněji používané fáze patří C18, Sephadex či Amberlit.

Při použití Amberlitu se nečistoty (např. kyseliny, cukry) nejčastěji vymývají okyselenou vodou, anthokyaniny se eluují okyseleným MeOH. Princip čištění na C18 je stejný jako purifikace na Amberlitu.³⁹ Princip purifikace na Sephadexu se od C18 a Amberlitu liší, protože se jedná o polární sorbent. K eluci flavonoidních látek se může využít např. směs vody a MeOH. Je doporučováno purifikaci provádět opakovaně.^{27, 39}

5.4 Frakcionace

Pod pojmem frakcionace je zahrnut postup, při kterém dochází k separaci původního vzorku na určitý počet frakcí, z nichž každá obsahuje rozdílný poměr jednotlivých složek původního vzorku. Ve frakcích by mělo být jednodušší zastoupení jednotlivých složek původního vzorku. V ideálním případě by měla každá frakce obsahovat jen jednu složku původní směsi. Tato práce je zaměřena na frakcionaci pomocí sloupcové chromatografie, a proto je dále uveden přehled použitých postupů pro izolaci anthokyaninů z různých materiálů (Tab. III.).

Už v roce 1957 byla provedena frakcionace anthokyaninů macešky velkokvěté, a to na celulosovém prášku Whatman B, kterým byla naplněna skleněná kolona o rozměrech 35 x 4 cm. Jako mobilní fáze byla použita směs butanolu, 36% kyseliny chlorovodíkové a

vody v poměru 5:1:4, v/v. Rozseparované anthokyaniny byly z kolony vymyty MeOH. Závěrem autoři uvedli, že použitý celulosový prášek je pro frakcionaci vhodný, nicméně neuvádí, které anthokyaniny byly separovány.⁴⁰

Podle Zhanga a kolektivu je velmi účinná frakcionace anthokyaninů na Sephadexu LH 20, kterým naplnili kolonu o délce 100 cm a průměru 2,6 cm. Zkoumaným materiálem bylo 5 ml extraktu malin, který byl před frakcionací přečištěn přes Amberlit XAD 7. Byla použita izokratická eluce mobilní fází složené z vody, okyselenou 0,5% trifluoroctovou kyselinou (dále jen TFA), a MeOH v poměru 7:3. Průtok mobilní fáze činil 0,3 ml/min. Jednotlivé frakce byly shromažďovány frakčním kolektorem. Celkem bylo nasbíráno 7 frakcí a podle odpovídající relativní absorbance bylo zjištěno, že nejvíce anthokyaninů se nachází ve frakcích č. 3 a 6. Analýzou pomocí HPLC/ESI-MS bylo zjištěno, že hlavními anthokyaniny v malinách jsou Cy-3-Glu a Cyanidin-3-Sophorosa (Cy-3-Soph).⁴¹

Podobně jako Zhang použila frakcionaci na Sephadexu LH 20 i Myjavcová s kolektivem, tentokrát byl však frakcionován vzorek zimolezu kamčatského. K extrakci anthokyaninů byla použita různá rozpouštědla a sledovalo se, která mají největší extrakční schopnost. Jednotlivé extrakty byly poté nanášeny na skleněnou kolonu o rozměrech 14 x 2 cm, jako mobilní fáze byl použit MeOH o průtoku 1,4 ml/min. Celkem byly nasbírány 4 frakce, které se odebíraly po 8 minutách. Jednotlivé frakce byly následně analyzovány pomocí LC/MS. Bylo zjištěno, že největší obsah anthokyaninů byl získán při použití okyseleného MeOH jako extrakčního činidla. Některé studie uvádějí, že nejlepším činidlem je aceton, to však při tomto experimentu nebylo potvrzeno. Na základě MS/MS spekter byla identifikována řada anthokyaninů, nejčastěji deriváty Cy a Pn.²⁷

Dalším běžně používaným sorbentem pro frakcionaci anthokyaninů je reverzní fáze (nejčastěji C18). Frakcionace probíhala ve sloupci o rozměrech 23 x 1,5 cm. Na rozdíl od předchozích experimentů byla použita gradientová eluce, a to od 100% vody s 2% přídavkem kyseliny octové (dále jen HAc) do 100% MeOH, také s přídavkem 2% HAc. Byly nasbírány celkem 3 frakce, které se analyzovaly pomocí LC/MS. Ve frakci č. 1 se vyskytovaly především neacetylované anthokyaniny, zejména Mv-3-Glu. Ve frakci č. 2 bylo opět zaznamenáno nejvíce Mv-3-Glu společně s jeho acetyl a coumaroyl deriváty. Byly zde nalezeny i pyranoanthokyaniny, zejména pak vitisin B, acetylvitisin B a coumaroylvitisin B. V poslední frakci se vyskytovaly méně polární látky.⁴²

Frakcionaci anthokyaninů lze provádět i na gelových sorbentech. Alcalde-Eon a kolektiv frakcionovali červené víno z Portugalska na Toyopearl HW-40 (s) gelu, který umístili do kolony o délce 20 cm a průměru 1,5 cm. Jako mobilní fáze byl použit 95%

EtOH, kterým eluovala většina anthokyaninů Celkem bylo nasbíráno 7 frakcí. Předběžná LC analýza s detektorem diodového pole (DAD) ukázala, že frakce č. 1-4 měly podobné UV/VIS spektra, chromatogramy a retenční časy jednotlivých píků byly shodné. Další shodnost se projevila ve frakcích č. 5-7. Pro zjednodušení se následující frakce spojily do frakce A (1-4) a frakce B (5-7). Na základě LC/MS analýz bylo zjištěno, že ve frakci A se nacházely převážně pyranoanthokyaniny, ve frakci B kondenzáty anthokyaninů a dalších flavonolů. Výhodou frakcionace je umožnění detekce i méně zastoupených anthokyaninů (např. derivátů peonidinu), které jsou obtížněji detekovány v přítomnosti majoritních anthokyaninů (u vína např. derivátů malvidinu).⁴³

Kromě sloupcové chromatografie se může k frakcionaci využít i protiproudá chromatografie (MLCCC). Princip této metody je založen na udržení kapalně stacionární fáze na teflonové trubici pomocí vysoké odstředivé síly. Podmínkou je použití nemísitelných mobilních fází.⁴⁴

Tab. III Přehled podmínek pro frakcionaci anthokyaninů

Stacionární fáze	Mobilní fáze	Typ vzorku	Rozměry kolon, délka x průměr [cm]	Průtok [ml/min]	Literární zdroj
celulosový prášek Whatman B	Butanol + 36% HCl + H ₂ O v poměru 5:1:4	maceška velkokvětá	35 x 4	X	40
Sephadex LH 20	H ₂ O (+0,5% TFA) + MeOH v poměru 7:3	maliny	100 x 2,6	0,3	41
Sephadex LH 20	MeOH	zimolez kamčatský	14 x 2	1,4	27
RP – C18	H ₂ O (+ 2% HAc) → MeOH (+ 2% HAc)	červené víno	23 x 1,5	2,8	42
ID Toyopearl [®] HW-40 (s) gel	95 % EtOH	červené víno	20 x 1,5	0,2	43

Pozn.: symbol „→“ znázorňuje gradientovou eluci

Jednotlivé frakce obsahují poměrně velké množství rozpouštědla, proto je třeba rozpouštědlo odstranit a frakce zkoncentrovat. Nejběžněji se pro odstranění nadbytečného rozpouštědla používá vakuová rotační odparka.⁴⁵ Ve většině případů se následně frakce lyofilizují. Takto vzniknou čisté a koncentrované frakce připravené ke kontrole složení a dalším experimentům.

5.5 Možnosti identifikace

Dříve mezi nejčastěji využívané metody k identifikaci anthokyaninů patřila UV/VIS spektroskopie, protože se jedná o metodu levnou a rychlou. Díky těmto výhodám je metoda využívána i v současnosti. Všechny aglykony flavonoidů poskytují dvě absorpční maxima, a to při 240-285 nm a 300-550 nm. Hodnoty maxim jsou závislé na struktuře jednotlivých typů flavonoidů a uvnitř těchto skupin platí, že jednoduché substituenty (např. methylová nebo hydroxylová skupina) způsobí v postavení maxima jen minimální změny.⁴⁶

S rozvojem instrumentálních technik se do popředí dostává hmotností spektrometrie.²⁴ MS analýza je prováděna pro objasnění struktury anthokyaninů i pro studium jejich přeměn během výroby a skladování potravin. Jednostupňová MS analýza v kombinaci s UV detekcí slouží především k potvrzení přítomnosti anthokyaninů. Pro identifikaci neznámých barviv je optimální použití tandemového hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením a možností měření přesné a správné hmotnosti (informace o elementárním složení).^{46,47}

Mezi nejběžněji používanou metodou ionizace je ESI, kterou využil např. Wu s Priorem při analýze 40 druhů potravin.²⁵ Další možností je využití nanoelektrospreje (nanoESI). Hlavní výhodou oproti konvenční ESI je vyšší citlivost a menší spotřeba dávkovaného vzorku.⁴⁸ Mezi povrchvé techniky studia anthokyaninů patří MALDI a desorpční elektrosprej (DESI). Pro analýzu anthokyaninů byla technika MALDI použita poprvé v roce 1999.⁴⁹ O rok později, v roce 2000, využil Wang se svým týmem MALDI-TOF-MS pro identifikaci anthokyaninů v borůvkách. Podle autorů byla jedna z hlavních výhod této metody krátká analýza, jeden vzorek byl proveden cca za 4 minuty.⁴⁷ Metoda DESI nabízí přímou analýzu vzorků bez složité přípravy a přečištění, proto bývá používaná v řadě aplikací – analýza léčiv, drog či výbušnin. Analýzu anthokyaninů ve víně, směsí vín a různých druhů bobulí pomocí desorpčního nanoelektrospreje (nanoDESI) poprvé použila Hartmanová s kolektivem v roce 2010.⁵⁰

NMR se používá nejen k identifikaci anthokyaninů, ale také ke studiu reakčních produktů s dalšími sloučeninami. Oproti MS poskytuje detailní informace o struktuře anthokyaninů.²⁴ Využívá se jak jednodimenzionálních ^1H NMR spekter, tak i dvoudimenzionálních (např. COSY). Na základě NMR spekter byl např. navržen mechanismus kondenzace Mv-3-Glu, resp. Mv-3-coumaroylglukosidu s pyrohroznovou kyselinou.⁵¹

6 CÍLE PRÁCE

1. Výběr vhodných sorbentů umožňujících frakcionaci červených vín obohacených malými reaktivními molekulami indukujícími tvorbu kondenzovaných barviv
2. Testování vybraných sorbentů
3. Studium anthokyaninových barviv a produktů jejich kondenzace v získaných frakcích tandemovou vysokorozlišující hmotnostní spektrometrií a její kombinací s ultraúčinnou kapalinovou chromatografií (UPLC/ESI-MS²)

7 MATERIÁL A METODY

7.1 Chemikálie a sorbenty

Redestilovaná voda (deionizační stanice Milipore, Molsheim, Francie), methanol (HPLC grade, Fisher Scientific, Nizozemí), dimethylsulfoxid (p.a., Sigma-Aldrich, USA), acetonitril (HPLC grade, J. T. Baker, Nizozemí), kyselina mravenčí (p.a., Sigma-Aldrich, Německo), leucin-enkefalin (p. a., Sigma-Aldrich, USA), přečištěný mořský písek

Během práce byly použity chromatografické sorbenty: Septra SDB-L ($d_p = 95 \mu\text{m}$, 255 \AA), silikagel 60 ($d_p = 15\text{-}40 \mu\text{m}$, Merck, Německo), Amberlit XAD 16 (20-60 mesh, 100 \AA , Sigma-Aldrich, Francie), LiChroprep RP-18 ($d_p = 40\text{-}63 \mu\text{m}$, Merck, Německo)

7.2 Použité přístroje

UV/VIS spektrometr (Lambda 25, Perkin Elmer, USA), hybridní hmotnostní spektrometr Q-TOF Premiere (Waters Corporation, Milford, USA), ultraúčinný kapalinový chromatograf (UPLC, Acquity, Waters Corporation, Milford, USA), vysokoúčinný kapalinový chromatograf (Knauer, Německo), MPLC systém Bioline (Knauer, Německo), lyofilizátor (Christ, Alpha 1-2 LD plus, Německo), centrifuga (Mikro 120, Německo)

7.3 Parametry použitých kolon

Pouzdra pro semipreparativní experimenty:

1. sloupcová skleněná kolona, $L = 16 \text{ cm}$, $d = 2 \text{ cm}$
2. Bioline (Knauer, Německo), $L = 14,5 \text{ cm}$, $d = 2 \text{ cm}$

Analytická kolona pro ultraúčinnou chromatografii:

kolona Acquity UPLC BEH C18 (Waters, USA), $100 \times 2,1 \text{ mm}$, $d_p = 1,7 \mu\text{m}$

7.4 Použité stacionární a mobilní fáze

Přehled použitých stacionárních (SF) a mobilních fází (MF) je uveden v tabulce IV.

Tab. IV Přehled použitých stacionárních a mobilních fází*

SF	MF A	MF B
SDB-L	5% HCOOH ve vodě	5% HCOOH v methanolu
Silikagel (HILIC)	5% HCOOH v acetonitrilu	5% HCOOH v 60% acetonitrilu+ 40% vody
Amberlit	5% HCOOH ve vodě	5% HCOOH v methanolu
RP C18	0,1% HCOOH ve vodě	0,1% HCOOH v 50% vody + 50% acetonitrilu

* roztoky jsou připravovány smícháním jednotlivých složek v objemových poměrech

7.5 Příprava vzorků

K frakcionaci byly použity dva vzorky – červené víno Cabernet Moravia (roč. 2010) s přidavkem acetaldehydu a červené víno Cabernet Moravia (roč. 2010) s přidavkem pyrohroznové kyseliny. Tato vína byla připravena v laboratořích Ústavu posklizňové technologie zahradnických produktů, Zahradnická fakulta v Lednici, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Do mladého vína byl přidán acetaldehyd, resp. pyrohroznová kyselina v množství, které poskytlo finální koncentraci 4 g/l. Část připraveného vína obohaceného kyselinou pyrohroznovou byla odebrána po 8 měsících zrání a lyofilizována. Vzorek s přidavkem acetaldehydu byl odebrán a lyofilizován po 12 měsících zrání. Doby odběru a lyofilizace tohoto většího množství obohacených vín byly voleny na základě předběžné LC/MS kontroly, při které bylo zjištěno, že převážná část anthokyaninů byla přeměněna na kondenzovaná barviva a obsah nativních anthokyaninů je velmi malý. Odebraný vzorek byl zfiltrován a supernatant byl lyofilizován a skladován v mrazicím boxu. K frakcionaci bylo naváženo 10 mg lyofilizovaného supernatantu, který byl rozpuštěn v 1 ml mobilní fáze A (dle druhu experimentu, viz Tab. IV.)

7.6 Příprava sloupcové kolony

Kolona byla vždy plněna metodou na mokré cestě, suspenze byla připravena smícháním dané stacionární fáze s MeOH. Po dokonalém usazení fáze v koloně bylo na vrchní část stacionární fáze aplikováno malé množství přečištěného mořského písku, aby během frakcionace nedocházelo k víření sorbentu.

Příprava kolony v systému Bioline zahrnovala sestavení spodní a horní frity a ferulí pro připojení spojovacích kapilár. Po naplnění kolony sorbentem a jeho usazení byla

připojena a adjustována horní fritu. Jednotlivé části systému Bioline před a po jeho sestavení ukazuje Příloha 1.

6.6 Průběh frakcionace v klasickém sloupcovém uspořádání

Po promytí sloupce sorbentu mobilní fází A byl nanesen připravený vzorek. Vzorku s acetaldehydem bylo aplikováno 0,6 ml, vzorku s pyruvátém 1 ml. Byla použita gradientová eluce od 100% MF A zvyšováním obsahu složky B jak je pro jednotlivé systémy uvedeno v tabulce IV. Během frakcionace byly pravidelně odebrány frakce o objemu 6 ml. U každé nasbírané frakce bylo změřeno UV/VIS spektrum, na základě spekter byly vybrány vhodné frakce k následné analýze (podle barevného profilu). Vybrané frakce byly částečně odpařeny dusíkem a následně lyofilizovány. Lyofilizovaný materiál byl před analýzou skladován v mrazicím boxu. Dle použité identifikační analytické metody se vzorky rozpustily ve vhodném rozpouštědle (viz níže).

7.8 Parametry hmotnostního spektrometru Q-TOF Premier

Napětí na sprejovací kapiláře: 3,2 kV

Teplota iontového zdroje: 120 °C

Teplota desolvatačního plynu: 150 °C

Kolizní energie: 5-70 eV (podle typu experimentu)

Doba skenu: 0,2 s

Interscan delay: 0,02 s

Průtok zmlžovacího plynu: 30 l/hod

Průtok desolvatačního plynu: 450 l/hod

7.9 Parametry semipreparativního chromatografu Smartline Knauer

Čerpadlo: Smartline Pump 1000

UV detektor: 490 nm

PDA detektor: 200 – 500 nm

Gradient: 0-60 min: od 100% H₂O okyselené 0,1% HCOOH do H₂O:ACN 1:1 (v/v) okyselené 0,1 % HCOOH

Průtok: 4 ml/min

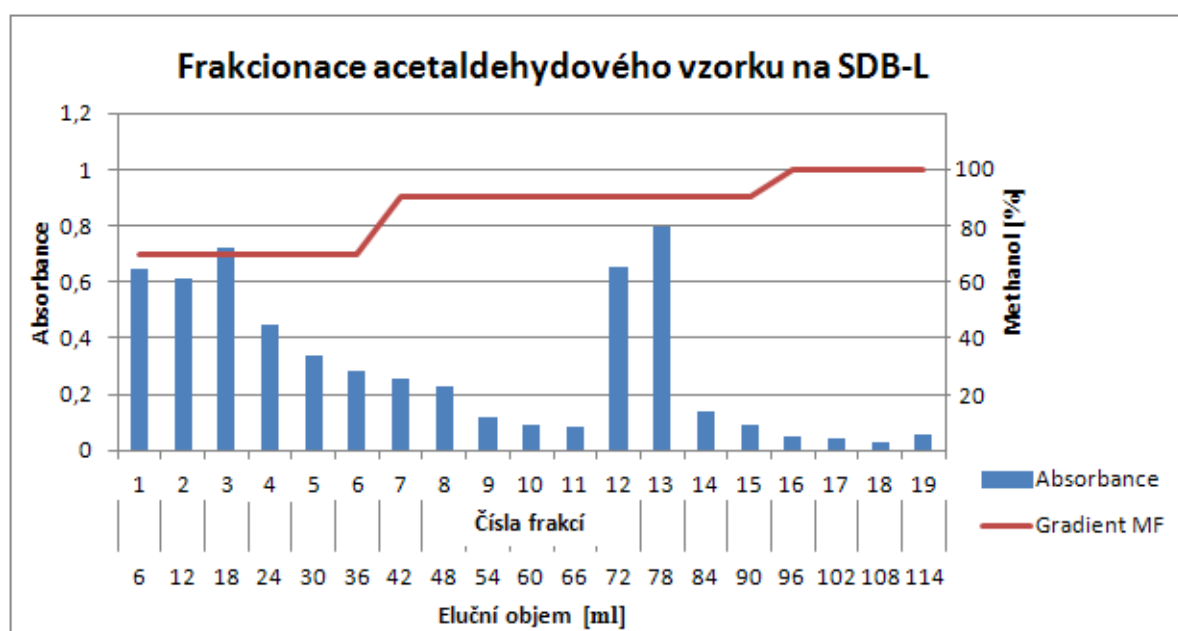
Velikost smyčky: 250 µl

8 DISKUZE A VÝSLEDKY

8.1 Vzorek vína obohacený acetaldehydem

8.1.1 Frakcionace na sorbentu Sepra SDB-L

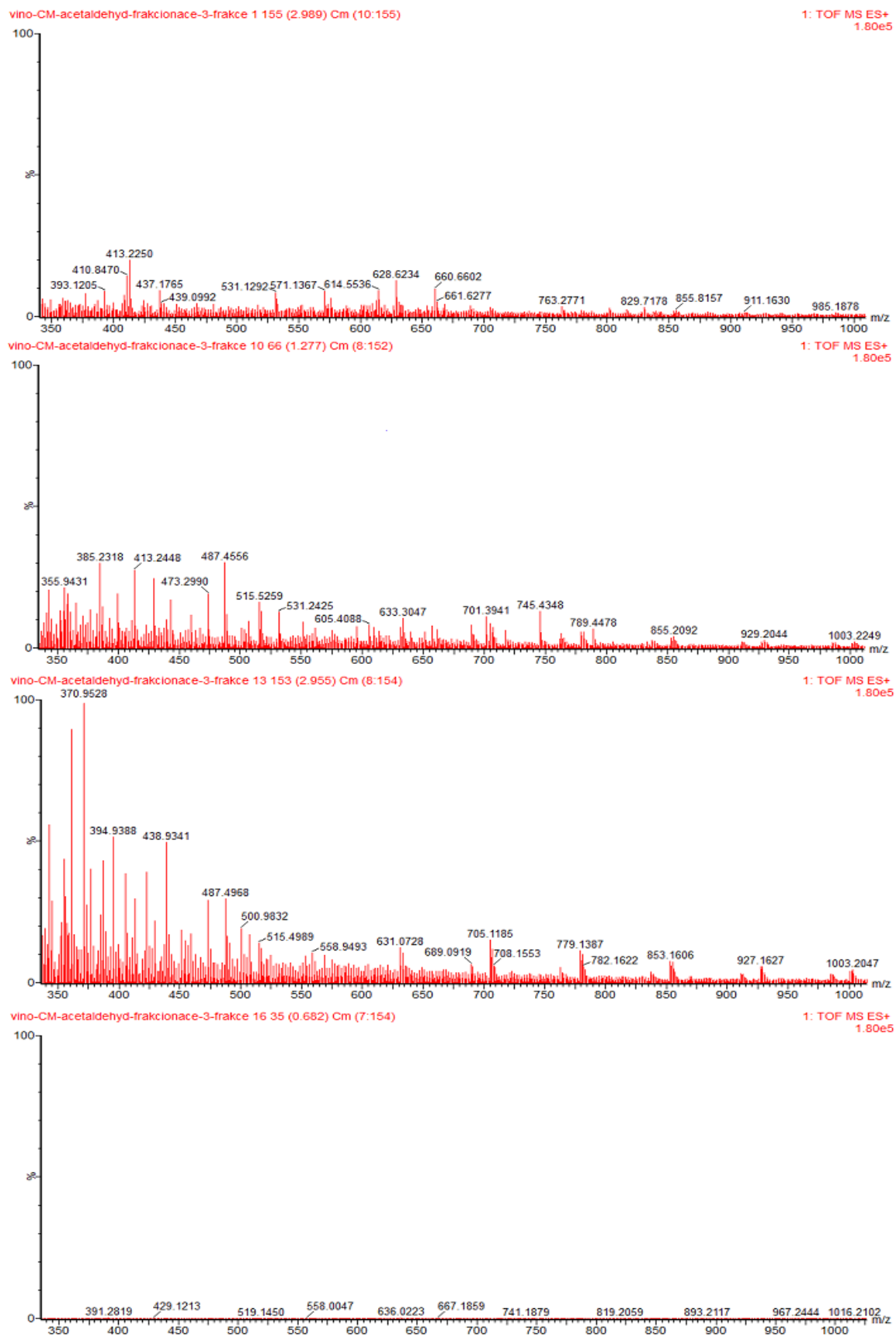
Při frakcionaci vzorku vína obohaceného acetaldehydem na sorbentu Sepra SDB-L bylo nasbíráno celkem 19 frakcí. Z obrázku 10 lze vyčíst závislost absorbance při vlnové délce 500 nm na jednotlivých odebraných frakcích a elučních objemech. K bližší analýze frakcí byla použita přímá infuze vzorku do ESI-MS.



Obr. 10. Graf závislosti absorbance na jednotlivých odebraných frakcích a elučních objemech

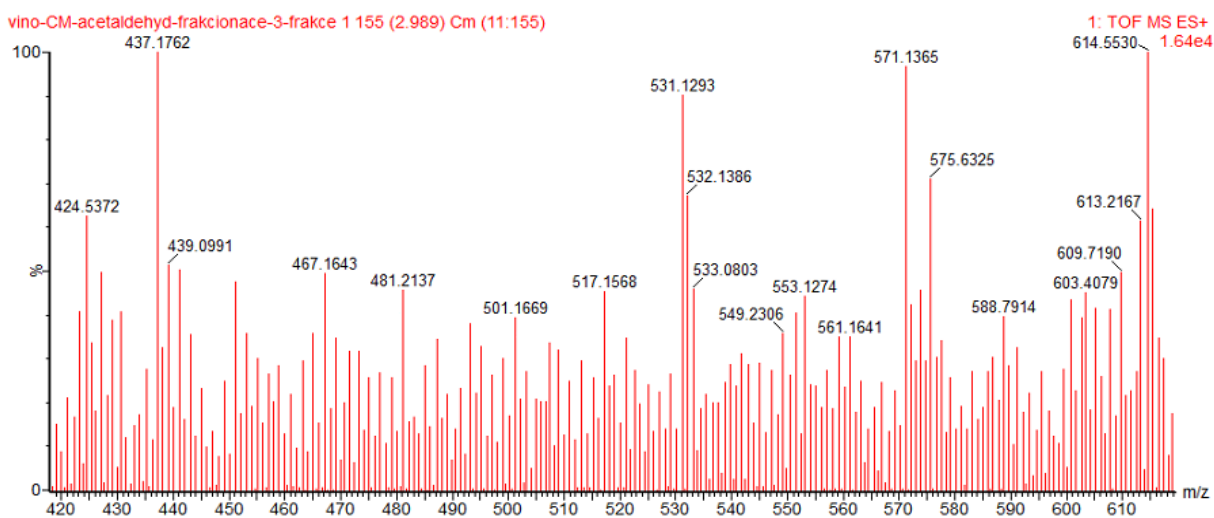
K přímému nástřiku do MS byly vybrány frakce č. 1, 10, 13 a 16. Po lyofilizaci byly frakce rozpuštěny v 1 ml směsi MeOH a dimethylsulfoxidu (dále jen DMSO) v poměru 9:1 (v/v).

Na obrázku 11 jsou znázorněna MS spektra vybraných frakcí. Spektra jsou poskládána tak, jak byla odebírána a jsou vztažena na jednotnou intenzitu $1,8 \cdot 10^5$ imp. Frakce č. 13 představovala frakci s největším množstvím anthokyaninových látek, naopak frakce č. 16 neobsahovala téměř žádné.

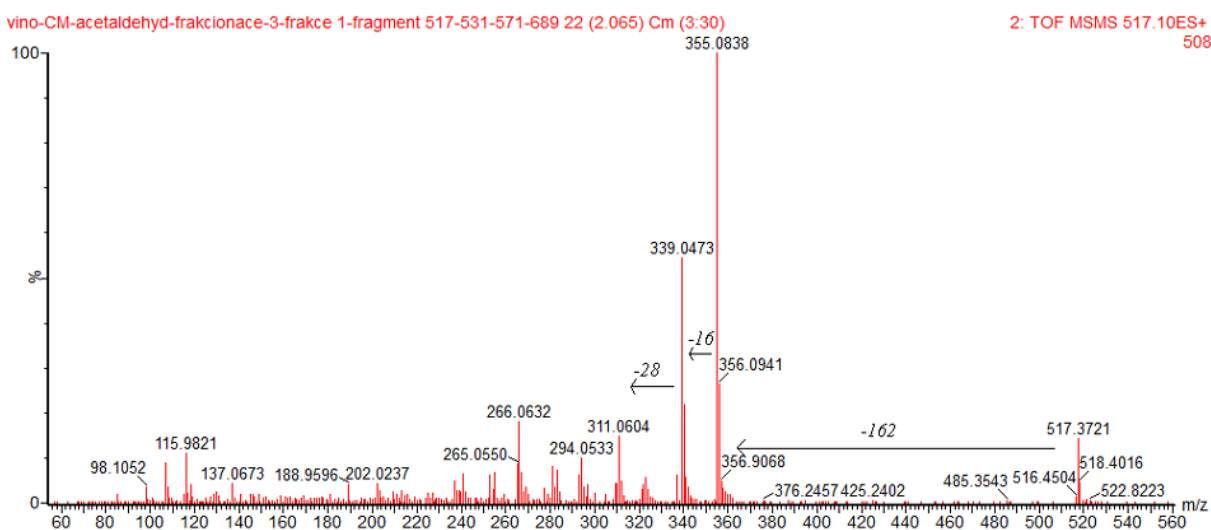


Obr. 11 MS spektra frakcí č. 1, 10, 13 a 16 získaných při separaci vzorku vína obohaceného acetaldehydem na sorbentu Sepra SDB-L

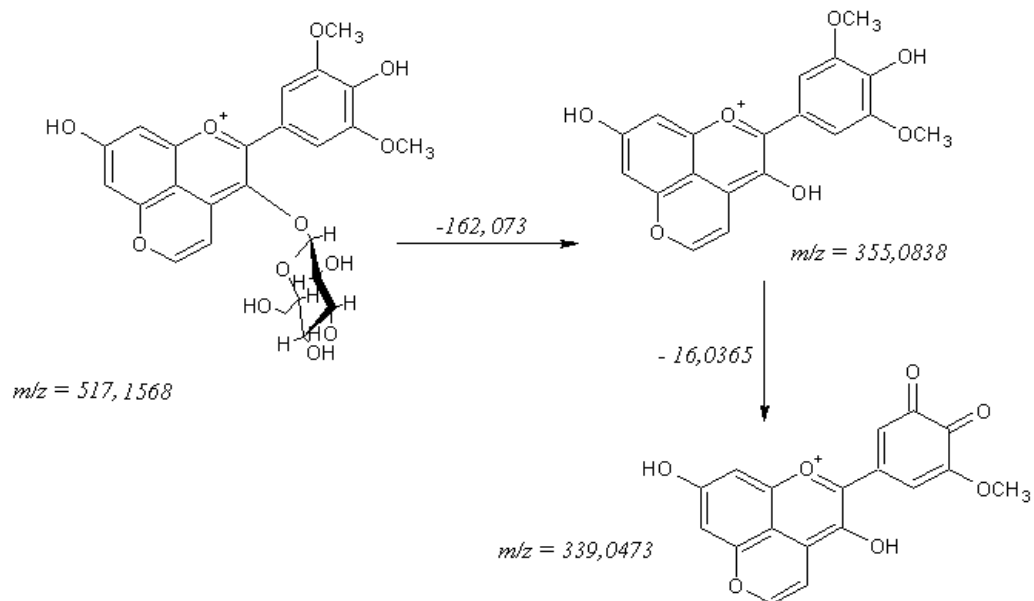
Na obrázku č. 12 lze vidět výřez MS spektra frakce č. 1. Nachází se zde ion o m/z 517,1568, který byl na základě jeho kolizního spektra (Obr. 13) identifikován jako vitisin B. Odchyłka od teoretické hodnoty je 42,9 ppm, tuto chybu je možné připsat nedostatečnému poměru signál/šum. V kolizním spektru je ovšem patrné odštěpení glukosy (odpovídá ztrátě 162,0730) za vzniku aglykonu o m/z 355,0838. Následně došlo k odštěpení neutrální částice o m/z 16,0365 (ztráta methanu) a 27,9869 (ztráta karbonylu) za vzniku iontu o m/z 311,0604. Fragmentace vitisinu B je vidět na obrázku 14 (uvedené m/z odpovídají naměřeným hodnotám).



Obr. 12 Výřez MS spektra frakce č. 1

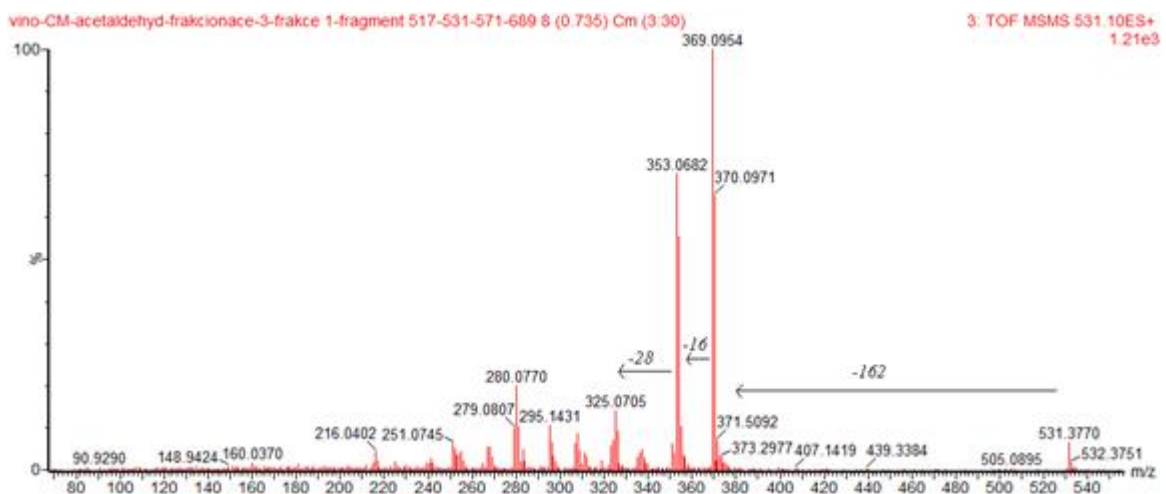


Obr. 13 Kolizní spektrum vitisinu B

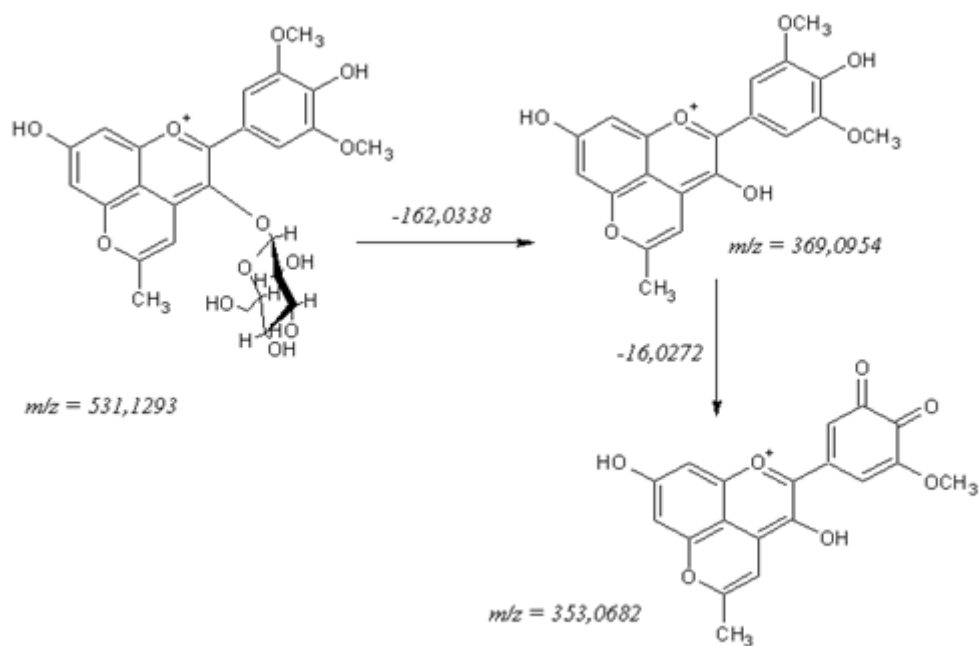


Obr. 14 Struktura vitisinu B a jeho vzniklé fragmenty

Za zmínku stojí ion o $m/z = 531,1293$. Z jeho kolizního spektra lze vyčíst ztráta glukosy (odpovídá hmotě $162,0339$) za vzniku aglykonu. Následovaly ztráty o m/z $16,0272$ (ztráta methanu) a $27,9977$ (ztráta karbonylu) za vzniku fragmentu o m/z $325,0705$. Na základě kolizního spektra byl tento anthokyanin předběžně identifikován jako 5-methylpyranomalvidin-3-glukosid (v literatuře také označován jako Mv-3-Glu-aceton³⁴). Odchyłka od teoretické hodnoty je $39,7$ ppm. Jeho kolizní spektrum lze vidět na obrázku 15, jeho strukturu a vzniklé fragmenty na obrázku 16 (uvedené m/z odpovídají naměřené hodnotě).

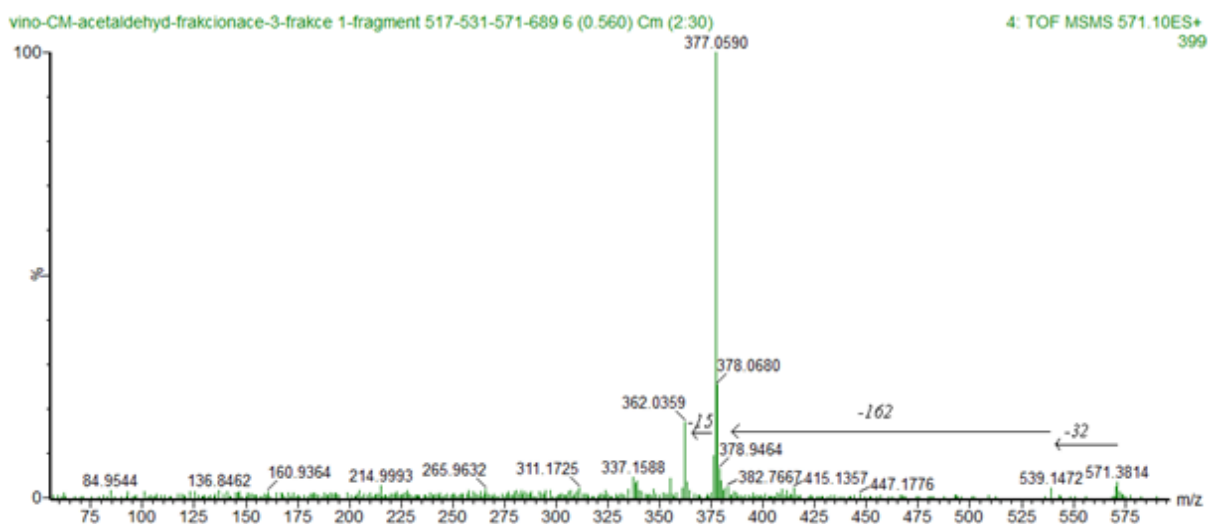


Obr. 15 Kolizní spektrum anthokyaninu 5-methylpyranomalvidin-3-glukosidu



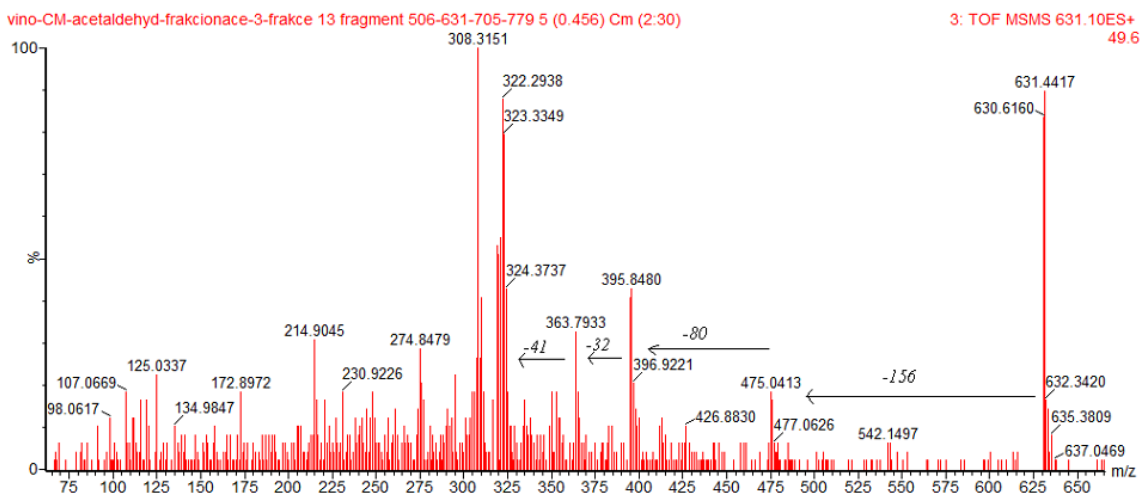
Obr. 16 Struktura 5-methylpyranomalvidin-3-glukosidu a jeho vzniklé fragmenty

Dalším výrazným iontem ve frakci č. 1 je ion o m/z 571,1365. Nejprve došlo k odštěpení fragmentu o m/z = 31,9893 za vzniku iontu o m/z = 539,1472. Následně došlo opět k odštěpení glukosy za vzniku iontu o m/z 377,0590 (obr. 17). I přes kvalitní kolizní spektrum se tuto látku zatím nepodařilo identifikovat.

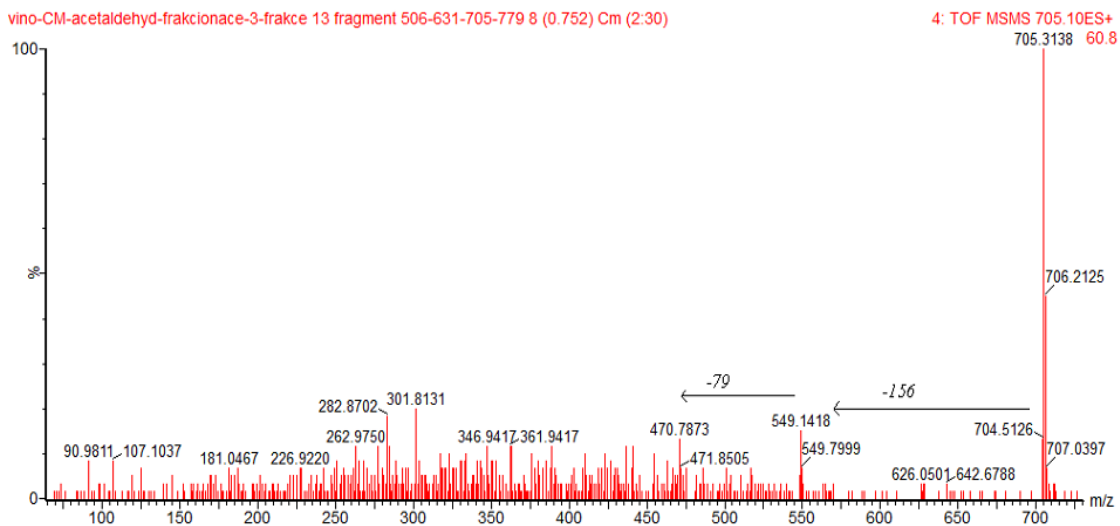


Obr. 17 Kolizní spektrum iontu o m/z 571,1365

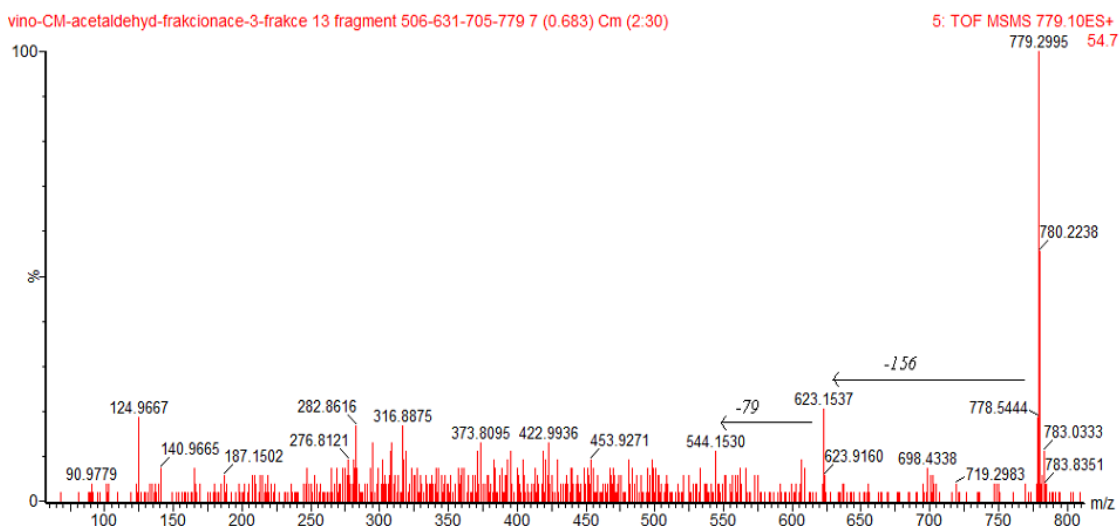
Frakce č. 13 představovala druhou intenzivní barevnou zónu s obsahem mnoha iontů - za pozornost stojí ionty o $m/z = 631,0731$; $705,1183$ a $779,1384$. Kolizní spektrum iontu $m/z 631,0731$ (resp. $631,4417$) lze vidět na obrázku 18, iontu $m/z 705,1183$ (resp. $705,3138$) na obrázku 19 a iontu $m/z 779,1384$ (resp. $779,2995$) na obrázku 20. U všech tří zmiňovaných iontů došlo nejprve k odštěpení neutrální částice o hmotnosti o 156.



Obr. 18 Kolizní spektrum iontu o $m/z 631,0731$

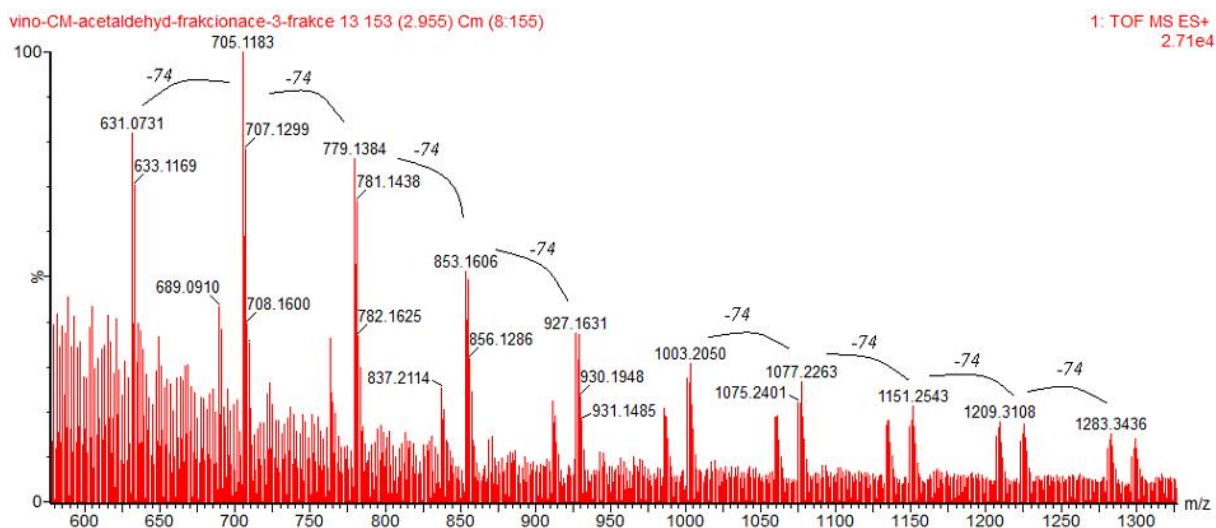


Obr. 19 Kolizní spektrum iontu o $m/z 705,1183$



Obr. 20 Kolizní spektrum iontu o m/z 779,1384

Ve frakci č. 13 byly dále fragmentovány ionty o vyšších hodnotách m/z (927,1631; 1003,2050; 1077,2263; 1151,2543; 1209,3108 a 1283,3436). I přes to, že intenzita rodičovských iontů byla dostatečná a hodnota kolizní energie byla optimalizována v širokém rozsahu (30-70 eV), se nepodařilo získat kvalitní kolizní spektra. Zajímavé je, že mezi přítomnými ionty dochází k pravidelnému přírůstku hmoty o m/z 74 (obr. 21).



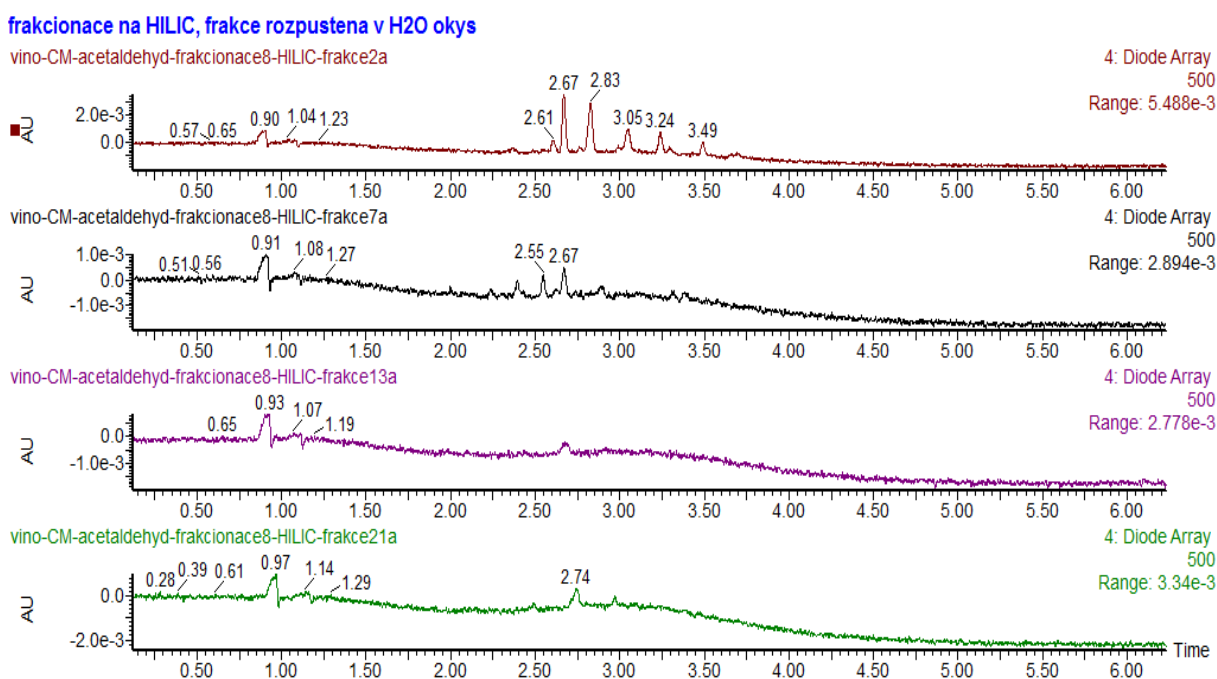
Obr. 21 Výřez hmotnostního spektra frakce č. 13

8.1.2 Frakcionace na silikagelu v systému HILIC

Při frakcionaci vzorku vína obohaceného acetaldehydem na silikagelu v systému HILIC bylo nasbíráno celkem 27 frakcí. Došlo k vytvoření pouze jedné barevné zóny, kterou představuje frakce č. 2. K bližší charakterizaci byla použita UPLC/MS, kolizní spektra byla získaná přímou infuzí vzorku do ESI-MS.

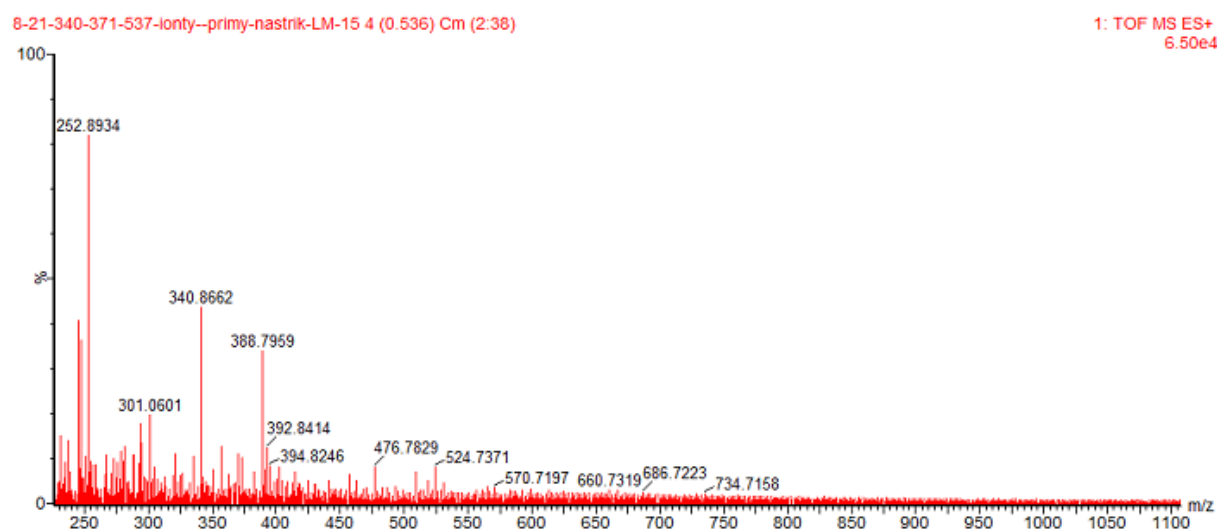
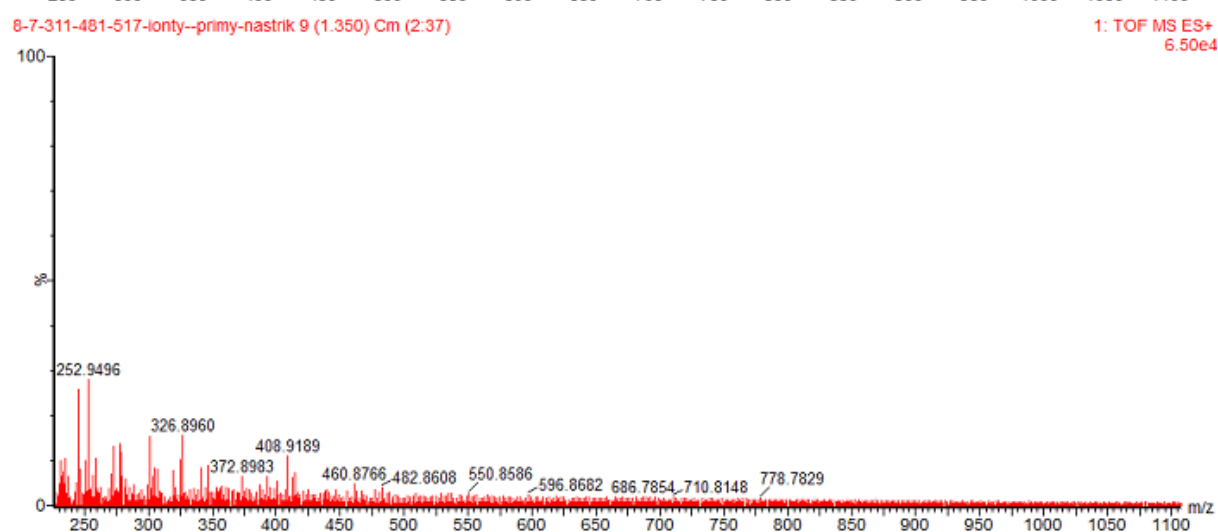
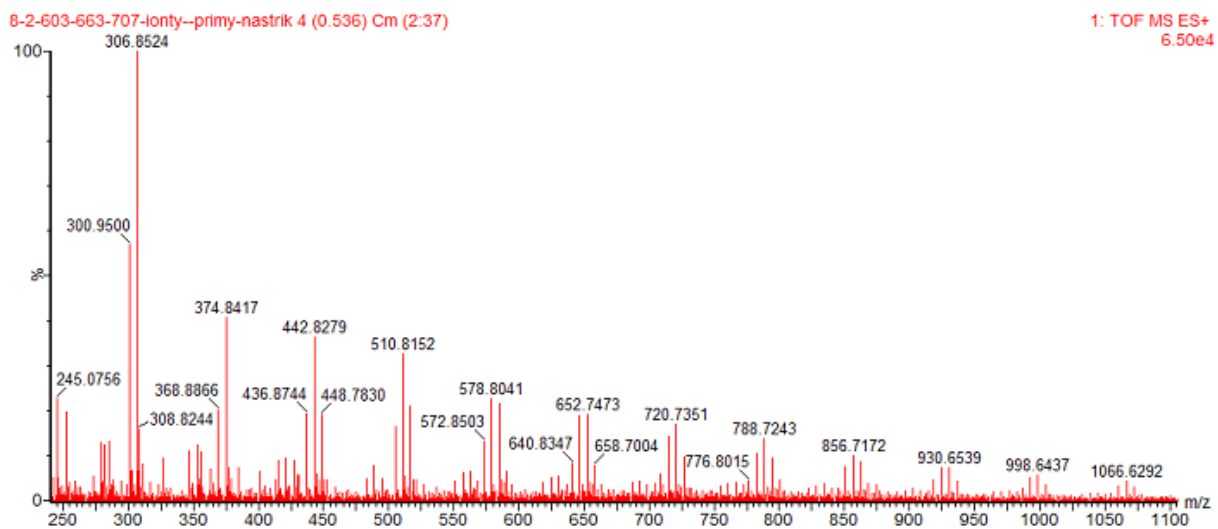
K analýze byly vybrány frakce č. 2, 7, 13 a 21. Po lyofilizaci byly frakce rozpuštěny v 1 ml vody s 5% HCOOH (v/v).

Na obrázku 22 jsou vyneseny chromatogramy vybraných frakcí při vlnové délce 500 nm pořízené metodou UPLC/MS.



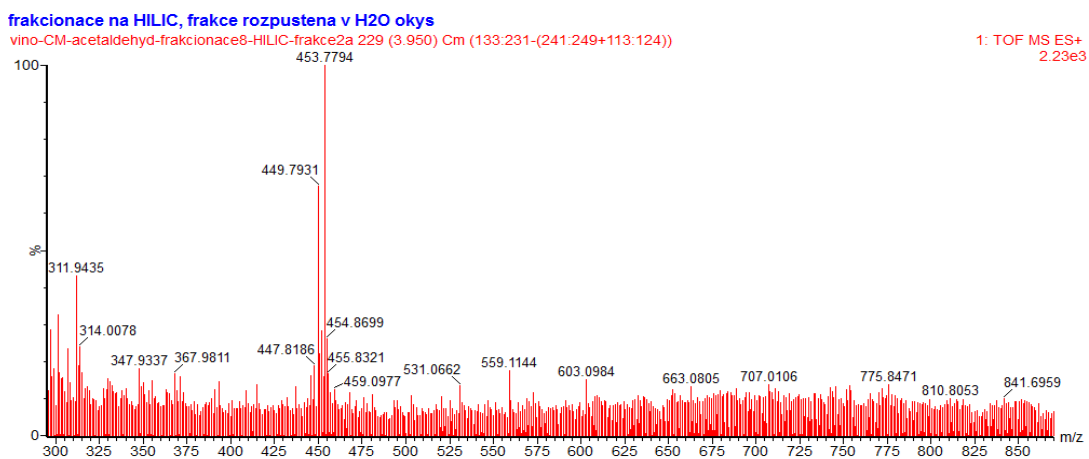
Obr. 22 Chromatogramy vybraných frakcí

Na obrázku 23 jsou znázorněna MS spektra frakcí č. 2, 7 a 21 pořízená přímým nástřikem do MS. Spektra jsou poskládána tak, jak byla odebírána a jsou vztažena na jednotnou intenzitu $6,5 \cdot 10^4$ imp.



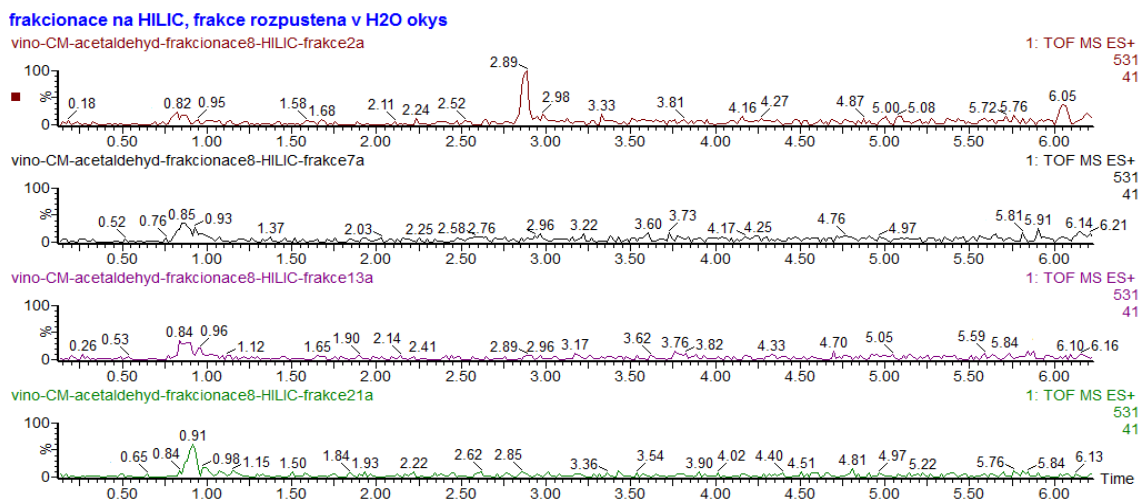
Obr. 23 MS spektra frakcí č. 2, 7 a 21 získaných při separaci vzorku vína obohaceného acetaldehydem na silikagelu v systému HILIC

Na obrázku 24 je znázorněn výřez z MS spektra frakce č. 2 pořízeného během UPLC/MS analýzy (suma spekter mezi 2– 4 minutou). Nachází se zde ion o m/z 453,7794, který se vyskytuje v každé frakci, jedná se o balastní ion.

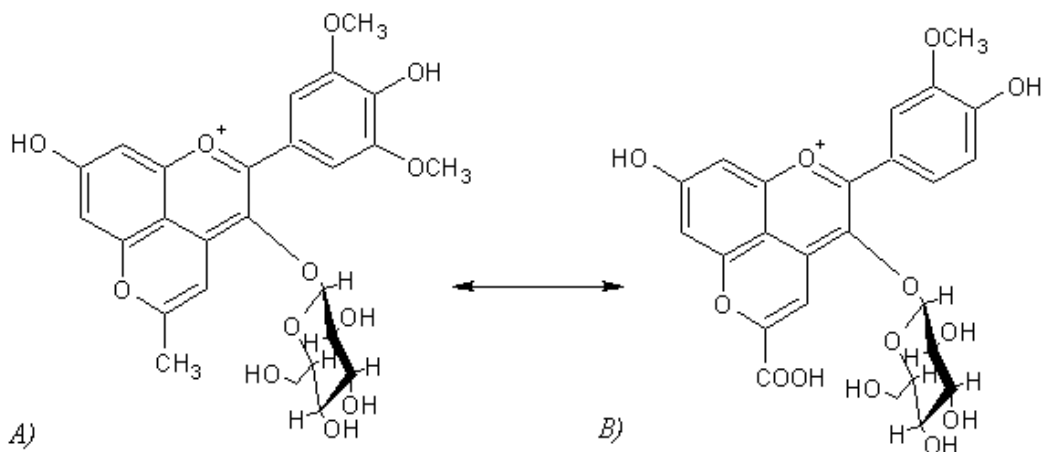


Obr. 24 Výřez hmotnostní spektrum frakce č. 2 pořízené během UPLC/MS

Ve frakci č. 2 se nachází ion o m/z 531,0662, který se nevyskytuje v žádné jiné frakci (Obr. 25). Jeho fragmentační (MS/MS) spektrum pořízené přímým nástřikem do MS je totožné se spektrem iontu 531,1293, který se vyskytoval při frakcionaci na SDB-L, bude se tedy jednat pravděpodobně o totožný anthokyanin, a to 5-methylpyranomalvidin-3-glukosid nebo jeho izomer 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosid (Obr. 26). Odchyłka od skutečné hodnoty činí 158,4 ppm, tuto hodnotu lze připsat malému odstupu signálu od šumu. Ztrátu glukosy z iontu 531,0662 potvrzují i doplňující experimenty UPLC/MS². V kolizním spektru po chromatografické separaci je ion 369,1058 rovněž patrný, přestože jeho intenzita je nižší.



Obr. 25 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o m/z 531,0662

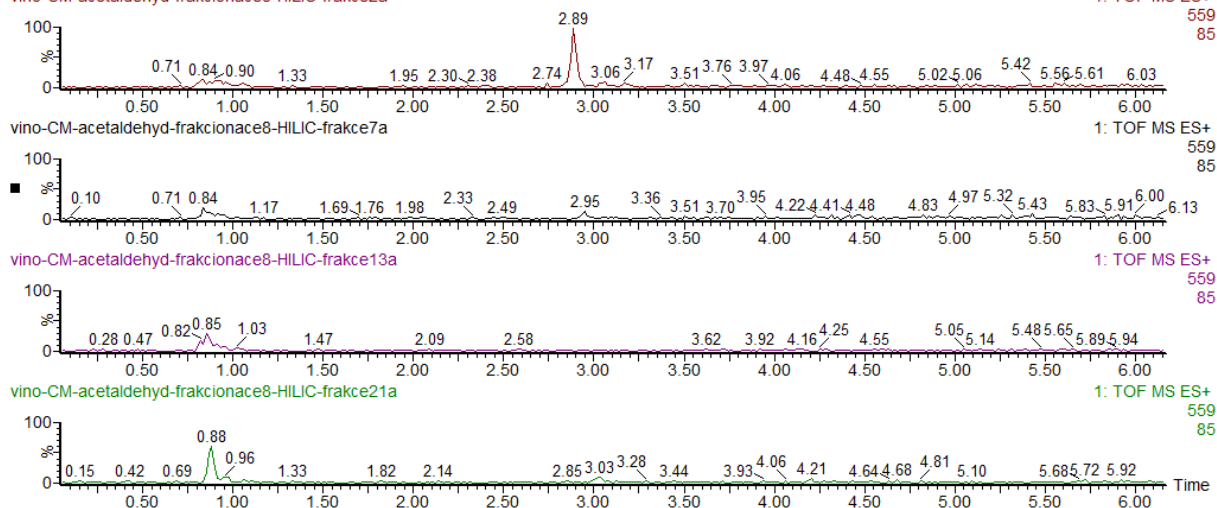


Obr. 26 Struktura A) 5-methylpyranomalvidin-3-glukosidu a jeho izomeru B) 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosidu

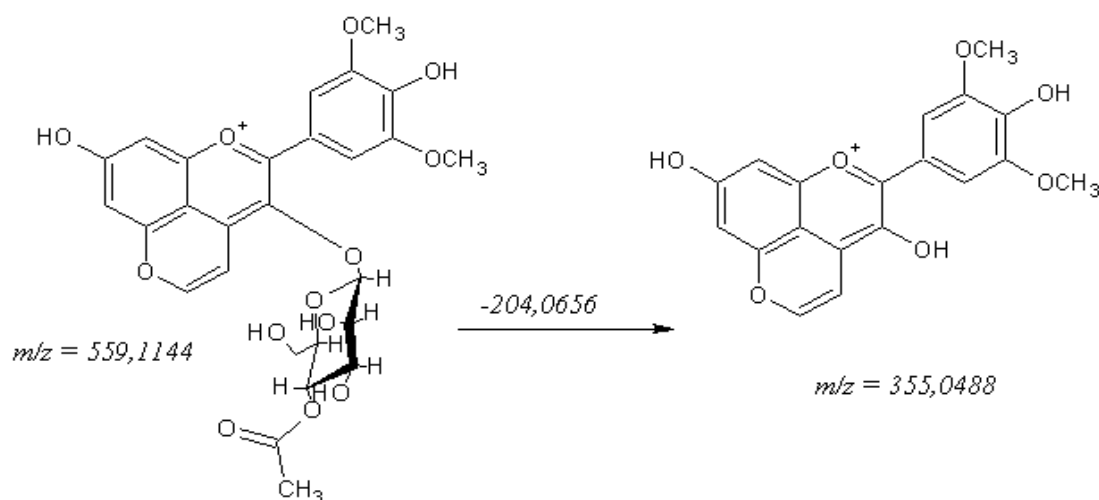
Taktěž ion 559,1144 se vyskytuje pouze v první frakci (Obr. 27). Při jeho fragmentaci vznikl pouze jeden fragment o $m/z = 355,0488$, což odpovídá ztrátě hmoty 204,0656. Tato ztráta může odpovídat acetylglukose. Tento anthokyanin se vyskytoval téměř ve všech acetaldehydových vzorcích a porovnáním všech fragmentačních spekter byl tento ion identifikován jako acetylvtisin B (obr. 28, uvedené hodnoty m/z odpovídají naměřeným hodnotám). Odchylka od skutečné hodnoty činí 55,1 ppm. Že jde o derivát vtisinu B, potvrzuje právě ion 355,0488, který vzniká jeho fragmentací.

frakcionace na HILIC, frakce rozpustena v H₂O okys

vino-CM-acetaldehyd-frakcionace8-HILIC-frakce2a



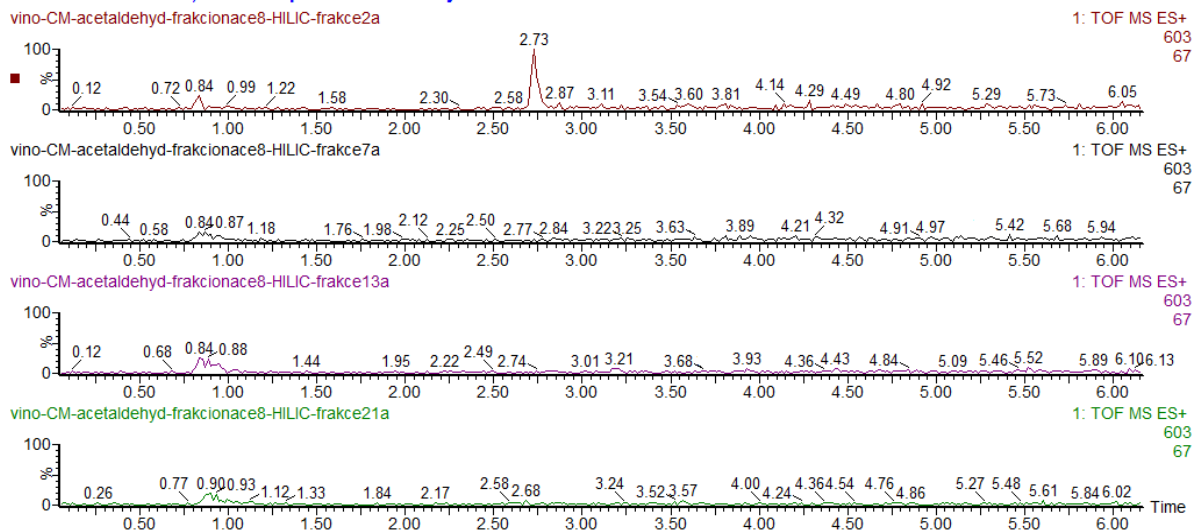
Obr. 27 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 559,1144$



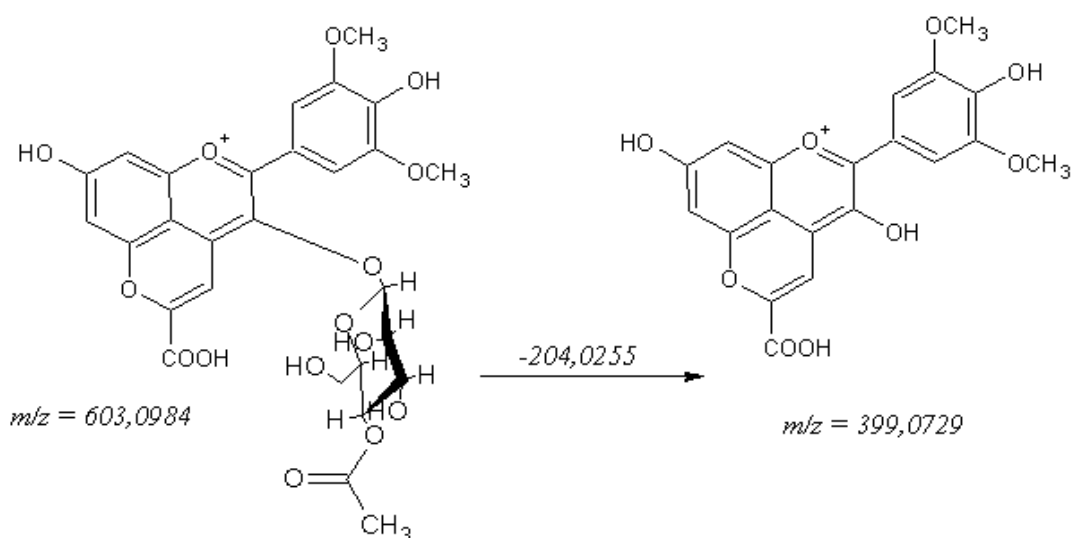
Obr. 28 Struktura acetyl-vitisinu B a jeho vzniklý fragment

Posledním intenzivním iontem, který lze nalézt pouze v první frakci je ion o $m/z = 603,0984$ (Obr. 29). Kolizní spektrum neposkytovalo mnoho fragmentů, fragmentem o největší intenzitě byl ion o $m/z 399,0729$. Opět došlo ke ztrátě acetylglukosy o hmotě 204,0255. Anthokyanin se vyskytoval jak v acetaldehydových, tak pyruvátových vzorcích a porovnáním více fragmentačních spekter byl ion identifikován jako acetyl-vitisin A (obr. 30, uvedené hodnoty m/z odpovídají naměřeným hodnotám, odchylka od teoretické hodnoty je 60,7 ppm).

frakcionace na HILIC, frakce rozpustena v H2O okys



Obr. 29 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 603,0984$

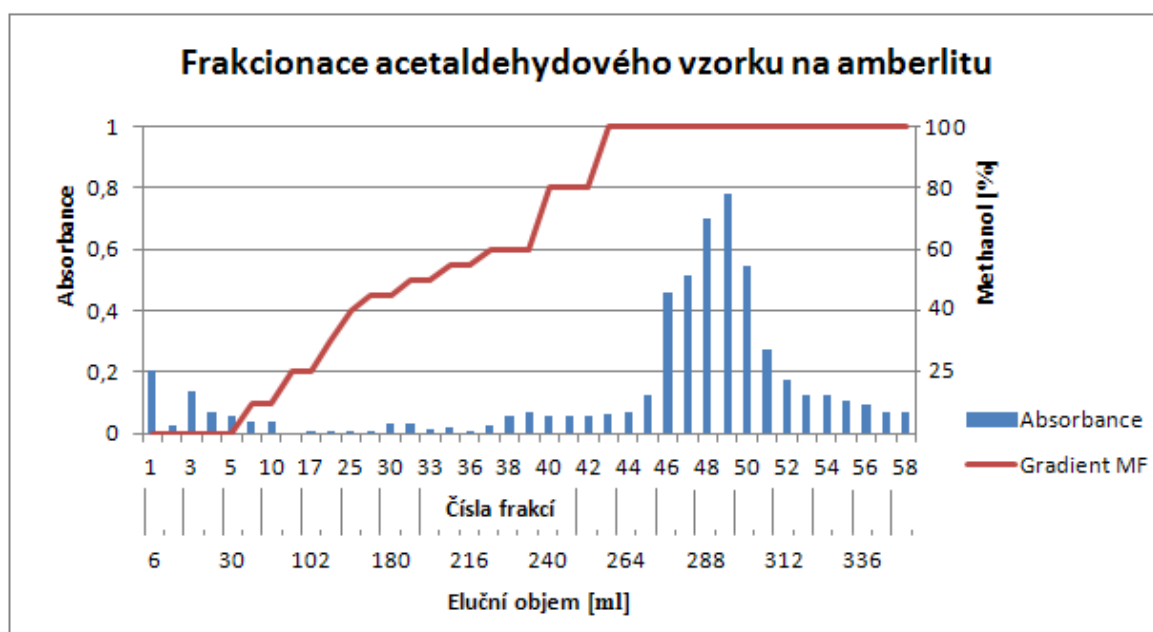


Obr. 30 Struktura acetylchitinu A a jeho vzniklý fragment

Chromatogramy pořízené během UPLC/MS analýzy a MS spektra ukazují, že silikagel v systému HILIC není příliš vhodný pro frakcionaci barviv vznikajících kondenzací anthokyaninů s acetaldehydem, protože barevné látky, které jsou objektem zájmu této studie eluují v prvních frakcích a jejich retence je poměrně slabá.

8.1.3 Frakcionace na sorbentu Amberlit XAD 16

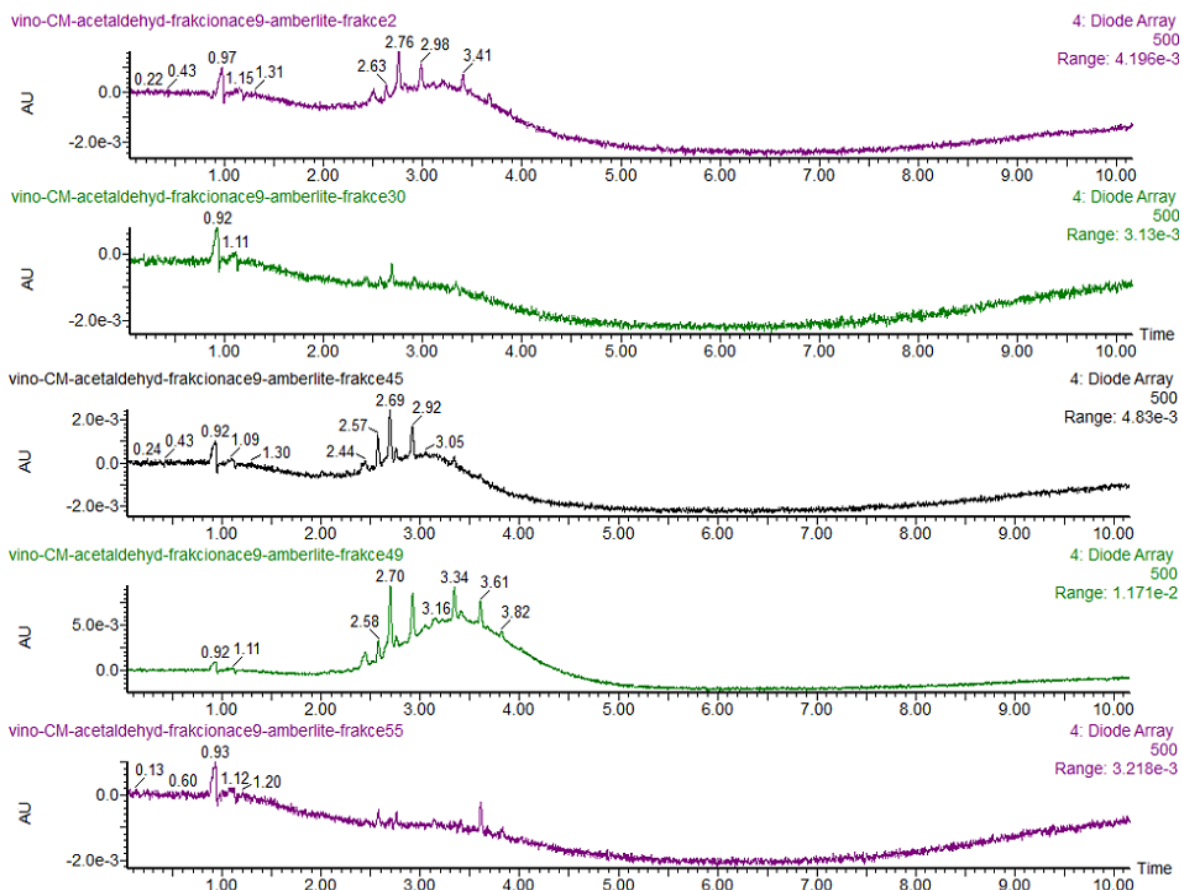
Při frakcionaci vzorku vína obohaceného acetaldehydem na sorbentu Amberlit XAD 16 bylo nasbíráno celkem 58 frakcí. Z obrázku 31 lze vyčíst závislost absorbance při vlnové délce 500 nm na jednotlivých odebraných frakcích a elučních objemech. Podobně jako u frakcionace na SDB-L došlo k vytvoření dvou barevných zón (absorbance > 0,1). K bližší identifikaci frakcí byla použita UPLC/MS, kolizní spektra byla získaná přímou infuzí do ESI-MS.



Obr. 31 Graf závislosti absorbance na jednotlivých odebraných frakcích a elučních objemech

K analýze byly vybrány frakce č. 2, 30, 45, 49 a 55. Po lyofilizaci byly frakce rozpuštěny v 1 ml mobilní fáze A (tj. 5% HCOOH v H₂O, v/v).

Na obrázku 32 jsou vyneseny chromatogramy vybraných frakcí při vlnové délce 500 nm pořízené metodou UPLC/MS.



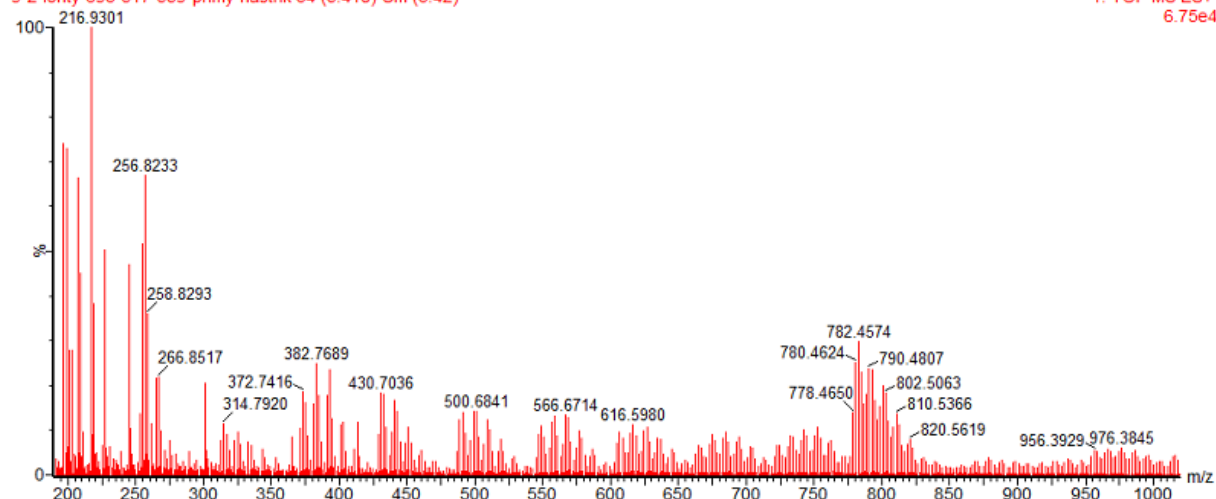
Obr. 32 Chromatogramy vybraných frakcí

Na obrázku 33 jsou znázorněna MS spektra frakcí č. 2, 45 a 49 pořízená přímým nástřikem do MS. Spektra jsou seřazena tak, jak byla odebrána a jsou vztažena na jednotnou intenzitu $6,75 \cdot 10^4$ imp. Frakce č. 30 a č. 55 představovaly „světlé zóny“ a nevyskytovala se v nich žádná anthokyaninová barviva. Obrázky 32 a 33 ukazují, že na Amberlitu XAD 16 dochází k předfrakcionaci vzorku (posun maxima profilů v chromatogramech měřených při $\lambda=500$ nm a v MS spektrech).

Frakcionace acetaldehydu, amberlit

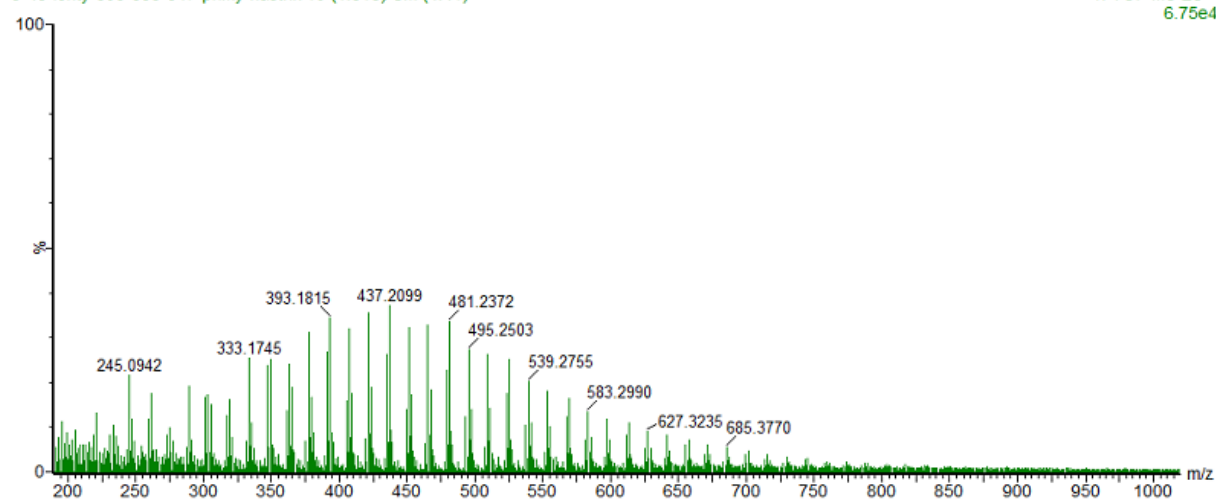
9-2-ionty-393-517-559-primy-nastrik 34 (5.418) Cm (3:42)

1: TOF MS ES+
6.75e4



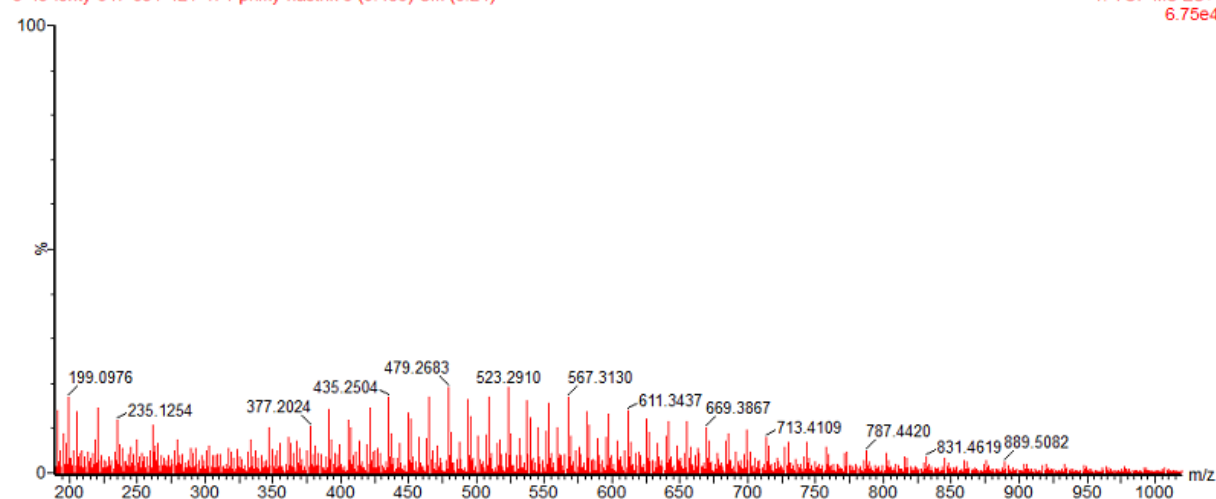
9-45-ionty-303-333-347-primy-nastrik 10 (1.516) Cm (4:41)

1: TOF MS ES+
6.75e4



9-49-ionty-347-391-421-474-primy-nastrik 3 (0.463) Cm (3:24)

1: TOF MS ES+
6.75e4



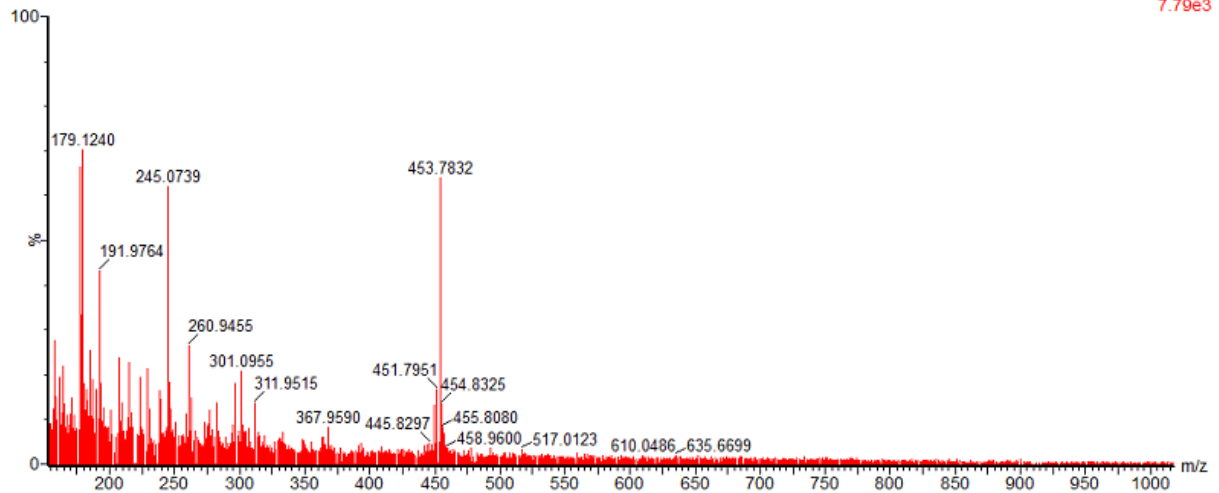
Obr. 33 MS spektra frakcí č. 2, 45 a 49 získaných při frakcionaci vzorku vína obohaceného acetaldehydem na Amberlitu XAD 16

Obrázek 34 ukazuje profil látek v jednotlivých frakcích eluujících při UPLC chromatografii mezi 2-5 minutou. Spektra jsou seřazena tak, jak byla odebírána a jsou vztažena na jednotnou intenzitu $7,79 \cdot 10^3$ imp. Je patrné, že dříve eluující frakce obsahují větší množství nízkomolekulárních látek. Naproti tomu později eluované frakce a zejména frakce č. 49 obsahuje zřetelně vyšší množství barviv přibližně v rozsahu molekulových hmotností od 350 do 850 Da. Rozdíly v odezvách mezi frakcemi 45 a 49 v analýzách přímým nástřikem a po UPLC je možno vysvětlit rozdílným vlivem matrice a/nebo nevratným zachycením některých složek vzorku stacionární fází.

frakcionace na amberlite, frakce rozpustena v H2O okys

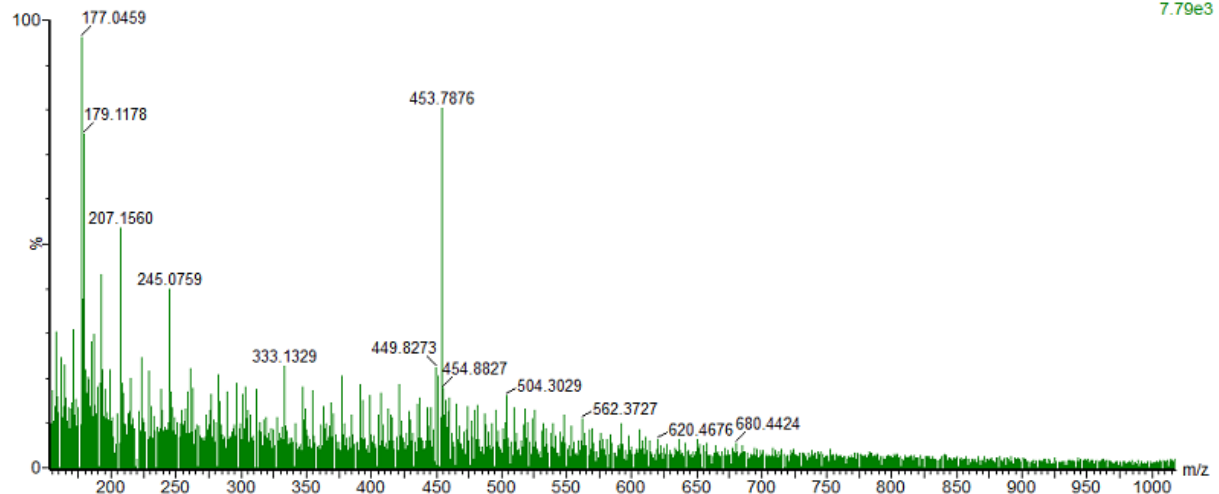
vino-CM-acetaldehyd-frakcionace9-amberlite-frakce2 288 (4.967) Cm (116:288-(300:334+77:103))

1: TOF MS ES+
7.79e3



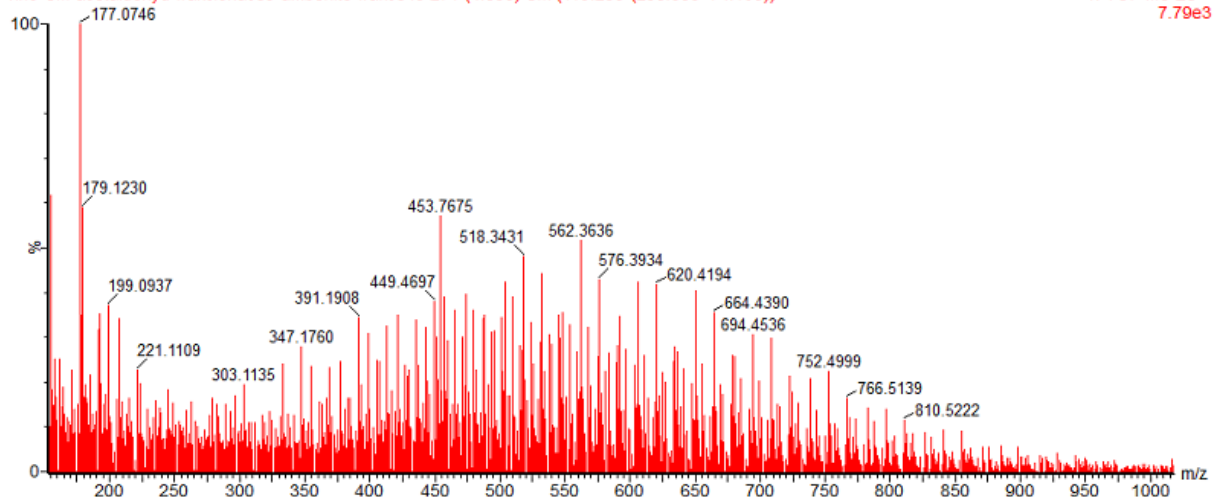
vino-CM-acetaldehyd-frakcionace9-amberlite-frakce45 282 (4.874) Cm (117:290-(299:323+80:104))

1: TOF MS ES+
7.79e3



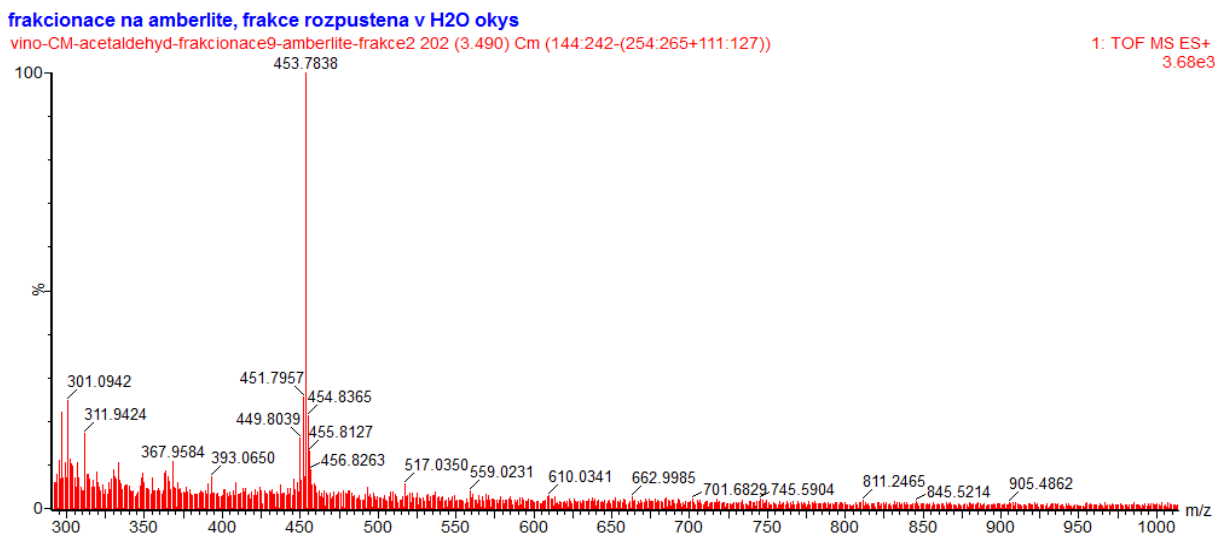
vino-CM-acetaldehyd-frakcionace9-amberlite-frakce49 271 (4.683) Cm (119:288-(295:333+74:108))

1: TOF MS ES+
7.79e3



Obr. 34 Hmotnostní spektra frakcí č. 2, 45 a 49 pořízené během UPLC/MS analýzy

Na obrázku 35 je znázorněn výřez z MS spektra frakce č. 2 pořízené během UPLC/MS analýzy. Opět se zde nachází ion o m/z 453,7839, který se vyskytuje v každé frakci, pravděpodobně se bude jednat o balastní ion.



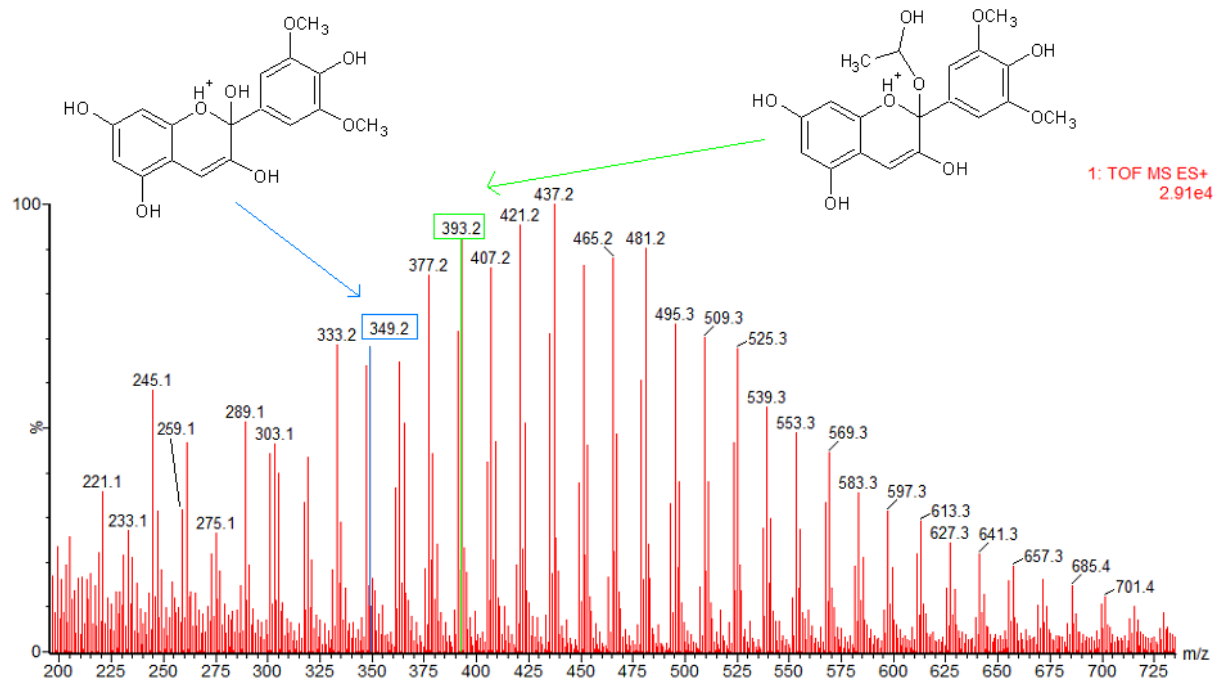
Obr. 35 Výřez hmotnostního spektra frakce č. 2 pořízené během UPLC/MS analýzy

Ve frakci č. 2 stojí za povšimnutí ionty o m/z 517,0350 a 559,0231, které odpovídají vitisinu B (Obr. 14) a jeho acetylderivátu (Obr. 28). Vyskytují se zde ale poměrně v malých intenzitách, ve frakci č. 49 jejich množství vzrostlo přibližně na šestinásobnou hodnotu. Frakce 2 tedy obsahuje jednoduché pyranoanthokyaniny, jejichž separace od ostatních barviv eluujících v dalších frakcích však není dosaženo.

Detailní identifikace iontů ve frakcích 45 a 49 nebyla provedena, avšak výsledky získané na základě frakcionací na Amberlitu jsou pro komplexní studium látek vznikajících reakcí acetaldehydu s anthokyaniny dobrým základem. Ve spektru frakce č. 45 (Obr. 36) se vyskytuje skupina iontů $m/z = 349, 331, 303$ a 259, které nápadně připomínají ionty nalezené ve starší práci⁵² věnované studiu stability růžových vín. Ion s hodnotou m/z 349 je zde popisován jako adukt malvidinu s vodou, resp. odpovídající chalkon. Analogicky je tedy možné následně odvodit například pro ion m/z 393 strukturu odpovídající aduktu s vodou a acetaldehydem, resp. více molekulami acetaldehydu (Obr. 36). Výsledky jsou předběžné a nejsou zatím potvrzeny měřením přesné a správné hmotnosti.

Frakcionace acetaldehydu, amberlit

9-45-ionty-303-333-347-primy-nastrik 10 (1.516) Cm (2.45)

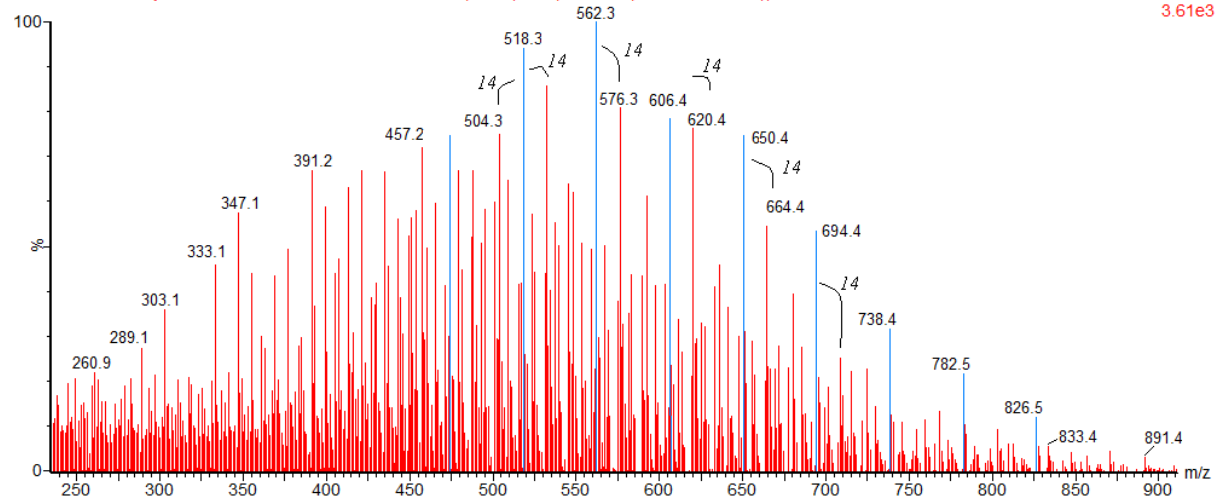


Obr. 36 Výřez MS spektra frakce č. 45 se vzniklými adukty

Frakce č. 49 představovala nejintenzivnější barevnou zónu s mnoha anthokyaniny. Na obrázku 37 je znázorněn výřez MS spektra pořízené během UPLC/MS analýzy (suma spekter v oblasti 2-5 min). Ve spektru je možno pozorovat sérii iontů lišící se o m/z 14 a resp. m/z 44 (vyznačeno modře).

frakcionace na amberlite, frakce rozpuštena v H₂O okys

vino-CM-acetaldehyd-frakcionace9-amberlite-frakce49 247 (4.270) Cm (132:255-(269:299+85:120))



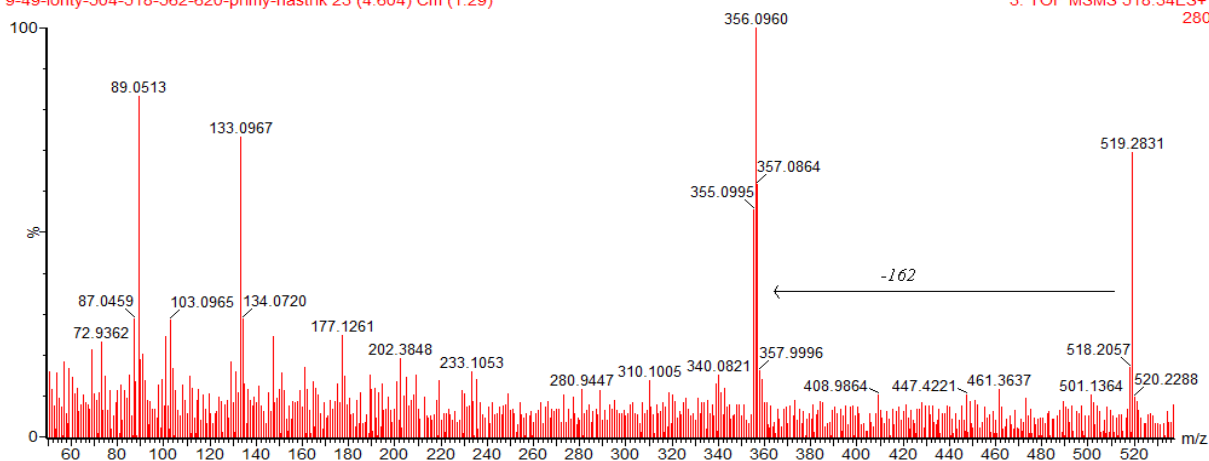
Obr. 37 Výřez hmotnostního spektra frakce č. 49 pořízené během UPLC/MS analýzy

V MS/MS spektru je patrný také ion 519,3, který byl připsán aduktu Mv-3-Glu s jednou acetaldehydovou skupinou. S větší intenzitou v MS spektru je pozorován i ion s lichým počtem elektronů (radikál) s hodnotou m/z 518.3. Při fragmentaci těchto iontů (izolační šířka na kvadrupólu ~ 2 Da) jsou jednoznačně pozorovány fragmenty 357,0864 a 356,0960, odpovídající odštěpení dehydratované glukosy (Obr. 38). Odchylka od teoretické hodnoty je u těchto fragmentů 30,8 ppm a 18 ppm. U rodičovských iontů je odchylka od teoretické hodnoty vyšší, což může souviset s nedostatečným rozlišením od balastních iontů. Struktura a vniklý fragment je znázorněn na obrázku 39. Anthokyanin se nachází zejména ve frakcích 49 a 55, ve stopách ve frakci 45, zcela chybí ve frakcích č. 2 a 30 (Obr. 40).

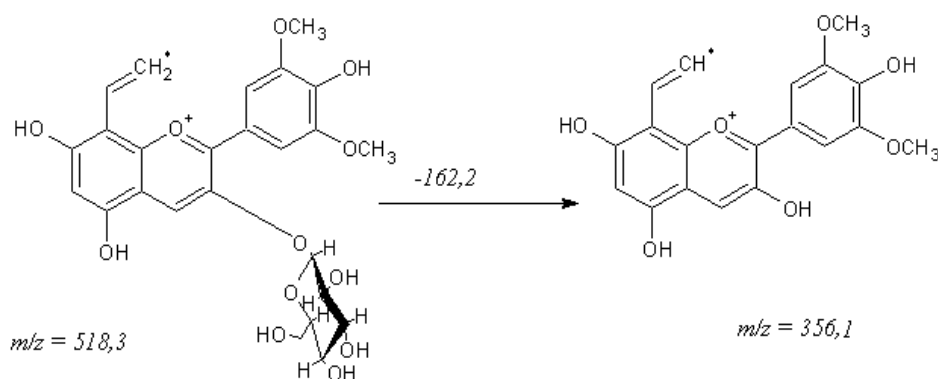
Frakcionace acetaldehydu, amberlit

9-49-ionty-504-518-562-620-primy-nastrik 23 (4.604) Cm (1:29)

3: TOF MSMS 518.34ES+ 280



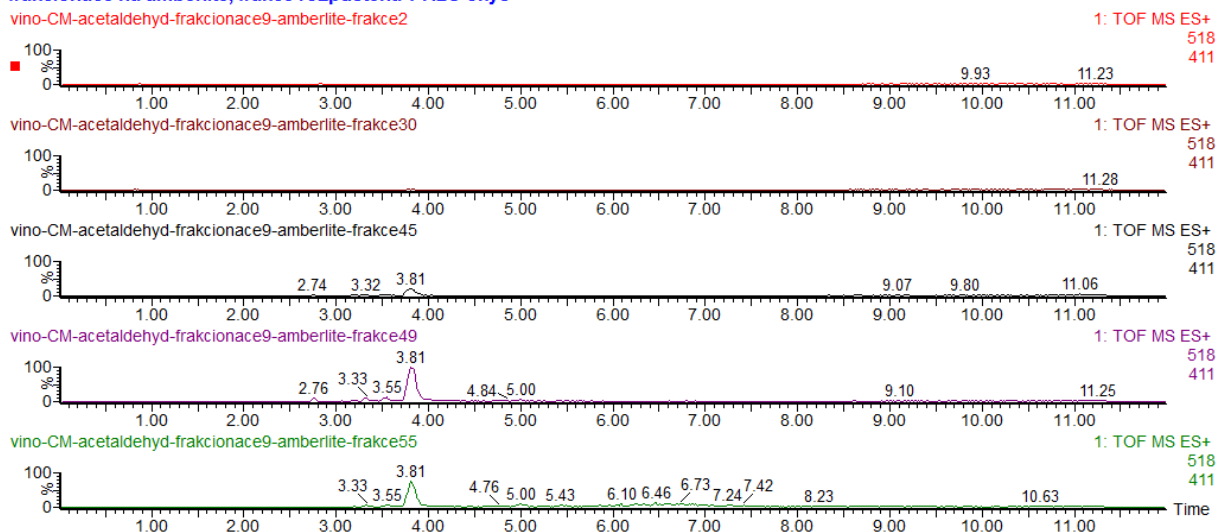
Obr. 38 Kolizní spektrum Mv-3-Glu s jednou acetaldehydovou skupinou



Obr. 39 Struktura radikál-kationtu anthokyaninu Mv-3-Glu s jednou acetaldehydovou skupinou a jeho vzniklý fragment

frakcionace na amberlite, frakce rozpustena v H2O okys

vino-CM-acetaldehyd-frakcionace9-amberlite-frakce2



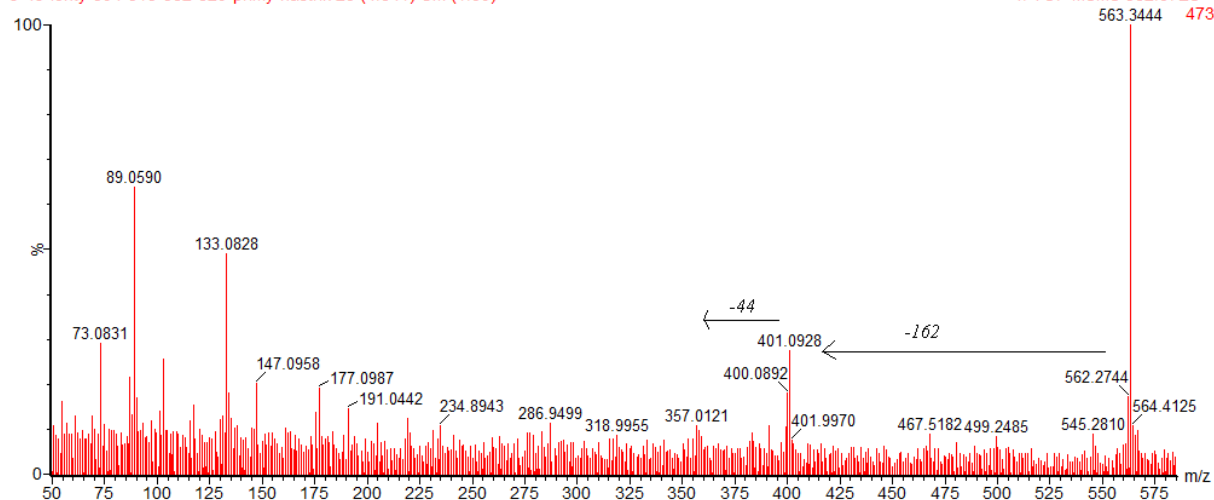
Obr. 40 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 518,3$

Dalším fragmentovaným iontem byl 562,3. Na obrázku 41 je znázorněno jeho kolizní spektrum, kde se nachází i ion 563,3. S větší intenzitou je v MS spektru opět pozorován ion s lichým počtem elektronů. Při fragmentaci těchto iontů (izolační šířka ~ 2 Da) jsou jednoznačně pozorovány fragmenty 401,0928 a 400,0892 odpovídající odštěpení dehydratované glukosy. Struktura této glykosylované látky se zatím nepodařila vysvětlit, avšak difference hodnot m/z od předchozího anthokyaninu je 44 Da, což poukazuje na možnou přítomnost karboxylové skupiny. Odchyłka od teoretické hodnoty aglykonu obsahujícího karboxyl je 13,7 ppm. Tato ztráta je s menší intenzitou v kolizním spektru rovněž pozorována (Obr. 41). Anthokyanin se nachází zejména ve frakcích 49 a 55, ve stopách ve frakci č. 45, zcela chybí ve frakcích č. 2 a 30 (Obr. 42).

Frakcionace acetaldehydu, amberlit

9-49-ionty-504-518-562-620-primy-nastrik 23 (4.641) Cm (1:30)

4: TOF MSMS 562.37ES+

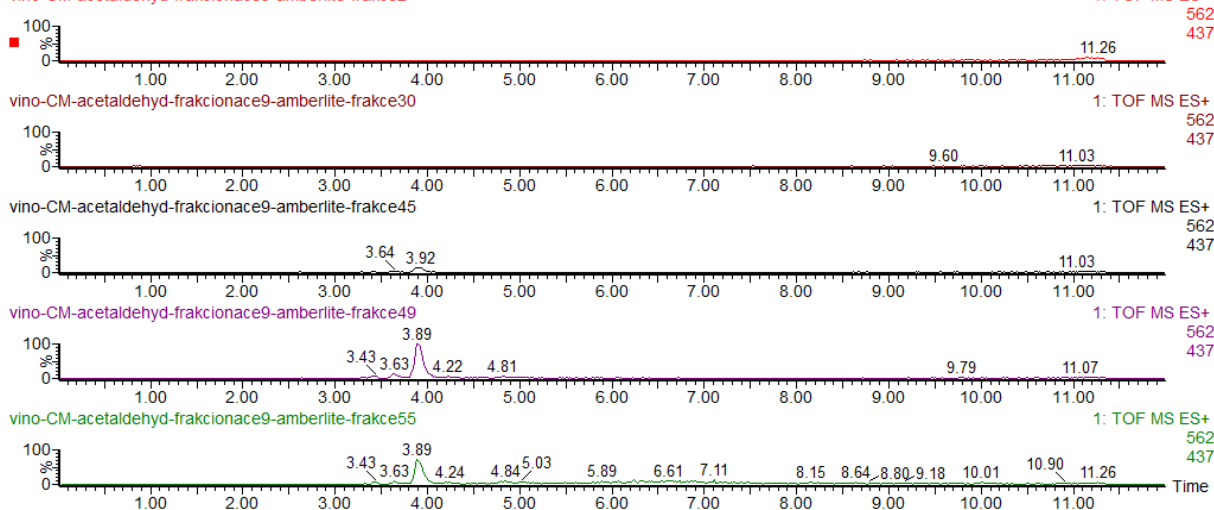


Obr. 41 Kolizní spektrum iontu o $m/z = 562,3$

frakcionace na amberlite, frakce rozpustena v H2O okys

vino-CM-acetaldehyd-frakcionace9-amberlite-frakce2

1: TOF MS ES+



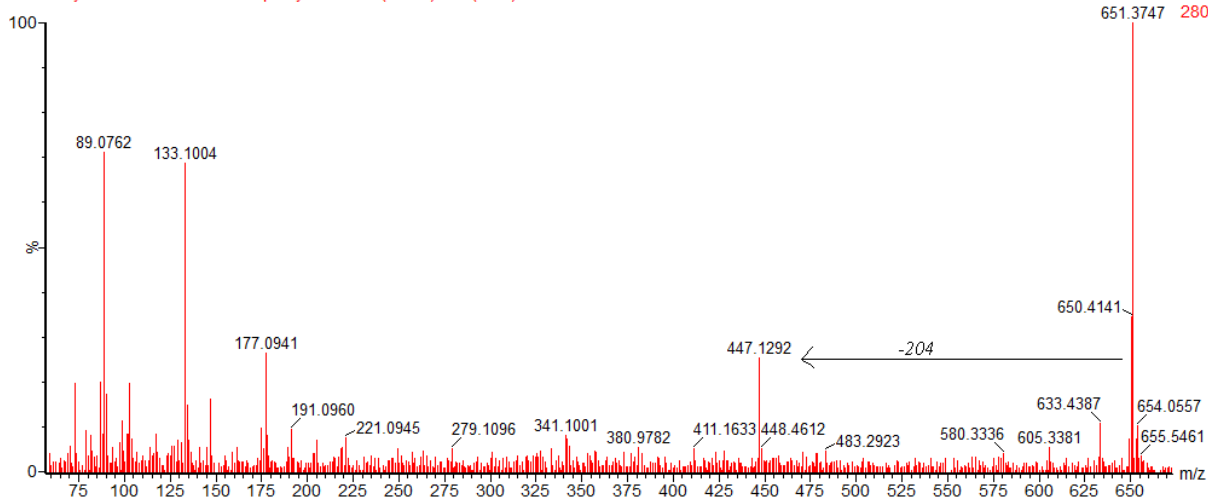
Obr. 42 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 562,3$

Na obrázku 43 lze vidět kolizní spektrum iontu m/z 650,4. Ve spektru je patrný ion m/z 651,4, který nebyl od iontu m/z 650,4 separován kvadrupólem. Při fragmentaci došlo k odštěpení acetylglukosy za vzniku aglykonu 447,1292. Mohlo by se jednat 5-(4-hydroxyfenyl)pyranoMv-3acetylglukosid, což je v souladu s poznatkami v literatuře³⁴ (Obr. 44, uvedené hodnoty m/z odpovídají naměřeným hodnotám). Anthokyanin se nacházel opět pouze ve frakcích č. 49 a 55 (Obr. 45).

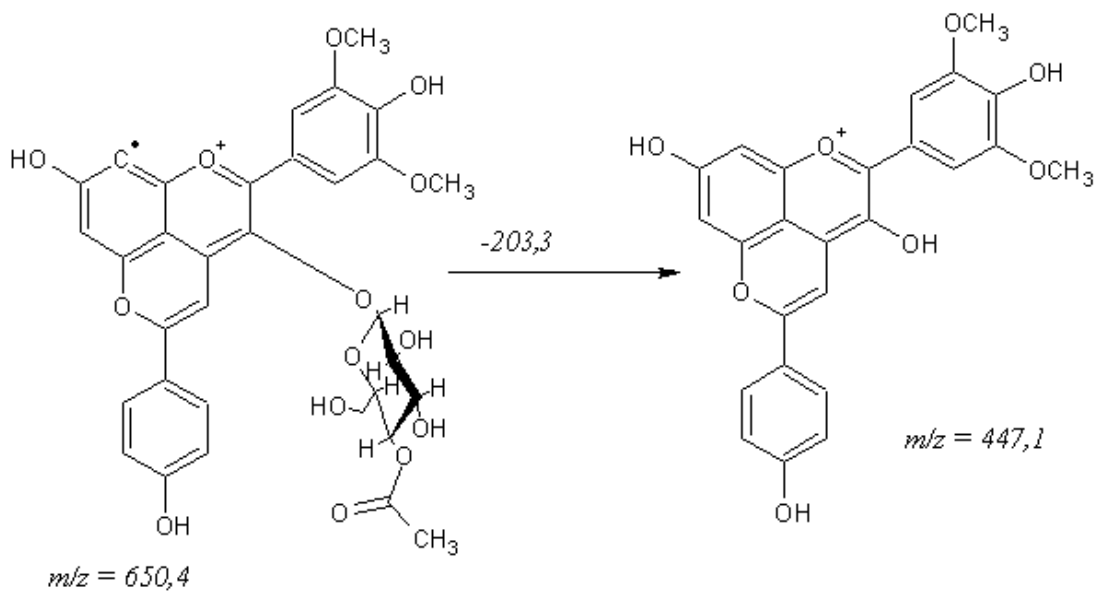
Frakcionace acetaldehydu, amberlit

9-49-ionty-650-664-694-708-752-primy-nastrik 7 (1.553) Cm (2:26)

2: TOF MSMS 650.43ES+
651.3747 280



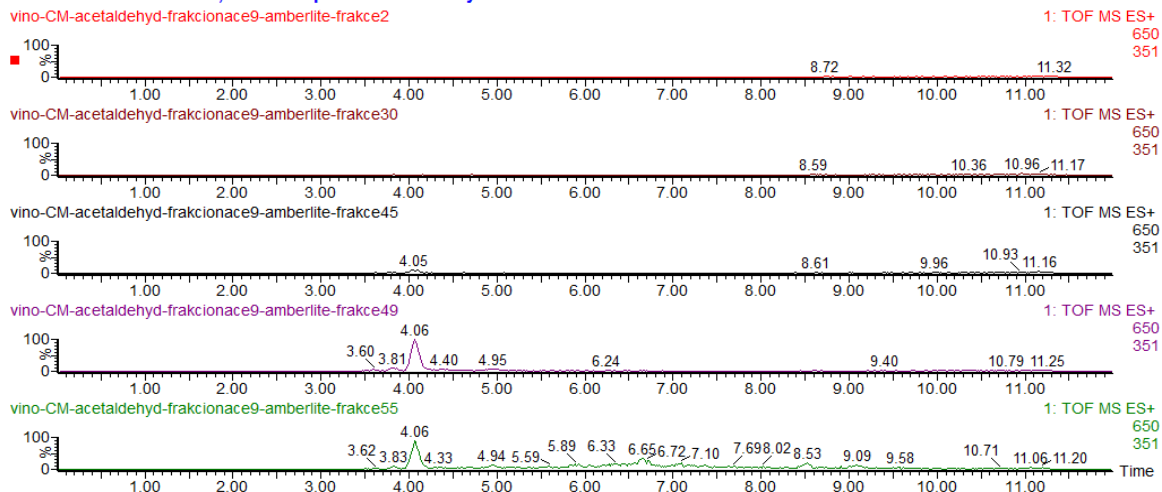
Obr. 43 Kolizní spektrum 5-(4-hydroxyfenyl)pyranoMv-3acetylglukosidu



Obr. 44 Předpokládané struktury 5-(4-hydroxyfenyl)pyranoMv-3acetylglukosidu a jeho vzniklého fragmentu

frakcionace na amberlite, frakce rozpustena v H2O okys

vino-CM-acetaldehyd-frakcionace9-amberlite-frakce2

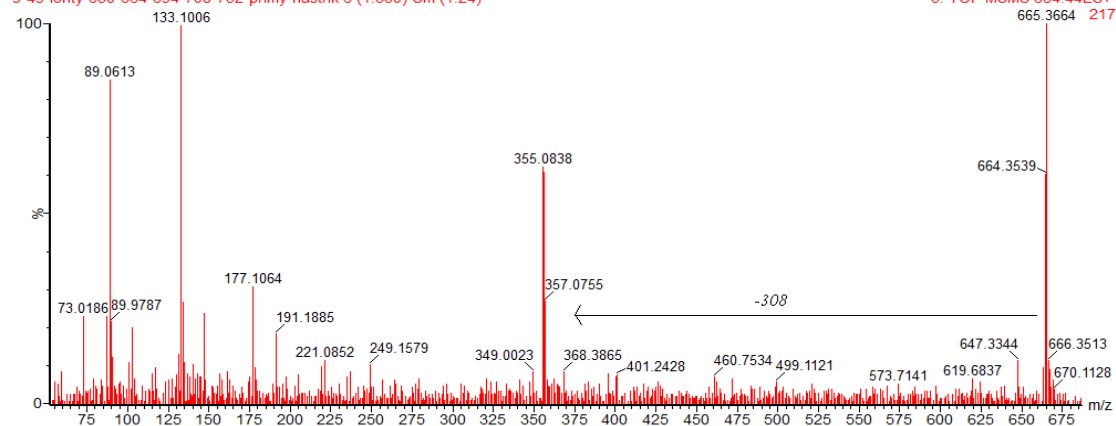


Obr. 45 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 650,4$

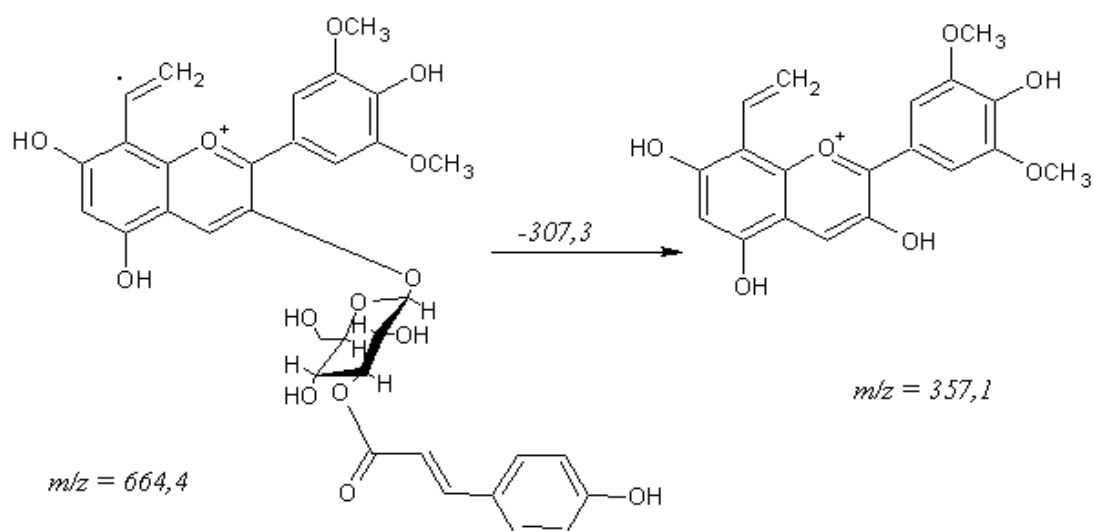
Dalším nalezeným iontem ve frakci č. 49 byl 664,4. Na obrázku 46 je znázorněno jeho kolizní spektrum, kde se nachází i 665,4, který nebyl separován kvadrupólem (podobně jako v předchozích případech). Nejprve dojde o odštěpení coumaroylglukosy za vzniku aglykonu 357,0755 (odchylka 61,3 ppm). Předpokládaná struktura anthokyaninu je znázorněna na obrázku 47. Anthokyanin se nacházel opět jenom v později eluovaných frakcích, ve frakcích č. 2 a 30 zcela chybí (Obr. 48). Podobně jako v předchozích případech je pozorována odchylka hodnoty m/z rodičovských iontů od teoreticky vypočítané hodnoty, která je dána nedostatečně vysokým rozlišením hmotnostního spektrometru. Selektivita se výrazně zvýší charakteristickou fragmentací, a proto je zřejmě dosaženo lepší přesnosti hodnot m/z fragmentů (pokud jsou tyto v kolizním spektru dostatečně intenzivní).

Frakcionace acetaldehydu, amberlit

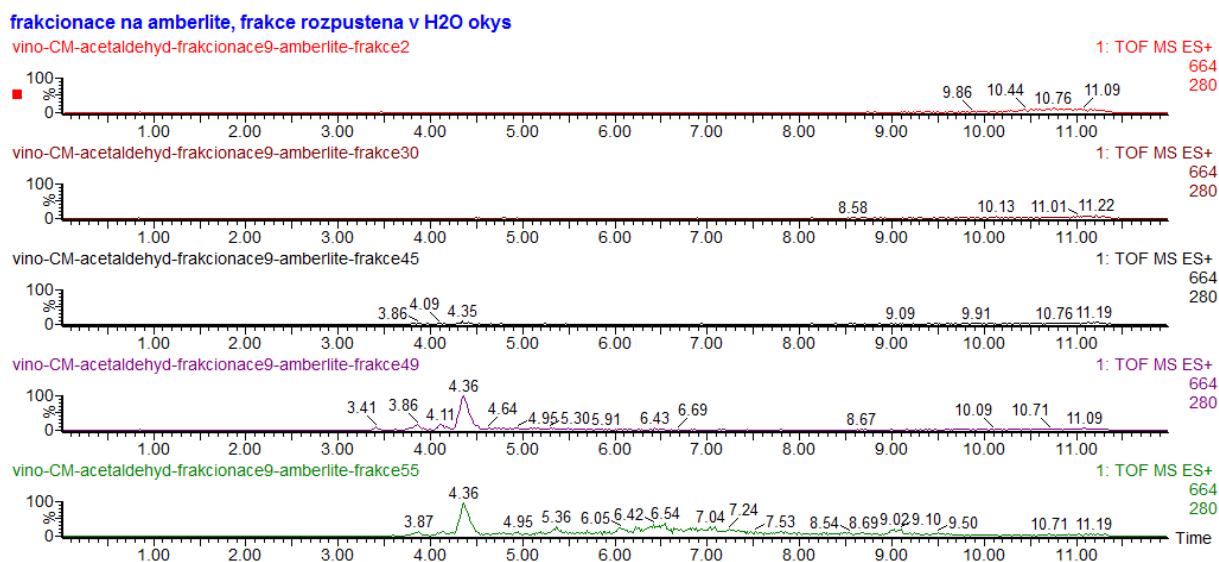
9-49-ionty-650-664-694-708-752-primy-nastrik 6 (1.350) Cm (1:24)



Obr. 46 Kolizní spektrum iontu o $m/z = 664,4$



Obr. 47. Předpokládaná struktura anthokyaninu o $m/z = 664,4$

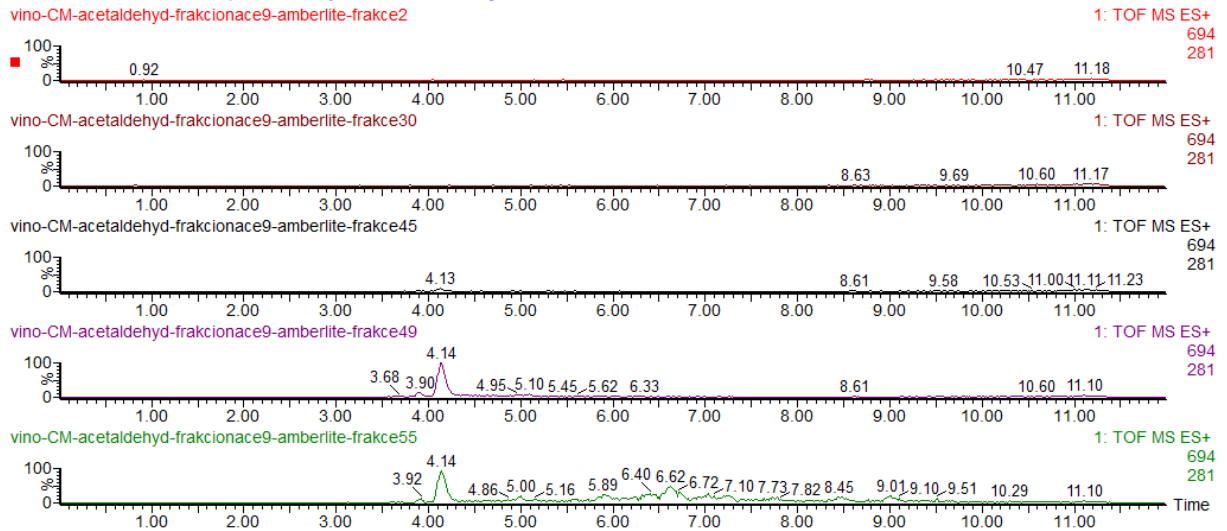


Obr. 48 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 664,4$

Posledním fragmentovaným iontem ve frakci č. 49 byl ion o $m/z = 694,4$. I přes to, že intenzita rodičovského iontu byla dostatečná a hodnota kolizní energie byla optimalizována v širokém rozsahu (30-70 eV) se nepodařilo získat kvalitní kolizní spektrum, které by přispělo k jeho identifikaci. Z chromatogramů pořízených metodou UPLC/MS vyplývá, že neznámý anthokyanin se nachází opět jen v později eluovaných frakcích (Obr. 49).

frakcionace na amberlite, frakce rozpustena v H2O okys

vino-CM-acetaldehyd-frakcionace9-amberlite-frakce2

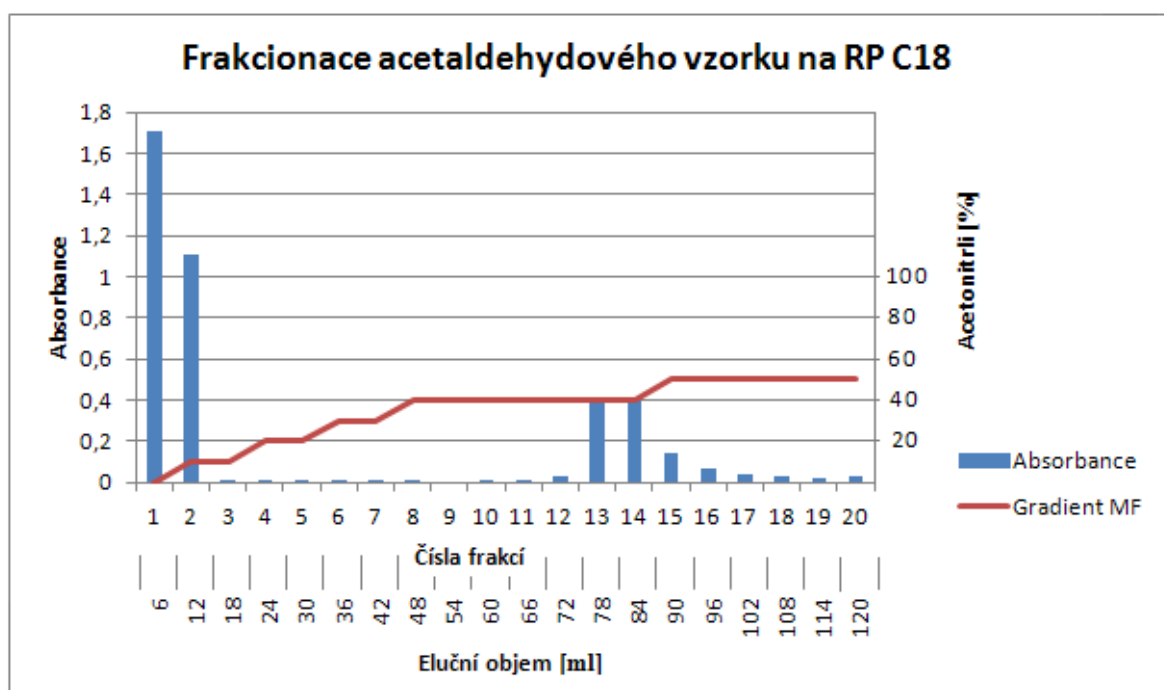


Obr. 49 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 694,4527$

Ve spektrech pořízených jak přímým nástřikem, tak i UPLC/MS metodou je patrné velké množství dalších látek, jejichž popis a identifikace přesahuje rámec této práce a bude předmětem dalšího výzkumu. Z chromatogramu získaného měřením DAD detektorem při vlnové délce 500 nm a odpovídajících spekter (viz Obr. 34) jsou patrné rozdíly mezi zastoupením barevných látek v jednotlivých frakcích. Amberlit XAD 16 tedy nabízí selektivitu při prefrakcionační úpravě vzorků vín obohacených acetaldehydem pro analýzu anthokyaninových barviv a jejich případnou izolaci.

8.1.4 Frakcionace na reverzní fázi C18

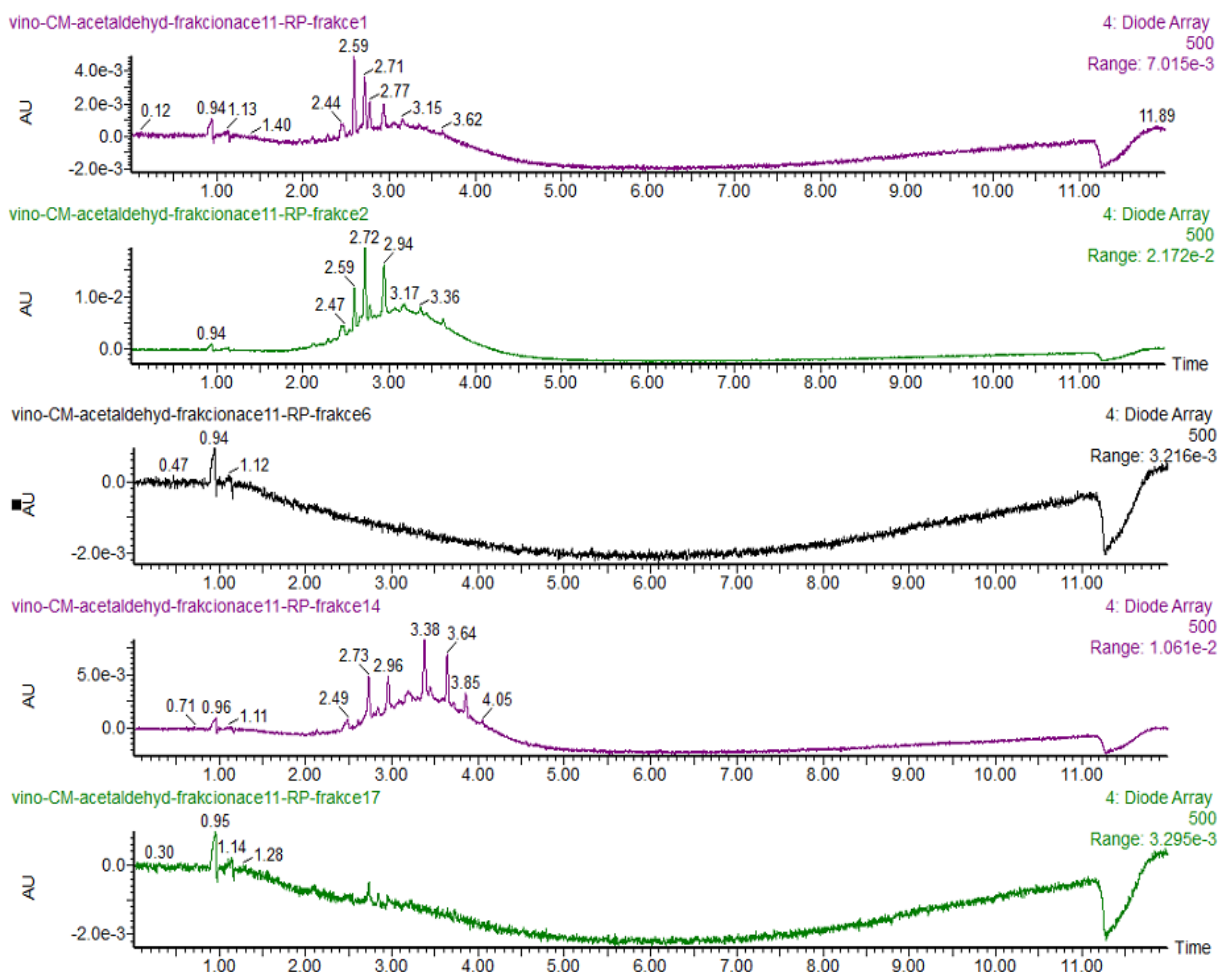
Při frakcionaci vzorku vína obohaceného acetaldehydem na reverzní fázi C18 bylo nasbíráno celkem 20 frakcí. Z obrázku 50 je patrná závislost absorbance při vlnové délce 500 nm na jednotlivých odebraných frakcích a elučních objemech. Na rozdíl od frakcionace na již zmíněných sorbentech, se při frakcionaci na RP C18 vytvořily tři barevné zóny odpovídající frakcím č. 1, 2 a 14 (viz Příloha 2). K bližší charakterizaci frakcí byla použita UPLC/MS, kolizní spektra byla získána přímou infuzí do ESI-MS.



Obr. 50 Graf závislosti absorbance na jednotlivých odebraných frakcích a elučních objemech

K analýze byly vybrány frakce č. 1, 2, 6, 14 a 17. Po lyofilizaci byly frakce rozpuštěny v 1 ml mobilní fáze A (tj. 0,1% HCOOH v H₂O, v/v).

Na obrázku 51 jsou vyneseny chromatogramy vybraných frakcí při vlnové délce 500 nm pořízené metodou UPLC/MS. Profil barevných látek je podobný jako v experimentu s Amberlitem.

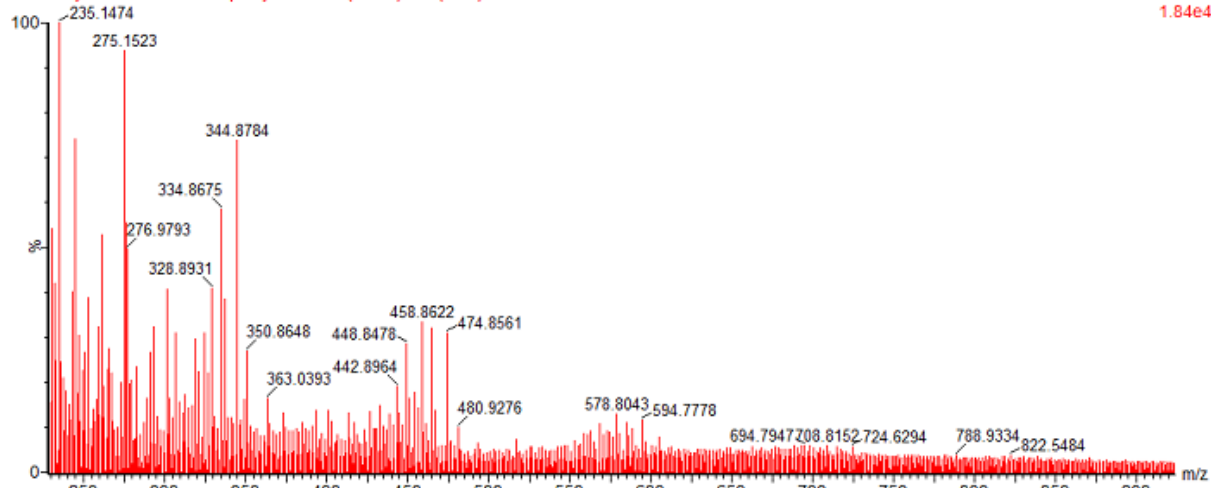


Obr. 51 Chromatogramy vybraných frakcí

Na obrázku 52 jsou znázorněna MS spektra frakcí č. 1, 2 a 14 pořízená přímým nástřikem do MS. Spektra jsou poskládána tak, jak byla odebírána a jsou vztažena na jednotnou intenzitu $1,84 \cdot 10^4$ imp. Frakce č. 6 a č. 17 představovaly světlé zóny obsahující malá množství barviv.

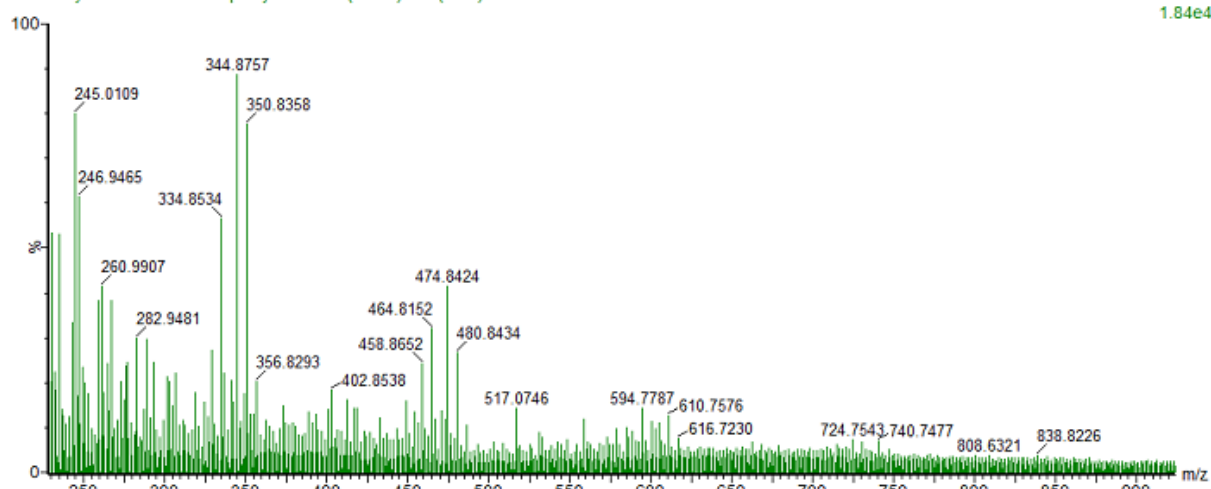
11-1-Ionty-561-603-649-663-primy-nastrik 9 (1.683) Cm (2:29)

1: TOF MS ES+
1.84e4



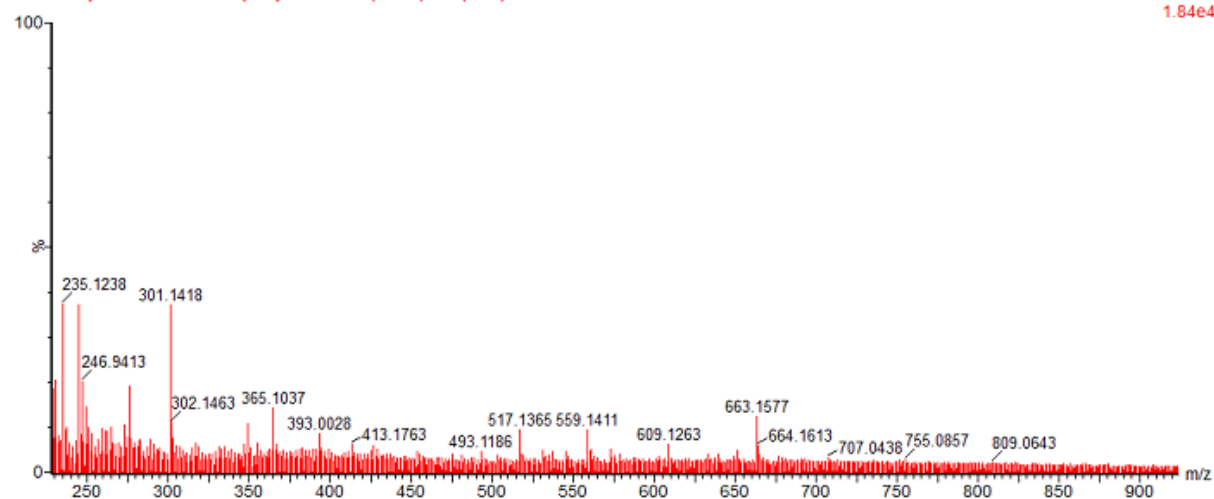
11-2-Ionty-349-393-493-531-primy-nastrik 5 (0.869) Cm (1:27)

1: TOF MS ES+
1.84e4



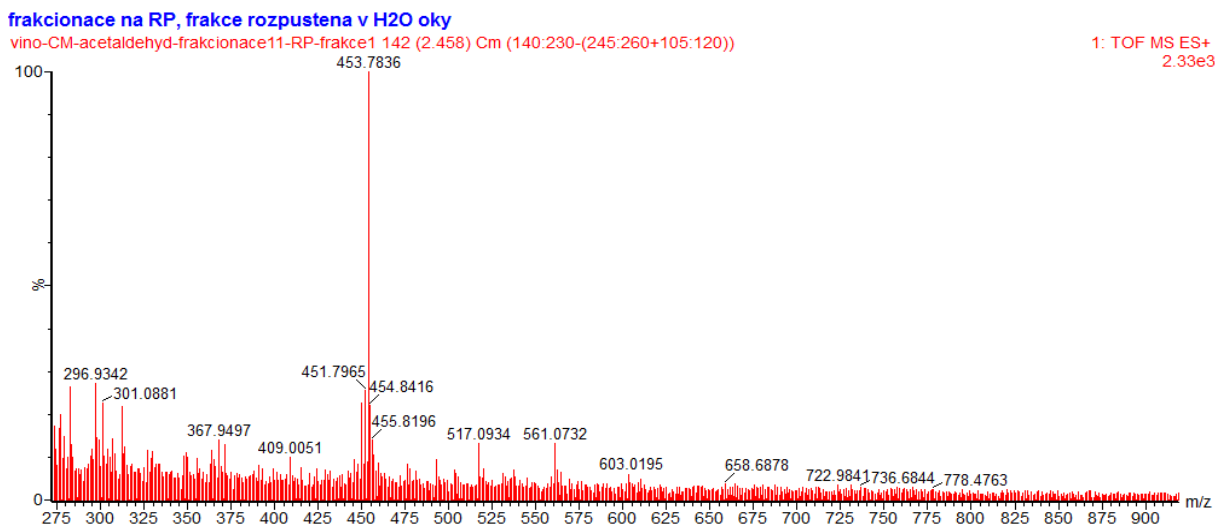
11-14-Ionty-559-609-663-707-primy-nastrik 24 (4.733) Cm (2:25)

1: TOF MS ES+
1.84e4



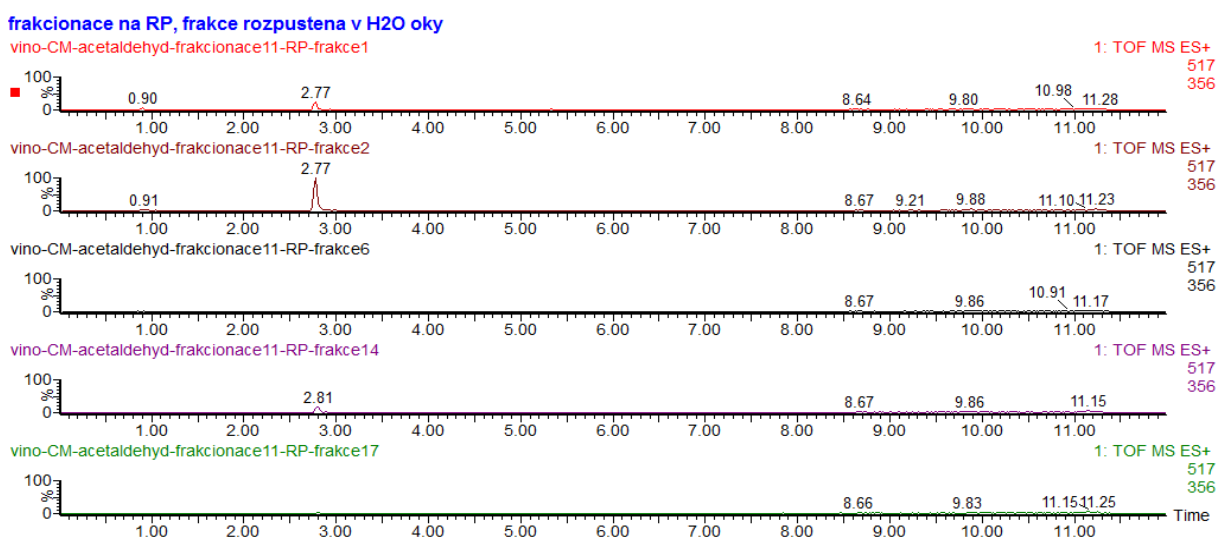
Obr. 52 MS spektra frakcí č. 1, 2 a 14 získaných při frakcionaci vzorku vína obohaceného acetaldehydem na RP C18

Na obrázku 53 je znázorněn výřez z MS spektra frakce č. 1 pořízeného z UPLC/MS analýzy průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-5 min a odečtením základní linie. Nachází se zde ion o m/z 453,7836, který se vyskytuje v každé frakci, a jde o balastní ion.



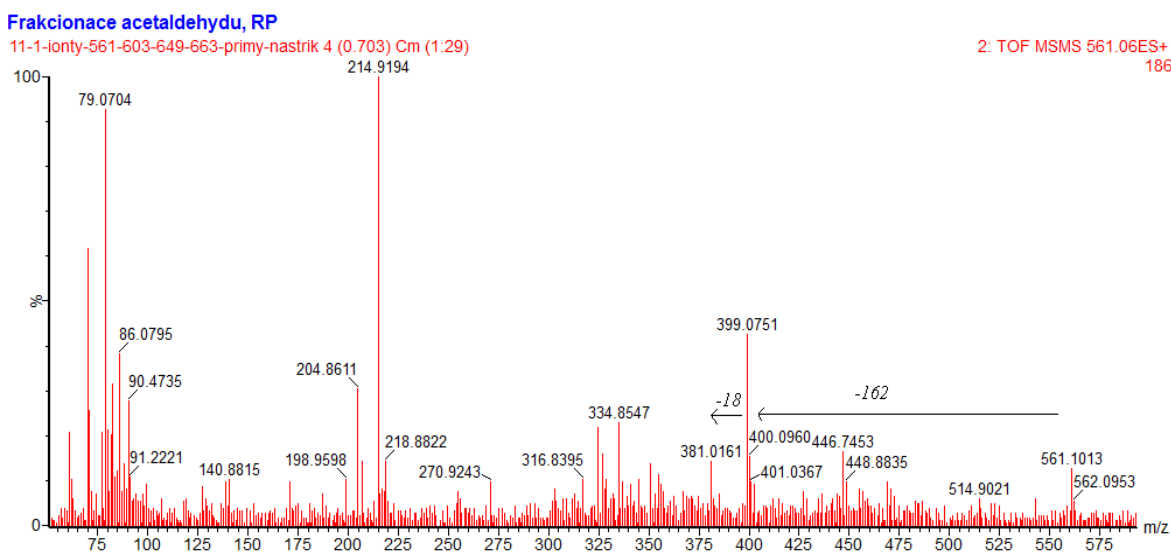
Obr. 53 Výřez hmotnostního spektra frakce č. 1 pořízené během UPLC/MS analýzy

Ve frakci č. 1 stojí za zmínku ion o $m/z = 517,0934$, který byl na základě kolizního spektra identifikován jako vitisin B. Jeho struktura a fragmentace je znázorněna na obrázku 14. Odchylna od teoretické hodnoty je 79,7 ppm. Anthokyanin se nachází ve stopách také ve frakci č. 14, jeho nejvyšší množství je však ve frakci č. 2, kde se jeho koncentrace zvedla přibližně čtyřnásobně (Obr. 54).

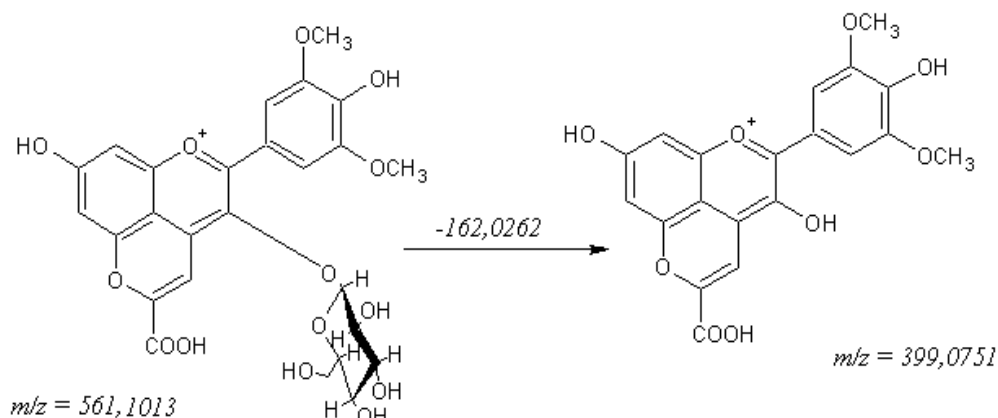


Obr. 54 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 517,0934$

Dalším fragmentovaným iontem ve frakci č. 1 byl ion 561,0732 (resp. 561,1013 v MS/MS spektru). Jeho kolizní spektrum lze vidět na obrázku 55. Nejprve došlo k odštěpení glukosy za vzniku aglykonu o $m/z = 399,0751$ (odchylka od teoretické hodnoty 8,8 ppm). Následovala ztráta neutrální částice 18,0590, což odpovídá ztrátě vody. Anthokyanin se nacházel i ve vzorcích vína obohacených kyselinou pyrohroznovou a porovnáním všech kolizních spekter byl anthokyanin identifikován jako vitisin A (Obr. 56, uvedené m/z odpovídají naměřeným hodnotám). Odchylka od skutečné hodnoty naměřené v MS/MS spektru činí 41 ppm. Vitisin A se nacházel také ve frakci č. 2 (Obr. 57).

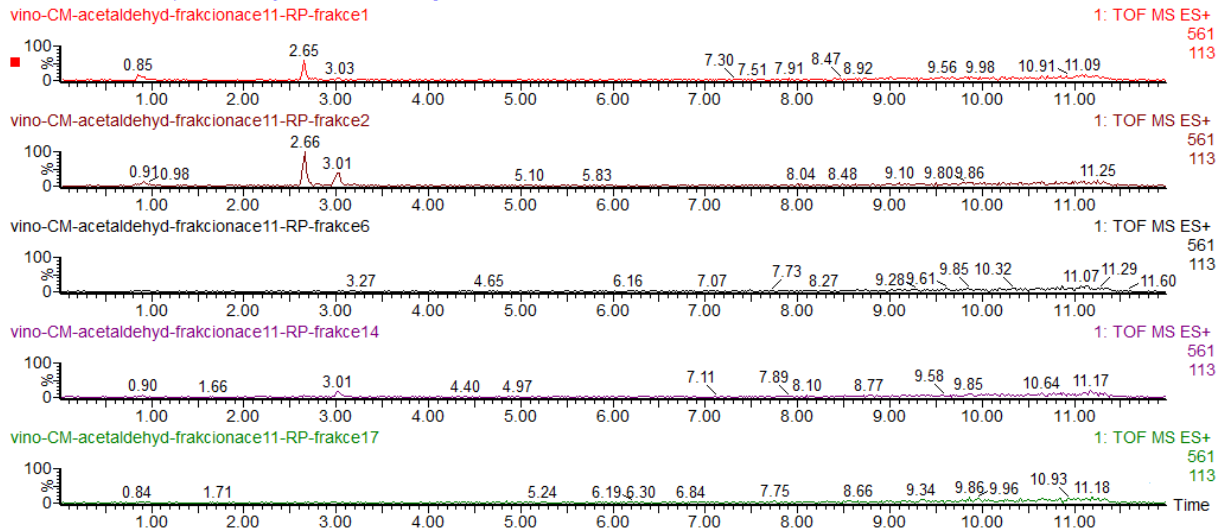


Obr. 55 Kolizní spektrum iontu vitisinu A



Obr. 56 Struktura vitisinu A a jeho vzniklý fragment

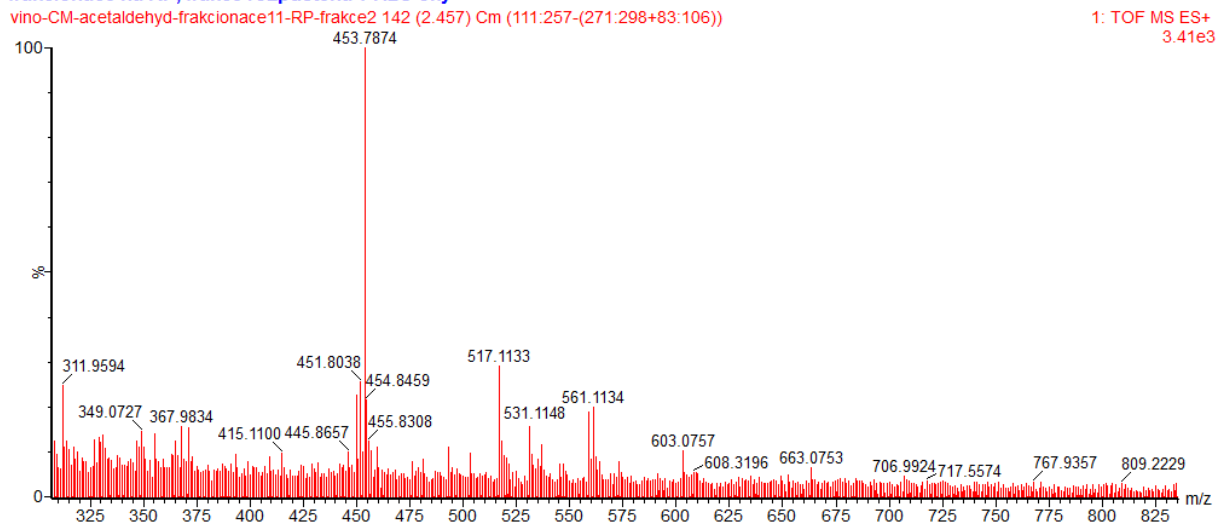
frakcionace na RP, frakce rozpustena v H2O oky



Obr. 57 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 561,0732$

Na obrázku 58 je znázorněn výřez z MS spektra frakce č. 2 pořízeného z UPLC/MS analýzy průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-5 min a odečtením základní linie. I zde se nachází velmi intenzivní balastní ion $m/z 453,7874$.

frakcionace na RP, frakce rozpustena v H2O oky



Obr. 58 Výřez z MS spektra frakce č. 2 pořízené během UPLC/MS analýzy

Ve spektru se nachází stejné anthokyaniny jako v předešlé frakci, jejich intenzity oproti frakci č. 1 jsou ale vždy větší (Obr. 54, 57).

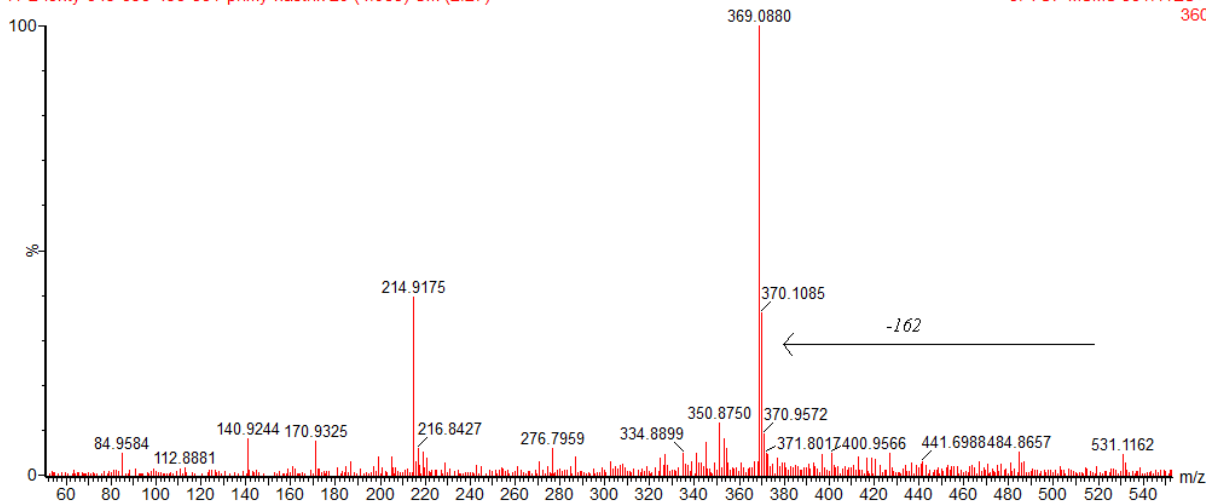
Dalším fragmentovaným iontem ve frakci č. 2 je 531,1148 (resp 531,1162 v MS/MS spektru). Na základě jeho kolizního spektra (Obr. 59) byl anthokyanin

identifikován jako 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosid (Obr. 60, uvedené m/z odpovídají naměřeným hodnotám). Odchyłka od teoretické hodnoty je 1,7 ppm. Ze spektra je patrná ztráta glukosy za vzniku aglykonu 369,0880. Anthokyanin se nachází pouze ve frakci č. 2, v ostatních frakcích se téměř nevyskytuje (Obr. 61).

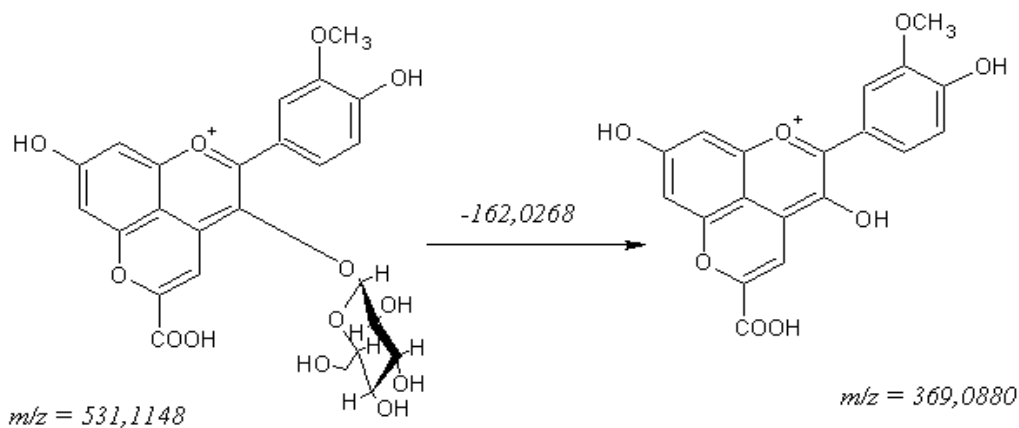
Frakcionace acetaldehydu, RP

11-2-ionty-349-393-493-531-primy-nastrik 20 (4.068) Cm (2.27)

5: TOF MSMS 531.11ES+
360



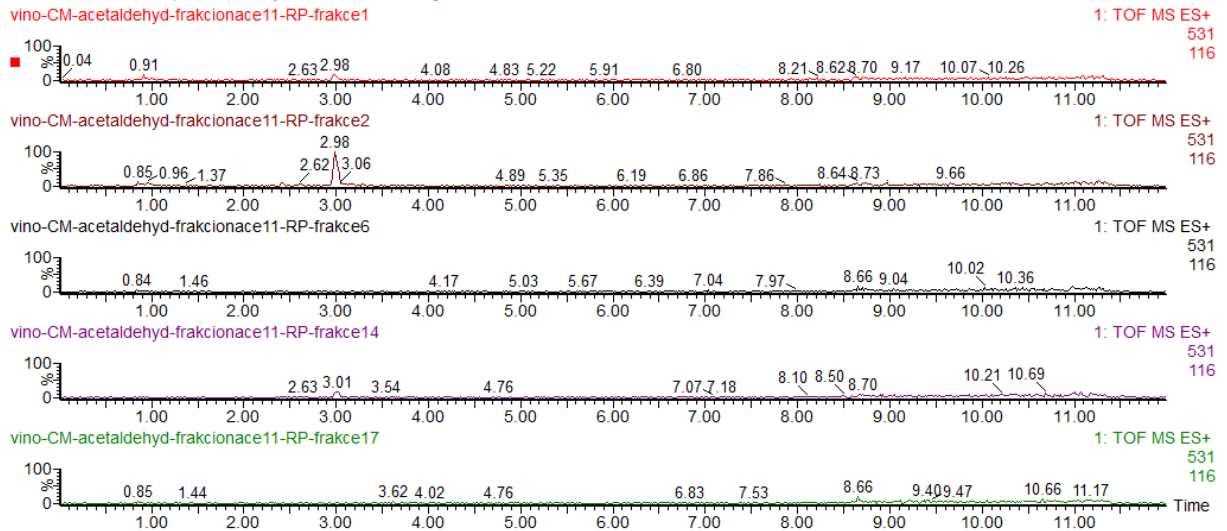
Obr. 59 Kolizní spektrum iontu 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosidu



Obr. 60 Struktura 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosidu a jeho fragmentu

frakcionace na RP, frakce rozpustena v H2O oky

vino-CM-acetaldehyd-frakcionace11-RP-frakce1

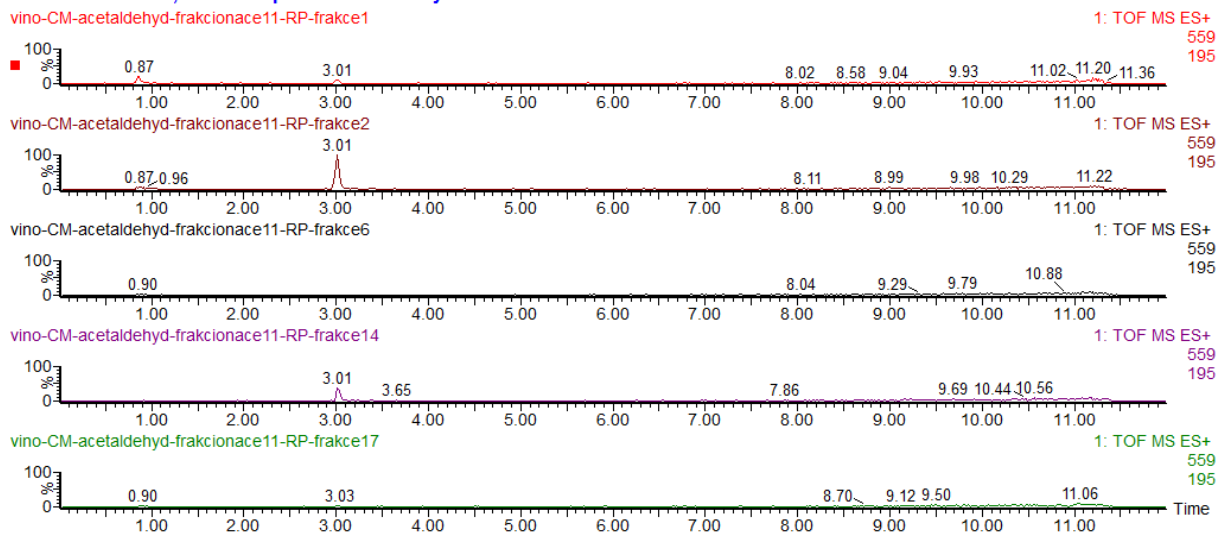


Obr. 61 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 531,1148$

Ve frakci č. 2 se nachází již dříve identifikován acetylvitisin B o $m/z = 559,0941$ (Obr. 28). Ve stopovém množství se nachází i ve frakcích č. 1 a 14. (Obr. 62)

frakcionace na RP, frakce rozpustena v H2O oky

vino-CM-acetaldehyd-frakcionace11-RP-frakce1

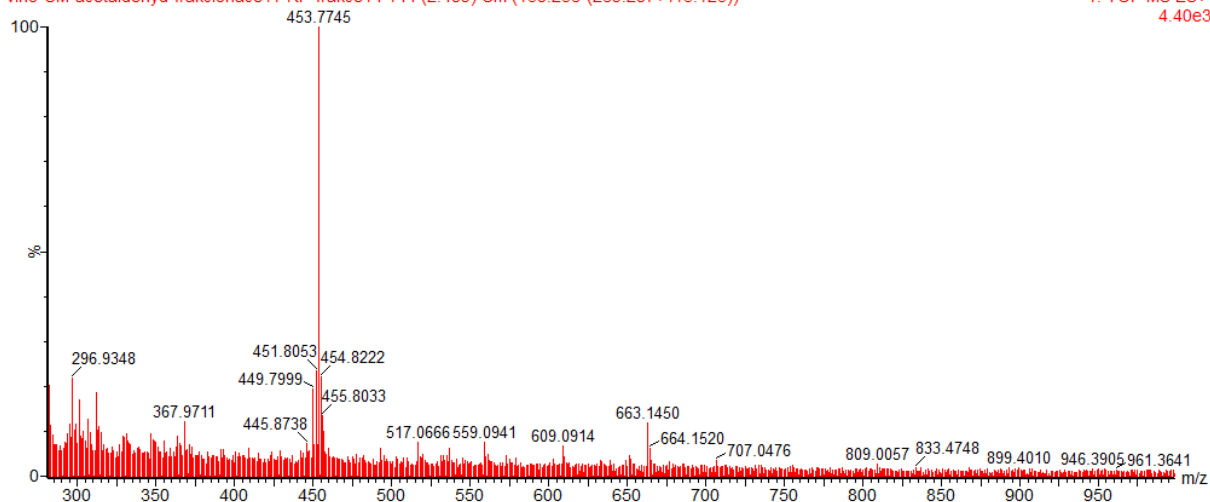


Obr. 62 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 559,0941$

Frakce č. 14 představovala poslední intenzivní barevnou zónu, výřez MS spektra pořízeného z UPLC/MS analýzy průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-5 min a odečtením základní linie je znázorněn na obrázku 63. Ve spektru se opět nachází balastní ion $m/z 453,7745$.

frakcionace na RP, frakce rozpustena v H2O oky

vino-CM-acetaldehyd-frakcionace11-RP-frakce14 144 (2.489) Cm (138:256-(269:287+113:123))

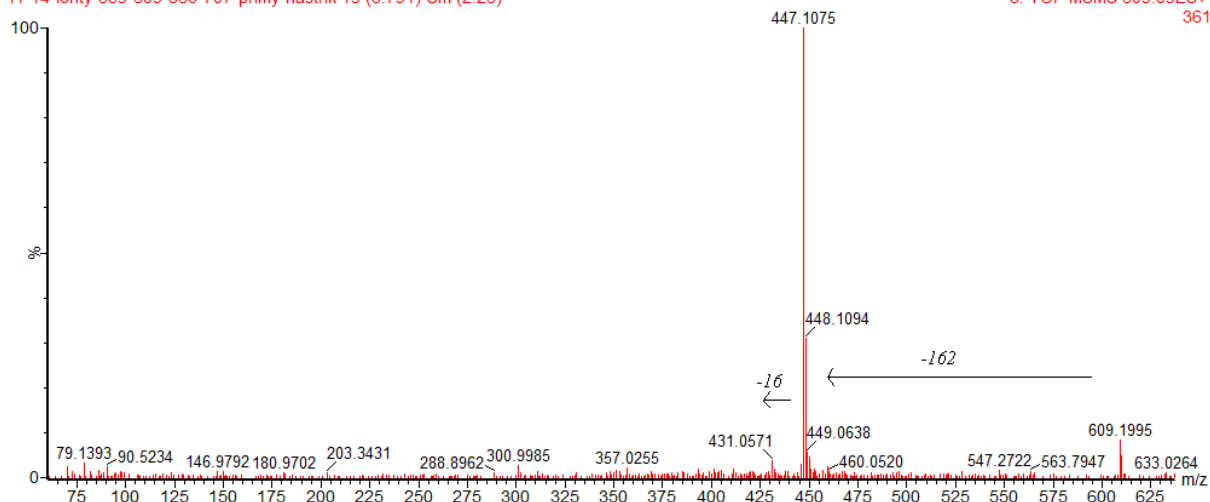
1: TOF MS ES+
4.40e3

Obr. 63 Výřez hmotnostního spektra frakce č. 14 pořízený během UPLC/MS analýzy

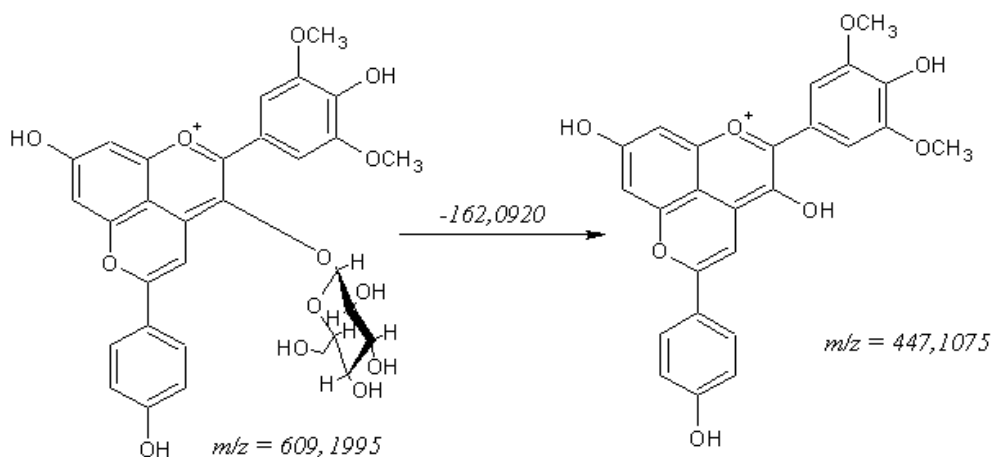
Ve frakci č. 14 byl fragmentován ion 609,0914 (resp. 609,1995 v MS/MS spektru, odchylka od teoretické hodnoty 63,5 ppm). Z kolizního spektra (Obr. 64) lze vyčíst ztrátu glukosy za vzniku aglykonu 447,1075 (odchylka od teoretické hodnoty 1,1 ppm) a ztrátu neutrální částice $\Delta m/z$ 16,0504. Stejný fragment vzniká i při fragmentaci iontu 650,4 (Obr. 43), pravděpodobně se tedy bude jednat o 5-(4-hydroxyfenyl)pyranoMv-3-glukosid^{34,43} (Obr. 65, uvedené m/z odpovídají naměřeným hodnotám). Anthokyanin se nachází pouze ve frakci č. 14 (Obr. 66).

Frakcionace acetaldehydu, RP

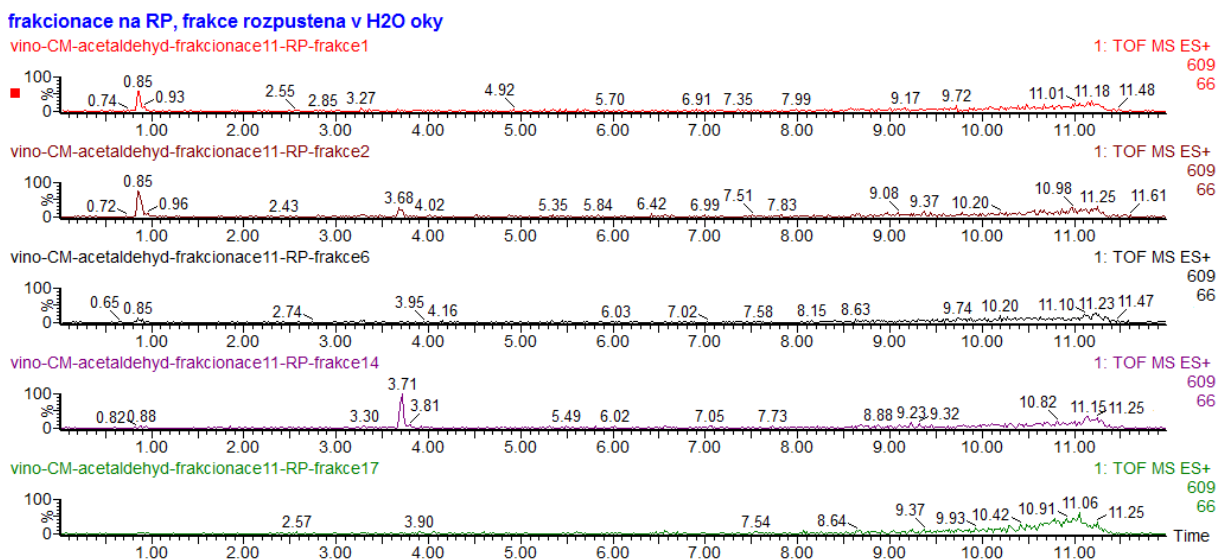
11-14-ionty-559-609-663-707-primy-nastrik 19 (3.791) Cm (2:26)

3: TOF MSMS 609.09ES+
361

Obr. 64 Kolizní spektrum 5-(4-hydroxyfenyl)pyranoMv-3-glukosidu



Obr. 65 Navrhovaná struktura 5-(4-hydroxyfenyl)pyranoMv-3-glukosidu



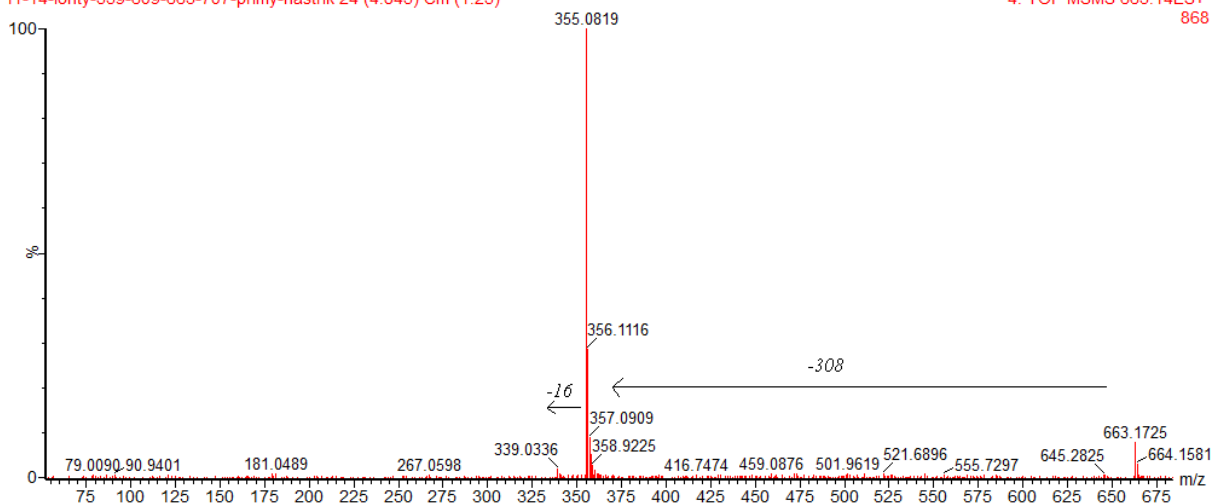
Obr. 66 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 609,0914$

Posledním fragmentovaným iontem ve frakci č. 14 je 663,1450 (resp. 663,1725 v MS/MS spektru) s odchylkou od teoretické hodnoty 45,1 ppm. Jeho kolizní spektrum je znázorněno na obrázku 67. Je patrná ztráta 308,0631, což odpovídá coumaroylglukose za vzniku aglykonu 355,0819 (odchylka od teoretické hodnoty 0,3 ppm). Následuje ztráta neutrální hmoty $\Delta m/z$ 16,0484 (ztráta methanu). Jedná o coumaroylvitisin B, jehož strukturu a vzniklý fragment lze vidět na obrázku 68 (uvedené m/z odpovídají naměřeným hodnotám). Že jde o derivát vitisinu B potvrzuje vzniklý fragment 355,0819, který vzniká jeho fragmentací. Coumaroylvitisin B se nachází převážně ve frakci č. 14, ve stopách ve frakcích č. 1 a 2 (Obr. 69).

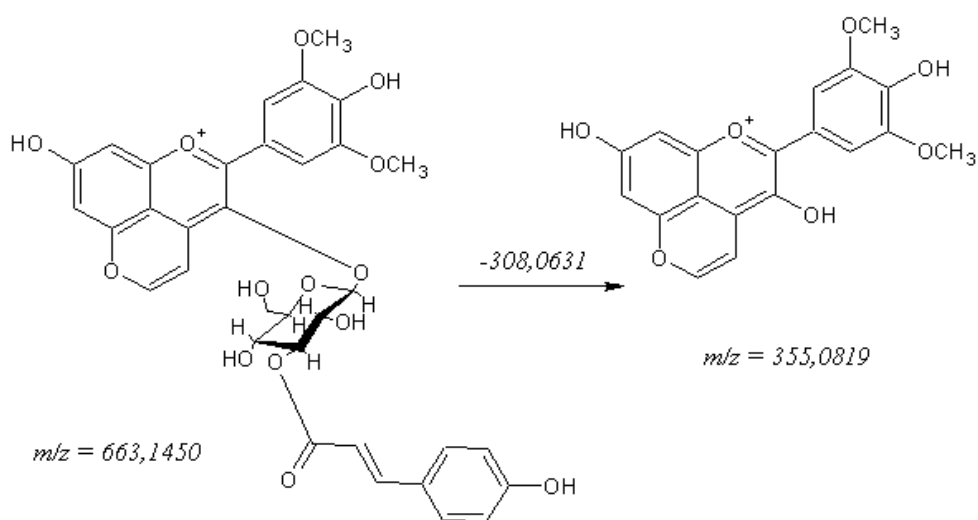
Frakcionace acetaldehydu, RP

11-14-ionty-559-609-663-707-primy-nastrik 24 (4.845) Cm (1:25)

4: TOF MSMS 663.14ES+
868



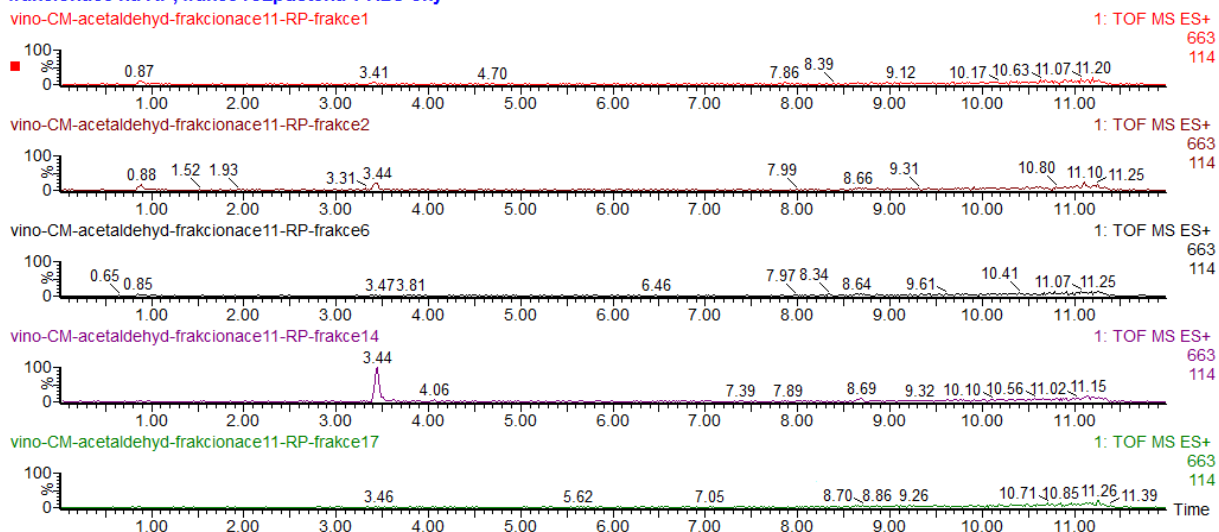
Obr. 67 Kolizní spektrum iontu coumaroylvanilinu B



Obr. 68 Struktura coumaroylvanilinu B a jeho dominantního fragmentu

frakcionace na RP, frakce rozpustena v H₂O oky

vino-CM-acetaldehyd-frakcionace11-RP-frakce1



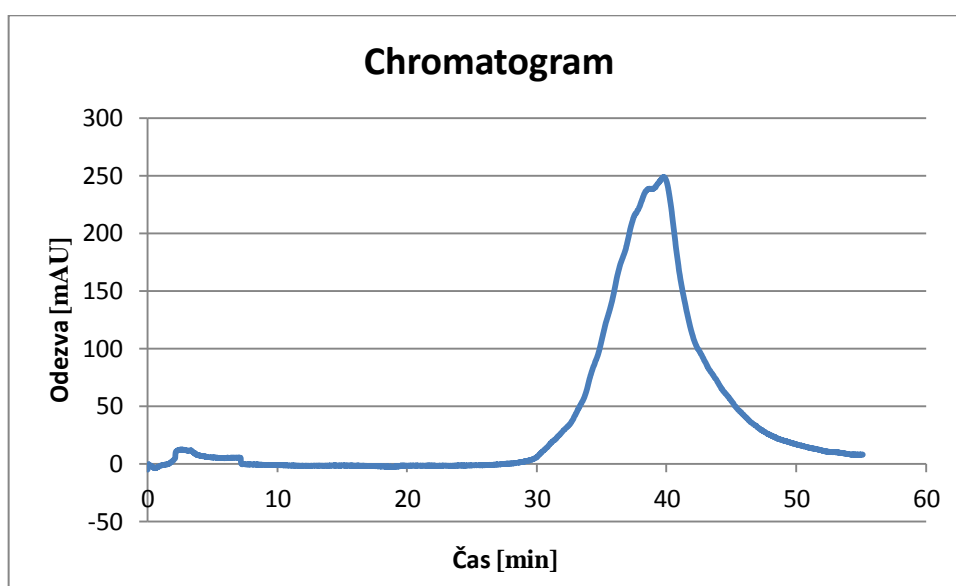
Obr. 69 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 663,1450$

Z uvedených experimentů je patrné, že reverzní fáze ve sloupcovém uspořádání dovoluje od sebe separovat skupinu pyrano a 5-karboxypyrananthokyaninů (tj. vitisin A, 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosid, vitisin B a pyranopeonidin-3-glukosid, který byl také v malém množství rovněž zachycen) od složitějších kondenzovaných anthokyaninů jako jsou comaroylvitisin B a 5-(4-hydroxyfenyl)pyranoMv-3-glukosid.

8.1.5 Frakcionace na reverzní fázi C18 pomocí MPLC na koloně Bioline

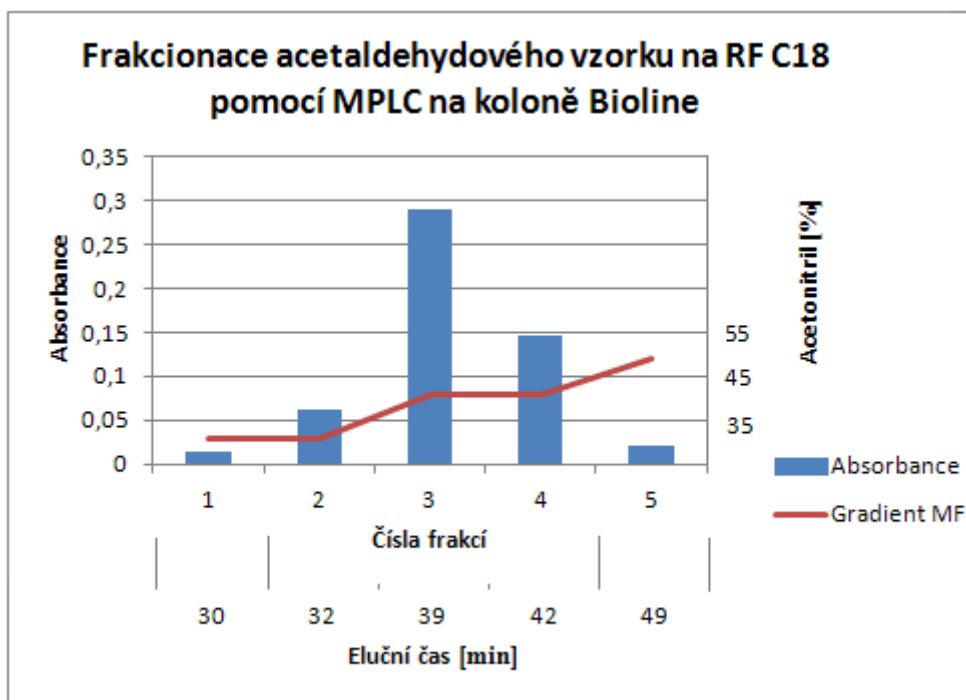
Vedle sloupcové chromatografie v klasickém uspořádání byla pilotně testována i chromatografie s využitím systému Bioline, který je moderní variantou MPLC. Kolona Bioline byla připojena k chromatografickému systému Knauer (detaily viz kapitola 7.9). Podobně jako v experimentech se sloupcovou chromatografií jsou na chromatogramu ze systému Bioline patrné dvě barevné zóny (píky při $\lambda=490$ nm). Je však třeba poznamenat, že malá část barviv zůstala nevratně sorbována na koloně.

Bylo nasbíráno celkem 5 frakcí. Na obrázku 70 lze vidět chromatografický záznam pořízený během frakcionace.



Obr. 70 Chromatogram pořízený během frakcionace na Bioline

Odebrané frakce byly následně změřeny pomocí UV/VIS spektrofotometrie, závislost absorbance na jednotlivých odebraných frakcích a elučních časech při vlnové délce 500 nm je uvedena na obrázku č. 71. Složení získaných frakcí je předmětem dalšího výzkumu.

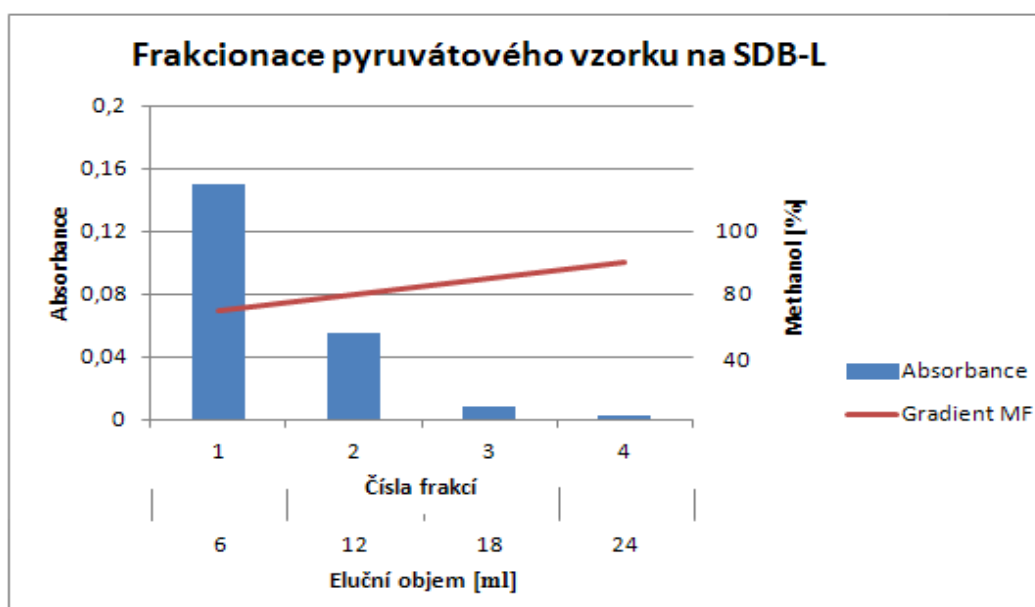


Obr. 71 Závislost absorbance na odebraných frakcích a elučních časech

8.2 Vzorek vína obohacený pyrohroznovou kyselinou

8.2.1 Frakcionace na sorbentu Sepra SDB-L

Při frakcionaci vzorku vína obohaceného pyrohroznovou kyselinou na sorbentu Sepra SDB-L byly nasbírány celkem 4 frakce. Z obrázku 72 je patrná závislost absorbance při vlnové délce 500 nm na jednotlivých odebraných frakcích a elučních objemech. Během frakcionace došlo k vytvoření pouze jedné barevné zóny, a přesto v jejím rámci dochází k separaci. K bližší analýze frakcí byla použita metoda UPLC/MS. Následující spektra jsou získána průměrováním chromatogramu v rozmezí od 2 do 4 min a odečtením iontů základní linie.



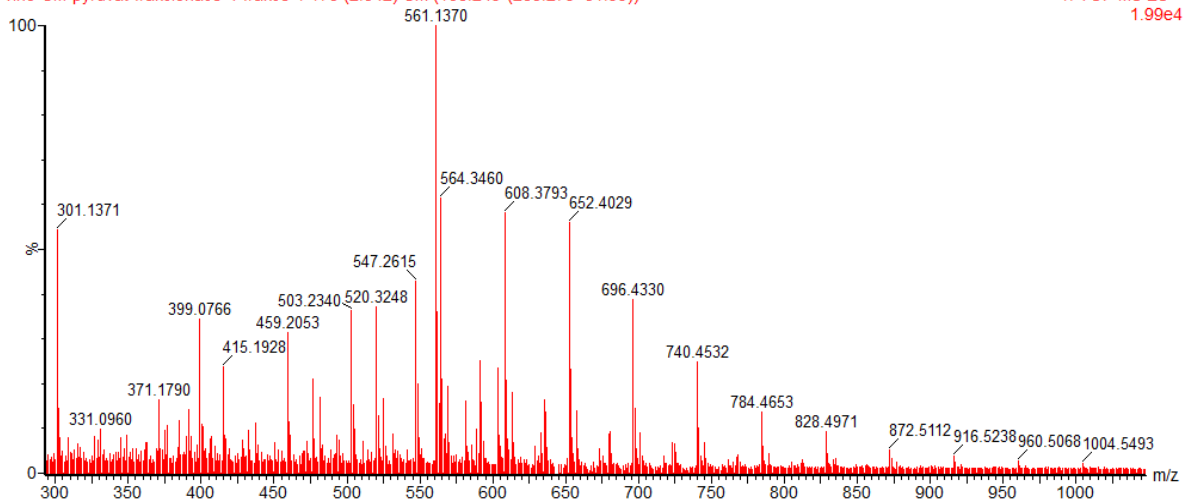
Obr. 72 Graf závislosti absorbance na jednotlivých odebraných frakcích a elučních objemech

K analýze byly vybrány všechny frakce, ty byly lyofilizovány a před analýzou rozpuštěny v 0,5 ml vody okyselené 0,1% HCOOH (v/v).

Výřez hmotnostního spektra frakce č. 1 pořízený z UPLC/MS analýzy průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-4 min a odečtením základní linie je znázorněn na obrázku 73.

frakcionace na SDB-L, frakce rozpustena v okys COOH voda 500uL
vino-CM-pyruvat-frakcionace-4-frakce-1 175 (2.842) Cm (136:249-(265:279+81:99))

1: TOF MS ES+
1.99e4



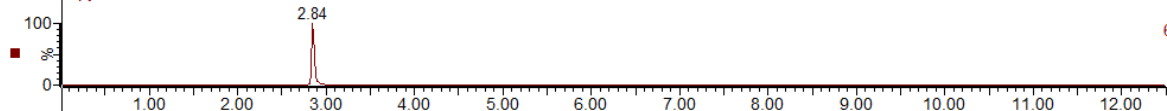
Obr. 73 Výřez hmotnostní spektra frakce č. 1

Nejintenzivnějším iontem frakce č. 1 je anthokyanin o $m/z = 561,1370$. Jak již bylo napsáno dříve, jedná se o vitisin A (Obr. 56). Odchylka od skutečné hodnoty je 22,4 ppm. Během fragmentace vitisinu A vzniká aglykon 399,0610, dále dochází ke ztrátě methanu ($m/z = 16,0235$). Vitisin A se nacházel nejvíce ve frakci č. 1, jeho intenzita postupně klesala a v poslední čtvrté frakci se nenacházel vůbec (Obr. 74).

frakcionace na SDB-L, frakce rozpustena v okys COOH voda 500uL

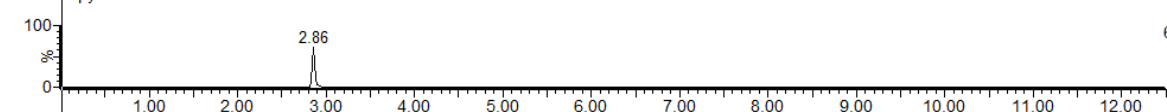
vino-CM-pyruvat-frakcionace-4-frakce-1

1: TOF MS ES+
561
6.86e3



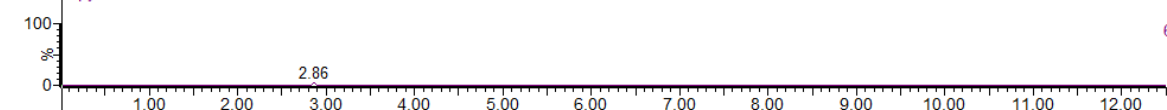
vino-CM-pyruvat-frakcionace-4-frakce-2

1: TOF MS ES+
561
6.86e3



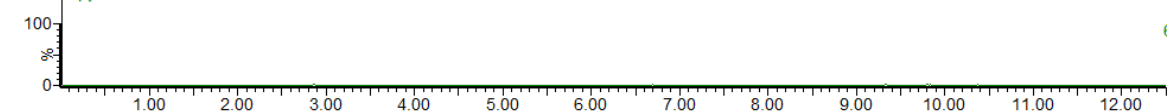
vino-CM-pyruvat-frakcionace-4-frakce-3

1: TOF MS ES+
561
6.86e3



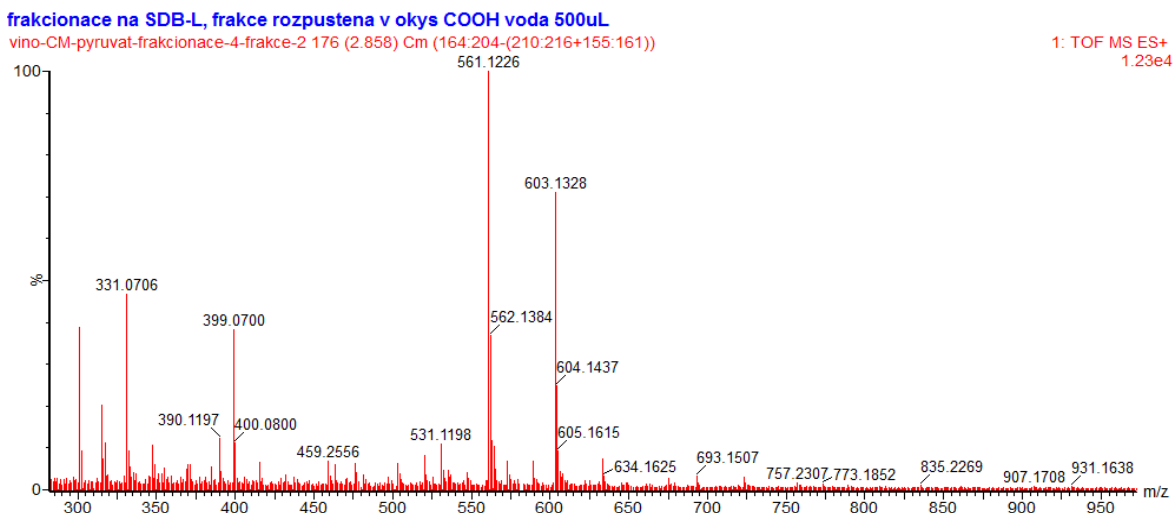
vino-CM-pyruvat-frakcionace-4-frakce 4

1: TOF MS ES+
561
6.86e3



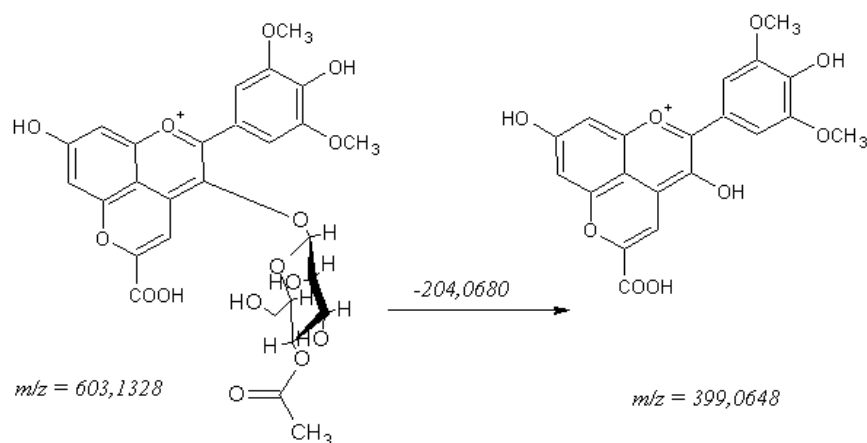
Obr. 74 Chromatogramy jednotlivých frakcí pořízené pro ion o $m/z = 561,1370$

Výřez hmotnostního spektra frakce č. 2 pořízeného z UPLC/MS analýzy průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-4 min a odečtením základní linie je znázorněn na obrázku 75.

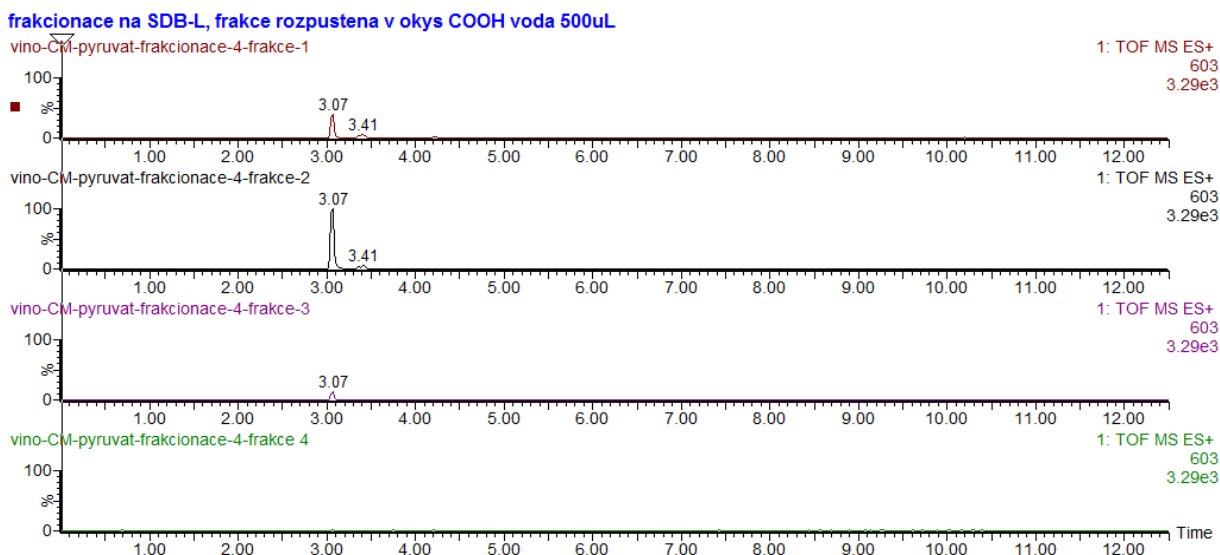


Obr. 75 Výřez hmotnostního spektra frakce č. 2

Nejintenzivnějším iontem ve frakci č. 2 je stále visitin A ($m/z = 561,1226$, odchylka od teoretické hodnoty je 3,2 ppm). Do popředí se dostává i ion o $m/z = 603,1328$, který se vyskytuje téměř ve všech vzorcích vína obohacených pyrohroznovou kyselinou. Na základě porovnání všech fragmentačních spekter byl tento anthokyanin identifikován jako acetylvisitin A (Obr. 76). Při fragmentaci dojde k odštěpení acetylglukosy za vzniku aglykonu $m/z 399,0648$ (odchylka od teoretické hodnoty 17 ppm). Jeho intenzita je největší právě ve frakci č. 2 (Obr. 77).

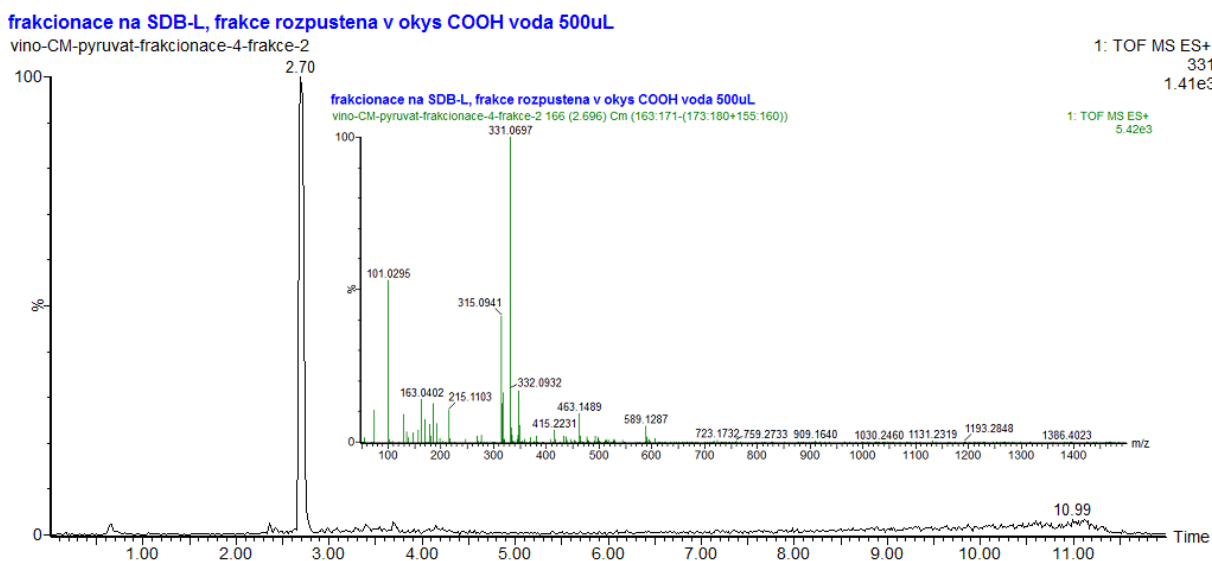


Obr. 76 Struktura acetylvisitinu A a jeho vzniklého fragmentu



Obr. 77 Chromatogramy iontu o m/z 603,1328 v jednotlivých frakcích

Zajímavé je, že v této frakci se nachází i relativně velké množství volného anthokyanidinu, a to malvidinu ($m/z = 331,0706$, odchylna od skutečné hodnoty je 33,8 ppm). Jeho chromatogram a spektrum lze vidět na obrázku 78.

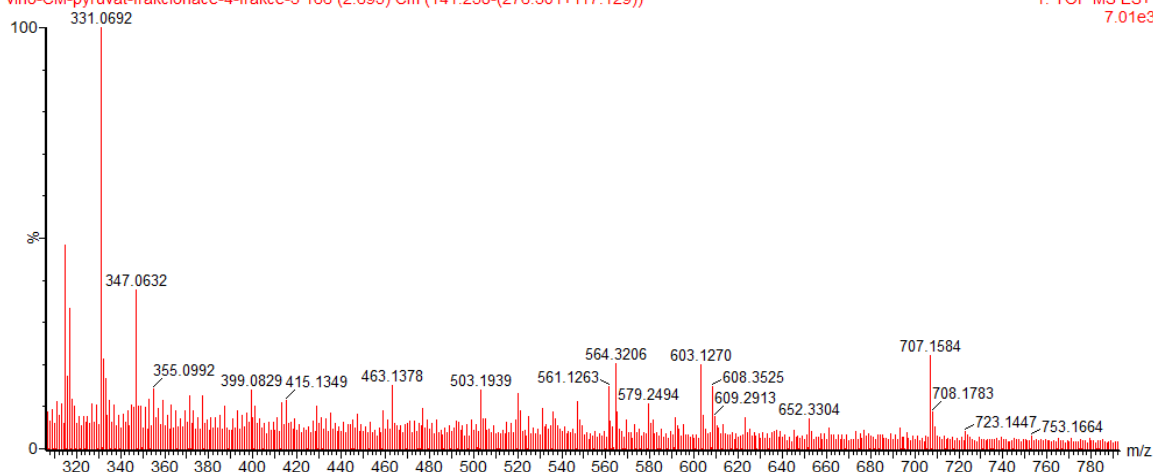


Obr. 78 Chromatogram a spektrum malvidinu

Výřez hmotnostní spektra frakce č. 3 pořízeného z UPLC/MS analýzy průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-4 min a odečtením základní linie je znázorněn na obrázku 79.

frakcionace na SDB-L, frakce rozpustena v okys COOH voda 500uL
vino-CM-pyruvat-frakcionace-4-frakce-3 166 (2.695) Cm (141:258-(276:301+117:129))

1: TOF MS ES+
7.01e3

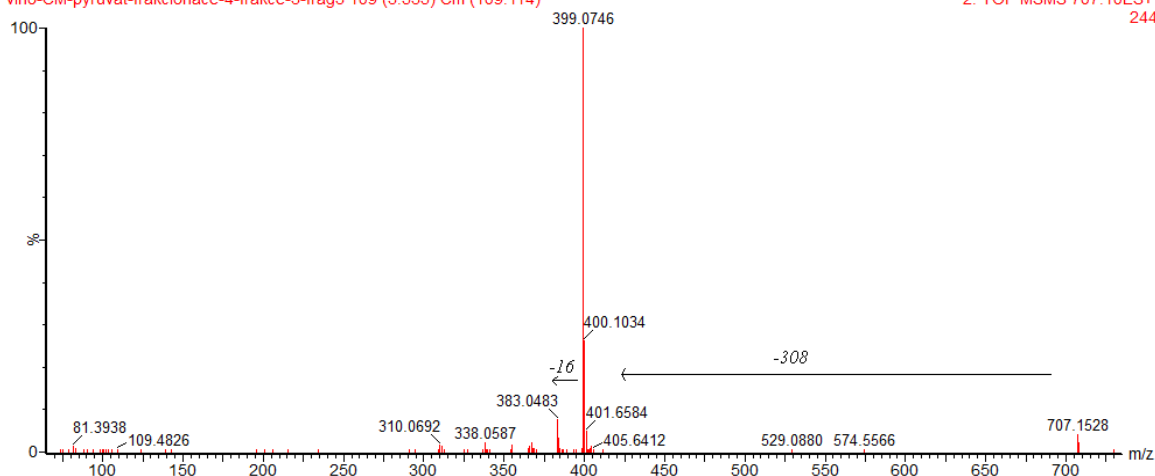


Obr. 79 Výřez z hmotnostního spektra frakce č. 3

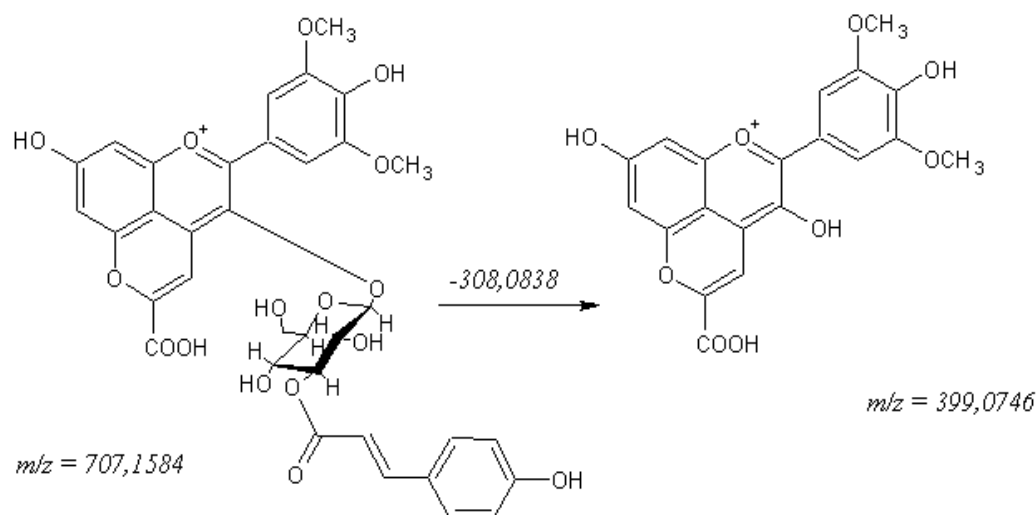
Ve frakci č. 3 se nově objevuje anthokyanin o m/z 707,1584. Na základě jeho kolizního spektra (Obr. 80) byl identifikován jako 5-karboxypyranomalvidin-3-coumaroylglukosid, označován také jako coumaroylvitisin A (Obr. 81). Odchylna od skutečné hodnoty činí 4,0 ppm. Z kolizního spektra je patrná ztráta coumaroylglukosy o hmotě 308,0838 za vzniku aglykonu 399,0746 (odchylna od skutečné hodnoty 7,5 ppm). Následuje neutrální ztráta částice methanu. Tento anthokyanin se v první frakci nevyskytuje vůbec, v druhé pouze ve stopách, neintenzivnější je ve frakci č. 3 a 4. (Obr. 82). Ve spektru se opět nachází malvidin o m/z = 331,0692, odchylna od skutečné hodnoty činí 38,1 ppm.

frakcionace na SDB-L, frakce rozpustena v okys COOH voda 500 uL, frag 707-677-693
vino-CM-pyruvat-frakcionace-4-frakce-3-frag3 109 (3.535) Cm (109:114)

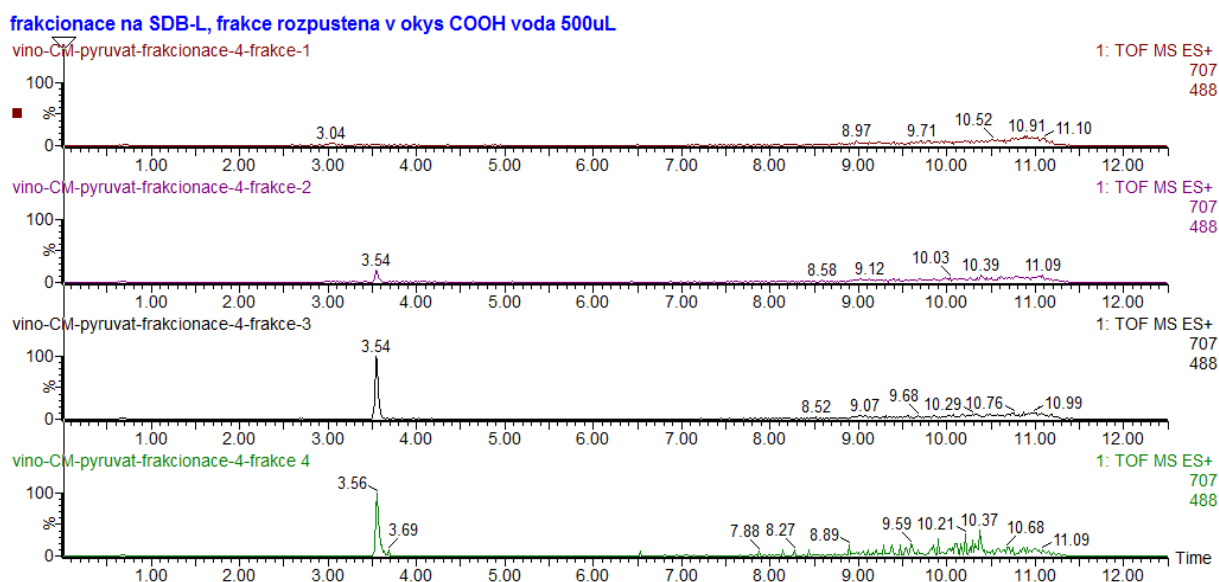
2: TOF MSMS 707.10ES+
244



Obr. 80 Kolizní spektrum coumaroylvitisinu A



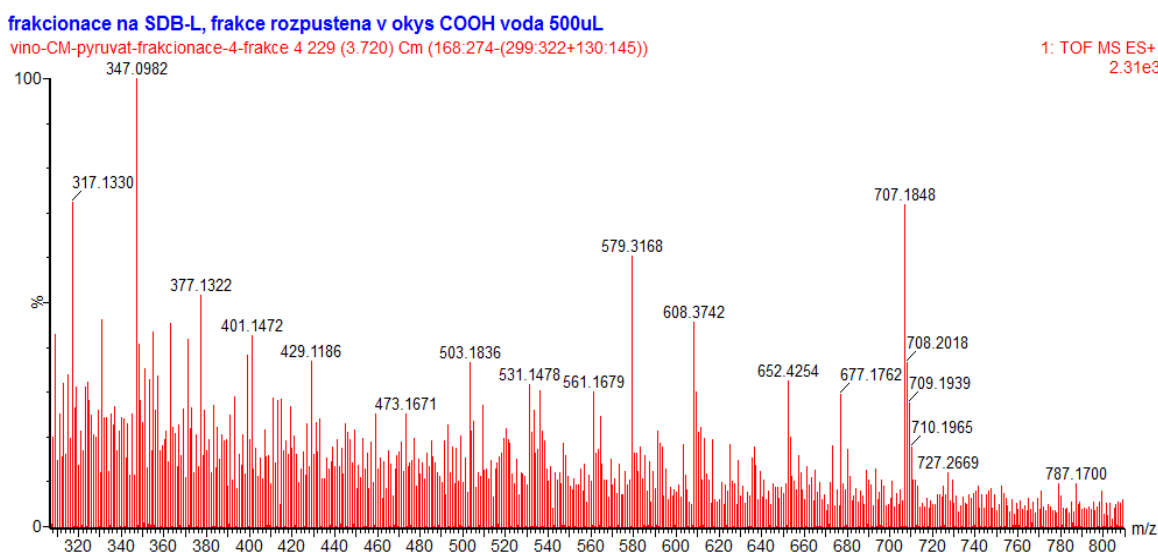
Obr. 81 Struktura coumaroylvisisinu A a jeho vzniklého fragmentu



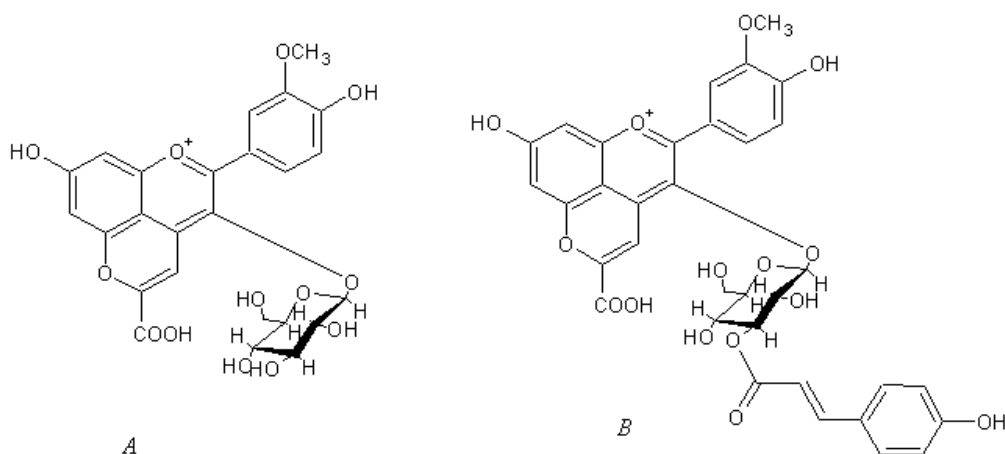
Obr. 82 Chromatogramy iontu m/z 707,1584 v jednotlivých frakcích

Na obrázku 83 je znázorněn výřez hmotnostního spektra poslední frakce získaného z UPLC/MS měření průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-4 min a odečtením základní linie. Kromě derivátů malvidinu se ve frakci objevují i deriváty peonidinu, a to 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosid ($m/z = 531,1478$, odchylka od teoretické hodnoty 63,8 ppm) a 5-karboxypyranopeonidin-3-coumaroylglukosid ($m/z = 677,1762$, odchylka od teoretické hodnoty 37,8 ppm). Oba anthokyaniny poskytují během své fragmentace jeden fragment o m/z 369, který odpovídá 5-karboxypyranopeonidinu. Struktury obou

anthokyaninů lze vidět na obrázku 84. Anthokyanin 531,1478 se nachází také ve frakci č. 2, anthokyanin 677,1762 se nachází pouze ve frakci č. 4.

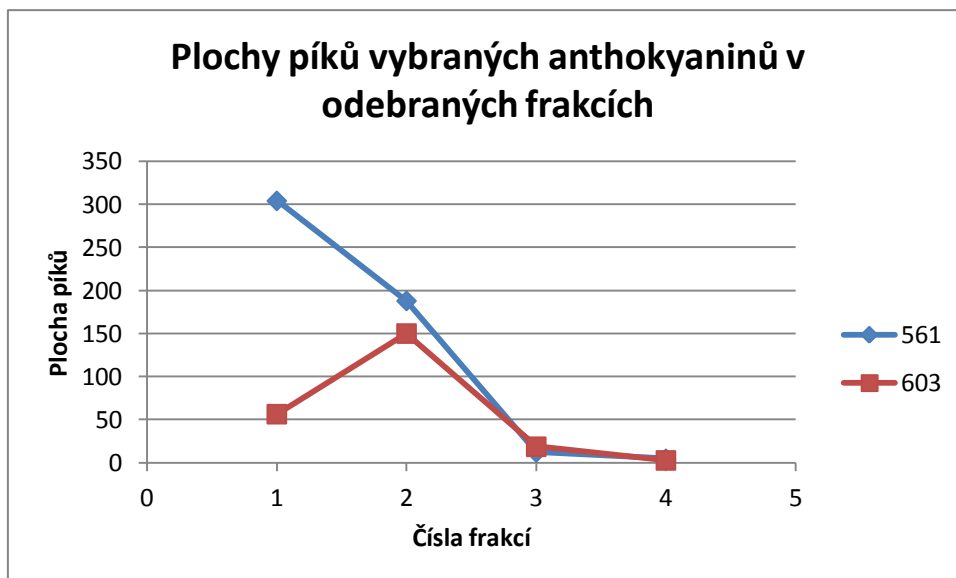


Obr. 83 Výřez hmotnostního spektra frakce č. 4

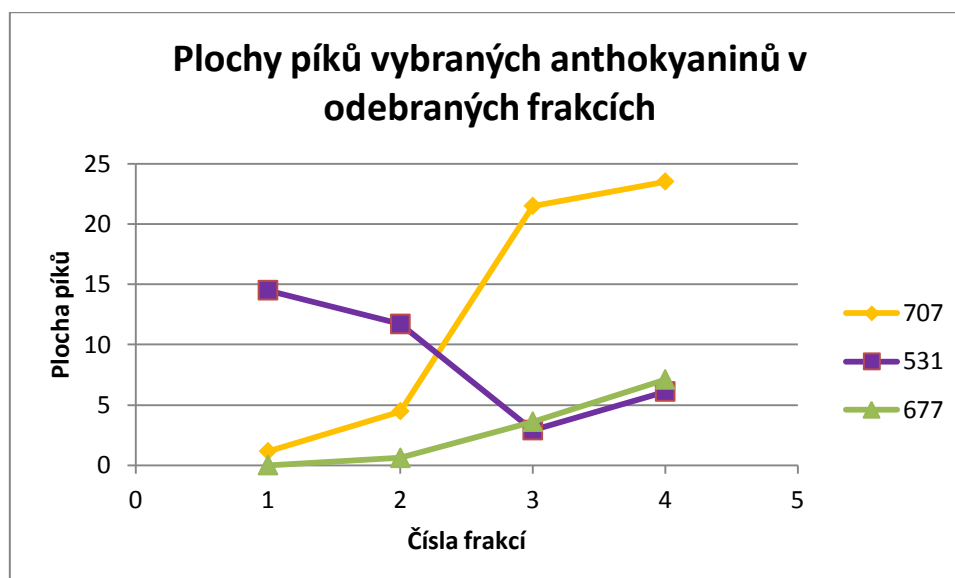


Obr. 84 Struktury pyranoanthokyaninů (A – 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosid, B – 5-karboxypyranopeonidin-3-coumaroylglukosid)

Na obrázku 85 a 86 jsou znázorněny plochy píků vybraných anthokyaninů v jednotlivých odebraných frakcích. Z grafu je patrné, že množství vitisinu A (m/z 561) postupně klesá, množství acetylvitisinu A (m/z 603) dosáhlo maxima ve frakci č. 2, dále postupně klesá, množství coumaroylvitisinu A (m/z 707) vzrůstá a maxima dosáhne ve frakci č. 4. 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosid (m/z 531) dosahuje maxima ve frakci č. 1, 5-karboxypyranopeonidin-3-coumaroylglukosid (m/z 677) ve frakci č. 4.



Obr. 85 Plochy píkú vitisinu A (561) a acetylvitisinu A (603) v odebraných frakcích

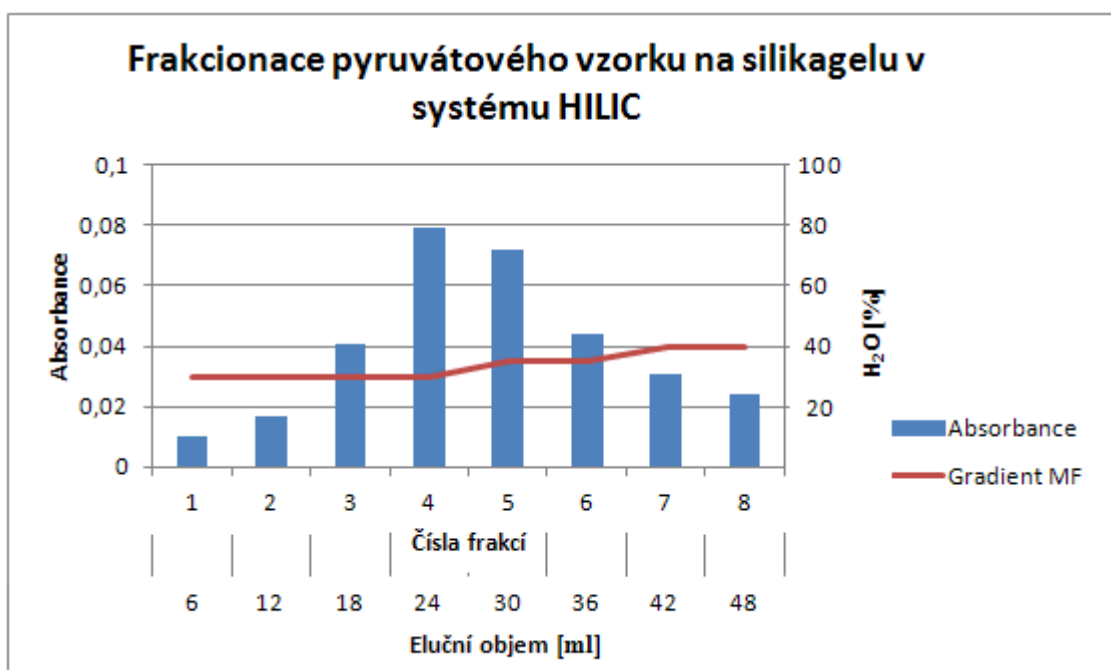


Obr. 86 Plochy píkú coumaroylvitisinu A (707), 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosidu (531) a 5-karboxypyranopeonidin-3-coumaroylglukosidu (677) v odebraných frakcích

Výsledky ukazují, že styren-divinylbenzenový kopolymer je možné použít pro frakcionaci pyranoanthokyaninů ve vínech. Je možné provést separaci podle typu acylace na cukerném zbytku pyranoanthokyaninu.

8.2.2 Frakcionace na silikagelu v systému HILIC

Při frakcionaci vzorku vína obohaceného kyselinou pyrohroznovou na silikagelu v systému HILIC bylo nasbíráno celkem 8 frakcí. Z obrázku 87 je patrná závislost absorbance při vlnové délce 500 nm na jednotlivých odebraných frakcích a elučních objemech. Podobně jako u frakcionace na SDB-L došlo vizuálně k vytvoření pouze jedné barevné zóny, detailní analýza UPLC/MS však ukazuje, že dochází k poměrně účinné separaci podle polaritý jednotlivých barviv.



Obr. 87 Graf závislosti absorbance na jednotlivých odebraných frakcích a elučních objemech

K analýze byly vybrány frakce č. 2 - 7. Po lyofilizaci byly frakce rozpuštěny v 0,5 ml vody okyselené 0,1% HCOOH (v/v).

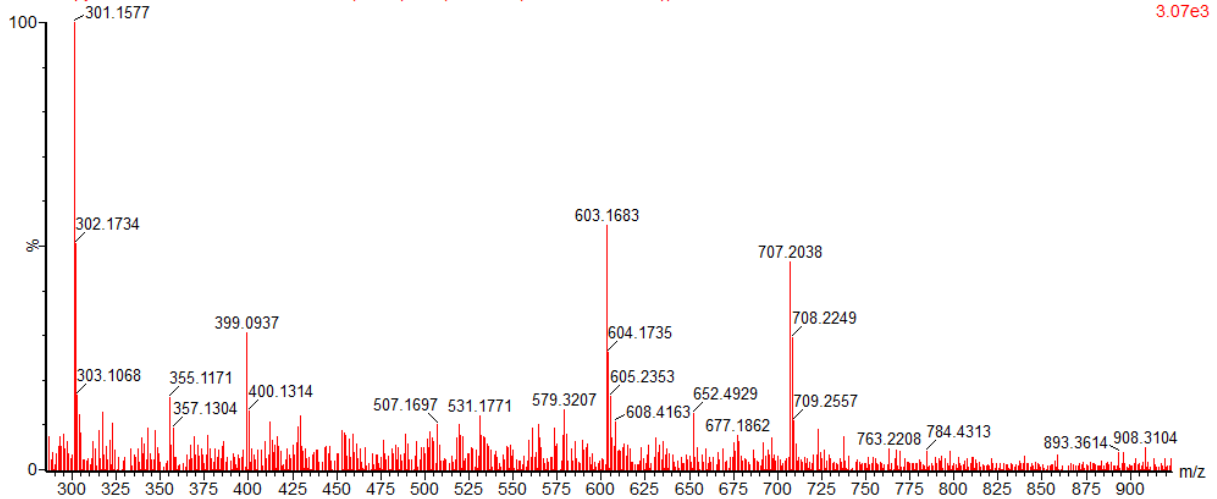
Na obrázku 88 je znázorněn výřez hmotnostního spektra získaného z UPLC/MS experimentu průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-4 min a odečtením základní linie frakce č. 2. Ve spektru se objevují deriváty vitisinu A – acetylvitisin A ($m/z = 603,1683$, odchylka od skutečné hodnoty je 55,2 ppm) a coumaroylvitisin A ($m/z = 707,2038$, odchylka od skutečné hodnoty je 60,2 ppm). Jejich struktury lze vidět na obrázcích č. 30 a 81. Acetylvitisin A se nachází také ve frakcích č. 3 a 4, dále jeho množství postupně klesá. (Obr. 89). Coumaroylvitisin A se nachází v maximální intenzitě právě ve frakci č. 2, dále jeho koncentrace postupně klesá (Obr. 90). Dále se ve spektru

nachází jejich aglykon o $m/z = 399,0937$. Ion 531,1771 odpovídá 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosidu (Obr. 60). Maximální intenzity ion 531,1771 dosáhl ve frakci č. 4 (Obr. 91). Ion s největší intenzitou ve spektru je anthokyanidin peonidin o $m/z 301,1557$.

frakcionace na silikagelu, frakce rozpustena v okys COOH voda 500 uL

vino-CM-pyruvat-frakcionace-5-fra-ke 2 189 (3.066) Cm (165:237-(248:276+144:160))

1: TOF MS ES+ 3.07e3

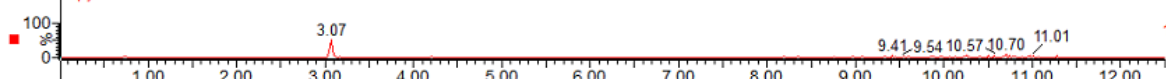


Obr. 88 Výřez hmotnostního spektra frakce č. 2

frakcionace na silikagelu, frakce rozpustena v okys COOH voda 500 uL

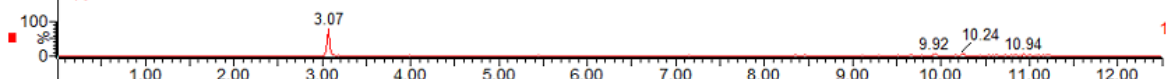
vino-CM-pyruvat-frakcionace-5-fra-ke 2

1: TOF MS ES+ 603 1.58e3



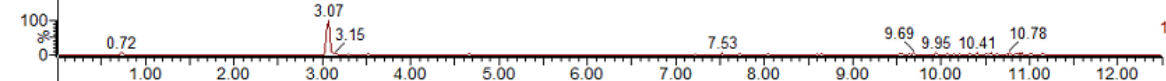
vino-CM-pyruvat-frakcionace-5-fra-ke 3

1: TOF MS ES+ 603 1.58e3



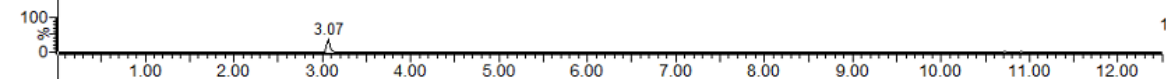
vino-CM-pyruvat-frakcionace-5-fra-ke 4

1: TOF MS ES+ 603 1.58e3



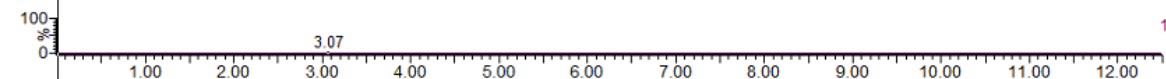
vino-CM-pyruvat-frakcionace-5-fra-ke 5

1: TOF MS ES+ 603 1.58e3



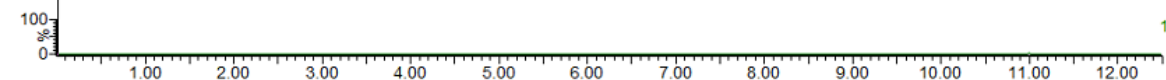
vino-CM-pyruvat-frakcionace-5-fra-ke 6

1: TOF MS ES+ 603 1.58e3



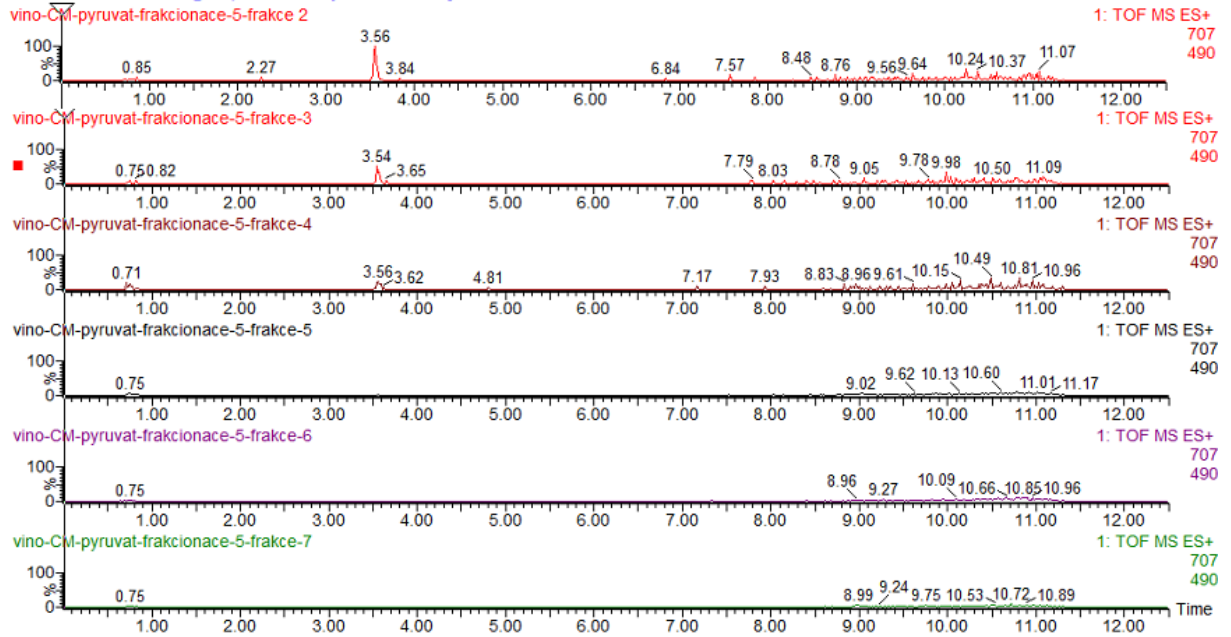
vino-CM-pyruvat-frakcionace-5-fra-ke 7

1: TOF MS ES+ 603 1.58e3



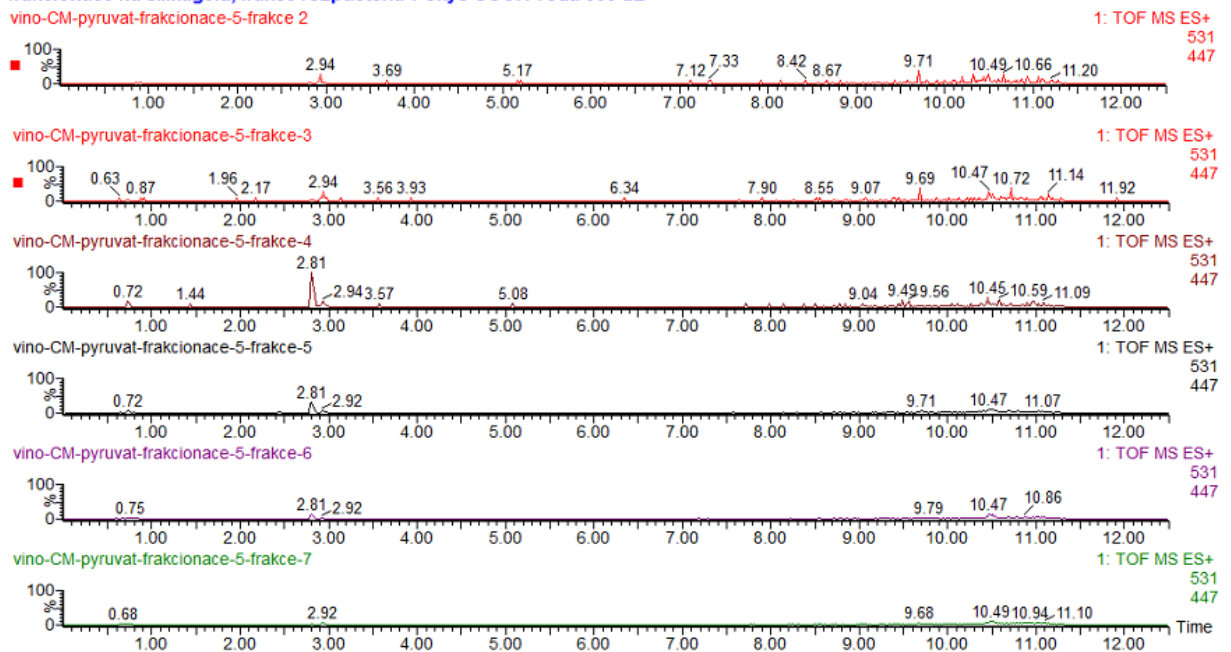
Obr. 89 Chromatogramy iontu $m/z 603,1683$ v jednotlivých frakcích

frakcionace na silikagelu, frakce rozpustena v okys COOH voda 500 uL



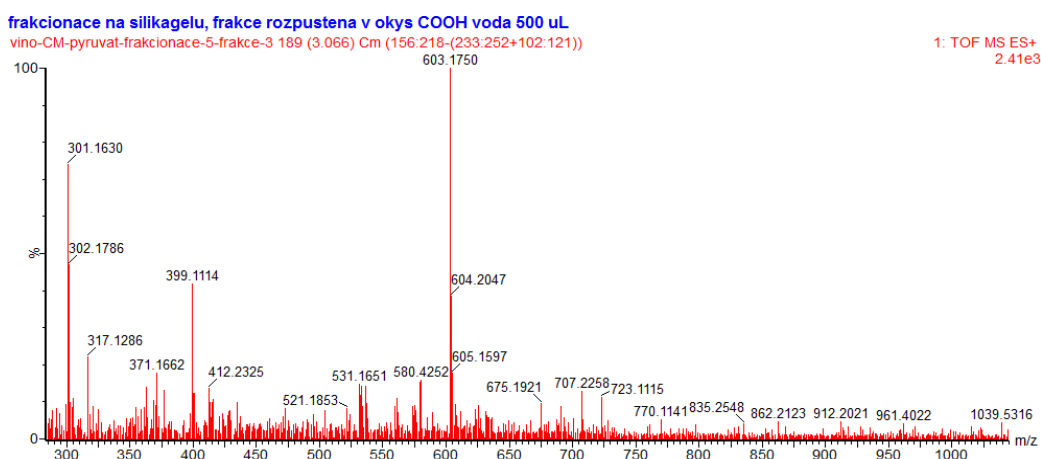
Obr. 90 Chromatogramy iontu m/z 707,2038 v jednotlivých frakcích

frakcionace na silikagelu, frakce rozpustena v okys COOH voda 500 uL



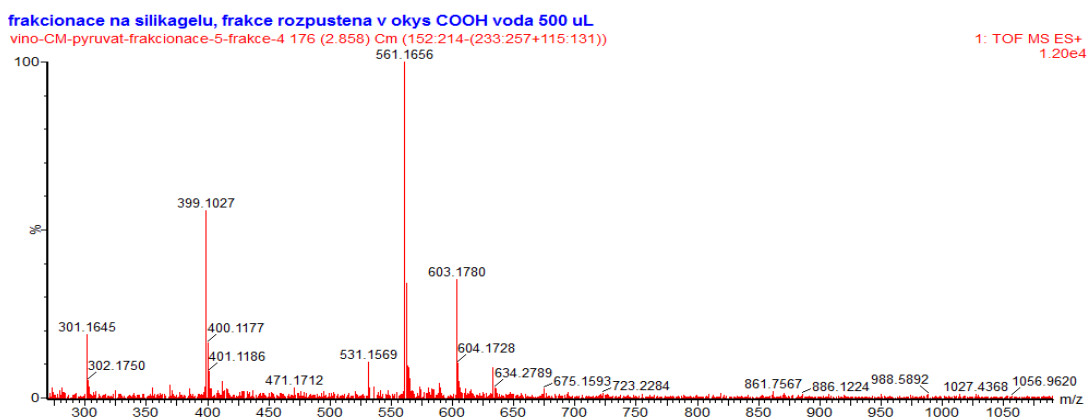
Obr. 91 Chromatogramy iontu m/z 531,1771 v jednotlivých frakcích

Na obrázku 92 je znázorněn výřez hmotnostního spektra z UPLC/MS experimentu získaného průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-4 min a odečtením základní linie z frakce č. 3. Ion s největší intenzitou je 603,1750, který odpovídá acetylvitisinu A (Obr. 30, odchylka od skutečné hodnoty 66,3 ppm). Mezi další anthokyaniny, které se vyskytují ve frakci č. 3, patří 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosid o m/z 531,1651 (Obr. 60, odchylka od skutečné hodnoty 27,9 ppm) a coumaroylvitisin A o $m/z = 707,2258$ (Obr. 81, odchylka od skutečné hodnoty 91,3 ppm). Jejich intenzity v porovnání s ostatními frakcemi lze vidět na obrázcích 89, 91 a 90.



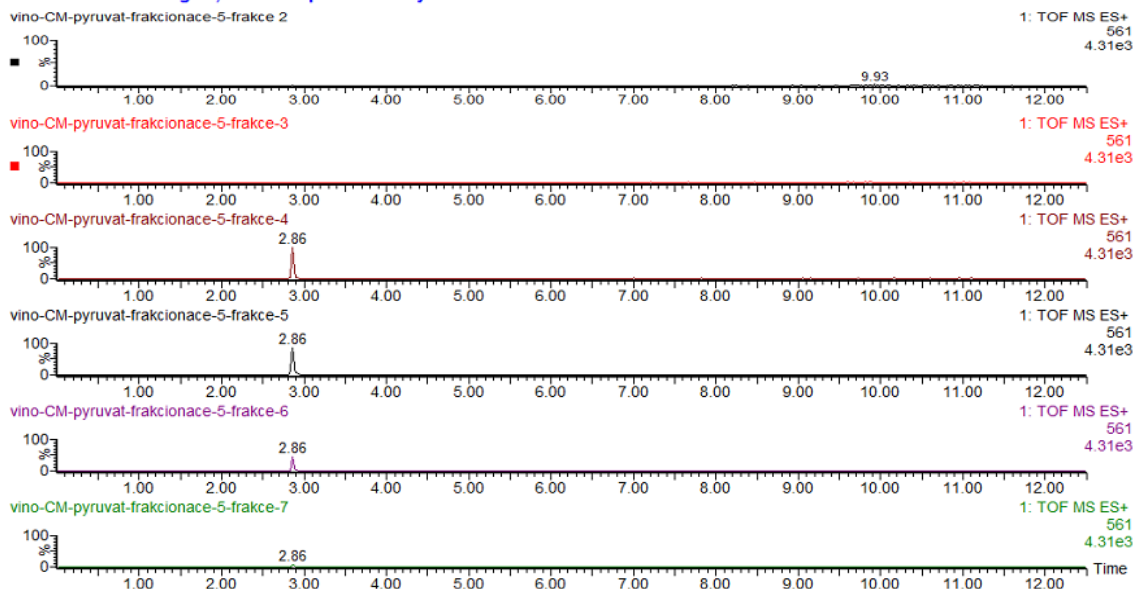
Obr. 92 Výřez z hmotnostního spektra frakce č. 3

Na obrázku 93 je znázorněn výřez z hmotnostního spektra frakce č. 4. Ion s největší intenzitou je 561,1656, který odpovídá vitisinu A (Obr. 56, odchylka od skutečné hodnoty 73,4 ppm). Největší intenzita tohoto iontu je právě ve frakci č. 4, postupně jeho intenzita klesá. Ve frakcích č. 2 a 3 se nenacházel vůbec (Obr. 94).



Obr. 93 Výřez z hmotnostního spektra frakce č. 4

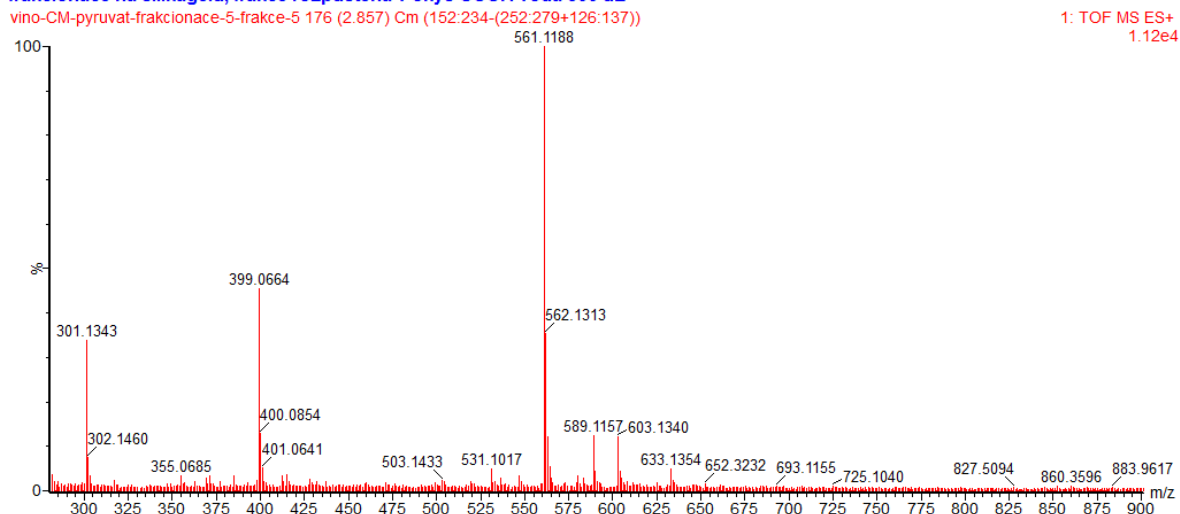
frakcionace na silikagelu, frakce rozpustena v okys COOH voda 500 uL



Obr. 94 Chromatogramy iontu m/z 561,1656 v jednotlivých frakcích

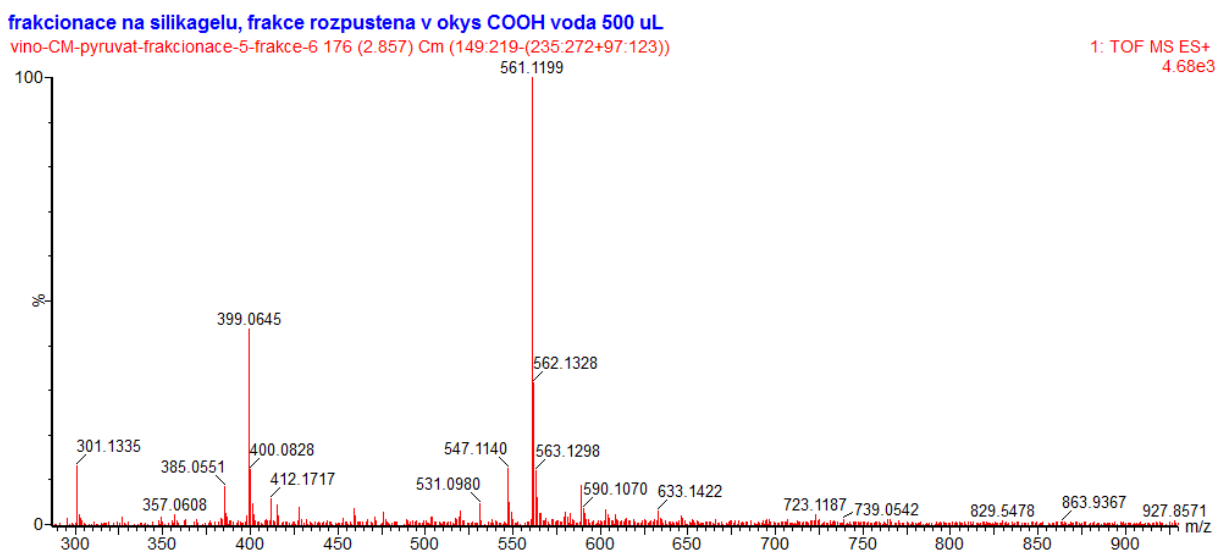
Na obrázku 95 je vidět výřez hmotnostního spektra z UPLC/MS analýzy získané průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-4 min a odečtením základní linie z frakce č. 5. Ion s největší intenzitou je opět 561,1188, který odpovídá vitisinu A (Obr. 56, odchylka od skutečné hodnoty 10 ppm). Mezi další anthokyaniny, které se vyskytují ve frakci č. 5, patří 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosid o m/z 531,1017 (Obr. 60, odchylka od skutečné hodnoty 91,5 ppm) a acetylvitisin A o m/z 603,1340 (Obr. 30, odchylka od teoretické hodnoty 1,7 ppm). Jejich intenzity v porovnání s ostatními frakcemi lze vidět na obrázcích 94, 91 a 89.

frakcionace na silikagelu, frakce rozpustena v okys COOH voda 500 uL

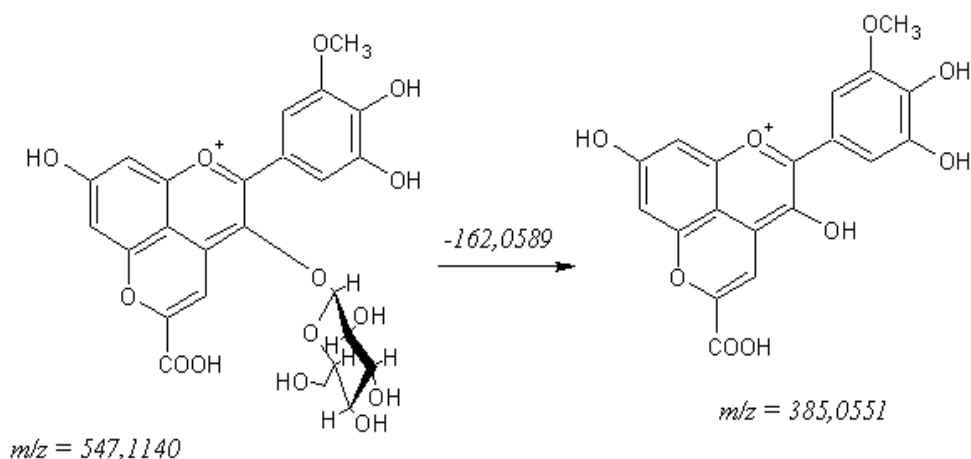


Obr. 95 Výřez hmotnostního spektra frakce č. 5

Na obrázku 96 je znázorněn výřez z MS spektra získaného z UPLC/MS analýzy průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-4 min a odečtením základní linie z frakce č. 6. Ion s největší intenzitou je opět vitisin A (Obr. 56) o $m/z = 561,1199$ s odchylkou od skutečné hodnoty 8,0 ppm. Ve spektru se objevil ion 547,1082 (odchylna od skutečné hodnoty je 1,1 ppm), který odpovídá 5-karboxypyranopetunidin-3-glukosidu. V jeho kolizním spektru se objevil aglykon, který odpovídá hmotě 385,0551. Struktura a vzniklý fragment lze vidět na obrázku 97, uvedené hodnoty m/z odpovídají naměřeným hodnotám. Z obrázku 98 je patrné, že se anthokyanin nachází téměř výhradně jen ve frakci č. 6.



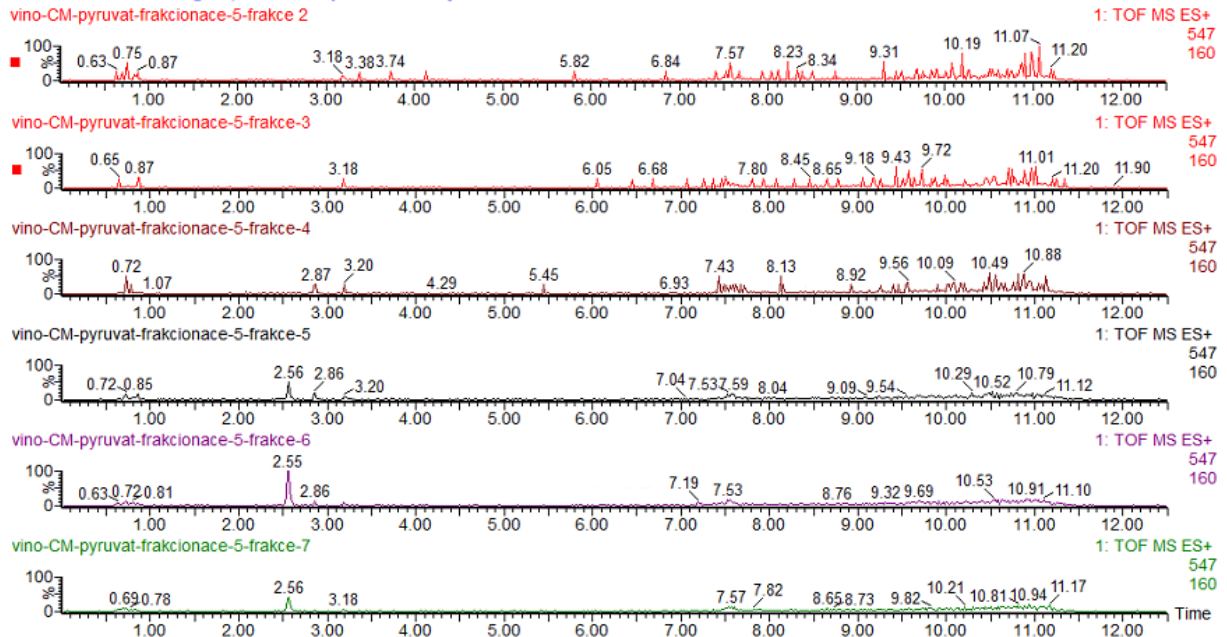
Obr. 96 Výřez z hmotnostního spektra frakce č. 6



Obr. 97 Struktura 5-karboxypyranopetunidin-3-glukosidu a jeho vzniklého fragmentu

frakcionace na silikagelu, frakce rozpustena v okys COOH voda 500 uL

vino-CM-pyruvat-frakcionace-5-frakce 2

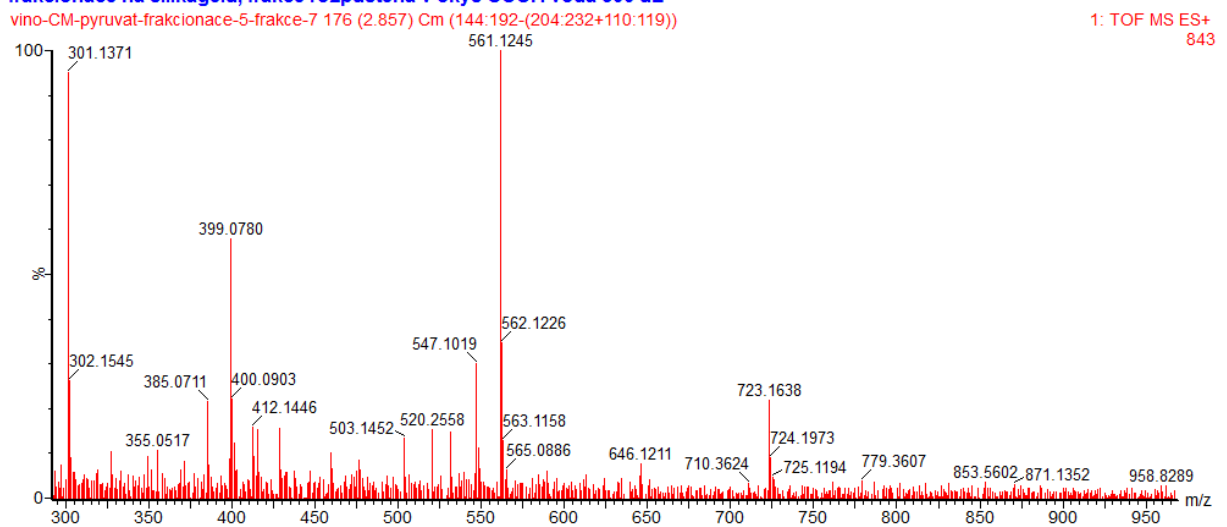


Obr. 98 Chromatogramy iontu m/z 547,1140 v jednotlivých frakcích

Spektrum poslední měřené frakce č. 7 je znázorněno na obrázku 99. Intenzity anthokyaninů 5-karboxypyranopetunidin-3-glukosid o m/z = 547,1019 (Obr. 97, odchylka od skutečné hodnoty 12,6 ppm) a vitisinu A o m/z = 561,1245 (Obr. 56, odchylka od skutečné hodnoty 0,2 ppm) jsou porovnány na obrázcích č. 98 a 94. Ve spektru se také nachází aglykony zmíněných anthokyaninů (m/z 399,0780 a 385,0711).

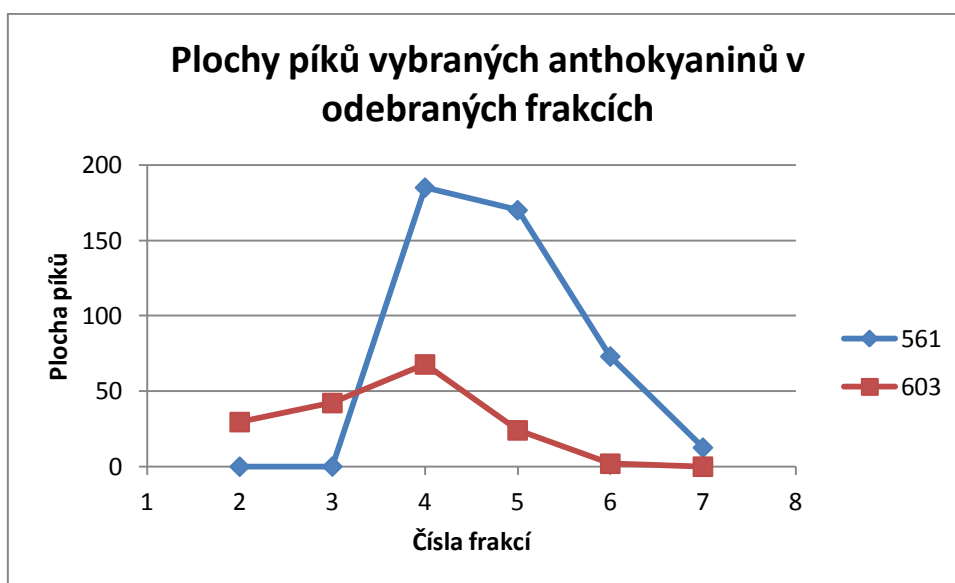
frakcionace na silikagelu, frakce rozpustena v okys COOH voda 500 uL

vino-CM-pyruvat-frakcionace-5-frakce-7 176 (2.857) Cm (144:192-(204:232+110:119))

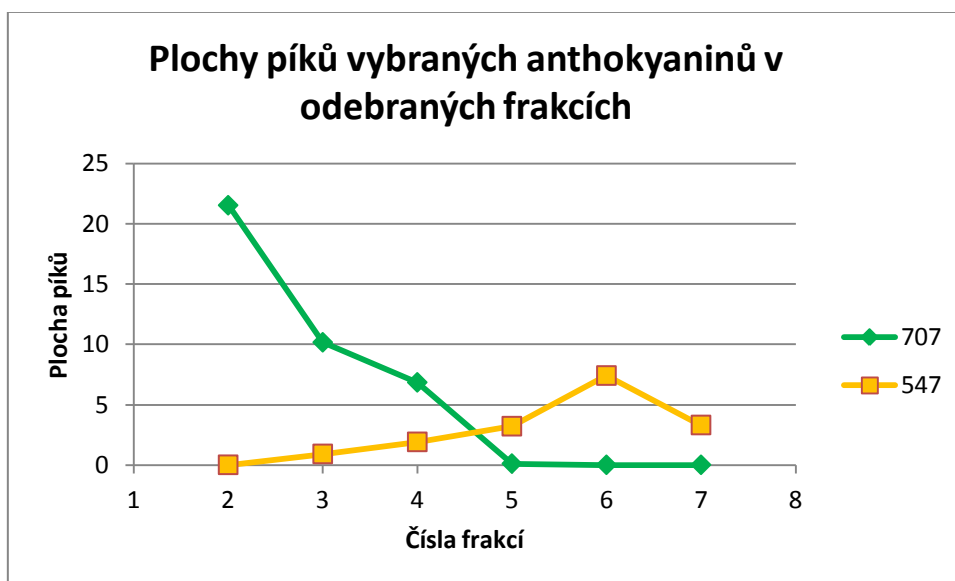


Obr. 99 Výřez hmotnostního spektra frakce č. 7.

Na obrázku 100 a 101 jsou znázorněny plochy píků vybraných anthokyaninů v odebraných frakcích. Z grafu je patrné, že množství anthokyaninu vitisinu A (m/z 561) nabývá největší intenzity ve frakci č. 4, dále postupně klesá. Množství acetylvitisinu A (m/z 603) dosáhlo maxima také ve frakci č. 4, dále postupně klesá a v poslední frakci se už nenachází zcela vůbec. Množství coumaroylvitisinu A (m/z 707) nabývá největší intenzity ve frakci č. 2, dále postupně klesá. Množství 5-karboxypyranopetunidin-3-glukosidu (m/z 547) dosahuje maxima ve frakci č. 6.



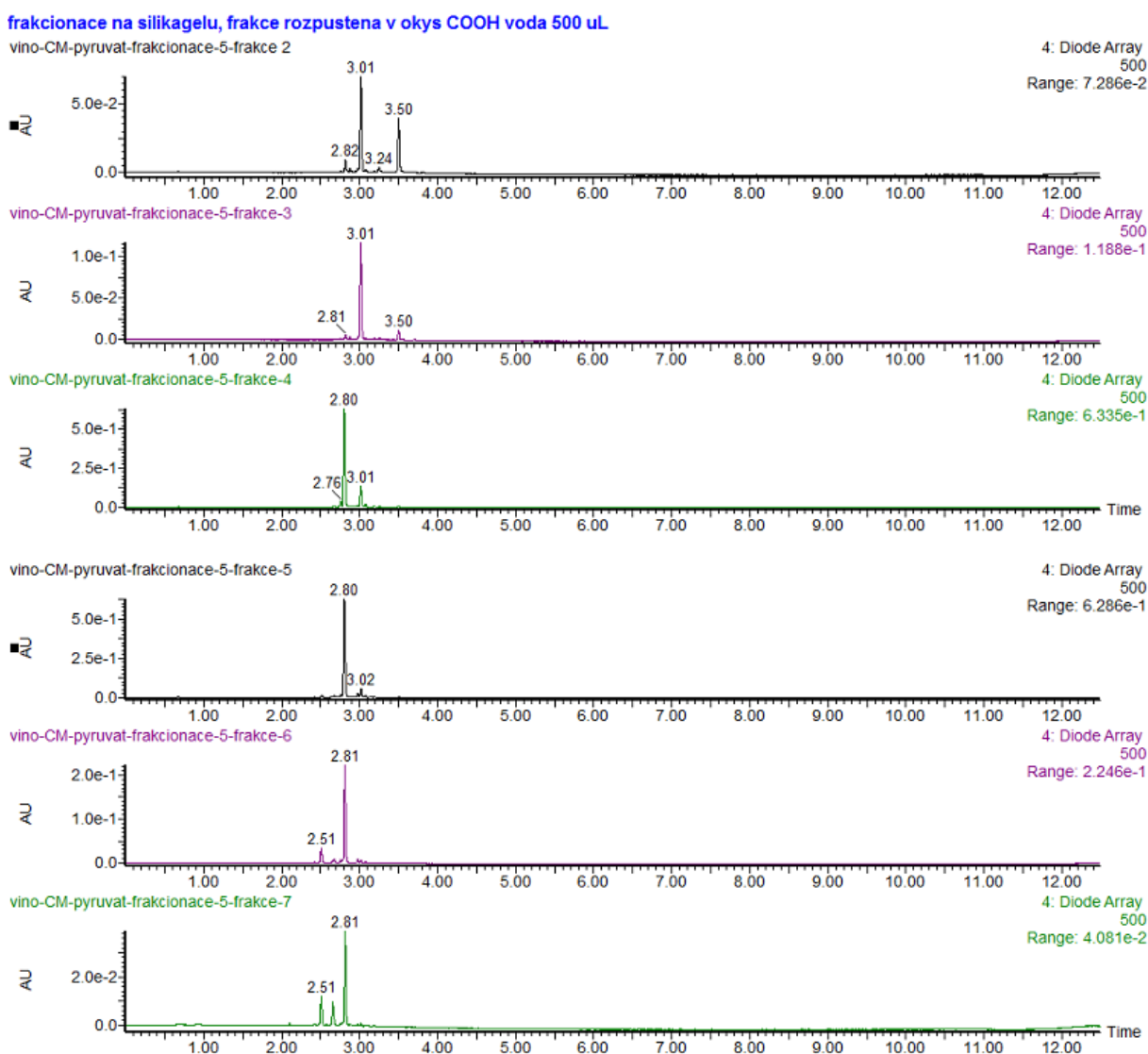
Obr. 100 Plochy píků vitisinu A (561) a acetylvitisinu A (603) v odebraných frakcích



Obr. 101 Plochy píků coumaroylvitisinu A (707) a 5-karboxypyranopetunidin-3-glukosidu (547) v odebraných frakcích

Výsledky ukazují, že pro frakcionaci pyranoanthokyaninů je možné použít silikagel v systému HILIC. Separace probíhá podle typu acylace na cukerném zbytku pyranoanthokyaninů a výsledkem jsou frakce obohacené různými pyranoanthokyaniny.

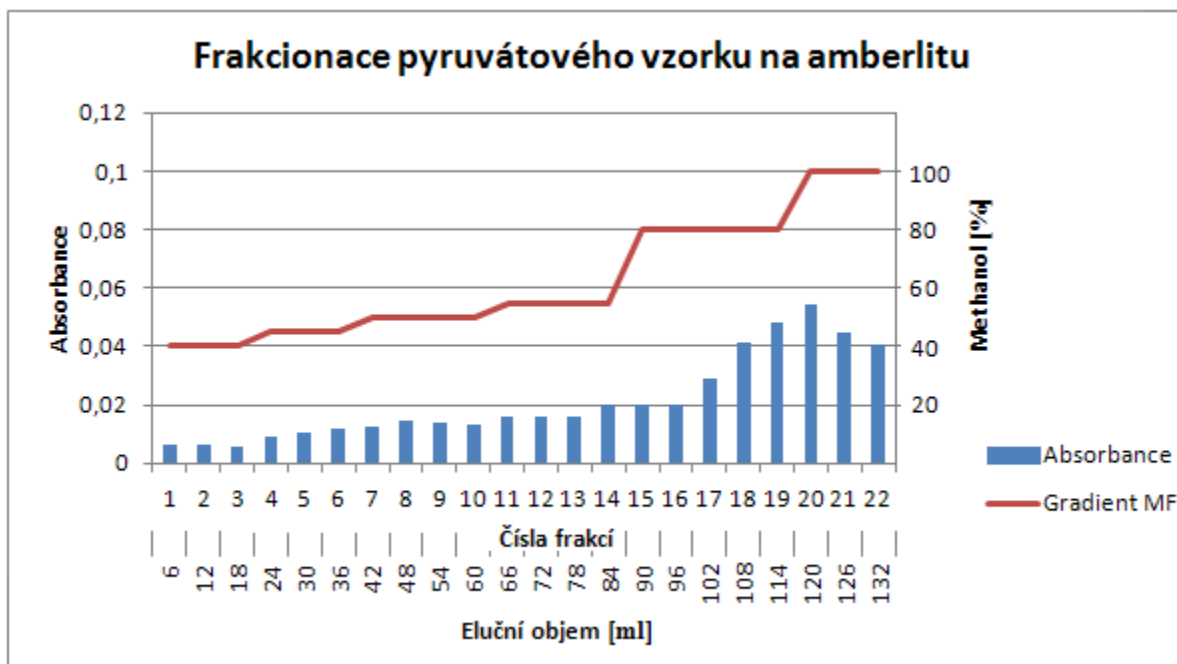
Obrázek 102 ukazuje, že v HILIC systému jsou látky frakcionovány v pořadí od nejméně polárních k nejpolarnějším. Frakcionace a následná UPLC metoda jsou tedy systémy vzájemně chromatograficky ortogonální. Frakce č. 5 a 6 nabízí možnost izolace vitisinu A s vysokou čistotou.



Obr. 102 Chromatogramy vybraných frakcí při vlnové délce 500 nm pořízené metodou UPLC/MS

8.2.3 Frakcionace na sorbentu Amberlit XAD 16

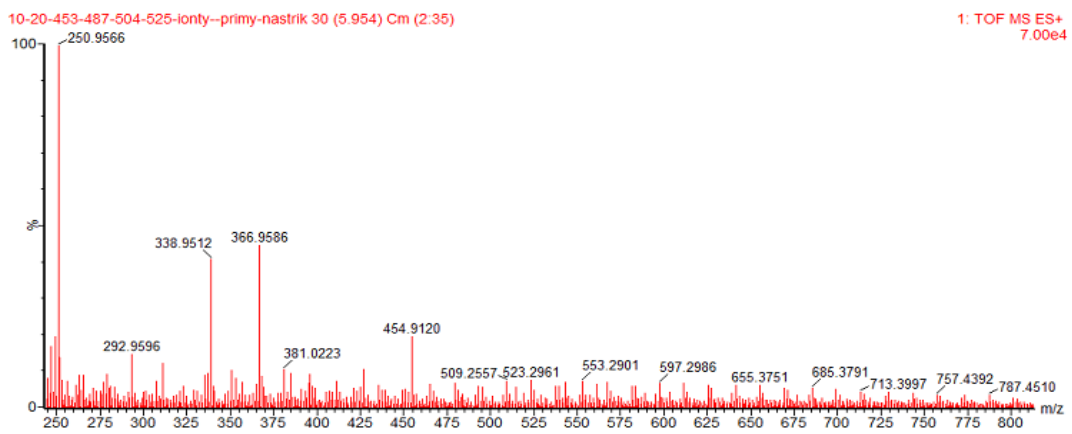
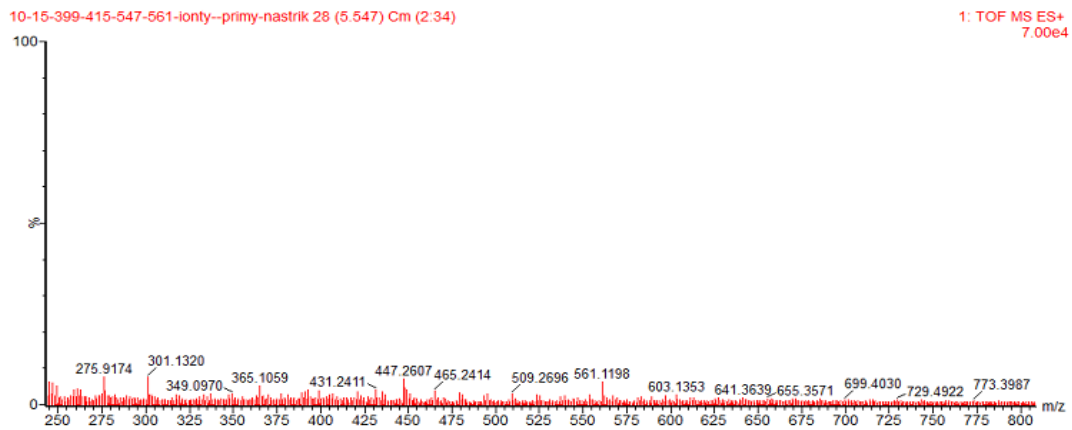
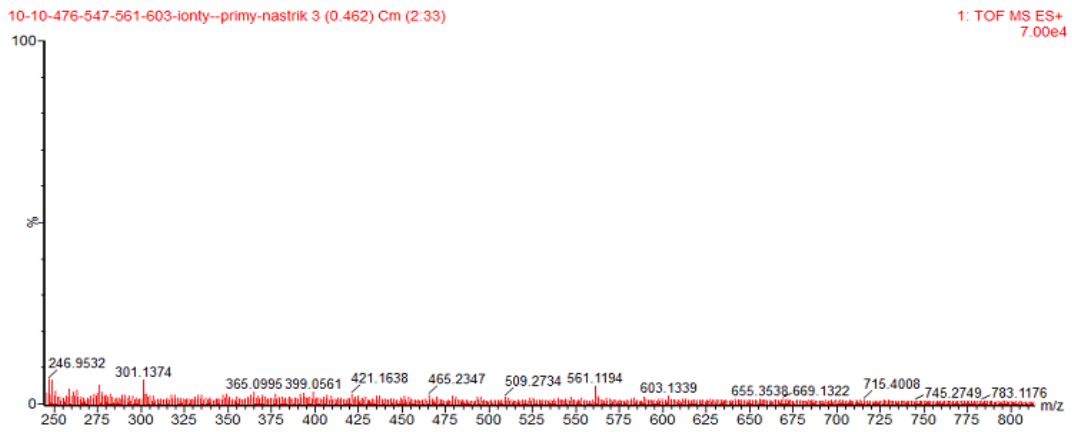
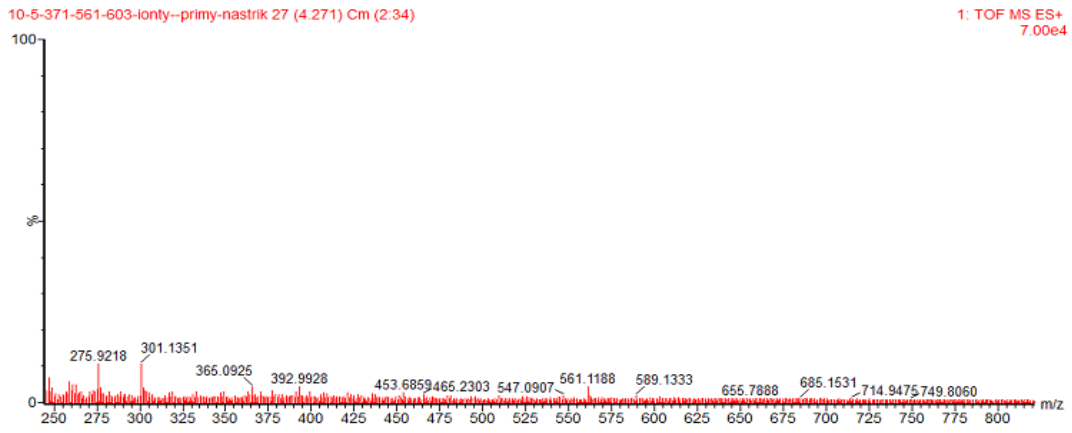
Při frakcionaci vzorku vína obohaceného pyrohroznovou kyselinou na sorbentu Amberlit XAD 16 bylo nasbíráno celkem 22 frakcí. Z obrázku 103 je patrná závislost absorbance při vlnové délce 500 nm na jednotlivých odebraných frakcích a elučních objemech. K bližší analýze frakcí byla použita metoda UPLC/MS, kolizní spektra byla získána přímým nástřikem do ESI-MS.



Obr. 103 Závislost absorbance na odebraných frakcích a elučních objemech

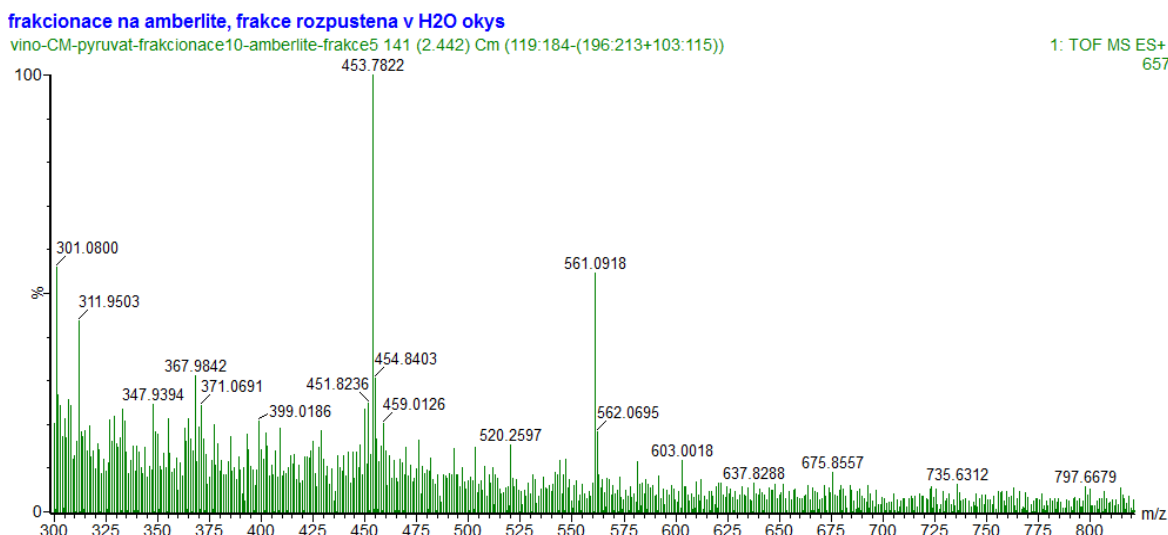
K analýze byly vybrány frakce 5, 10, 15 a 20, po lyofilizaci byly rozpuštěny v 0,5 ml vody okyselené 0,1% HCOOH (v/v).

Na obrázku 104 jsou znázorněna MS spektra frakcí č. 5, 10, 15 a 20 pořízená přímým nástřikem do MS. Spektra jsou poskládána tak, jak byla odebírána a jsou vztažena na jednotnou intenzitu $7,0 \cdot 10^4$ imp.



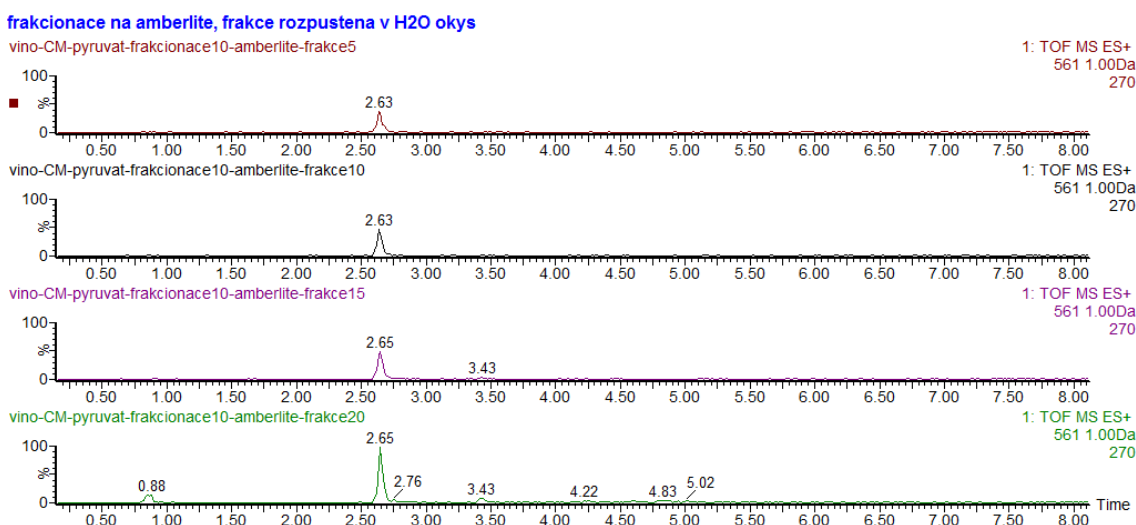
Obr. 104 MS spektra frakcí č. 5, 10, 15 a 20 získaných při separaci vzorku vína obohaceného pyrohroznovou kyselinou na sorbentu Amberlīt XAD 16

Na obrázku 105 je znázorněn výřez z MS spektra získaného z UPLC/MS experimentu průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-4 min a odečtením základní linie z frakce č. 5. Nachází se zde ion o m/z 453,7822, který se vyskytuje téměř v každé frakci, bude se jednat o neznámý balastní ion.



Obr. 105 Výřez z hmotnostního spektra frakce č. 5

Ve frakci č. 5 se nachází vitisin A ($m/z = 561,0918$, Obr. 56) a acetylvitisin A ($m/z = 603,0018$, Obr. 30). Intenzita zmiňovaných anthokyaninů má v této frakci nejmenší hodnotu ve srovnání s frakcemi ostatními, největší množství se nachází v poslední frakci (vitisin A – Obr. 106, acetylvitisin A – Obr. 107). Ve spektru se nachází také jejich aglykon m/z 399,0186.

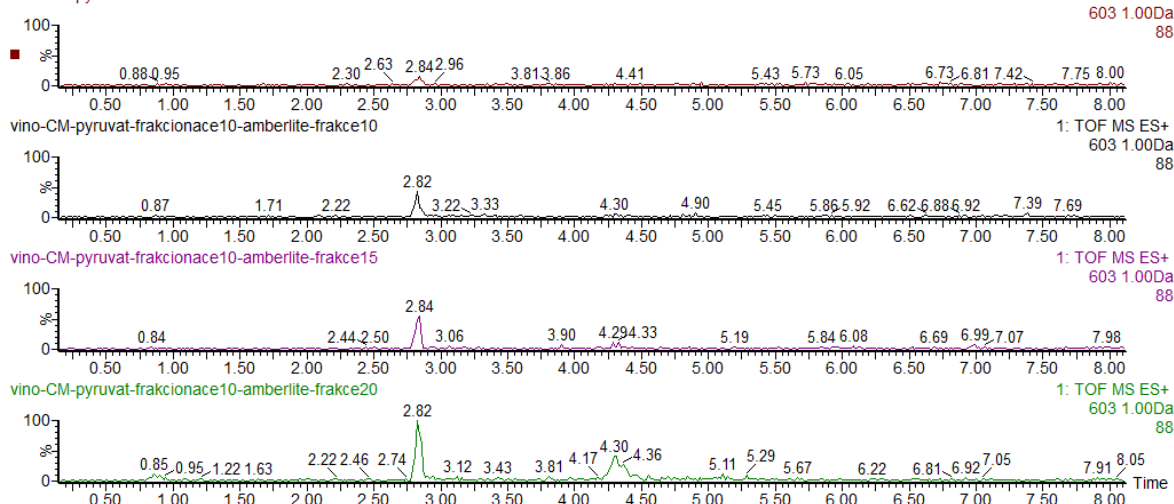


Obr. 106 Chromatogramy iontu m/z 561,0918 v jednotlivých frakcích

frakcionace na amberlite, frakce rozpustena v H2O okys

vino-CM-pyruvat-frakcionace10-amberlite-frakce5

1: TOF MS ES+
603.100Da
88



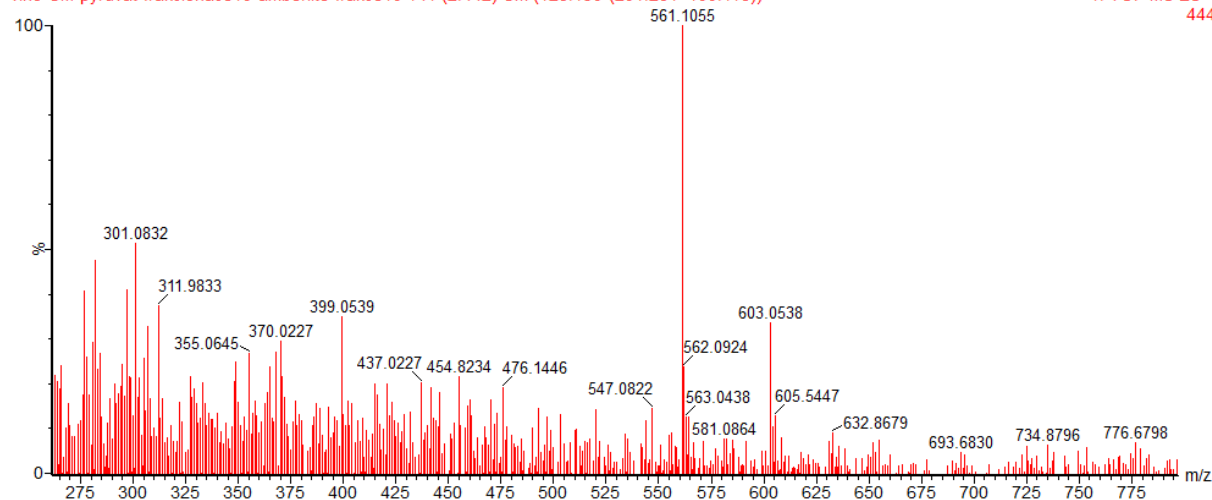
Obr. 107 Chromatogramy iontu m/z 603,0018 v jednotlivých frakcích

Výřez z hmotnostního spektra frakce č. 10 pořízeného z UPLC/MS analýzy průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-4 min a odečtením základní linie je znázorněn na obrázku 108. Ve spektru se opět nachází vitisin A o $m/z = 561,1055$ s odchylkou od skutečné hodnoty 33,7 ppm (Obr. 56) a acetylvitisin A o $m/z = 603,0538$ s odchylkou od teoretické hodnoty 134,6 ppm (Obr. 30). Ion 399,0539 odpovídá jejich aglykonům po odštěpení glukosy a acetylglukosy. Ve frakci se objevil i 5-karboxypyranopetudin-3-glukosid o $m/z = 547,0822$ (Obr. 97). Zastoupení vitisinu A v jednotlivých frakcích lze vidět na obrázku 106, acetylvitisinu A na obrázku 107.

frakcionace na amberlite frakce rozpustena v H2O okys

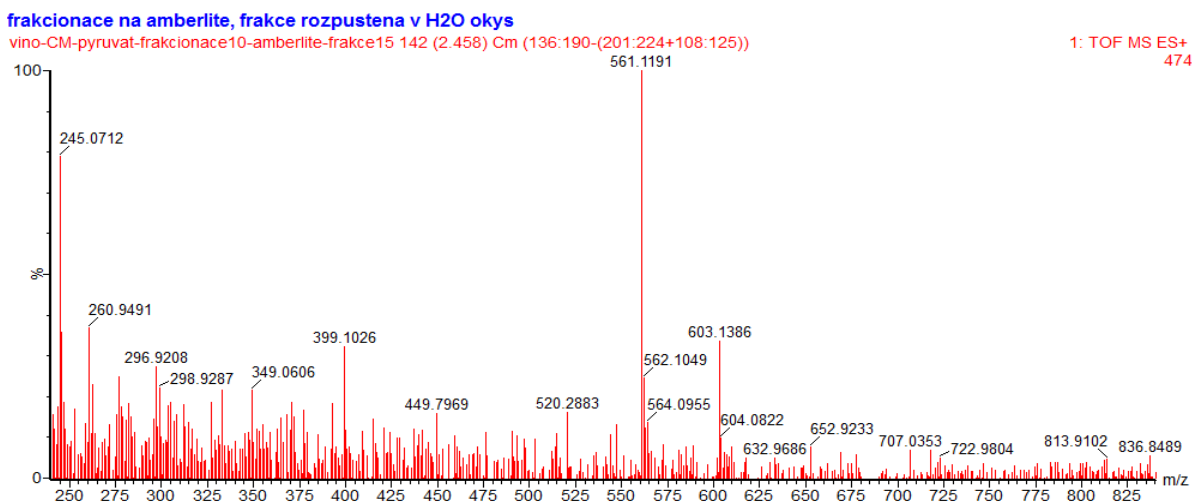
vino-CM-pyruvat-frakcionace10-amberlite-frakce10 141 (2.442) Cm (125:190:(201:231+100:116))

1: TOF MS ES+
444

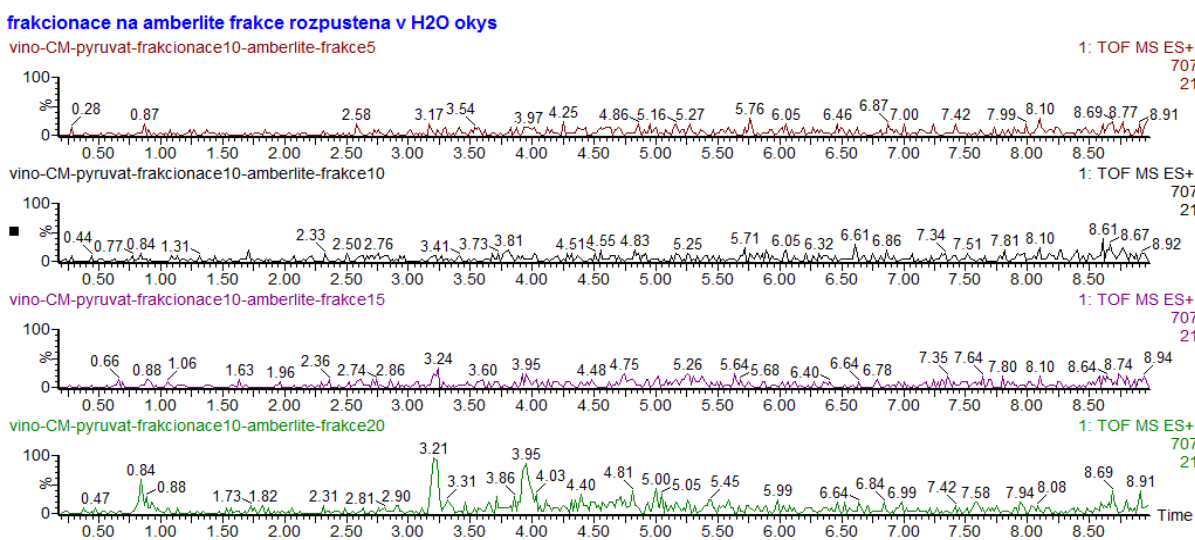


Obr. 108 Výřez z hmotnostního spektra frakce č. 10

Na obrázku 109 je vidět výřez z MS spektra frakce č. 15 pořízeného z UPLC/MS experimentu průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-4 min a odečtením základní linie. Ve frakci se opět nachází vitisin A (561,1191, Obr. 56, odchylka od teoretické hodnoty 9,4 ppm), acetylvitisin A (603,1386, Obr. 30, odchylka od teoretické hodnoty 6,0 ppm) a nově se ve frakci objevil coumaroylvitisin A (707,0353, Obr. 81, odchylka od teoretické hodnoty 178,1 ppm – velká odchylka může být způsobena nedostatečným odstupem signálu od šumu). Zastoupení vitisinu A v jednotlivých frakcích lze vidět na obrázku 106, acetylvitisinu A na obrázku 107. Coumaroylvitisin A byl nejvíce zastoupen ve frakci č. 20 (Obr. 110), ale v porovnání s jinými pyranoderiváty malvidinu se ve vzorku vína obohaceného kyselinou pyrohroznovou nachází pouze ve stopovém množství.

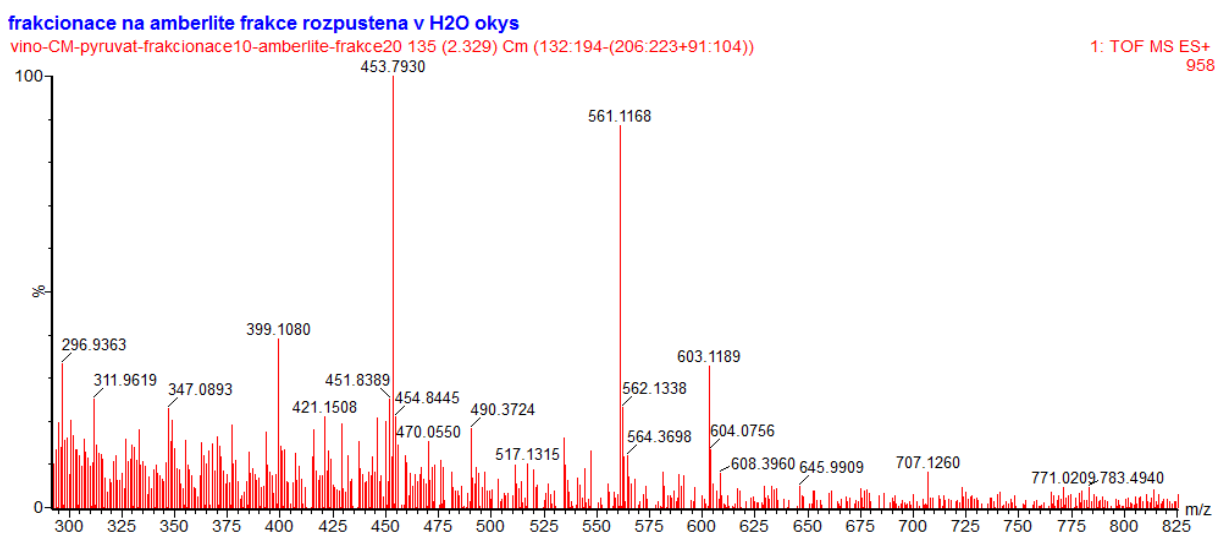


Obr. 109 Výřez z hmotnostního spektra frakce č. 15



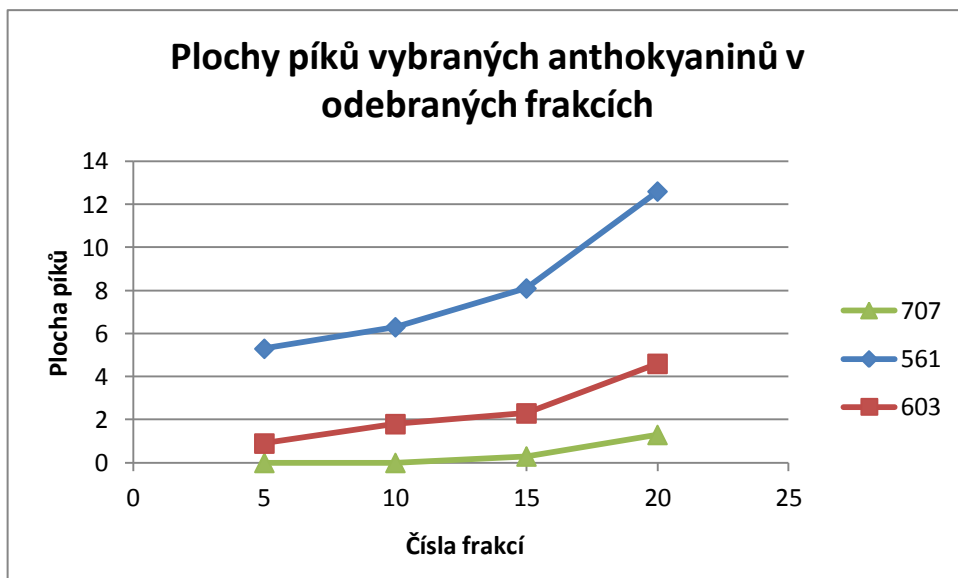
Obr. 110 Chromatogramy iontu m/z 707,0353 v jednotlivých frakcích

Na obrázku 111 je znázorněn výřez MS spektra pořízeného během UPLC/MS analýzy (průměrováním přes chromatogram v oblasti 2-4 min a odečtením základní linie) frakce č. 20, která představovala vizuálně nejintenzivnější barevnou frakci. Ve spektru se opět nachází deriváty vitisinu A, hmota 399,1080 odpovídá jejich aglykonům. Zastoupení vitisinu A v jednotlivých frakcích lze vidět na obrázku 106, acetylvitisinu A na obrázku 107 a coumaroylvitisinu A na obrázku 110. Ve frakci 20 jsou patrné dva dobře separované píky s m/z 707 (Obr. 110), pík s retenčním časem 3,21 odpovídá podle porovnání hodnot m/z coumaroylvitisinu A.



Obr. 111 Výřez hmotnostního spektra frakce č. 20

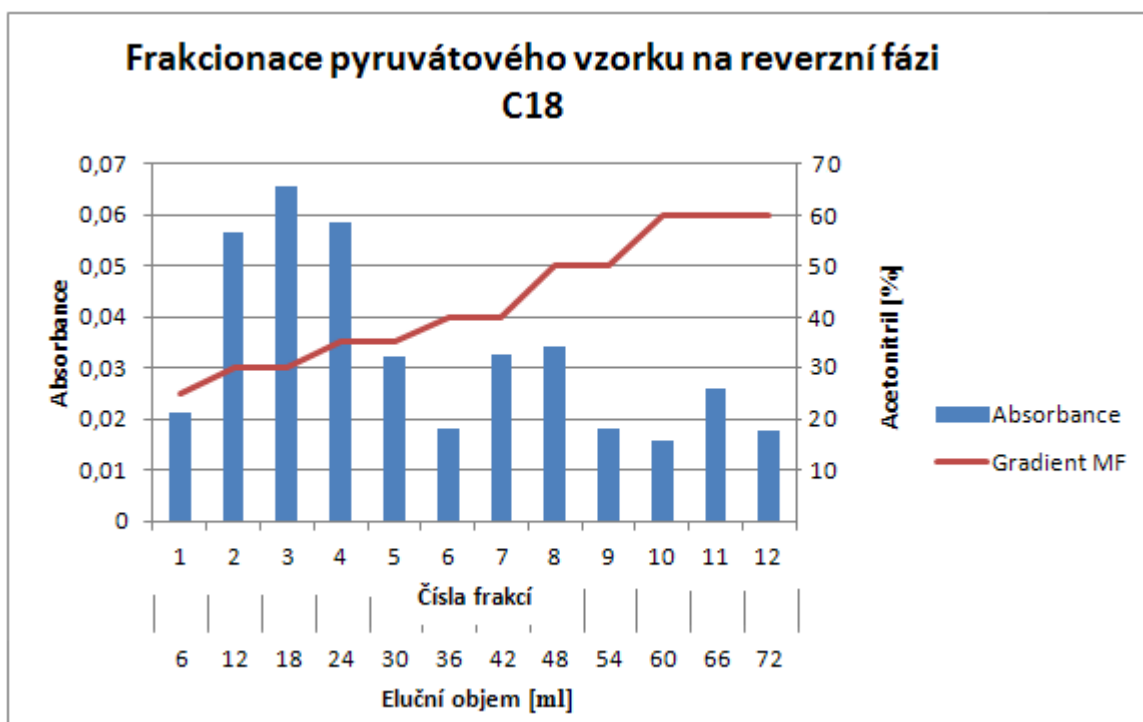
Na obrázku 112 jsou znázorněny plochy píků vybraných anthokyaninů v odebraných frakcích. Z grafu je patrné, že vybrané pyranoderiváty malvidinu (vitisin A m/z 561, acetylvitisin A m/z 603 a coumaroylvitisin A m/z 707) se nachází ve všech frakcích a liší se pouze svojí intenzitou. Lze tedy říci, že sorbent Amberlit XAD 16 není v porovnání s ostatními studovanými sorbenty příliš vhodný na frakcionaci vzorku vína obohaceného pyrohroznovou kyselinou.



Obr. 112 Plochy píků vitisinu A (561) a acetylvitisinu A (603) a coumaroylvitisinu A (707) v odebraných frakcích

8.2.4 Frakcionace na reverzní fázi C18

Při frakcionaci vzorku vína obohaceného pyrohroznovou kyselinou na reverzní fázi C18 bylo nasbíráno celkem 12 frakcí. Z obrázku 113 je patrná závislost absorbance při vlnové délce 500 nm na jednotlivých odebraných frakcích a elučních objemech. K bližší analýze frakcí byla použita metoda UPLC/MS, kolizní spektra byla získána přímým nástřikem do ESI-MS.



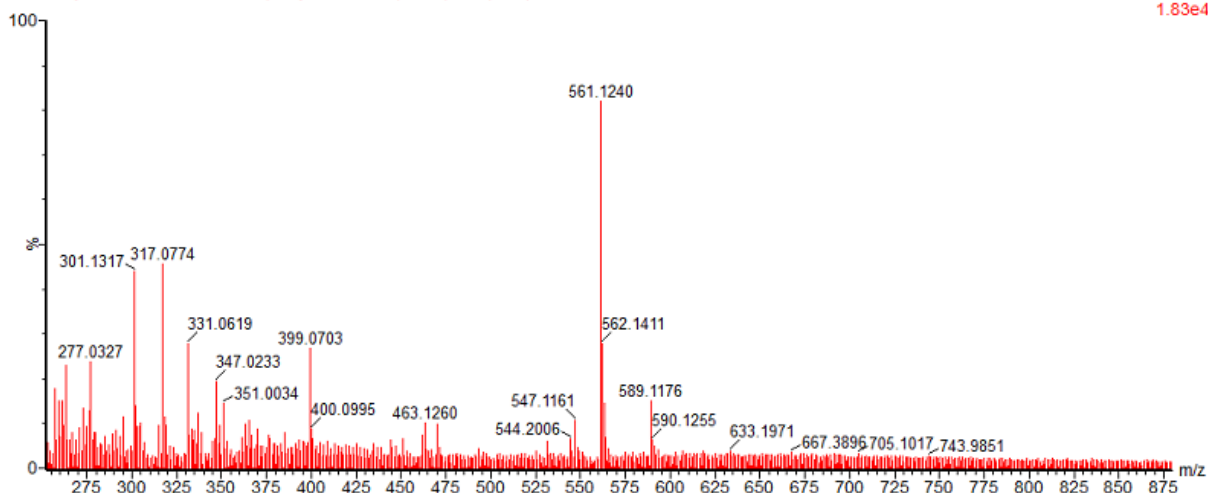
Obr. 113 Závislost absorbance na jednotlivých frakcích a elučních objemech

K bližší analýze byly vybrány frakce č. 3, 7 a 11. Po lyofilizaci byly frakce rozpuštěny ve vodě okyselené 0,1% HCOOH (v/v).

Na obrázku 114 jsou znázorněna MS spektra frakcí č. 3 a 7 pořízená přímým nástřikem do MS. Spektra jsou poskládána tak, jak byla odebírána a jsou vztažena na jednotnou intenzitu $1,83 \cdot 10^4$ imp. Frakce č. 11 představovala málo intenzivní zónu.

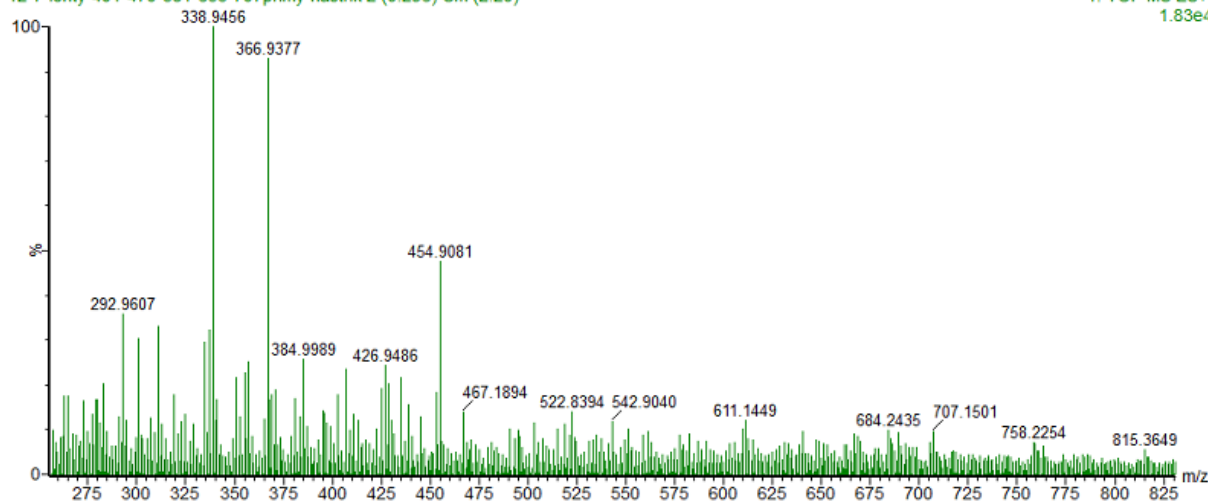
12-3-ionty-470-492-544-605-618-primy-nastrik 10 (2.237) Cm (3:21)

1: TOF MS ES+
1.83e4



12-7-ionty-401-470-581-653-707primy-nastrik 2 (0.296) Cm (2:20)

1: TOF MS ES+
1.83e4



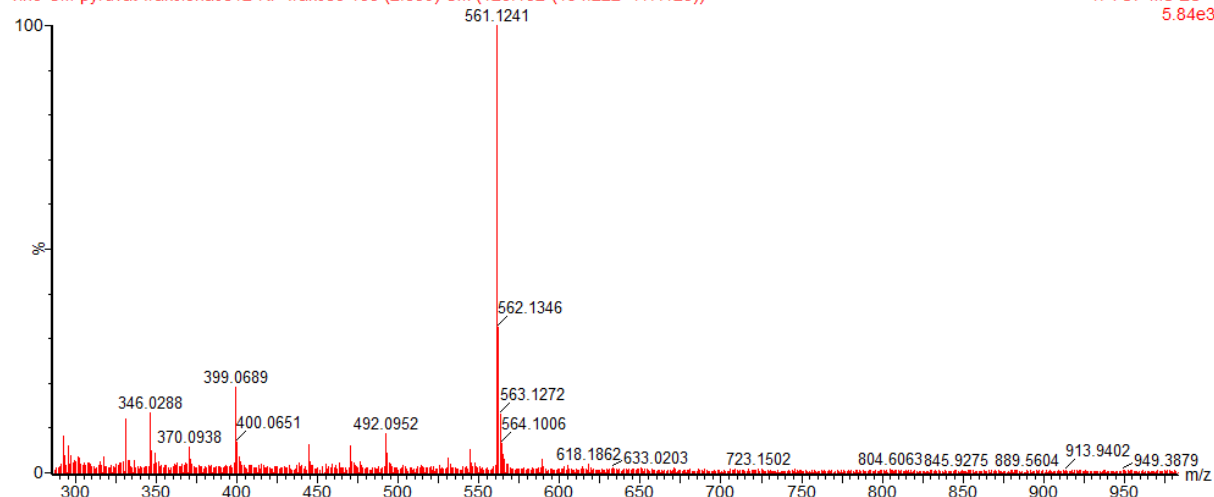
Obr. 114 MS spektra frakcí č. 3 a 7 získaných při separaci vzorku vína obohaceného kyselinou pyrohroznovou na reverzní fázi C18

Na obrázku 115 je znázorněn výřez MS spektra frakce č. 3 pořízeného během UPLC/MS analýzy (suma spekter pořízených během 2-4 minuty analýzy). Anthokyaninem o největší intenzitě je vitisin A (Obr. 56) o $m/z = 561,1241$ s odchylkou od teoretické hodnoty 0,5 ppm a jeho aglykon o $m/z = 399,0689$ (odchylka od teoretické hodnoty 6,8 ppm). Vitisin A se vyskytuje pouze ve frakci č. 3 (Obr. 116), v ostatních frakcích zcela chybí.

frakcionace na RP, frakce rozpustena v H2O oky

vino-CM-pyruvat-frakcionace12-RP-frakce3 155 (2.680) Cm (123:182-(194:222+117:128))

1: TOF MS ES+
5.84e3

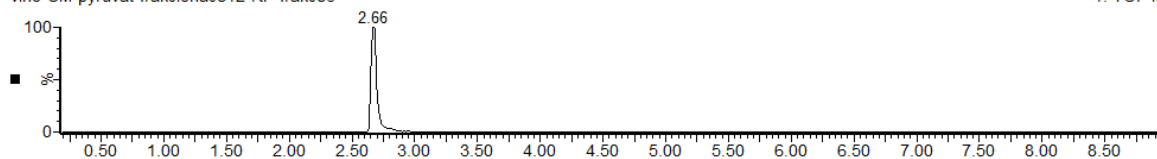


Obr. 115 Výřez hmotnostního spektra frakce č. 3 pořízené během UPLC/MS analýzy

frakcionace na RP, frakce rozpustena v H2O oky

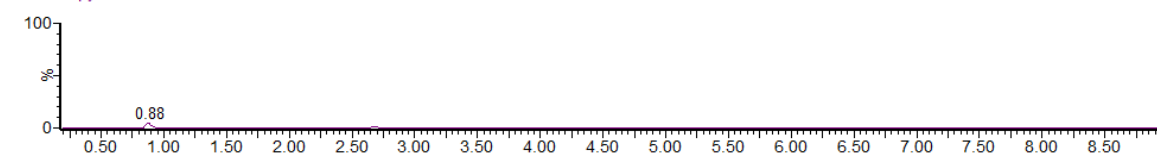
vino-CM-pyruvat-frakcionace12-RP-frakce3

1: TOF MS ES+
561
1.62e3



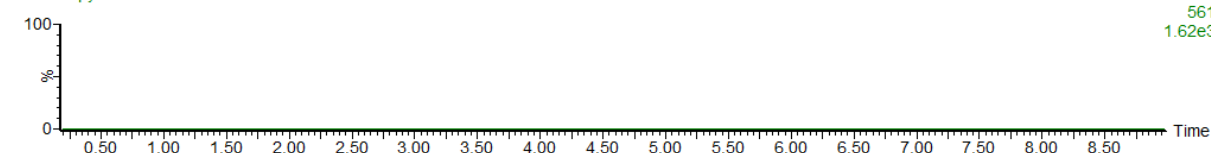
vino-CM-pyruvat-frakcionace12-RP-frakce7

1: TOF MS ES+
561
1.62e3



vino-CM-pyruvat-frakcionace12-RP-frakce11

1: TOF MS ES+
561
1.62e3



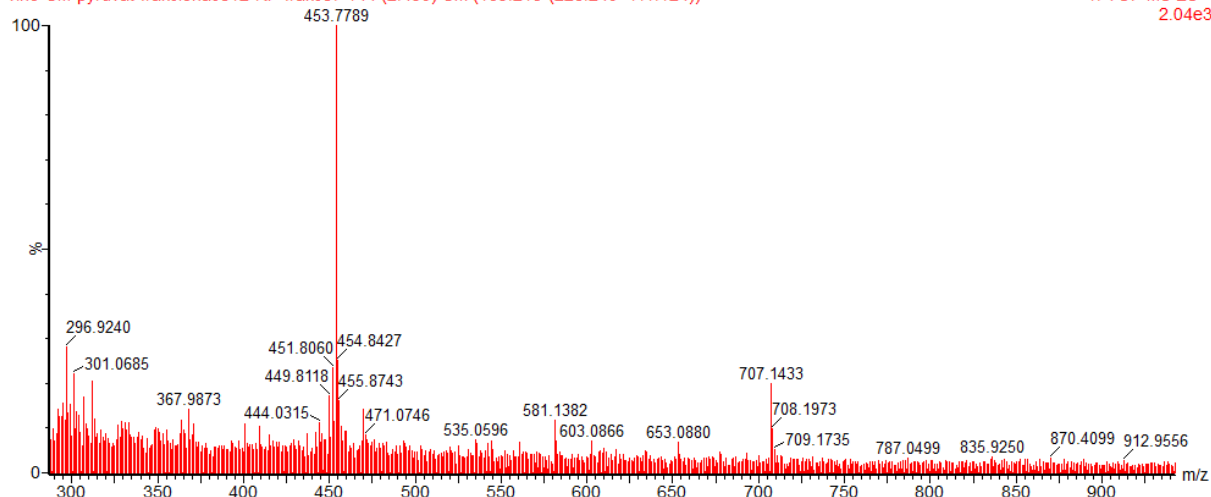
Obr. 116 Chromatogramy iontu m/z 561,1241 v jednotlivých frakcích

Výřez z hmotnostního spektra frakce č. 7 pořízeného z UPLC/MS analýzy (suma spekter pořízených během 2-4 minuty analýzy) je znázorněn na obrázku 117. Na rozdíl od předešlé frakce zcela chybí vitisin A a do popředí se dostává jeho coumaroylderivát o $m/z = 707,1433$ s odchylkou od skutečné hodnoty 25,3 ppm (Obr. 81). Zastoupení coumaroylvitisinu A v jednotlivých frakcích je znázorněno na obrázku 118. Ve spektru se vyskytuje ion 581,1382, bohužel se nepodařilo získat kvalitní kolizní spektrum, které by ion pomohlo identifikovat.

frakcionace na RP, frakce rozpustena v H2O oky

vino-CM-pyruvat-frakcionace12-RP-frakce7 144 (2.490) Cm (139:218-(226:240+111:124))

1: TOF MS ES+
2.04e3

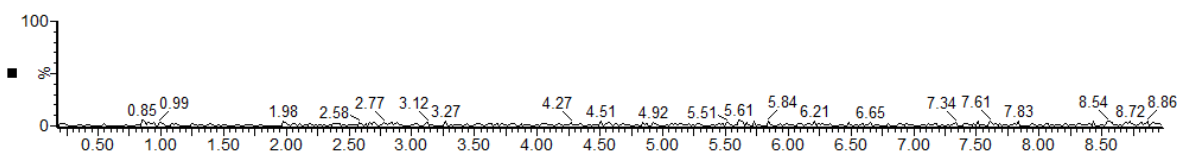


Obr. 117 Výřez hmotnostního spektra frakce č. 7

frakcionace na RP, frakce rozpustena v H2O oky

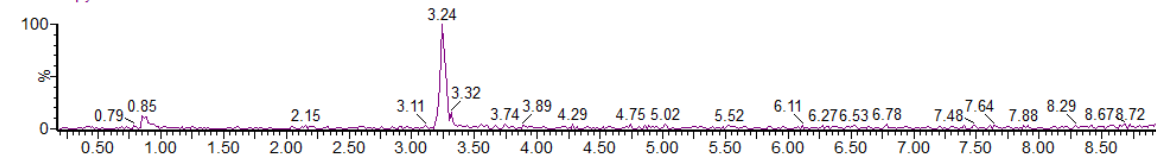
vino-CM-pyruvat-frakcionace12-RP-frakce3

1: TOF MS ES+
707
100



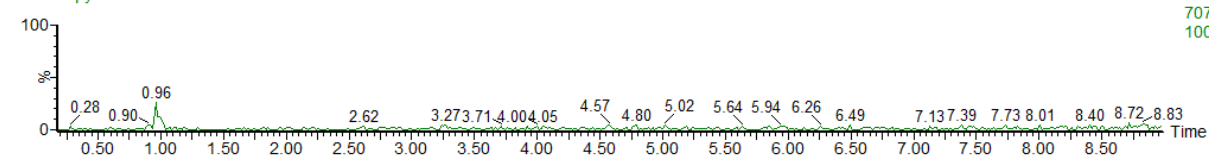
vino-CM-pyruvat-frakcionace12-RP-frakce7

1: TOF MS ES+
707
100



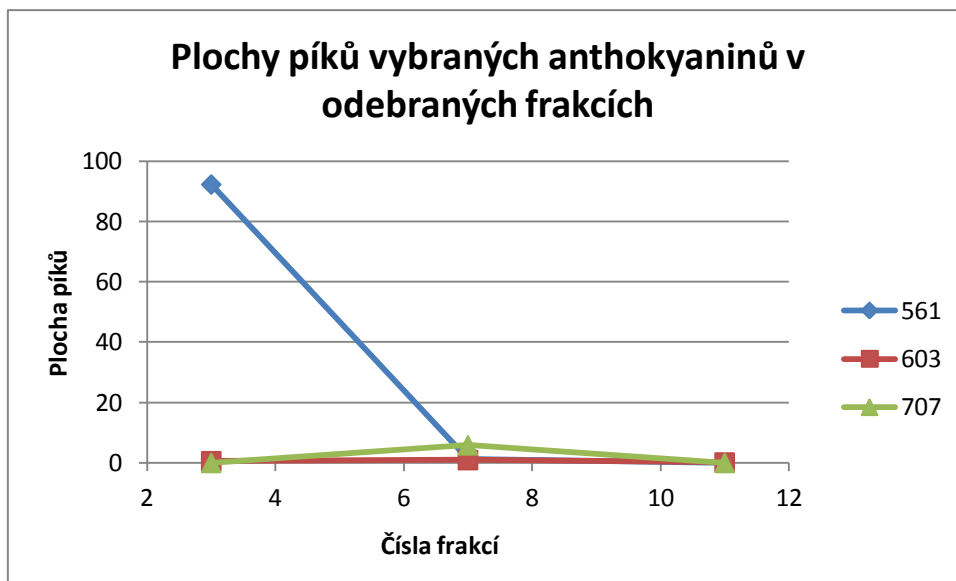
vino-CM-pyruvat-frakcionace12-RP-frakce11

1: TOF MS ES+
707
100

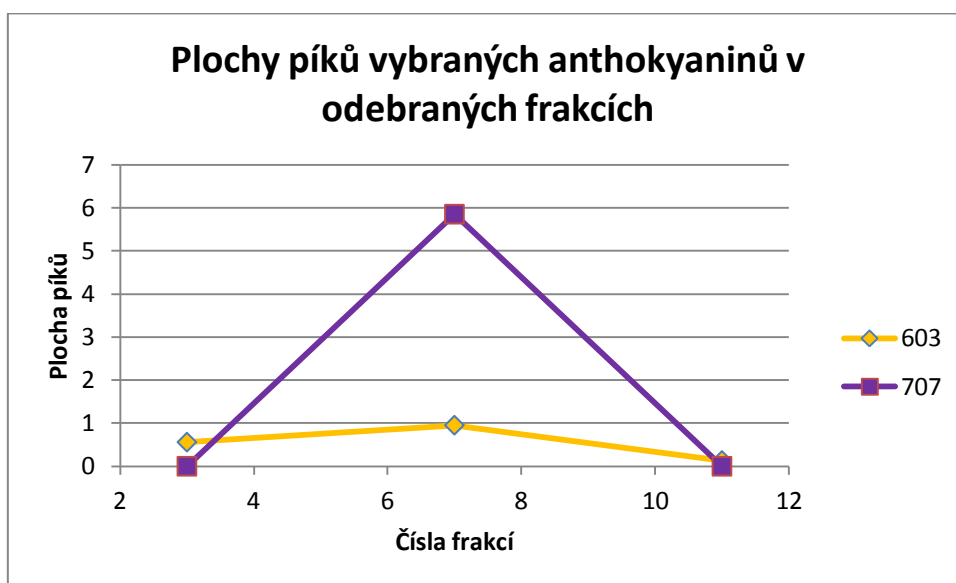


Obr. 118 Chromatogramy iontu m/z 707,11433 v jednotlivých frakcích

Na obrázku 119 a 120 jsou znázorněny plochy píků vybraných anthokyaninů v odebraných frakcích. Z grafů a spekter je patrné, že reverzní fáze C18 je vhodná pro frakcionaci pyranoanthokyaninů ve vínech, lze účinně odseparovat vitisin A od jeho acetyl a coumaroylderivátů. Při frakcionaci byla získána frakce (konkrétně frakce č. 3), která je výrazně obohacena o vitisin A.



Obr. 119 Plochy píkú vitisinu A (561) a acetylvitisinu A (603) a coumaroylvitisinu A (707) v odebraných frakcích



Obr. 120 Plochy píkú acetylvitisinu A (603) a coumaroylvitisinu A (707) v odebraných frakcích

9 ZÁVĚR

Předmětem práce bylo nalézt vhodný postup pro semipreparativní frakcionaci vzorků červeného vína Cabernet Moravia s přidavkem acetaldehydu a pyrohroznové kyseliny za účelem charakterizace profilu přítomných rostlinných barviv.

Prvním zkoumaným sorbentem byl kopolymer styrenu a divinylbenzenu (Septra SDB-L), který se ukázal být vhodný k frakcionaci vzorků obohacených acetaldehydem i pyrohroznovou kyselinou. Jak bylo zjištěno UPLC/MS analýzou, v případě vzorku obohaceného acetaldehydem dochází k separaci látek s větší molekulovou hmotností, které eluují v pozdějších frakcích (tj. dochází k přečištění iontů 927,1631; 1003,2050; 1077,2263; 1151,2543; 1209,3108 a 1283,3436). Identifikace těchto iontů je předmětem dalšího výzkumu. Výsledky také ukazují, že styren-divinylbenzenový kopolymer je možné použít pro frakcionaci pyranoanthokyaninů ve vínech obohacených pyrohroznovou kyselinou. Je možné provést semipreparativní separaci podle typu acylace na cukerném zbytku pyranoanthokyaninu.

Pokud se jako sorbent pro semipreparativní chromatografii ve sloupcovém uspořádání použije silikagel (bez chemické modifikace) v HILIC módu je možno dosáhnout velmi účinné separace pyranoanthokyaninů ve vzorku vína obohaceného pyrohroznovou kyselinou. Byly získány jednotlivé frakce obohacené vitisinem A, acetylvitisinem A a coumaroylvitisinem A. Postup umožňuje dokonce izolaci vitisinu A s vysokou čistotou. V HILIC systému byly látky frakcionovány v pořadí od nejméně polárních k nejpolarnějším. Frakcionace a následná UPLC metoda (s kolonou Acquity C18) jsou tedy systémy vzájemně chromatograficky ortogonální. Naproti tomu pro frakcionaci barviv vznikajících reakcí acetaldehydu s anthokyaniny není silikagel v HILIC uspořádání vhodnou stacionární fází.

Dalším testovaným sorbentem byl Amberlit XAD 16. Tento materiál umožňuje oddělení nízkomolekulárních látek od barviv s vyššími hmotami m/z (přibližně v rozsahu molekulových hmotností od 350 do 850 Da) ve vzorku vína obohaceného acetaldehydem. Naproti tomu Amberlit XAD 16 nenabízí zřetelné výhody pro frakcionaci pyranoanthokyaninů z vína obohaceného pyrohroznovou kyselinou.

Posledním testovaným materiálem byla reverzní fáze C18. Tento běžný materiál dovoluje ve sloupcovém uspořádání od sebe separovat skupinu identifikovaných pyrano a 5-karboxypyrananthokyaninů (tj. vitisin A, 5-karboxypyranopeonidin-3-glukosid, vitisin B a pyranopeonidin-3-glukosid) od složitějších kondenzovaných anthokyaninů jako jsou coumaroylvitisin B a 5-(4-hydroxyfenyl)pyranoMv-3-glukosid. Ze vzorků vína

obohaceného pyrohroznovou kyselinou, které jsou z hlediska počtu a druhu přítomných barviv materiálem jednodušším, je možno s využitím reverzní fáze použitým postupem izolovat vitisin A.

Pilotně byl testován moderní systém pro středotlakou semipreparativní chromatografii Knauer s kolonou Biline s reverzní fází C18. Možnosti frakcionace na tomto systému se kvalitativně shodují s klasickým sloupcovým uspořádáním.

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. da Costa C. T., Horton D., Margolis S. A.: *J. Chromatogr. A* **881**, 403 (2000).
2. Švec F.: *Chem. Listy* **103**, 266 (2009).
3. Churáček J., Jandera P.: *Separace látek (kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie)*. SNTL, Praha 1986.
4. Deyl Z., Macek K., Janák J.: *Liquid column chromatography (a survey of modern techniques and applications)*. Elsevier Scientific Pub. Co., Amsterdam 1975.
5. Churáček J. a kol.: *Analytická separace látek*. SNTL, Praha 1990.
6. Keil B. a kol.: *Laboratorní technika organické chemie*. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1963.
7. http://en.wikipedia.org/wiki/Column_chromatography. (staženo dne 22. 3. 2012).
8. Knauer H.: *Bioline Assembly instructions for glass columns*, Wissenschaftliche Gerätebau, Berlín.
9. Meyer R. V.: *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Wiley, Chichester 2010.
10. Pacáková V., Šculík K.: *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1986.
11. <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/learning-center/technical-bulletins/al-142/amberlite-amberlyst.html#A3>. (staženo 6. 3. 2012).
12. <http://www.rohmhaas.com/ionexchange/pharmaceuticals/xad.htm>. (staženo 6. 3. 2012).
13. Amberlite XAD[®] 16 Industrial Grade Polymeric Adsorbent, Rohm and Haas Company. (2003).
14. Vřešťál V. a kol.: *Hmotnostní spektrometrie*. Masarykova univerzita v Brně, Brno 2000.
15. Ho C. S., Lam C. W. K., Chan M. H. M., Cheung R. C. K., Law L.K., Lit L. C. W., Ng K. K., Suen M. W. M., Tai H. L.: *Clin Biochem Rev* **24**, 3 (2003).
16. Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha 2004.
17. De Hoffmann E., Stroobant V.: *Mass spektrometry, Principles and applications*. Wiley, Chippenham 2007.
18. Dass Ch.: *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Wiley, Hoboken 2007.
19. <http://penyfan.ugent.be/labo/joelv/Qtof.html>. (staženo dne 16. 4. 2012).
20. Nováček F.: *Fytochemické základy botaniky*. Fontána, Olomouc 1990.

21. Rivera S. M., Canela-Garayoa R.: *J. Chromatogr. A* **1224**, 1 (2012).
22. Cai Y. Z., Xing J., Sun M., Corke H.: *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6520 (2006).
23. De Rijke E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooier C., Brinkman U. A. Th.:
J. Chromatogr. A **1112**, 31 (2006).
24. Castaneda-Ovando A., Pacheco-Hernandez M. L., Paez-Hernandez M. E., Rodriguez
J. A., Galan-Vidal C. A.: *Food Chem.* **113**, 859 (2009).
25. Wu X., Prior R. L.: *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3101 (2005).
26. Stintzing F. C., Carle R.: *Trends Food Sci Tech* **15**, 19 (2004).
27. Myjavcová R., Marhol P., Křen V., Šimánek V., Ulrichová J., Palíková I, Papoušková
B., Lemr K, Bednář P.: *J. Chromatogr. A* **1217**, 7932 (2010).
28. Fleschhut J., Kratzer F., Rechkemmer G., Kulling s. E.: *Eur J Nutr* **45**, 7 (2006).
29. Wu X., Beecher G. R., Holden J. M., Haytowitz D. B., Gebhardt S. E., Prior R. L.: *J.*
Agric. Food Chem. **54**, 4069 (2006).
30. Chandra A., Rana J., Li Y.: *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3515 (2001).
31. Lapidot T., Harel S., Akiri B., Granit R., Kanner J.: *J. Agric. Food Chem.* **47**, 67
(1999).
32. Pérez - Magariño S., Gonzáles – San José M. L.: *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1181
(2004).
33. Mateus N., Silva A. M. S., Santos – Buelga C., Rivas – Gonzalo J. C., de Freitas V.: *J.*
Agric. Food Chem. **50**, 2110 (2002).
34. Wang H., Race E. J., Shrikhande A. J.: *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7989 (2003).
35. Romero C., Bakker J.: *Int J Food Sci Tech.* **35**, 129 (2000).
36. Morata A., Gómez-Cordovés M. C.Colomo B, Suárez J. A.: *J. Agric. Food Chem.*
51, 7402 (2003).
37. Sun B., Fernandes T. A., Spranger M. I.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 254
(2010).
38. Dallas C., da Silva J. M. R., Laureano O.: *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2402 (1996).
39. Rodriguez – Saona L. E., Wrolstad R. E.: *Current Protocols in Food Analytical*
Chemistry, Extraction, Isolation, and purification of Anthocyanins, Unit F1.1 (1990).
40. Endo T.: *Nature* **179**, 378 (1957).
41. Zhang Y., Liao X., Chen F., Wu J., Hu X.: *Eur Food Res Technol* **226**, 395 (2008).
42. Vivar – Quintana A. M., Santos – Buelga C., Rivas – Gonzalo J. C.: *Anal. Chim. Acta*
458, 147 (2002).

43. Alcade – Eon C., Escribano – Bailón M. T., Santos – Buelga C., Rivas – Gonzalo J. C.: *Anal. Chim. Acta* **513**, 305 (2004).
44. Vidal S., Hayasaka Y., Meudec E., Cheynier V., Skouroumounis G.: *J. Agric. Food Chem.* **52**, 713 (2004).
45. Orak H. H.: *Sci. Hortic.* **111**, 235 (2007).
46. De Rijke E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooier C., Brinkman U. A. Th.: *J. Chromatogr. A* **1112**, 31 (2006).
47. Wang J., Kalt W., Sporns P.: *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3330 (2000).
48. Hayasaka Y., Asenstorfer R. E.: *J. Agric. Food Chem.* **50**, 756 (2002).
49. Wang J., Sporns P.: *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2009 (1999).
50. Hartmanová L., Ranc V., Papoušková B., Bednář P., Havlíček V., Lemr K.: *J. Chromatogr. A* **1217**, 4223 (2010).
51. Mateus N., Silva A. M. S., Rivas – Gonzalo J. C., Santos – Buelga C., de Freitas V.: *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1919 (2003).
52. Stávek J., Papoušková B., Balík J., Bednář P.: *Int J. Food Prop*, v tisku (DOI: 10.1080/10942912.2010.511751).

11 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
C18	reverzní fáze s kovalentně navázanou oktadecylovou skupinou
C8	reverzní fáze s kovalentně navázanou oktylovou skupinou
Cy	cyanidin
Cy-3-Glu	cyanidin-3-glukosid
Cy-3-Soph	cyanidin-3-sophorosa
DAD	detektor diodového pole
DESI	desorpce elektrosprejem
DMSO	dimethylsulfoxid
Dp	delfinidin
EI	chemická ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOH	ethanol
FAB	bombardování rychlými atomy
FD	desorpce polem
FI	ionizace polem
FIB	bombardování rychlými ionty
GC	plynová chromatografie
HAc	octová kyselina
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IEC	iontově výměnná chromatografie
IT	iontová past
LC	kapalinová chromatografie
LPLC	automatizovaný systém sloupcové chromatografie
MALDI	desorpce laserem za účasti matrice
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MLCCC	protiproudá chromatografie
MPC	mikrokanálová destička

MPLC	středotlaká chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
Mv	malvidin
Mv-3-Glu	malvidin-3-glukosid
NP	system normálních fází
PC	papírová chromatografie
Pg	pelargonidin
PMT	fotonásobič
Pn	peonidin
Pn-3-Glu	peonidin-3-glukosid
Pt	petunidin
Pt-3-Glu	petunidin-3-glukosid
RP	system reverzních fází
SF	stacionární fáze
TFA	trifluoroctová kyselina
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TOF	průletový analyzátor
TSP	ionizace termosprejem
SF	stacionární fáze
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie

12 PŘÍLOHA

12.1 Fotografie pořízené během frakcionace vzorku vína s přídavkem acetaldehydu na reverzní fázi C18 pomocí MPLC na koloně BIOLINE

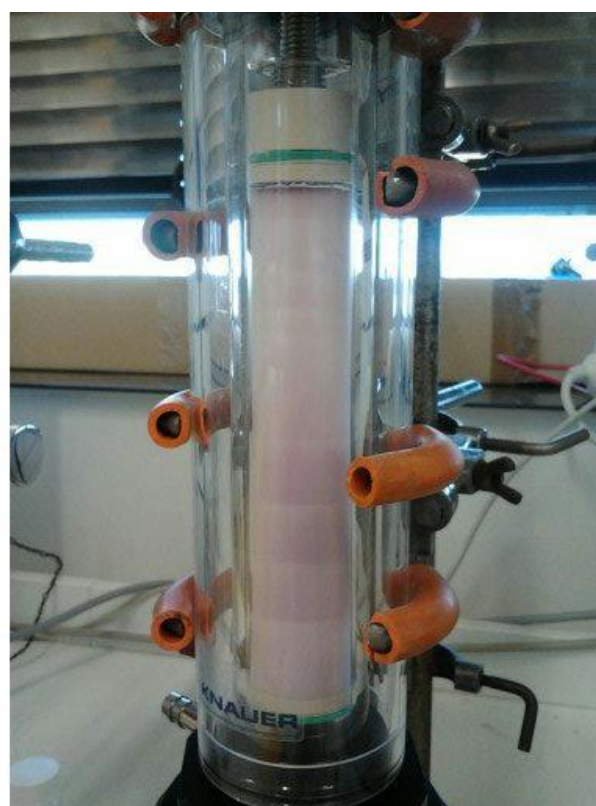
Fotografie 1 znázorňuje zařízení Bioline určenou pro středotlakou chromatografii v rozloženém stavu. Na fotografii 2 lze vidět naplněnou kolonu zapojenou s HPLC zařízením. Fotografie 3 znázorňuje transport anthokyaninů kolonou v důsledku zvyšování eluční síly mobilní fáze.



Fotografie 1 Rozložená kolona Bioline



Fotografie 2 Zapojení kolony Bioline s HPLC



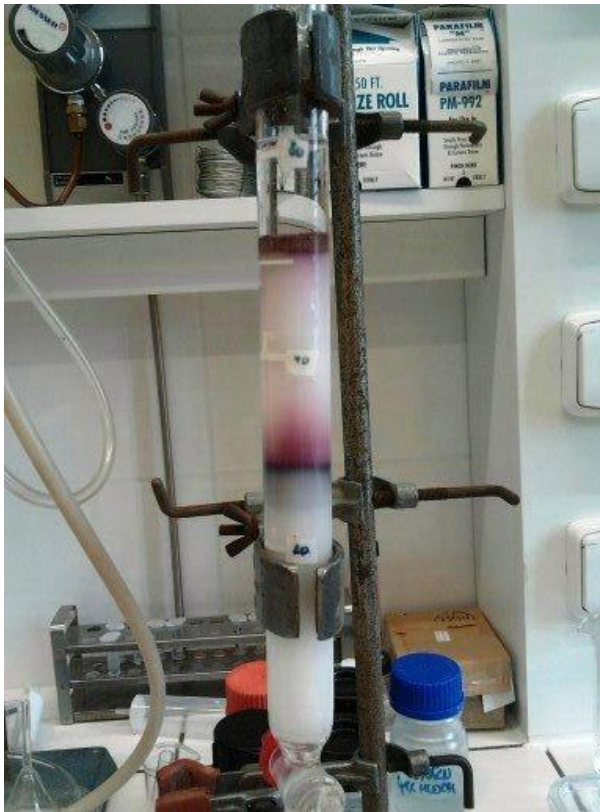
Fotografie 3 Transport anthokyaninových barviv kolonou Bioline

12.2 Fotografie pořízené během frakcionace vzorku vína s přídavkem acetaldehydu na reverzních fázích C18 ve sloupcovém uspořádání

Fotografie 4 znázorňuje nadávkování vzorku a vytvoření prvních dvou barevných zón. Na fotografii 5 lze vidět postup barevných zón kolonou při zvyšování eluční síly mobilní fáze. Fotografie 6 poukazuje na vytvoření třetí, méně intenzivní, barevné zóny. Fotografie 7 znázorňuje postup třetí barevné zóny kolonou. Na fotografii 8 lze vidět jednotlivé posbírané frakce během celé frakcionace vzorku v systému reverzních fází.



Fotografie 4 Dávkování vzorku, tvorba první a druhé barevné zóny



Fotografie 5 Postup první a druhé barevné zóny kolonou



Fotografie 6 Tvorba třetí barevné zóny



Fotografie 7 Postup třetí barevné zóny kolonou



Fotografie 8 Frakce nasbírané během frakcionace vzorku vína obohaceného acetaldehydem v systému reverzních fází C18