

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**Vývoj metod pro analýzu odpadů z vinařské výroby
a kontrolu jejich zpracování**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor: RNDr. Lukáš Kučera

Studijní program: Analytická chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Olomouc 2016

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma: „Vývoj metod pro analýzu odpadů z vinařské výroby a kontrolu jejich zpracování“ vypracoval samostatně pod odborným dohledem vedoucího disertační práce pana doc. RNDr. Petra Bednáře, Ph. D. a uvedl jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Olomouci dne.

Podpis

Na tomto místě bych rád především poděkoval panu doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a informace, ochotu a vstřícnost během celého mého doktorského studia. Děkuji také panu doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za pomoc při práci s přístrojem GC/MS, panu Mgr. Tomáši Pospíšilovi, Ph.D. a slečně Mgr. Ludmile Hradilové, Ph. D. za NMR experimenty a celé katedře analytické chemie za pomoc při řešení nejrůznějších problémů.

Souhrn

Disertační práce se zabývá možnostmi analytické kontroly fermentační směsi při výrobě bioplynu. Popisuje celý proces anaerobní fermentace, složky přítomné ve vstupním materiálu i v reakční směsi s důrazem na složení digestátu (kapalného podílu fermentační směsi, která v bioreaktoru zůstává po ukončení fermentace) a analytické metody používané pro kontrolu jejich složení. Detailní průzkum literatury, který byl v průběhu přípravy disertační práce zpracován do přehledového článku, ukazuje, že analytická kontrola složení digestátu je doposud ve vývoji. Chybí průběžná kontrola řady složek, zejména polutantů, jako jsou pesticidy, herbicidy, fungicidy a těžkých kovů, ale také nezfermentovaných cukrů, mastných kyselin a bílkovin a v neposlední řadě i kontrola profilu flavonoidních látek. Vzhledem k očekávanému nárůstu produkce digestátu v souvislosti s evropskou vyhláškou 1999/31/EC, která plánuje redukci skládkového biologicky rozložitelného odpadu do roku 2020 na 35% současně produkovaného množství, bude význam dalšího zpracování digestátu a tedy i jeho analytické kontroly narůstat.

Při vinařské výrobě vzniká velké množství rostlinného odpadu, které by bylo vhodné dále zpracovat. Mezi mnoha možnými postupy je anaerobní fermentace logickou cestou. Tato práce je zaměřena na studium anaerobní fermentace vinařského odpadu a přeměny flavonoidů za anaerobních podmínek.

První část práce je zaměřena na popis procesů, které mohou podle nastavených podmínek probíhat ve fermentační směsi během zplyňování vinařského odpadu. Vlivem působení mikroorganismů, teploty a vzájemných reakcí složek vinařského odpadu při jeho skladování a následné anaerobní fermentaci v bioreaktoru dochází k řadě rozkladných i kondenzačních procesů. Významnou roli hrají v těchto procesech flavonoidní látky. Jejich obsah ve vinařském odpadu je poměrně vysoký a tyto látky inhibují práci anaerobních mikroorganismů a komplikují proces zplyňování. Detailně nebyl osud flavonoidů během skladování odpadu a jeho anaerobní fermentace doposud popsán. V této práci byly studovány procesy rozkladu anthokyaninových barviv (kyanidin a malvidin-3-galaktosid) při pH 7 a vysoké teplotě (95°C). V roztoku byly sledovány hlavní rozkladné produkty - fenolické kyseliny (kys. protokatechová a kys. syringová) a 2,4,6 – trihydroxybenzaldehyd. Při rozkladu standardu floroglucinaldehydu byly v roztoku nalezené po jedné hodině tři nové látky. Tyto látky byly na základě fragmentačních experimentů, porovnání s autentickým standardem a literaturou identifikovány jako kondenzační produkty floroglucinaldehydu.

Vedle rozkladných procesů, lze ve vinařské technologii, při skladování vinařského odpadu a v průběhu jeho fermentace očekávat v malé míře také kondenzační reakce. Objektem zájmu této práce byl vývoj chromatografických metod pro sledování

diastereomerních můstkových barviv (+)-katechin-ethyl-malvidin-3-glukosidů vznikajících kondenzací (+)-katechinu, malvidin-3-glukosidu a acetaldehydu. Pro separaci můstkových barviv a jejich prekurzorů byla optimalizována metoda nano-kapalinové chromatografie. Její parametry byly porovnány s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií využívající analytické kolony běžných rozměrů. Nano-kolona poskytla vyšší retenci a separační účinnost v porovnání s konvenční HPLC. Na druhou stranu lepší selektivita pro oba diastereomery a vyšší rozlišení všech látek bylo získáno pomocí konvenční HPLC.

V další části této práce je popsán gasifikační proces těžko-zplynitelného vinařského odpadu v diskontinuálním mikroreaktoru. Před samotným zplyňovacím experimentem byla provedena řada experimentů pro nalezení optimálních podmínek, tj. různé poměry prasečí kejdy a vinařského odpadu, přídavek methanogenních bakterií a/nebo thioglykolátového média a úprava pH pomocí hydroxidu amonného. Účinnost bioplynového procesu byla kontrolována plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Pro odhalení chemických odlišností zplyňovaného vinařského odpadu v porovnání s běžně používanými materiály byla použita kapalinová chromatografie s vysokorozlišující tandemovou hmotnostní spektrometrií v kombinaci s analýzou hlavních komponent a ortogonální projekcí do latentních struktur. Mezi hlavními markery bylo nalezeno velké množství látek s polyfenolickou strukturou. Analýzy vzorků odebraných v průběhu acidogenní fáze a nestabilizované methanogeneze poukazují na vytvoření dihydro-flavonoidů v počátečních fázích procesu a jejich následná degradace, tj. hydroxykaempferol, hydroxybenzoylkatechin, methylkvercetin, malvidin-3-glukosid, chalkon malvidinu a redukovaný katechin. Změny v profilu flavonoidů (přeměna flavonoidů na jejich redukované formy a jejich rozklad) v nestabilizovaném digestátu mohou ovlivňovat životní prostředí, pokud budou použity například jako hnojivo. Některé redukované formy flavonoidů (např. taxifolin) vykazují totiž vyšší toxicitu (LD_{50} hodnoty) než běžné flavonoidy vyskytující se ve vinařském odpadu (např. kvercetin, malvidin atd.). Detailní kontrola chemického složení digestátu by tedy do budoucna měla být významnou součástí jeho dalšího využití.

Summary

This thesis is devoted to analytical control of composition of anaerobic fermentation mixture used for biogas production. The process of anaerobic digestion, presence of compounds in feedstock material and digestate (liquid part in reactor after anaerobic fermentation process) is discussed in first part of the work. Detailed review of published results showed that the process of analytical control of digestate is still in development. The proper control of many pollutants such as pesticides, herbicides, fungicides, and heavy metals, but also nonfermented sugars, fatty acids, proteins and monitor of the profile of flavonoid compounds is still missing. With respect to new European Notice 1999/31/EC, which plan to reduce the amount of biodegradable waste going to landfill to 35% until year 2020, the processing and analysis of digestate will be necessary. Detailed research of methods used for biogas production and digestate control was published as a review article.

During winemaking process a huge amount of waste is produced. Effective treatment of the waste is still a challenging task. Its utilization in biogas stations is one logical possibility. This work is focused on development and utilization of analytical methods for control of waste produced during winemaking and its anaerobic fermentation during gasification. The attention was paid especially to the profile of flavonoids.

The attention was paid to both decomposition and condensation processes occurring in wine waste and in the rising digestate. In the first part of thesis we are dealing with processes that can be expected in fermentation mixture during anaerobic fermentation of wine waste. Flavonoids are effective inhibitors of microbial growth and thus their presence in fermentation mixture affects the whole gasification process. The fate of flavonoids during storage and anaerobic fermentation was not described yet. In this work a degradation process was studied on anthocyanin dyes (cyanidin, malvidin-3-galactoside) by high temperature and pH. The phenolic acids (protocatechuic and syringic acids) and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde were monitored in model solutions. After one hour of degradation of floroglucinaldehyde standard three new compounds were found. These compounds were using fragmentation experiment, comparison with authentic standard and literature identified as floroglucinaldehyde condensation products.

Condensation of anthocyanins with other flavonoids occurs in plant materials and extracts. Second part of this thesis deals with the development of chromatographic methods for analytical control of diastereomeric bridged dyes - (+)-catechin-ethyl-malvidin-3-glucosides rising by condensation of (+)-catechin, malvidin-3-glucoside and acetaldehyde. A nano-liquid chromatographic method was optimized for their separation and compared with

high performance liquid chromatography utilizing analytical columns with common dimensions. Nano-LC column offered higher retention and separation compared with conventional HPLC as well. On the other hand slightly better selectivity for separation of diastereomers and higher resolution for all components of the tested mixture was found for conventional HPLC system compared to nano-LC system

Final part of this work is devoted to the study of anaerobic fermentation of hardly gasifiable wine waste in discontinuous microscale reactor. A series of gasifying experiments was performed to optimize conditions for anaerobic fermentation, i.e. optimization of ratio of pig slurry and winery waste, addition of methanogens and/or thioglycolate medium and adjusting the pH value with ammonium hydroxide. Efficiency of biogas production was monitored by gas chromatography/mass spectrometry. Liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry in combination with advanced data treatment, i.e. principal component analysis and orthogonal projection to latent structures, was used to reveal main chemical differences of gasified winery waste mixture from commonly used fermentation mixtures in agricultural biogas plants. Compounds with particular polyphenolic structures appeared among the most distinctive markers. Analysis of samples collected during acidogenic phase and unstabilized methanogenesis revealed formation of certain dihydro-flavonoids in early stages of the process and their consequent degradation, i.e. hydroxykaempferol, hydroxybenzoylcatechin, methylquercetin, malvidin-3-glucoside, malvidin chalcon and reduced catechin. Unstabilized digestate would represent a potential environmental risk when used as a fertilizer since higher toxicity of some dihydroflavonoids (e.g. taxifolin) compared to their common counterparts present naturally in wine waste (e.g. quercetin, malvidin, etc.) was described.

Obsah

Souhrn	4
Summary	6
Obsah	8
1. Úvod	10
2. Teoretická část	11
2.1. Anaerobní fermentace	11
2.1.1. Princip tvorby bioplynu	12
2.1.2. Bioplynové stanice	14
2.3. Složení plynné fáze v reaktoru v průběhu fermentace	18
2.4. Složení digestátu a jeho kontrola dle legislativy ČR	19
2.4.1. Fyzikálně-chemické úpravy digestátu	19
2.5. Využití separačních technik při kontrole anaerobní fermentace	21
2.5.1. Vzkovávání	21
2.5.2. Aplikace separačních metod pro analýzu minoritních látek	23
2.6. Flavonoidy	28
2.6.1. Rozklad flavonoidů	30
3. Cíle disertační práce	33
4. Experimentální část	34
4.1. Chemikálie	34
4.2. Přístroje a vybavení	34
4.2.1. Kapalinový chromatograf a hmotnostní spektrometr	34
4.2.2 Nano-kapalinový chromatograf s UV detekcí	35
4.2.4. NMR experimenty	36
4.2.5. Ostatní laboratorní vybavení	37
4.3. Studium rozkladu anthokyaninů	37
4.3.1. Příprava mobilní fáze a optimalizace retence	37
4.3.2. Příprava vzorků	37
4.3.3. Syntéza standardu anthrachysenu	38
4.4. Studium kondenzace flavonoidů	38
4.4.1. Příprava reakční směsi, frakcionace reakčních produktů a příprava extraktu z vylisků z červených hroznů	38
4.4.2. Příprava kapilárních kolon	39

4.5. Anaerobní fermentace vinařského odpadu	40
4.5.1. Příprava vzorku.....	40
4.5.2. Příprava mobilní fáze	41
4.5.3. Použitý software a statistické vyhodnocování dát.....	41
5. Výsledky a diskuze	42
5.1. Studium rozkladu anthokyaninů.....	42
5.1.1. Modelové roztoky anthokyaninů a floroglucinaldehydu.....	42
5.1.2. Identifikace neznámých látek vznikajících rozkladem floroglucinaldehydu	43
5.2. Studium kondenzace flavonoidů	46
5.2.1. Nano-kapalinová chromatografie	48
5.2.2. Porovnání konvenční vysoko-účinné kapalinové chromatografie s nano-kapalinovou chromatografií	53
5.3. Anaerobní fermentace vinařského odpadu	56
5.3.1. Optimalizace anaerobní fermentace.....	56
5.3.2. Analýza digestátu pomocí LC/MS	59
6. Závěr	77
Seznam symbolů a zkratk	79
Literatura	81
Přílohy	93
Curriculum vitae.....	103
Články, abstrakty a postery.....	106

1. Úvod

V současné době je anaerobní fermentace široce používaná metoda pro úpravu odpadu (zmenšení jeho množství) a využití energie, která je v něm ukryta, zejména pro výrobu levné tepelné a elektrické energie. Po ukončení zplyňování tzv. mokrou cestou (která je nejběžnějším postupem) zůstává v reaktoru nerozložený digestát (směs pevných a kapalných částí), který je bohatý na základní agrochemické prvky (dusík, uhlík, vápník, draslík, fosfor atd.). Proto je digestát hojně využíván jako hnojivo. Nicméně v digestátu se mohou nacházet také škodlivé látky, které nejsou rutinně sledovány (jejich analýza je doposud spíše součástí výzkumu). Jde především o pesticidy, polychlorované bifenyly a další agrochemikálie a organické polutanty. Digestát ovšem obsahuje i významné množství nerozložených metabolitů vznikajících při růstu a zrání surovin rostlinného původu a při jeho zpracování v potravinářském průmyslu. Zajímavým materiálem je v této souvislosti odpad vznikající při výrobě vína.

Tato práce je zaměřena na některé změny probíhající při skladování vinařského odpadu a jeho zpracování anaerobní fermentací. Jedna část práce se zabývá sledováním procesů přeměn anthokyaninových barviv přítomných v odpadu vznikajícím při výrobě červeného vína (jejich rozklad na jednodušší molekuly i vznik složitějších kondenzátů). V druhé části práce je studován proces anaerobní fermentace výlisků z červených hroznů v mikroreaktoru za kontrolované produkce bioplynu se zaměřením na osud flavonoidních látek. Tyto látky mají antibakteriální vlastnosti a představují tedy problém pro práci anaerobních mikroorganismů. Vzhledem k tomu, že studované materiály jsou složitými směsmi s řadou neidentifikovaných složek přítomných v řádově rozdílných koncentracích, je hlavní náplní práce vývoj vhodných analytických metod (založených zejména na chromatografické separaci a detekci hmotnostní spektrometrií), jejich aplikace i pokročilé postupy zpracování získaných dat. Práce si klade za cíl přispět k pochopení procesu přeměn flavonoidů ve složitém rostlinném materiálu po jejich prvním využití (např. ve vinařském průmyslu) a po jeho anaerobní fermentaci při produkci bioplynu (druhé využití), které ve svém důsledku může napomoci optimalizovat využití vznikajícího odpadu i s ohledem na životní prostředí.

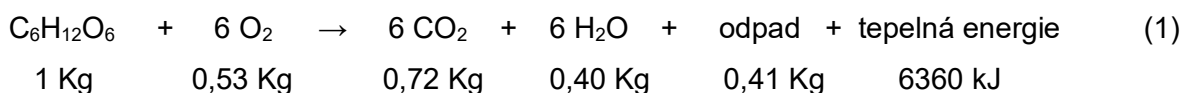
2. Teoretická část

2.1. Anaerobní fermentace

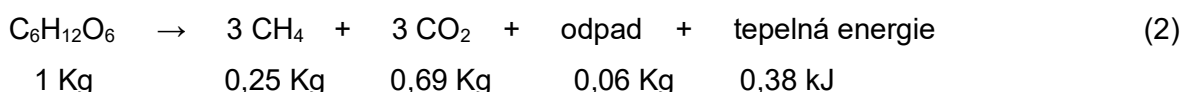
Počátky využití cílené anaerobní fermentace pro výrobu hořlavého plynu můžeme datovat na přelom 19. a 20. století, i když zmínky o možnosti vyrábět bioplyn se objevily již dříve. Tyto „bioplynové stanice“ byly situovány v čistírnách odpadních vod, kde se vzniklý bioplyn využíval na svícení a vytápění. První anaerobní bioplynová stanice byla postavena v Bombaji (Indie) už v roce 1859 v kolonii lidí nakažených leprou [1]. V roce 1895 došlo k rozmachu anaerobní fermentace v Anglii, kde byly tyto stanice optimalizovány pro zpracovávání kanalizačních splašků a vzniklý bioplyn byl využíván jako palivo pouličního osvětlení, např. v městě Exeter [2]. Od 30. let dvacátého století začíná intenzivní výzkumná činnost v oblasti anaerobní fermentace a bioplynových stanic [3].

Postupným výzkumem bylo objeveno mnoho druhů anaerobních methanogenních bakterií, díky nimž dochází k vývinu methanu. Anaerobní mikroorganismy produkující methan zasahovaly do prvních stádií vývoje planety Země až do doby, kdy se v atmosféře začal objevovat první kyslík. Kyslík je totiž pro tyto bakterie toxický [4]. Rozdíl mezi aerobní a anaerobní fermentací dobře přibližuje hmotnostní a energetická bilance rozkladu glukózy (Rovnice 1 a 2) [5].

Aerobní fermentace



Anaerobní fermentace

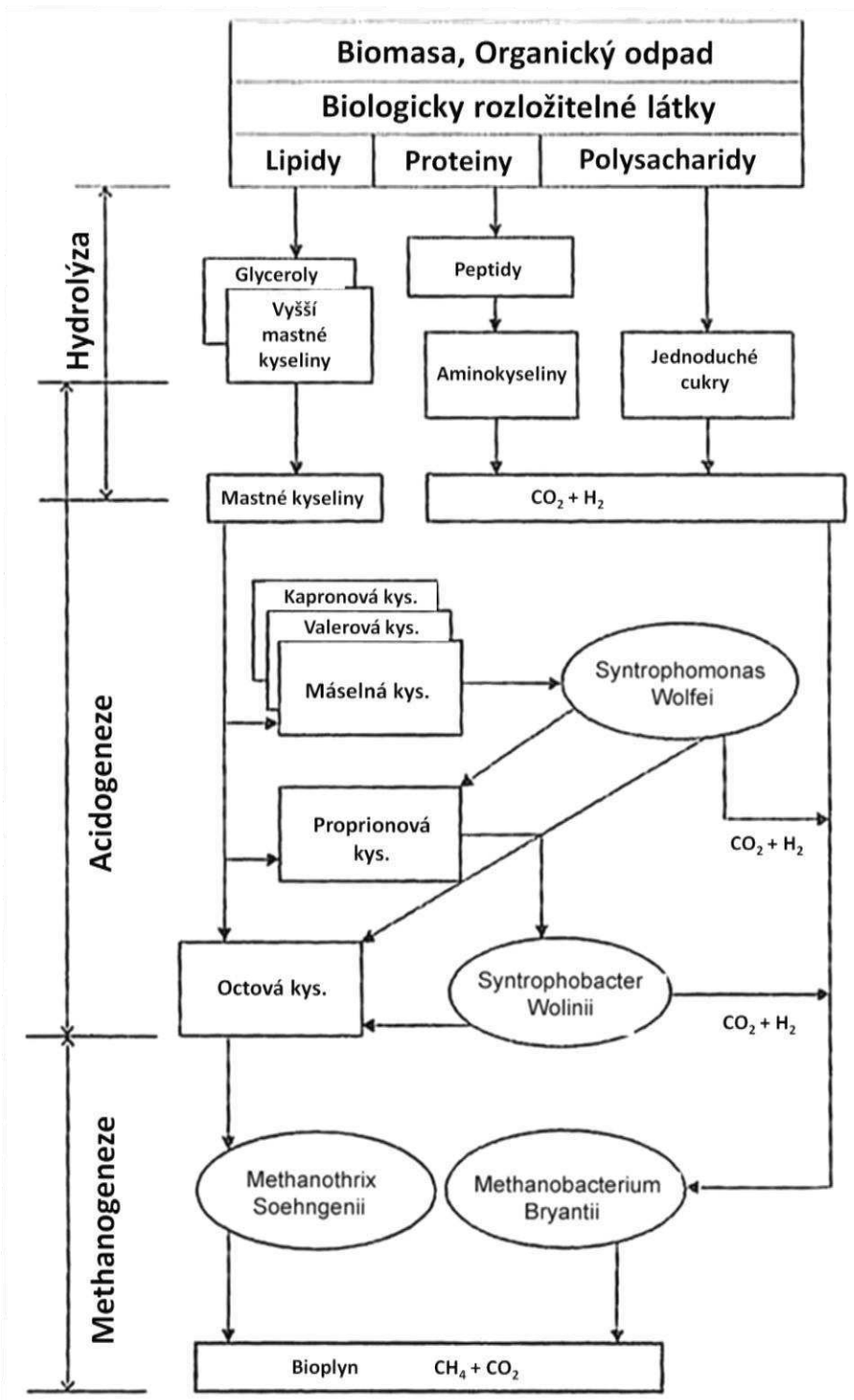


Z rovnic vyplývá, že při aerobním procesu dochází k vzniku většího množství pevného substrátu (biokalu), který se intenzivně zahřívá vzniklou energií. Tento efekt je u anaerobního procesu velmi malý nebo dokonce chybí, proto je nutné zplyňovanému materiálu dodávat energii v podobě tepla (směs v reaktoru zahřívát). I přesto však je anaerobní fermentace procesem energeticky dobře využitelným, protože je v podobě bioplynu získáno velmi účinné palivo [6]. V průběhu anaerobní fermentace se bakterie postupně množí a dochází ke zvýšení produkce methanu (a jeho poměru k oxidu uhličitému). Po skončení procesu fermentace zůstává nezplyněný odpad, který je z reaktoru odstraněn.

Anaerobní fermentaci (v některých literárních pramenech zvanou též anaerobní digesí) je možno realizovat dvěma hlavními postupy: A) při „mokrém“ anaerobní fermentaci je vstupní surovina smíchána s kapalnou složkou (nejčastěji vodou) a vložena do reaktoru, v němž je tato směs míchána a zahřívána. Po ukončení fermentace zůstává v reaktoru směs nazývaná digestát. B) při „suchém“ anaerobní fermentaci je vstupní surovina vložena do kovového koše ve vrchní části reaktoru a v určitých časových cyklech je pomocí čerpadel seshora sprchována vodou. Voda materiálem protéká a zachycuje se ve spodní části reaktoru. Tento kapalný zbytek je nazýván perkolát [7]. V této práci bude studována pouze "mokrá" anaerobní fermentace.

2.1.1. Princip tvorby bioplynu

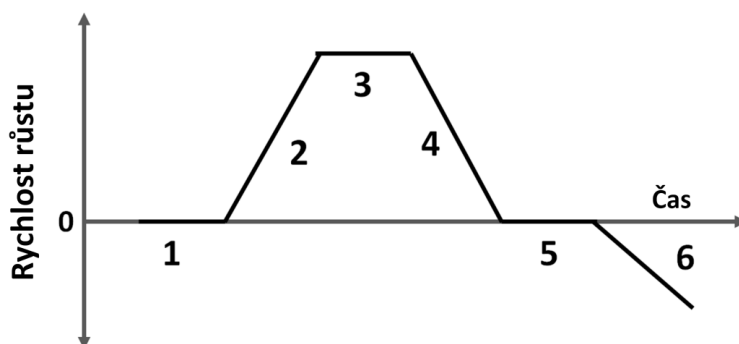
Bioplyn je převážně směs dvou plynů CO_2 a CH_4 . K jejich tvorbě nedochází ihned po vložení suroviny do reaktoru, ale vede k ní cesta přes několik stádií (viz Obr. 1). V první fázi fermentace dochází k rozkladu makromolekulárních látek na látky jednodušší. V této fázi je v reaktoru přítomen zbytkový kyslík, a proto není ještě uskutečňována methanogenními bakteriemi, nýbrž aerobními bakteriemi [8, 9]. Prvotní fázi lze tedy popsat jako rozklad (převážně hydrolýzu) biopolymerů. Z lipidů vznikají glyceriny a vyšší mastné kyseliny, z proteinů peptidy a poté aminokyseliny, a z polysacharidů jednoduché cukry. Hydrolýza postupně přechází v druhou fázi anaerobní fermentace - acidogenezi. Přechod mezi oběma fázemi není ostrý a tyto dva procesy běží po určitou dobu současně. V této fázi jsou vyšší mastné kyseliny rozkládány na nižší kyseliny (kapronová, valerová, máselná, propionová a octová) a další látky na CO_2 a H_2 (v této fázi jsou aktivní především bakterie *Syntrophomonas Wolfei* a *Syntrophobacter Wolinii*) [10]. Konec acidogeneze se podle vznikající kyseliny octové nazývá acetogeneze. Po fázi acidogeneze nastává závěrečná fáze celé anaerobní fermentace a to methanogeneze, která je uskutečňována pomocí acetotrofních (*Methanotrix Soehngenii*) a hydrogenotrofních (*Methanobacterium Bryantii*) methanogenů [11]. První zmíněný kmen bakterií je zodpovědný za přeměnu acetátu na metan a oxid uhličitý. Druhý kmen využívá pro svůj růst oxid uhličitý a vodík za současné produkce methanu [12-14]. Je tedy zřejmé, že pro kvalitní průběh anaerobní digesce je nutná přítomnost obou kmenů v reakční směsi.



Obr. 1. Schéma rozkladu organických látek při anaerobní fermentaci (publikováno s povolením autorů [15])

Rychlost růstu bakterií v methanogenní fázi je samozřejmě výrazně ovlivňována vstupní surovinou. Množení bakterií lze charakterizovat růstovou křivkou, na níž můžeme popsat 6 fází (viz. Obr. 2) [5].

- 1) Lagová fáze – dochází k adaptaci bakterií na okolní podmínky
- 2) Fáze zrychleného růstu – část mikroorganismů, jež se již přizpůsobily, se začínají množit
- 3) Fáze exponenciálního růstu – bakterie se plně přizpůsobily a rychle se množí
- 4) Fáze zpomaleného růstu – růst mikroorganismů se snižuje v důsledku vyčerpání živin a hromadění metabolitů
- 5) Stacionární fáze – z důvodů nedostatku živin je vitalita a mortalita bakterií v rovnováze
- 6) Fáze poklesu – pro nedostatek živin dochází k odumírání bakterií a jejich rozkladu



Obr. 2. Fáze růstu bakterií

1) lagová fáze, 2) fáze zrychleného růstu, 3) fáze exponenciálního růstu, 4) fáze zpomaleného růstu, 5) stacionární fáze, 6) fáze poklesu

Pro urychlení první a druhé fáze při fermentačním procesu se využívají očkovací látky (inokulum) z fermentoru v ustáleném stavu nebo se přidávají sušené stimulatory obsahující methanogeny v inaktivním stavu [16]. Některé inaktivní kmeny bakterií jsou komerčně dostupné. V některých případech jsou obohaceny o celulotické, amylolytické a proteiny rozkládající bakterie pro urychlení nástupu anaerobní fermentace [17, 18].

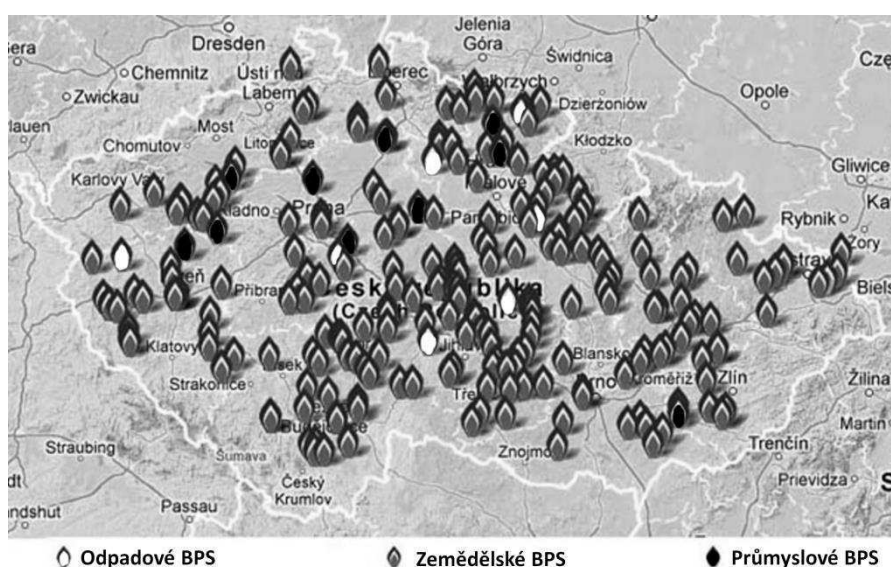
2.1.2. Bioplynové stanice

Většina bioplynových stanic je situována v blízkosti velkých farem (kravíny, vepřiny) z důvodu velké produkce kejdy a energetických zemědělských plodin (kukuřičná siláž, travní hmota, cukrová řepa atd. [19]).

Vyhláška 482/2005 Sb. o stanovení druhů, způsobů využití a parametrů biomasy při podpoře výroby elektřiny z biomasy byla novelizována vyhláškou 5/2007 Sb. a 477/2012 Sb.

Všechny tyto vyhlášky specifikují dvě kategorie bioplynových stanic, AF1 a AF2, přičemž stanice spadající do kategorie AF1 mají vyšší výkupní cenu energie. Kategorii AF1 je myšleno, že více než 50% vstupní suroviny za měsíc musí pocházet z energetických plodin [20] a zbytek musí zahrnovat jednu či více organických (ekologických) surovin jako: obilniny, odpad ze zpracování lnu, rostlinný materiál, výpalky z palíren [19] nebo meziprodukt z živočišné výroby (kejda, hnůj, močůvka) [20-22]. Pokud není možné splnit podmínky pro zařazení do kategorie AF1, pracuje bioplynová stanice v režimu AF2, která má nižší výkupní cenu energie [23]. Vhodnými surovinami pro AF2 bioplynové stanice jsou komunální a průmyslové odpady (např. odpady z potravinářského, mlékárenského, konzervářského, cukrovarnického a tabákového průmyslu) [20, 22]. Bioplynové stanice, které zplyňují odpad pocházející z masokombinátů (není myšlena kejda atp.) se musí navíc řídit Evropskou směrnicí 1774/2002.

Mapa bioplynových stanic (Obr. 3) publikovaná na stránkách České bioplynové asociace (CZBA) [24] ukazuje, že zemědělských (AF1) bioplynových stanic je mnohem více než odpadářských a průmyslových (obě patří do skupiny AF2). Tento fakt je do značné míry dán výkupní cenou. V roce 2011 byla výkupní cena energie ve skupině AF1 4120 CZK/MWh, zatímco ve skupině AF2 3550 CZK/MWh (ceny získány ze stránek Energetického regulačního úřadu [25]). V budoucnu je možné očekávat sjednocení obou kategorií na základě vyhlášky 1999/31/EC, v níž se členské státy zavazují ke snížení skládkování biologicky rozložitelného odpadu a upřednostňování jiných metod zpracování odpadu – zplyňování a kompostování. Z toho důvodu lze očekávat výrazný nárůst produkce digestátu různého chemického složení.



Obr. 3. Bioplynové stanice v České republice v roce 2012 (publikováno s povolením CZBA)

2.2. Složení kapalné části vznikající během anaerobní fermentace

Složení digestátu je úzce spjata s použitou vstupní surovinou a procesem jeho vzniku [26, 27]. Digestát může být využit jako hnojivo, ale v tomto případě je nutná prvotní registrace na Ústředním kontrolním a zkušebním ústavu zemědělském v Praze. V případě, že digestát vznikl z kejdy nebo rostlinného materiálu (siláž, sláma, etc.) je tento produkt považován za hnojivo a může být využit pro soukromé účely bez registrace [28].

Jak již bylo uvedeno v předchozím odstavci, znalost složení vstupního materiálu je nutná podmínka pro správné nastavení bioplynového systému. Celkový obsah sušiny (hmotnostní procenta) a obsah pevného organického podílu ve vstupní směsi může být kontrolován na základě výpočtu celkového množství rozložitelných organických látek. V případě že obsah organického dusíku přesahuje ve vstupní směsi 10% (w/w) z celkového obsahu organických látek, může dojít k narušení průběhu gasifikace a otravě mikroorganismů vznikajícím volným amoniakem (snadno rozeznatelným charakteristickým zápachem) a změnou (nárůstem) pH [10, 21]. pH vstupního materiálu je společně s jeho pufrovací kapacitou důležitým parametrem pro efektivní produkci bioplynu a proto je nutné kontrolovat pH vstupního materiálu ještě před jeho samotnou fermentací. Například zvířecí fekálie jsou velmi bohaté na amoniak (více než 4 g.L^{-1}) a chudé na pevný organický materiál. Z toho důvodu je nutné tento materiál smíchat s energeticky bohatou plodinou [29, 30]. V této souvislosti by rostlinný materiál s poměrem uhlík:dusík 20-100:1 neměl rušit proces anaerobní digesce. Pro plně stabilizovaný proces digesce byl určen optimální C:N poměr 20-30:1 [10, 15, 21]. Prasečí kejda s C:N poměrem 12-13:1, masokostní moučka 4-7:1, krev 3-4:1 a řepné řízky 8-12:1 jsou tedy považovány za těžko zplynitelné materiály. V případě špatného poměru C:N může být obsah uhlíku zvýšen přidávkou rostlinného substrátu jako např. sláma, tráva, atp. [10, 15, 21]. Je ale třeba zmínit, že některé druhy rostlinných pletiv (luštěniny) obsahující legumin (rostlinný kasein) v množství větším než 5% (w/w) dusíku jsou nevhodné plodiny pro úpravu C:N poměru. Další parametr ovlivňující produkci bioplynu a složení digestátu je množství přidávané vstupní suroviny do kontinuálního reaktoru [29]. V první fázi anaerobní fermentace je vhodné přivádět menší množství vstupního materiálu. V případě, že je reaktor přehlcen materiálem dochází k výraznému okyselování směsi v průběhu acidogenní fáze a reakční směs se stává nevhodným prostředím pro růst bakterií. V tomto případě vzniklý digestát bude obsahovat slabě rozložený organický materiál, pH bude v závislosti na vstupním materiálu nízké (vysoký obsah CO_2) nebo vysoké (vysoký obsah NH_3) a nebude ho tedy možno využít jako hnojivo [10, 31]. Dále je také nutné sledovat obsah lehce rozložitelných materiálů (škrob, lipidy a proteiny) a množství těžce rozložitelných materiálů (zejm. vlákniny).

Důležité je také sledovat obsah makroelementů ve vstupní směsi, které mohou být později detekovány v digestátu. Hlavní sledované parametry vstupního materiálu jsou uvedeny v Tab.1. Mikroelementy jako Cd, Pb, Hg, As, Cr, Ni, Cu, Zn, Fe, Mn nejsou běžně stanovovány ve vstupní směsi, ale pouze v konečném digestátu, pokud je plánované jeho využití jako hnojivo [26, 32].

Tab.1. Parametry kontrolované ve vstupní směsi

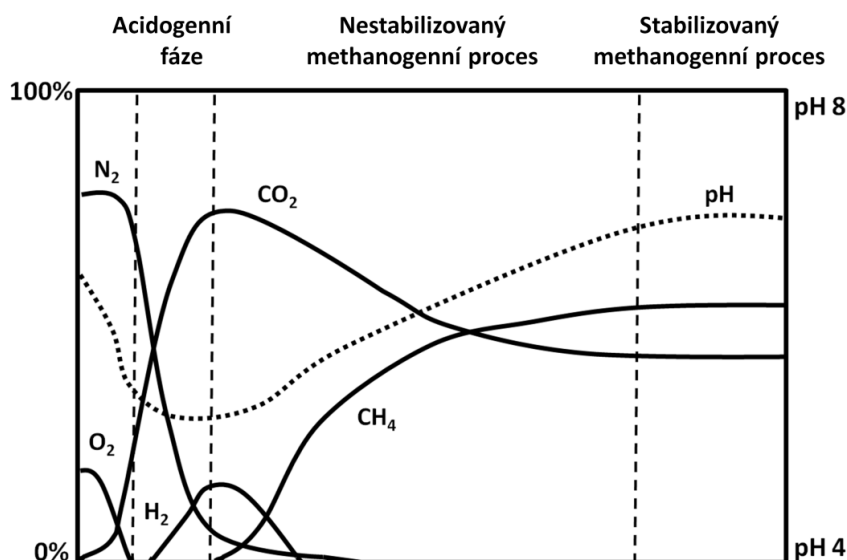
Parametr	Symbol, jednotka	Použitá metodika
Hlavní parametry		
Obsah sušiny	TS, % (w/w) v sušině	SOP 32 (ČSN EN 12879)
Rozložitelné látky	% (w/w) v sušině	SOP 32 (ČSN EN 12879)
Celkový organický uhlík	TOC, % (w/w) v sušině	SOP 56 (ČSN EN 13370)
Celkový uhlík	TC, % (w/w) v sušině	SOP 32 (ČSN EN 12879)
Chemická spotřeba dusíku	COD _{Cr} , mg/dm ³	SOP 05 (TNV 757520)
Neutralizační kapacita	ACN, mmol/dm ³	SOP 50 (ČSN EN ISO 9963-1)
pH	-	SOP 44 (JPP ÚKZUZ, Brno) potenciometrie
Lipidy	g.kg ⁻¹ v sušině	SOP 66 (JPP ÚKZUZ, Brno)
Proteiny	g.kg ⁻¹ v sušině	O-14
Škrob	g.kg ⁻¹ v sušině	C-6
Vláknina	g.kg ⁻¹ v sušině	SOP 64 (ČSN ISO 6541)
Obsah živin		
Celkový dusík	N _C , % (w/w) v sušině	SOP 61 (JPP - ÚKZÚZ, Brno) mineralizace, destilace, titrace
Amoniakální dusík	N _{NH4+} , mg.kg ⁻¹ v sušině	SOP 65 (JPP ÚKZÚZ, Brno) destilace, titrace/spektrofotometrie
Dusičnanový dusík	N _{NO3-} , mg.kg ⁻¹ v sušině	SOP 65 (JPP ÚKZÚZ, Brno) spektrofotometrie
Celkový fosfor	P _C , mg.kg ⁻¹ v sušině	SOP 62 (JPP - ÚKZÚZ, Brno) spektrofotometrie
Vápník	Ca, % (m/m) v sušině	SOP 60 (JPP - ÚKZÚZ, Brno) AES
Draslík	K, % (m/m) v sušině	SOP 60 (JPP - ÚKZÚZ, Brno) AES
Hořčík	Mg, % (m/m) v sušině	SOP 60 (JPP - ÚKZÚZ, Brno) AAS
Celková síra	S _T , mg.kg ⁻¹ v sušině	SOP 94 gravimetrie

Z Tab.1. je zřejmé, že analytické postupy doposud nezahrnují průběžnou kontrolu kontaminantů (pesticidy atd.) nebo metabolitů (zvířecí, rostlinné nebo mikrobiální), které do reaktoru přicházejí a nejsou fermentací přeměněny nebo naopak vznikají (jako vedlejší

produkty) při anaerobní fermentaci. Pro optimalizaci použití digestátu by do budoucna bylo vhodné i na tyto látky analytickou kontrolu vstupní suroviny i digestátu zaměřit.

2.3. Složení plynné fáze v reaktoru v průběhu fermentace

Analýza plynných komponent vznikajících v průběhu fermentace je důležitým krokem při kontrole optimální anaerobní digesce. Hlavními plyny vznikajícími v průběhu fermentace jsou oxid uhličitý a methan. Obr. 4 zobrazuje změny obsahu hlavních plynných složek ve vnitřní atmosféře reaktoru a změnu pH kapalného podílu v průběhu zplyňování. V první fázi fermentace (při hydrolýze) je pozorován velmi rychlý úbytek kyslíku a dusíku a pozvolný nárůst oxidu uhličitého se současným nárůstem pH. Tento jev přetrvává i v druhé fázi fermentace – acidogenezi. Ve finální fázi anaerobní digesce (methanogenezi) dojde k vysokému nárůstu koncentrace methanu se současným poklesem obsahu oxidu uhličitého. pH kapalné části je v této fázi ≥ 7 . [33, 34]. Kromě již zmíněných hlavních plynných složek, můžeme ve vnitřní atmosféře reaktoru detekovat také alifatické, alicyklické a aromatické uhlovodíky, alkoholy a thioly, aldehydy a ketony, estery, ethery, sulfidy a disulfidy, halogenderiváty uhlovodíků (včetně enviromentálních kontaminantů – polychlorované bifenyly, herbicidy, pesticidy, fungicidy), aminy a deriváty furanu. Některé z uvedených minoritních látek jsou také kontaminanty ovzduší v blízkosti bioplynových stanic a také finálního digestátu. Druh zápachu nám může pomoci přibližně identifikovat funkční skupiny navázané na těkavé látky [35-37]. V samostatných kapitolách budou dále podrobněji popsány postupy vzorkování a jednotlivé analytické metody.



Obr. 4. Změny ve složení vnitřní atmosféry reaktoru v průběhu anaerobní digesce a změna pH kapalné části reaktoru (publikováno s povolením autora [15])

2.4. Složení digestátu a jeho kontrola dle legislativy ČR

Znalost chemického složení digestátu je důležitá pro určení jeho nejvhodnějšího využití. V současnosti zahrnuje analytická kontrola digestátu pouze základní parametry, které jsou vázány příslušnou legislativou. Kontrola zahrnuje agrochemické parametry (celkový uhlík, COD_{Cr}, obsah N, P, K, Ca, Mg, S, obsah sušiny) [26] a obsah některých prvků, převážně kovů (Cd, Pb, Hg, As, Cr, Ni, Cu, Zn, Fe, Mn) které jsou obvykle stanovovány atomovou absorpční spektrometrií (FA-AAS). Další metody, které zatím nejsou součástí legislativy, pro kvantifikaci kovů v digestátu zahrnují atomovou emisní spektrometrii s indukčně vázaným plasmatem (ICP-AES), hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plasmatem (ICP-MS) a atomovou absorpční spektrometrie s generováním těkavých hydridů (HGAAS) [26, 32].

Elektrotermická atomová absorpční spektrometrie (ETA-AAS) je standardní technika pro stanovení arsenu (norma EN ISO 15586) a kadmia (norma EN ISO 5961). Atomová absorpční spektrometrie je doporučená metoda pro Mo, Zn, Pb, Cu, Ni (norma ISO 8288) a Cr (norma EN 1233). Ke stanovení rtuti je používán AMA analyzátor (norma ČSN 757440)

Mezi další stanovované parametry patří obsah tuků (gravimetrie; norma ČSN 757509), obsah hydrolyzovatelných a extrahovatelných látek, obsah vlákniny a popele (Henneberg - Stohmann – Ruškovského metoda) [29]. Obsah mikroelementů je výrazně ovlivněn historií vstupního materiálu. Například Cu objevující se v hovězí kejďě pochází převážně ze síranu měďnatého, který je obvykle používán k čištění kopyt [38] a zinek z oxidu zinečnatého používán pro úpravu střevní mikroflóry dobytka [39].

Důležité je také zmínit, že některé patogenní bakterie dokáží přežít v digestátu [40] a po jeho použití jako hnojiva může docházet k jejich množení [41, 42]. Mikrobiologická analýza je tedy další důležitý nástroj pro kontrolu digestátu. Nicméně detailnější popis mikrobiologické analýzy přesahuje rámec této práce. Na druhou stranu moderní nástroje analytické chemie dovolují analýzu biomarkerů některých druhů bakterií [43].

Důležitou otázkou je také to, co se děje s jednotlivými organickými látkami v průběhu anaerobní fermentace. Některé látky mohou například reagovat mezi sebou nebo být přeměněny na látky jiné (např. methylsiloxany, sulfonamidy a různá antibiotika). Analýza těchto látek je popsána v kapitole 2.5.2. Informace o kontrole složení digestátu a jeho využití jsou shrnuty v nedávno publikovaném v přehledovém článku [7]

2.4.1. Fyzikálně-chemické úpravy digestátu

Mnoho zemědělských bioplynových stanic je součástí farem a produkovaný digestát je využíván jako hnojivo. Nicméně, digestát obsahuje velmi vysoký obsah dusíkatých látek, které se mohou akumulovat na farmě či poli. V současnosti se vyvážení digestátu na

zemědělskou půdu řídí směrnicemi 9/2009 Sb. (Česká republika), 834/2007 a 91/676/EEC (obě Evropská unie) chránící vodní ekosystémy před znečištěním (riziko eutrofizace). Provozovatelé BPS jsou tedy nuceni k transportu digestátu na vzdálenější místa pro zamezení pronikání makroelementů (hlavně NH_4^+ a PO_4^{3-}) z půdy do podzemních vod v okolí BPS [44, 45]. Závažnost této problematiky může být popsána na bioplynové stanici v Bavorsku poblíž města Pasov. Tato BPS zpracovává zhruba 46 000 tun bioodpadu ročně a produkuje okolo 15 000 tun digestátu za rok. Takto obrovské množství digestátu nemůže být vyváženo na jednu lokalitu (pole, louka, atp.) a je tedy potřeba tuto surovinu modifikovat (viz. níže), exportovat či prodat zemědělským subjektům [46].

Digestát obsahuje až 95% vody, kterou je nutno odstranit z důvodu snížení ceny dopravy a úložného prostoru. Nadbytek vody může být například odstraněn pomocí membránové filtrace [47], reverzní osmózy [48, 49] nebo kombinací mechanického (filtrace) a teplotního odvodnění (proud horkého vzduchu) [50]. Dalším velmi často popisovaným procesem je odstranění nežádoucích složek z digestátu [49]. V prvním kroku dochází k oddělení kapalné a pevné části – nejčastěji flokulací polyakrylamidem nebo anorganickými solemi ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, FeCl_3) [51]. Alternativní metoda separace fází zahrnuje zadržení pevných složek pomocí polymerů pro flokulaci a následné oddělení rotačními bubny. Pevná část digestátu zůstává uvnitř rotačního bubnu a je dále pasterizována vysokou teplotou pro usmrcení možných patogenních organismů. Získaná kapalná část je bohatá na draslík a anorganický dusík. Dusík je možné převést pomocí nitrifikačního-denitrifikačního bioreaktoru na N_2 [49, 52]. Proces konverze amoniaku na molekulu dusíku je možno rozdělit do dvou kroků. V prvním kroku dochází k autotrofní nitrifikaci, která zahrnuje oxidaci NH_4^+ na NO_2^- a poté převedení NO_2^- na NO_3^- pomocí nitrifikačních bakterií za aerobních podmínek. Druhý krok je heterotrofní denitrifikace, která vede k redukci NO_3^- na N_2 pomocí denitrifikačních bakterií za anaerobních podmínek s organickým uhlíkem jako donorem elektronu (zejm. methanol). Proces konverze amoniaku na dusík byl kontrolován pomocí destilačního přístroje Kjeltec 1002 pro stanovení celkového dusíku. Obsah amoniaku byl stanoven titrací 0.01 mol.L^{-1} HCl za přítomnosti bromkresolové zeleně jako indikátoru [49, 52].

Dalším velmi důležitým indikátorem kvality digestátu je chemická spotřeba kyslíku (COD). COD nám pomůže specifikovat množství organických látek v digestátu. Pokud je COD parametr velmi nízký na konci fermentačního procesu, tak zplyňování proběhlo s vysokou účinností. V případě vysoké hodnoty COD probíhala anaerobní digesce špatně a digestát bude obsahovat velké množství nerozložené vstupní suroviny.

Gong a kol. (2010) navrhli snížení COD pomocí aerobní fermentace. Digestát je pumpován z anaerobního fermentoru do aerobního, kde dochází k další fermentaci. Tento typ fermentoru obsahuje membránový modul pro odstranění NH_4^+ a PO_4^{3-} iontů z fermentovaného digestátu. Po 120 dnech celkového fermentačního procesu (anaerobní-aerobní-membránová fermentace) se snížil obsah NH_4^+ iontů na 1.9 %, PO_4^{3-} na 23.4 % a COD poklesl z původního množství na 3.7 %. Takto modifikovaný digestát může být aplikován na zemědělskou půdu ve velkých množstvích, aniž by hrozilo zatížení ekosystému vysokým obsahem NH_4^+ a PO_4^{3-} iontů. Stanovení základních parametrů bylo provedeno podle standardní postupů uvedených v Tabulce 1 [53].

Digestát nemusí být využit pouze jako hnojivo, ale také jako topivo ve formě pelet [54]. Proces spalování je však silně ovlivněn složením vstupního materiálu (přítomnost těžkých kovů, těžko rozložitelné organické materiály atd.) a proto je nutná analytická kontrola digestátu před a v průběhu výroby pelet. Autoři analyzovali těžké kovy v digestátu pomocí ICP-MS (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) [54]. V literatuře se objevuje i metoda na kontrolu zastoupení kovů v popelu po spálení pelet. Zde byla použita je rentgenová fluorescenční analýza (RFA). Hirokawa et al. (2013) porovnávali AAS a RFA pro analýzu 5 kovů (Co, Ni, Pd, Ag, Au). RFA vykazovala nadhodnocené výsledky sledovaných kovů (kromě kobaltu) oproti AAS. Tento rozdíl byl pravděpodobně způsobem nedostatečným rozložením vzorku v lučavce královské [55].

2.5. Využití separačních technik při kontrole anaerobní fermentace

Hlavními plynnými složkami jsou metan, oxid uhličitý, kyslík a dusík [56]. Ve vnitřní atmosféře reaktoru se však vyskytuje také mnoho vysoce těkavých organických látek, které mohou negativně ovlivňovat anaerobní fermentaci či mít toxické vlastnosti. V tomto případě je plynová chromatografie nejvhodnější nástroj pro kontrolu složení atmosféry reaktoru. Nejčastěji užívané metody vzorkování a analýzy budou diskutovány v této kapitole.

Složení digestátu je poměrně složité a v průběhu digesce se výrazně mění. V podstatě pokrývá celé spektrum látek od biogenních a toxických iontů přes malé organické látky, mastné kyseliny, peptidy, mono- a oligosacharidy až k triacylglycerolům, proteinům a polysacharidům. K analýzám těchto látek je nejčastěji využívána kapalinová chromatografie.

2.5.1. Vzorkování

V této kapitole jsou popsány vzorkovací metody pro plynné i kapalně složky vznikající při anaerobní fermentaci.

Vzorkování pro kapalinovou chromatografie je méně komplikované. Nejčastěji se využívají vzorkovače (naběrákový, pístový, spirálový či žlábkový vzorkovač, vzorkovací trubice), čerpadla nebo průtokový vzorkovač. Tyto metody se řídí dle ČNS 015111, ČNS 015112 a ČNS EN ISO 5555. Odebraný kapalně zbytek je analyzován přímo po centrifugaci a filtraci [57-60]. Dalšími metodami úpravy vzorku jsou extrakce kapalina-kapalina, kde je jako extrakční činidlo použit pufr (např. citrátový pufr, Na₂EDTA-McIlvainův pufr) nebo organické rozpouštědlo (ethylacetát, diethylether) [61-63] a extrakce tuhou fází (např. reverzní fáze C18, N-vinylpyrrolidon-divinylbenzen) [62, 64, 65].

Nejběžnější metodou pro vzorkování plynu z bioplynových stanic je použití kontejnerů (kanystry, vaky) nebo vzorkovací trubice/vlákna [66-80]. Použití vhodné vzorkovací metody se odvíjí od druhu sledovaných látek. Vzorkovací vaky jsou velmi vhodné pro vzorkování ultra-těkavých látek, které se špatně zachytávají pomocí vzorkovacích trubic se sorbentem. Tyto vaky jsou nejčastěji vyráběny z polytetrafluorethylenu (PTFE), polyethylentereftalát-nylonu v kombinaci s hliníkovou folií která tvoří vnitřní stěnu (PET-NY-AL-CPE) nebo polyvinyl fluoridu (PVF) [81-83]. Důležité je zmínit, že pro vzorkování sulfanu musí být použity kanystry (vaky) s plastovou vnitřní stěnou, neboť může docházet k pasivaci povrchu [84]. Tomuto může být zabráněno použitím kanystrů vyrobených z jiných materiálů, než je kov. Na druhou stranu jsou kovové kanystry velmi vhodné pro vzorkování methysiloxanů oproti vzorkovacím vakům, kde je přítomné silikonové septum. Na silikonové septum se mohou sorbovat semitěkavé methysiloxany (VMS, z ang. volatile methylsiloxanes). Sorpce silikonových analytů může nastávat i na stěně skleněných nádob [85, 86].

Jiný postup vzorkování využívá zachytu analytů na pevné fázi. Tímto postupem je obvykle dosaženo i účinné prekoncentrace analytů. Extrakce pevnou fází za použití trubice plněné sorbentem (SPE) nebo vlákna (mikroextrakce pevnou fází, SPME) jsou nejčastěji používané techniky pro zachycení a zakoncentrování analytů [84, 87]. Nejběžněji využívaným materiálem ve vzorkovacích trubicích je aktivní uhlí, uhlíková molekulární síta, zeolit 13X, zeolit T, zeolit β, zeolit 5A nebo zeolit ZSM-5 [88-90]. Výhodou zachycení plyných látek v SPE trubicích je možnost připojení vzorkovacích trubic přímo k plynovému chromatografu a poté jejich uvolnění pomocí teplotní desorpce (TD) [81, 91, 92].

Autoři Lamaa a kol. porovnávali šest běžných adsorbentů (Carbotrap, Carbotrap C, Carbosieve SIII, Carboxen 1000, Chromosorb 106 a Tenax TA) pro adsorpci VMS. Zachycené látky byly následně analyzovány pomocí TD-GC/MS. Výsledkem této studie bylo

zjištění, že Tenax TA a Carbosieve SIII mají malou účinnost zachycení sledovaných látek v porovnání s Chromosorbem 106, Carbotrapem, Carbotrapem C a Carbotrapem 1000 [93]. Tassi a kol. porovnávali dvě vzorkovací metody – SPE a SPME za použití tří různých sorbentů (Carbosieve 111, Carboxen B a Carboxen C) pro vzorkování těkavých organických látek (VOC, z angl. volatile organic compounds) na skládkách odpadů a v blízkosti fumarol a vulkanických a geotermálních studní. SPME byla vhodnější metoda pro vzorkování VOC bez ohledu na použitý sorbent díky rychlosti a jednoduchosti [94]. Alternativou k zachycení analytů na pevném sorbentu je extrakce (probublávání) vzorku vhodnou kapalnou fází (nejčastěji methanol). Získaný extrakt může být poté přímo dávkován do plynového chromatografu [95].

Nedávno bylo publikováno několik studií popisující nové metody pro online analýzu látek v anaerobním fermentoru [96-98]. Ward a kol. popsali online analýzu složení plynné fáze v reaktoru pomocí mikro-plynového chromatografu (μ -GC) s kapilárními kolonami (MolSieve 5Å PLOT a PLOT Q) a teplotně vodivostním detektorem. V této studii byly analyzovány pouze hlavní složky bioplynu (CO_2 , CH_4 , H_2 , N_2 , O_2) [96, 98].

2.5.2. Aplikace separačních metod pro analýzu minoritních látek

V současné době je analýza vnitřní atmosféry reaktoru zaměřena pouze na základní plyny (CO_2 , CH_4 , H_2 , N_2 , O_2) pomocí plynové chromatografie [15]. V této kapitole budou popsány metody pro analýzu látek obsažených v malém množství v bioplynu a digestátu.

Mezi nejčastější kontaminanty ovzduší v blízkosti bioplynových stanic patří těkavé organické látky [100]. Matz a kol. navrhli novou vzorkovací metodu pro online analýzu těkavých a polotěkavých organických látek. Vzorkovací zařízení je kombinací SPME a membránové extrakce s pevnou fází (MESI). Kapalná část z anaerobního detektoru je nasávána peristaltickou pumpou a analyty pronikají do membránového materiálu umístěného v ocelové trubičce vyhřívané na 37°C. Tato část zařízení je přímo napojena na GC/MS. Těkavé organické látky pronikají skrze membránu a polotěkavé organické látky zůstávají zachyceny v membránovém materiálu. Na konci vzorkování je membrána opláchnuta proudem dusíku, teplota je zvýšena na 195°C při které dochází k desorpci analytů. Desorbované látky jsou následně analyzovány pomocí GC/MS [99].

Nepříjemný zápach v blízkosti bioplynových stanic je často spojen s únikem (neplánovanou produkcí) těkavých sírných látek (VSC, z angl. volatile sulfur compounds), které jsou řazeny mezi polutanty ovzduší díky svým toxickým vlastnostem. Tyto látky jsou nejčastěji analyzovány pomocí plynové chromatografie – Tab.2. [101-103]. Jednoduchou a levnou alternativou analýzy VSC unikajících z BPS je dynamická olfaktometrie (DO), kde je

detektorem lidský nos – přesněji neurony nacházející se v nosní dutině [104]. Nicméně tato metoda neposkytuje detailní chemické složení zápachu, které je možno získat chromatograficky. Další alternativou pro měření VSC, tedy převážně sulfanu je standardní metoda zahrnující absorpci H_2S v roztoku $\text{Cd}(\text{OH})_2$ a následovanou reakci s p-amino-N,N-dimethylanilinem. V přítomnosti slabého oxidačního činidla dochází ke vzniku methylenové modři, která je následně stanovena kolorimetricky [105]. Problémem této metody je nestabilita standardního roztoku p-amino-N,N-dimethylanilinu s chloridem železitým, který musí být vždy připraven čerstvý. S ohledem na tento fakt je nemožné využívat tuto metodu při měření v terénu. V roce 2006 vládní agentura Spojených států amerických pro bezpečnost práce a zdraví (Occupation Safety and Health Administration) publikovala novou metodu pro stanovení sulfanu pomocí kapalinové chromatografie po jeho zachycení na aktivním uhlí a následné reakci s hydroxidem amonným a peroxidem vodíku. Touto reakcí dochází k převodu sulfanu na síran, který je možno snadno analyzovat pomocí iontové chromatografie [106, 107]. Baramanti a kol. navrhli metodu pro stanovení sirných látek pomocí kapalinové chromatografie s reverzní fází. VSC jsou zachyceny v alkalickém vodném roztoku p-hydroxymerkuribenzoátu za vytvoření komplexu rtuť-thiol. Tyto látky jsou poté separovány pomocí LC na C18 reverzní fází s UV-VIS detektorem a atomovým fluorescenčním spektrometrem s generováním studených par pro Hg [108].

Další významnou a zároveň problematickou skupinou látek, kterou lze nalézt v reaktoru jsou methylsiloxany pocházející z kosmetických přípravků (mýdla, tělová mléka, deodoranty, šampóny, zubní pasty atd.) z důvodu jejich možné bioakumulace a toxicitě [109]. Hlavními semitěkavými methylsiloxany nalezenými v bioplynu jsou hexamethyldisiloxan, hexamethylcyklotrisiloxan, oktamethyltrisiloxan, oktamethylcyklotetrasiloxan, dekamethyltetrasiloxan, dekamethylcyklopentasiloxan, dodekamethylpentasiloxan, dodekamethylcyklohexasiloxan a trimethylsilanol [110, 111]. Vzorkování těchto látek probíhá různými způsoby, avšak nejčastějším způsobem je odběr plynu do ocelových kanystrů. Tyto látky nejsou v průběhu anaerobní fermentace rozloženy a je tedy nutné je sledovat jak ve vznikajícím bioplynu tak i v digestátu před jeho dalším využitím [112]. V bioplynu je nutné VMS sledovat z důvodu jejich konverze na mikrokrytalický SiO_2 při spalování bioplynu. Vzniklý SiO_2 má silné abrazivní schopnosti a může tedy docházet k poničení některých dílů hnacích zařízení (motorů) [110]. Vzorek je nejčastěji analyzován pomocí plynové chromatografie s (5%-fenyl)-methylpolysiloxanovou kolonou v kombinaci s hmotnostní spektrometrií [93, 112, 113].

V průběhu anaerobní fermentace dochází ke vzniku těkavých mastných kyselin (SCFA, z angl. short-chain fatty acids) z lipidů, které jsou později rozloženy na methan a oxid uhličitý. Sledování SCFA může pomoci odhalit problémy v reaktoru v průběhu fermentace související

se špatným rozkladem mastných kyselin v acidogenní fázi. Specifickými markery jsou kyselina máselná, izomáselná a isovalerová [114, 115]. Mnoho metod pro analýzu a kvantifikaci SCFA je založeno na přímém nástřiku nebo desorpci z SPME vlákna do GC/FID [116, 117]. Další metody jsou založeny na centrifugaci a filtraci [57, 118] (případně extrakci kapalina-kapalina [61]) a analýze pomocí kapalinové chromatografie na reverzní [61] nebo amidové fázi [57] v kombinaci s UV detekcí. Pind a kol prezentovali ve svém článku novou metodu pro online analýzu SCFA založenou na membránové filtraci a měření pomocí GC/FID. [119]. Další metoda využívá multi-injekční chromatografii (multi syringe chromatography; MSC) navrhnoutou Robert-Peillardem a kol. [60]. Tato separační technika je založena na jedinečných vlastnostech monolitických kolon, umožňující rychlejší a účinnější separace zejména pomalu difundujících molekul za nízkého zpětného tlaku [120-122]. SCFA jsou v prvním kroku derivatizovány metodou popsanou v práci Robert-Peillarda a kol. [123] a poté jsou látky separovány na monolitické koloně s reverzní fází a detekovány UV detektorem.

Významnou skupinu toxických látek přítomných v digestátu tvoří organocínicité sloučeniny (OTC, z angl. organotin compounds), což jsou látky používané při výrobě polyuretanové pěny, polyvinyl chloridu a silikonů jako tepelné a světelné stabilizátory. Nejvíce používané sloučeniny organocínu jsou mono- a dialkylcínicité deriváty (okolo 70 %) [124]. I když bylo používání organocínicích látek výrazně světově omezeno, sledování těchto látek je stále nutné. Pinel-Raffaitin a kol. analyzovali organocínicité sloučeniny v bioplynu a kapalném zbytku pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací indukčně vázaným plasmatem (GC/ICP-MS). Úprava vzorku před samotnou analýzou zahrnovala derivatizaci rozpuštěných OTC v kapalném zbytku a kryogenní zakoncentrování těkavých OTC v bioplynu. Zjištěná koncentrace těchto látek výrazně převyšovala koncentraci OTC v přírodě (tj. 15 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ pro bioplyn a 150 $\text{pg}\cdot\text{L}^{-1}$ pro kapalný zbytek ze skládky odpadů) [125]. Dalšími minoritními látkami jsou siloxany. Stanovení siloxanů v bioplynu je nejčastěji prováděno pomocí plynové chromatografie, kde je ovšem problém s detekcí z důvodu koeluce s některými VOC (převážně uhlovodíky) [126]. Tomuto je možné se vyhnout použitím hmotnostního detektoru a analýzou v SIM módu nebo komprehensivní dvoudimenzionální plynovou chromatografií GC/GC pro dokonalé oddělení siloxanů od uhlovodíků [127]. Další možností je splitovat průtok z GC a vzorek současně analyzovat pomocí MS a atomového emisního spektrometru [112, 128].

V některých případech se mohou ve finálním digestátu vyskytovat veterinární antibiotika, z důvodu jejich částečného vylučování zvířaty v nemetabolizované podobě [129, 130]. Stabilizovaný digestát je často využíván jako hnojivo a residuální antibiotika mohou

ovlivňovat půdní mikroflóru a vytvářet u některých druhů bakterií resistenci vůči antibiotikům. Arikan a kol. studovali osud oxytetracyklinu v průběhu anaerobní fermentace pomocí kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem (sledování MRM přechodů). Po 64 dnech došlo k rozložení 60 % sledované látky a k mírnému nárůstu degradačních produktů (metabolitů) oxytetracyklinu – 4-*epi*-oxytetracyklin a *apo*-oxytetracyklin [62]. Riemenschneider a kol studovali osud jiné látky řazené do skupiny antibiotik – colistinu. Autoři této práce také pozorovali výrazný úbytek colisinu v průběhu fermentace. Je zajímavé, že jednotlivé vzorky byly analyzovány pouze na C18 předkolonce (4x3mm) [65]. Mohring a kol analyzovali sulfonamidy (sulfometoxazol, sulfadiazin, sulfamerazin, sulfamethazin, sulfamethoxyridazin, sulfadimethoxin, sulfatiazol a trimethoprim) které byly přidány do reaktoru bioplynové stanice a zjistili výrazný úbytek těchto látek v anaerobním reaktoru (50 %), aniž by samotná anaerobní fermentace už započala. Vysvětlením tohoto jevu může být silná adsorpce studovaných látek na částice obsažené v reaktoru [63, 131].

Z Tab.2. je zřejmé, že nejvíce používanou metodou pro analýzu složek vznikajících v průběhu anaerobní fermentace je plynová chromatografie, kdy vzorek je nastříknut do přístroje přímo (online, headspace) nebo je v první řadě zachycen pomocí sorbentu (SPE, SPME).

Tab.2. Využití separačních technik při analýze hlavních a stopových látek v bioplynu a digestátu

	Matrice	Analyty	Kolona	Detektor	Úprava vzorku	Lit.
μ-GC	Bioplyn	CO ₂ , CH ₄ , H ₂ , N ₂ , H ₂ S, O ₂	MolSieve 5A PLOT; PLOT Q	TCD	online analýza, headspace	[96, 98]
	Bioplyn	VOC	PLOT Q; OV 1	TCD	online analýza, headspace	[77]
	Bioplyn, Filtrát	VOC	Poraplot U	MS	online analýza, headspace	[69]
GC	Bioplyn	VOC	BP-1	FID	sorpční trubice	[72]
	Bioplyn	VSC	CP-SIL 5 CB	MS	SPME	[132]
	Bioplyn	VOC	DB-1	FID-PID-ELCD	vzorkovací kanystry	[67]
	Bioplyn	VMS	DB-5	MS-AES	ocelové kanystry	[112]
	Bioplyn, Filtrát	VOC	DB-5MS	MS	trubice s aktivním uhlím	[66, 68, 69]
	Bioplyn	VOC	DB-624	MS	sorpční trubice	[66, 71]
	Bioplyn	SCFA	DB-FFAP	FID	přímý nástřik, headspace	[117]
	Bioplyn	VOC	DB-VRX	PFPD	vzorkovací vaky	[103]
	Bioplyn	EtOH (+ jeho ox. produkty)	FS-CW	FID	přímý nástřik, headspace	[97]

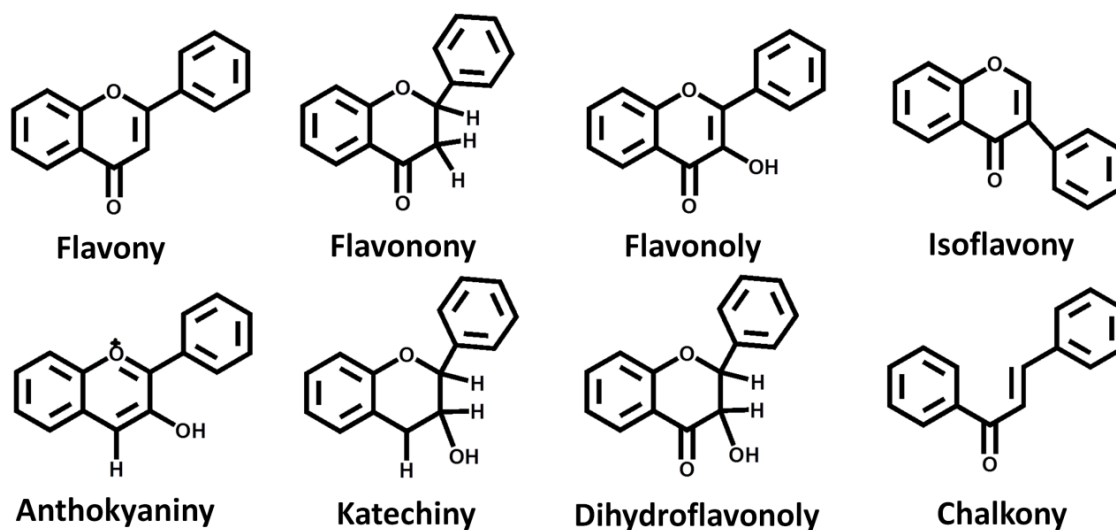
	Bioplyn	SCFA	FS-FFAP-CB	FID	přímý nástřik, headspace	[97]
	Digestát	SCFA	HP FFAP	FID	membránová filtrace	[119]
	Bioplyn	VOC	HP5	MS	SPME, sorpční trubice	[75, 77]
	Bioplyn	VMS	HP-5MS; TRB-G43; DB-1701; SUPELCOWAX 10	MS	sorpční trubice, vzorkovací vaky	[113]
	Bioplyn	VOC	HP-VOC	MS	sorpční trubice	[76]
	Plyn, Kapalina	VOC	Chromosorb PAW	TCD	SPME, sorpční trubice	[94]
	Filtrát	SCFA	Chromosorb W AW	FID	extrakce kapalina-kapalina	[119]
	Odpadní vody	VMS	Chromosorb W AW DMCS + ODPN	FPD	přímý nástřik, headspace	[101]
	Filtrát	SCFA	Chromosorb W + PPGS	FID	-	[116]
	Bioplyn	VOC	Meta.VOC	MS	SPME	[79]
	Bioplyn	Fosfan	Poraplot Q	TSD	vzorkovací vaky	[133, 134]
	Bioplyn	VOS	Rtx-VMS	MS	kryogenní prekoncentrátor	[85]
	Bioplyn	VMS standardy	Select Silanes kolona	MS	sorpční trubice	[93]
	Bioplyn	VOC	SGE BPX5	MS	vzorkovací vaky, SPME	[73]
	Bioplyn	VOC	SPB-624	MS	sorpční trubice	[74]
	Bioplyn	VMS, VOC, H2S	Supelcowax 10; Carbopack B	PID	online analýza, headspace	[111]
	Bioplyn, Filtrát	OTC	Tr-5	ICP-MS	derivatizace, kryogenní prekoncentrace	[125]
	Bioplyn	VOC, SCFA	ZB-5ms	MS	SPME	[78]
GCxGC	Bioplyn	VOC	Aluminium plot/Methylsilicone	FID	vzorkovací vaky	[70]
	Digestát/Bioplyn	VMS	SPB-Octyl kolona/DB-1 kolona	FID	vzorkovací vaky	[127]
HPLC	Filtrát	SCFA	Aminex HPX-87H Ion Exclusive kolona	UV	centrifugace, filtrace	[57]
	Digestát	Colisin	C18 Security Guard-guard kolona	MS	centrifugace, SPE extrakce	[65]
	Bioplyn	VSC	ChromSep Chromsphere 5AH C18	DAD-CVGAFS	sorpční trubice	[108]
	Digestát	ATB (trimethoprim)	Puresil C18	MS	extrakce kapalina-kapalina	[63]
	Digestát	SCFA	Synergi Polar-RP	UV	extrakce kapalina-kapalina, derivatizace	[61]

	Digestát	ATB (oxytetracykline)	Xterra MS C ₁₈ kolona	MS	extrakce kapalina-kapalina, SPE extrakce	[62]
	Digestát	ATB (sulfoaminy)	Zorbax SB C18	MS	extrakce kapalina-kapalina	[63]
	Digestát	Amino kys.	Chromolith Performace RP- 18e	ESI-MS, APCI- MS	centrifugace, filtrace	[58]
	Bioplyn	ATB směs	XDB-C18	ESI-MS	centrifugace, extrakce	[59]
MSC	Digestát	SCFA	Onyx C18	UV	centrifugace, filtrace	[60]
nano-LC	Digestát	Proteiny	nano-LC reverzní fáze	ESI-IT-MS	C18 PepMap nanotrap kolona	[64]

FID - plamenově ionizační detektor; PID - fotoionizační detektor; ELCD – detektor elektrolytické vodivosti, CD - vodivostní detektor, TCD - tepelně-vodivostní detektor, PFPD – pulzní plamenový fotometrický detektor, FPD - plamenově-fotometrický detektor, AES – atomová emisní spektrometrie, TSD - detektor se žhavenou katodou, ICP-MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem, DAD – detektor diodového pole, CVHAFS – atomová fluorescenční spektrometrie s generováním těkavých látek, IT – iontová past, MSC – multi-injekční chromatografie, ATB - antibiotika

2.6. Flavonoidy

Flavonoidy jsou látky náležející do skupiny bioaktivních polyfenolů [135]. První podrobnější výzkum těchto látek začal v roce 1936, kdy maďarský vědec Albert Szent-Gyorgi zkoumal vztah mezi vitamínem C a neidentifikovanou látkou pocházející z kůry citronů. Tuto látku nazval citrin (rutin). Později byla tato látka pojmenována vitamín P [136]. Základní struktura flavonoidů je tvořena dvěma benzenovými kruhy (A a B) propojenými šestičlenným heterocyklickým kruhem (C) [135]. Na základě rozdílů na kruhu C je možno flavonoidy rozdělit do osmi samostatných skupin (Obr. 5) [137]. Největší rozdíly v dané skupině flavonoidů jsou v hydroxylaci a methoxylaci flavonoidního skeletu a v jeho glykosylaci, případně acylglykosylaci.



Obr. 5. Struktury běžných skupin flavonoidů ukazující rozdíly na C kruhu

V rostlinách se flavonoidy nejčastěji vyskytují jako O- nebo C-glykosidy. O-glykosidy vznikají náhradou cukerné složky za hydroxy skupinu, nejčastěji v pozici 3 nebo 7 flavonoidního skeletu. U C-glykosidů dochází k navázání glykosidu přímo na uhlíkatý skelet v pozici 6 nebo 8 [138]. Flavonoidy můžeme nalézt v zelenině, ovoci, ořeších, semenech, květinách, čaji, víně atd. Jsou tedy nedílnou součástí stravy člověka [139-141]. Většina flavonoidů je barevná, a proto se také nazývají rostlinnými pigmenty. Na barevnosti se nejvíce podílí látky náležející do skupiny anthokyaninů [135, 142, 143]. V listech obsažené flavonoidy plní ochrannou funkci proti plísním či UV záření. Dále se v rostlinách účastní procesů zahrnující přenos energie, buněčné dýchání či fotosyntézu [135].

Z předešlých odstavců je patrné, že flavonoidy lze nalézt ve velkém množství v přírodě. Studie popisující vliv flavonoidů na živé organismy poukazuje na jejich pozitivní vliv vůči široké škále nemocí [144]. Mezi nejčastěji uváděné pozitivní účinky patří protizánětlivé, antibakteriální, antialergenní, antivirální [135, 136, 140], ochrana před změnami DNA (štěpení DNA), kardiovaskulárním onemocněním a ochrana buněk před oxidativním stresem [145-149]. Nicméně nejčastěji popisovanou pozitivní vlastností, s níž se můžeme setkat v literatuře je antioxidační působení [150-154]. Například vznik Alzheimerovy nemoci je spojován oxidativním stresem podobně jako rakovina a arteroskleróza [155, 156]. Oxidativní stres je možné popsat jako soubor reakcí za vzniku volných radikálů. Tyto velmi reaktivní částice vyhledávají další částice s volným elektronem pro vytvoření vazby. Tímto dochází k vytvoření dalších radikálů a k dalšímu poškození buňky [157]. Flavonoidy jsou schopny "zhášet" tyto volné radikály.

Antibakteriální vlastnosti flavonoidů, jakkoli pozitivní pro člověka, představují velký problém pro činnost anaerobních bakterií a tím snižují efektivitu zplyňovacího procesu. Materiály bohaté na flavonoidy jsou tedy obtížněji zplynitelné. Jedním ze snadno dostupných zdrojů rostlinných zbytků pro bioplynové stanice je vinařský průmysl – matoliny, třapiny, sedlina po fermentaci [158] atd. Jak bylo zmíněno, hlavní analytickou metodou používanou pro sledování procesu výroby bioplynu je plynová chromatografie [159-163]. Melamane a kol. sledovali pomocí plynové chromatografie účinnost anaerobní gasifikace materiálu bohatého na polyfenoly. Po 130 dnech anaerobní fermentace došlo k rozkladu pouze 63% z celkového obsahu polyfenolů. Takto nízká účinnost rozkladu těchto látek je přisuzována výše uvedeným antibakteriálním vlastnostem [163]. Na druhou stranu, některé novější studie popisují, že přídavek polyfenolů do kapalného zbytku po fermentaci urychluje růst bakterií, které jsou schopny rozkládat polycyklické bifenyly [164].

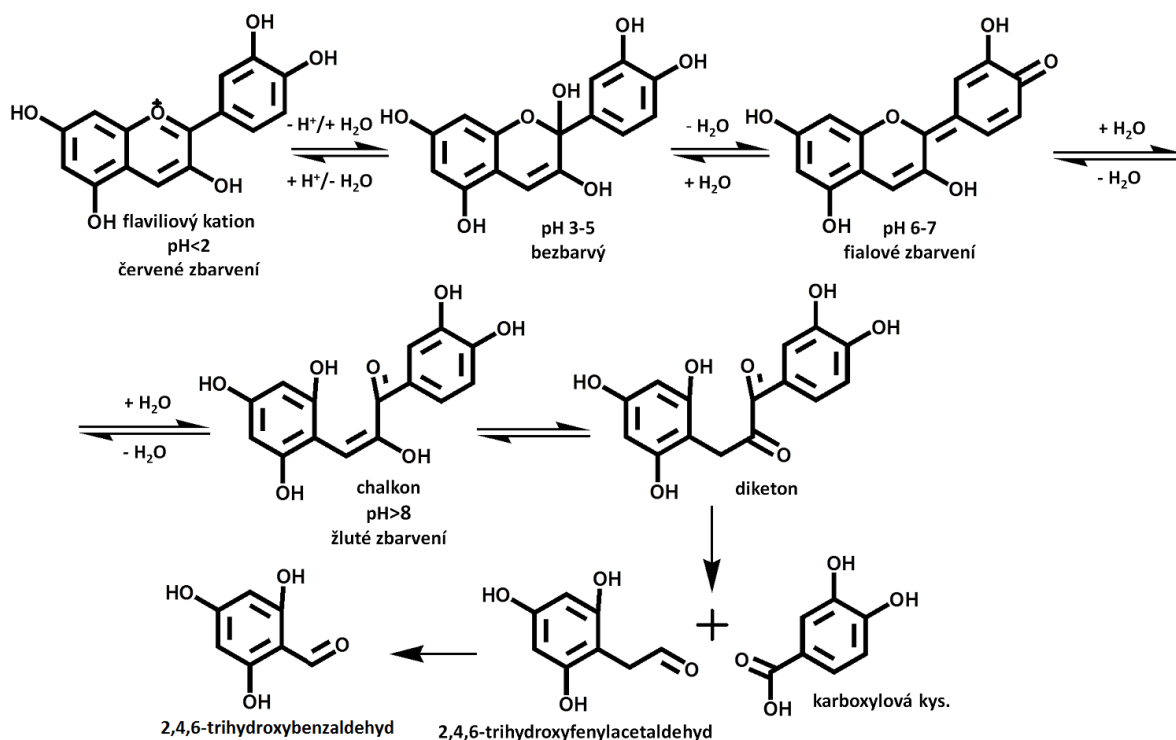
Vedle velkého množství studií poukazujících na pozitivní vlastnosti flavonoidů lze v literatuře nalézt i zmínky o jejich mutagenních a/nebo genotoxických účincích na bakterie a buňky savců [165-167]. Skibola a kol. poukázali na fakt, že vysoké koncentrace těchto látek v přírodě (uměle zvýšené např. digestátem) mohou ovlivnit aktivitu některých environmentálních genotoxikantů (tj. sloučenin s mutagenními a karcinogenními účinky) a jejich metabolismus v živých organismech [168].

V současné době existují pouze dvě publikace popisující osud flavonoidů v průběhu anaerobní gasifikace. Tyto práce sledují a popisují přeměny této skupiny na skupině standardů vybraných flavonoidů (tj. Hesperidin, Rutin, Katechin, Naringenin, Chrysin, Luteolin, Kvercetin, Kaempferol, Kyanidin a Petunidin) za současného sledování průběhu anaerobní fermentace s využitím plynové chromatografie (poměr CO₂ a CH₄). Kapalný zbytek byl analyzován pomocí kapalinové chromatografie (C18 kolona) v kombinaci se spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem [169, 170].

2.6.1. Rozklad flavonoidů

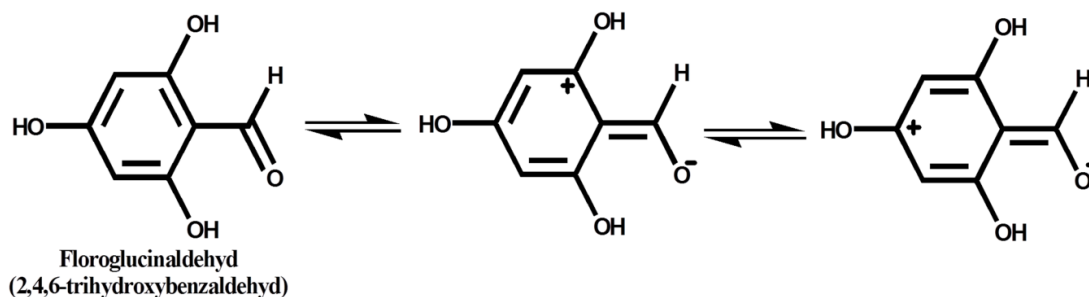
Rozklad flavonoidů je ovlivněn řadou faktorů jako je pH jejich roztoků, teplota, přítomnost reaktivních forem kyslíku, enzymů, činnost bakterií, koncentrace flavonoidů, světlo, rozpouštědlo a přítomnost kovových iontů [171]. V reálných systémech jde samozřejmě o kombinaci více faktorů. Patrně nejprobádanější skupinou flavonoidů jsou anthokyaniny. První zmínka o rozkladu anthokyaninů se objevila v práci Markakise a Livingstona z roku 1957. Autoři zde popsali důležitý krok vedoucí k rozpadu molekuly - otevření pyranového kruhu (kruh C) a vzniku chalkonu [172]. Další významné práce popisující rozklad anthokyaninů byly publikovány Hrazdinou (1971) [173], Tanchevem a Lonchevou (1976)

[174] (sledování vlivu pH) a Adamsem (1973) [175] (sledování vlivu teploty). Konečnými produkty rozkladu anthokyaninů je fenolická kyselina (strukturně odpovídající substituci B-kruhu anthokyanidinu) a 2,4,6-trihydroxyfenylacetaldehyd (Obr. 6). Vzniklý aldehyd není konečným rozkladným produktem a dále dochází ke zkrácení jeho postranního řetězce o jeden uhlík a vzniku konečného produktu 2,4,6-trihydroxybenzaldehydu neboli floroglucinaldehydu [176, 177].



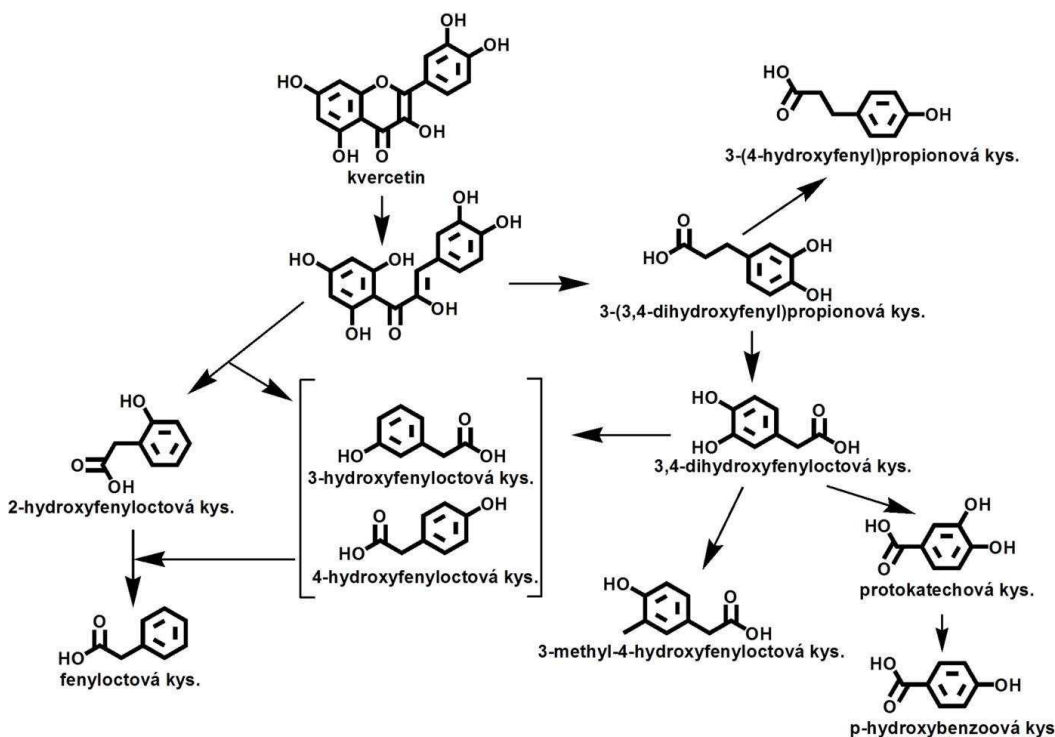
Obr. 6. Rozklad anthokyaninů vlivem pH [177, 178].

Floroglucinaldehyd je poměrně reaktivní a může v roztoku interagovat s řadou dalších sloučenin. Reaktivitu floroglucinaldehydu lze vysvětlit izomerními a mezomerními efekty - v polohách ortho a para vzniká parciální kladný náboj, zatímco na kyslíku v aldehydické skupině je parciální záporný náboj (Obr. 7) [179].



Obr. 7. Mezomerní efekty v molekule floroglucinaldehydu

Autoři Serra a kol. studovali in-vitro rozklad flavonoidů (kvercetin, kvercetin–rhamnosid kvercetin–rutinosid kaempferol-rutinosid, naringenin, luteolin a myricetin) vlivem bakterií z krysí střešní mikroflóry. Ve studovaných směsích detekovali jako hlavní metabolity 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionovou, 3,4-dihydroxyfenyloctovou, 3-hydroxyfenyloctovou a fenylactovou kyselinu. Na základě vzniku těchto látek bylo možno navrhnout pravděpodobnou degradační cestu flavonoidů v anaerobních podmínkách. Na Obr. 8 je jako příklad uvedena degradační cesta kvercetinu. Dále byl studován rozklad flavonoidů bakteriemi z lidského zažívacího traktu. Mezi produkty rozkladu nebyly nalezeny výše uvedené metabolity (autoři ve vzorku našli vyšší obsah kyseliny protokatechové a malý obsah kyseliny p-hydroxybenzoové), což poukazuje na rychlý rozklad 3,4-dihydroxyfenyloctové a p-hydroxybenzoové kyseliny [180]. Procesy rozkladu flavonoidů jsou tedy poměrně komplikované a velmi se odvíjí od bakteriálního složení (různé kmeny bakterií) kapalné části v bioplynovém reaktoru. Rozklad anthokyaninů je v souvislosti se skladováním a zplyňováním vinařského odpadu i jedním z objektů studia této disertační práce.



Obr. 8. Navržený degradační cesta kvercetinu střešní mikroflórou [180].

3. Cíle disertační práce

Cíle disertační práce jsou spojeny se studiem vybraných reakcí flavonoidů probíhajících při skladování vinařského odpadu a při jeho anaerobní fermentaci.

Cíle práce lze shrnout do následujících bodů:

- vysvětlení procesů probíhajících při rozkladu anthokyaninů kyanidinu a malvidin-3-glukosidu v modelových podmínkách vlivem zvýšené teploty v neutrálním prostředí (pH 7) analýzou rozkladných produktů spojením kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.
- vývoj nano-kapalinově chromatografické metody (nano-LC) pro analýzu můstkových barviv vznikajících kondenzací katechinu s malvidin-3-glukosidem v přítomnosti acetaldehydu
- optimalizace anaerobní fermentace vinařského odpadu v mikroměřítku (v mikroreaktoru) za průběžné kontroly zplyňování plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.
- analýza složení digestátu odebraného z mikroreaktoru v různých fázích anaerobní fermentace pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí a s využitím analýzy hlavních komponent (PCA) a ortogonální projekce do latentních struktur (OPLS-DA).

Nejvýznamnější výsledky uvedené v této disertační práci byly uveřejněny ve třech impaktovaných [181, 182, 190] a jedné recenzované publikaci [27].

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie

Standardy fenolických kyselin (protokatechová, syringová, m-hydroxybenzoová, 3,5-dihydroxybenzoová, benzoová kyselina), aromatických aldehydů (floroglucinaldehyd, p-hydroxybenzaldehyd) a flavonoidů (kyanidin chlorid, malvidin-3-glukosid, malvidin-3-galaktosid, (+)-katechin, kvercetin) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Všechny standardy byly v HPLC čistotě ($\geq 99,0\%$). Deionizovaná voda byla získána z dvoustupňové deionizační stanice Millipore Direct Q UV (Millipore S.A.S, Molsheim, Francie). Pro přípravu mobilní fáze a roztoků standardů byl používán methanol a acetonitril (gradient grade, BIOSOLVE, Valkensward, Nizozemí; gradient grade, MALINCKRODT BAKER, Derenter, Nizozemí; gradient grade, Carlo Erba, Miláno, Itálie). Acetaldehyd byl zakoupen od firmy Merck (Hohenbrunn, Německo), kyselina octová (99,8%), kyselina mravenčí (99%) a kyselina trifluoroctová od firmy Sigma-Aldrich, hydroxid sodný (p.a.) a dihydrogenfosforečnan sodný (p.a.) od Penta s.r.o. (Praha, Česká republika).

4.2. Přístroje a vybavení

4.2.1. Kapalinový chromatograf a hmotnostní spektrometr

Experimenty pro analýzu rozkladných produktů anthokyaninů a látek v reakční směsi po anaerobní fermentaci byly prováděny s využitím kapalinového chromatografu Acquity UPLC (Waters, Milford, USA). Vzorek byl dávkován pomocí autosampleru v módu fulloop (10 μl). Systém je vybaven UV/VIS detektorem s diodovým polem. Pro analýzu byla použita kolona Ascentis Express C18 (100 x 2,1 mm, $d_p = 2,7 \mu\text{m}$ (tloušťka porézní vrstvy 0,5 μm), Sigma-Aldrich). Pro detekci a identifikaci byl použit vysokorozlišující tandemový hmotnostní spektrometr Q-TOF Premier (Waters, USA) s ionizací elektrosprejem (Z-sprej). Parametry měření byly následující: sprejovací napětí bylo 2,5 kV v pozitivním i negativním módu (analýza směsi po anaerobní fermentaci v pozitivním módu a rozkladné produkty anthokyaninů v negativním), teplota zdroje 120°C, napětí na sampling cone 30 V, desolvatační teplota 150°C, průtok cone gas 50 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ a průtok desolvatačního plynu 400 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. Jako desolvační plyn byl použit dusík a jako kolizní plyn argon. Experimenty byly provedeny pomocí MS^E módu bez diskriminace iontů nebo jejich předvýběru (střídání MS skenu s nižší kolizní energií (5 eV) a skenu s vyšší kolizní energií (rampa kolizní energie 10-30 eV)). Pro detailní studium fragmentace byly analýzy doplněny MS/MS experimenty.

Fragmentační experimenty byly provedeny pomocí spojení kapalinového chromatografu Acquity UPLC systému (Waters) s vysokorozlišujícím tandemových hmotnostním

spektrometrem Synapt G2-S (Waters). Parametry ionizace elektrosprejem byly stejné jako pro hmotnostní spektrometr Q-TOF premier. MS/MS experimenty byly prováděny s různou kolizní energií vkládanou na kolizní cely Trap nebo Transfer (typ použité kolizní cely a kolizní energie jsou uvedeny u příslušného spektra).

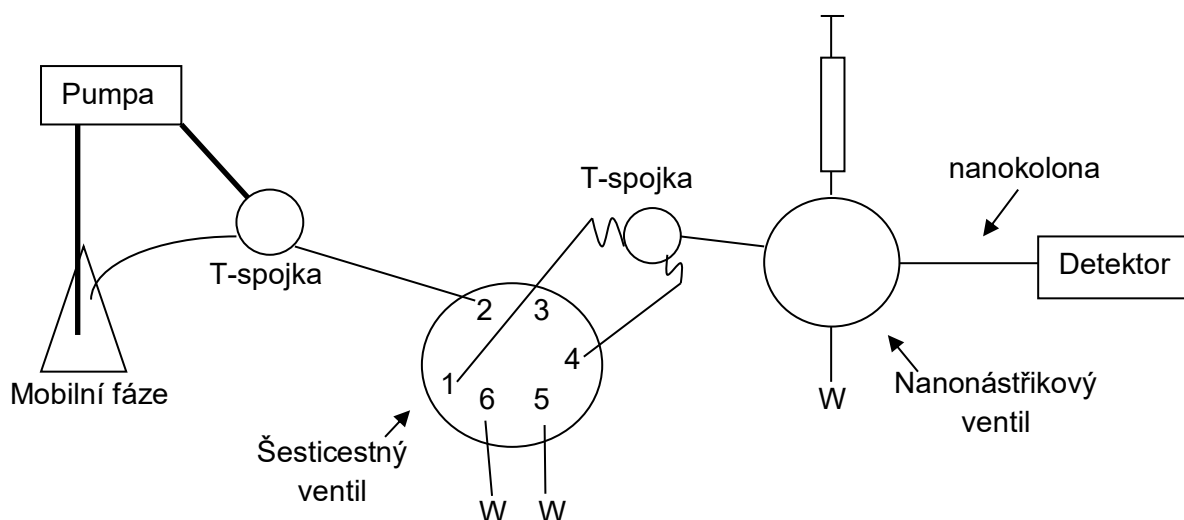
Při studiu vlivu anaerobní fermentace na flavonoidní látky bylo použito rovněž spojení Acquity UPLC systému s hmotnostním spektrometrem s analyzátozem typu trojitého kvadrupólu XEVO-TQD (Waters). Měření bylo prováděno v režimu sledování více fragmentačních procesů současně (multireaction monitoring, MRM). Sledované MRM přechody byly 305 → 127, 305 → 139, 305 → 151 a 305 → 153 s následujícími parametry: ionizace elektrosprejem (pozitivní mód), napětí na kapiláře 3,7 kV, desolvatační teplota 200°C, teplota desolvatačního plynu 650 L.h⁻¹, LM rozlišení 10,9, HM rozlišení 15,5, napětí na sampling cone 60 V, kolizní energie 15 eV.

Pro analýzu látek vznikajících kondenzací flavonoidů byl použit konvenční vysokoúčinný kapalinový chromatograf HPLC Smartline (Knauer, Germany) vybavený kolonou Chromosphere C18 (100 x 4,6 mm, 3 μm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a Kinetex 2,6 μm C18 100A (100 x 2,1 mm, dp = 2,6 μm (porézní vrstva 0,5 μm), Phenomenex, USA). Dávkovaný objem byl v optimalizovaných podmínkách 5 μL a při experimentech srovnávaných s nano-LC metodou 88 μL. Pro kontrolu složení reakční směsi při syntéze můstkových látek a jejich čistoty byl použit kapalinový chromatograf UPLC Acquity ve spojení s hmotnostním spektrometrem Q-TOF Premier (Waters, Milford, USA). Parametry nastavení hmotnostního spektrometru jsou uvedeny výše.

4.2.2 Nano-kapalinový chromatograf s UV detekcí

Nano-LC experimenty byly provedeny pomocí přístroje složeného z konvenční pumpy Spectra System P2000 a detektoru Spectra System UV1000 (Separation Products, San Jose, CA, USA). Jako reservoár mobilní fáze byl použit modifikovaný nástřikový šesticestný ventil (Enantiosep GmbH, Münster, Německo) se smyčkou 50 μL. Pro nástřik vzorku byl použit nano-nástřikový ventil (100 nL) (VICI Valco, Houston, TX, USA). Reservoár mobilní fáze a nástřikový ventil byly navzájem propojeny pomocí T-spojky křemennou kapilárou (50 μm x 11 cm). Pro redukci průtoku z μL.min⁻¹ na nL.min⁻¹ byl průtok splitován. LC pumpa byla napojena na T-spojku pomocí kapiláry z polyetheretherketonu (PEEK) (50 cm x 130 μm). Druhý výstup z T-spojky byl napojen na reservoár mobilní fáze kapilárou z nerezové oceli o rozměrech 50 cm x 50 μm i.d. a na třetí vývod z T-spojky byla připojena křemenná kapilára o rozměrech 7 cm x 500 μm i.d. (odpad). Zjednodušené schéma zapojení nano-LC systému je zobrazeno na Obr. 9. Pro separace byla použita laboratorně naplněná kapilární

chromatografická kolona (100 μm i.d., 375 o.d.) s různým typem stacionární fáze (podrobnosti jsou uvedeny níže v kapitole 4.4.2) a komerčně dostupná kapilární monolitická kolona Chromolith CapRod FR (150 mm x 100 μm i.d.) od firmy Merck (Merck, Darmstadt, Německo). Chromatografická kolona byla přímo napojena na nano-nástřikový ventil. Data byla zaznamenávána pomocí softwaru ChromQuest (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA). UV detekce byla prováděna při vlnové délce 205 nm.



Obr. 9. Schéma zapojení nanokapalinového chromatografu (*W – odpad*) [181].

4.2.3. Kontrola podmínek anaerobní digesce pomocí plynového chromatografu

Složení plynné fáze v horní části reaktoru bylo analyzováno pomocí spojení plynového chromatografu Agilent 789A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C (Agilent Technologies). Podmínky měření byly nastaveny následovně: počáteční teplota 70°C; teplotní gradient: 0-5 min (70°C), 5-16,33 min (70-240°C), 16,33-20,33 min. (240-300°C), 20,33-25,33 min. (300°C); nástřik metodou splitless, nástřikový objem 2 μL ; kolona Zebron ZB-5ms (5%-phenyl-arylen-95% dimethylpolysiloxan); plyn: helium; průtok 0,9 mL.min⁻¹; MS skenovací rozsah 12-120 Da; ionizace elektronem; ionizační energie 70 eV. Kvantifikace plyných složek byla prováděna metodou vnitřní normalizace.

4.2.4. NMR experimenty

Pro identifikaci látek vznikajících rozkladem anthokyaninů (kondenzace floroglucinaldehydu) a ověření struktury syntetizovaného standardu 1,3,5,7-tetrahydroxyantrachinonu (antrachrysenu) byl použit přístroj pro nukleární magnetickou rezonanci VNMR-400 (Varian, Palo Alto, USA). 1D spektra byla zaznamenána při frekvenci

399,89 MHz (^1H) a 100,56 MHz (^{13}C). Pro identifikaci připravených můstkových anthokyaninových barviv byl použit přístroj JEOL ECA-500 (Jeol, Peabody, USA). 1D a 2D NMR spektra byla zaznamenána při frekvenci 500,16 MHz (^1H) a 125,76 MHz (^{13}C). Pro 2D experimenty byly použity následující parametry měření: HMQC (J -constant = 140 Hz); HMBC (J -constant max = 163 Hz, J -constant min = 128 Hz, rozsah J = 8 Hz); a ROESY (čas míchání = 0,25 ms). U všech experimentů byl použit relaxační čas 1,5 s. Vzorky byly rozpuštěny v denaturovaném methanolu (CD_3OD) a kyselině trifluoroctové v poměru 98:2 (v/v). Naměřená spektra jsou uvedena v přílohách 1-4.

Reakce mezi malvidin-3-glukosidem, katechinem a acetaldehydem a detailní popis struktury vznikajících produktů již byly popsány v publikaci [183]. I přes menší množství získaných frakcí a horší čistotu izolované frakce 1 (látka C), bylo možné pomocí NMR experimentů a porovnání s literaturou potvrdit identitu vzniklých můstkových látek.

4.2.5. Ostatní laboratorní vybavení

Pro přípravu roztoku standardu byly využity analytické váhy Sartorius (Sartorius AG, Goettingen, Německo). K měření pH roztoku byl použit pH metr InoLab (WTW, Praha, Česká republika). Odplynění a dodatečné rozpuštění látek bylo provedeno pomocí ultrazvukové lázně Elma, S 40 H, Elmasonic (Elma Hans Schmidbauer, Singen, Německo).

4.3. Studium rozkladu anthokyaninů

4.3.1. Příprava mobilní fáze a optimalizace retence

Jako mobilní fáze A byla použita deionizovaná voda okyselená 0,1 % kyselinou mravenčí (v/v) a jako mobilní fáze B methanol okyselený 0,1% kys. mravenčí (v/v). Průtok mobilní fáze byl nastaven na $0,35 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Profil gradientu byl převzat z předchozí práce autora [178] a byl přepočítán z HPLC na UPLC experiment pro zkrácení doby analýzy (% v/v; 0–4,28 min (20% B), 4,28–7,85 min (20–60% B), 7,85–13,56 min (60% B), 13,56–14,99 min (60–20% B) a 14,99–22,13 min (20% B)).

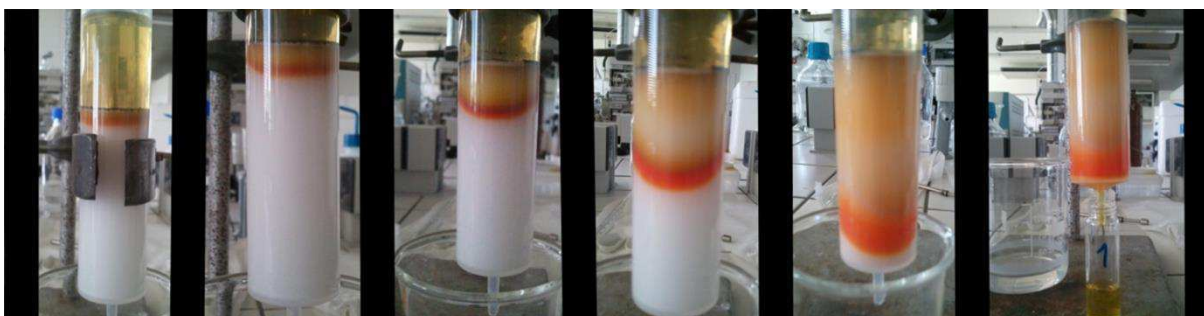
4.3.2. Příprava vzorků

Modelové roztoky anthokyaninů a floroglucinaldehydu byly připraveny rozpuštěním 0,5 mg každého standardu (kyanidin chlorid, malvidin-3-galaktosid a floroglucinaldehyd) v 1 ml methanolu. Po odfoukání rozpouštědla proudem dusíku byly jednotlivé frakce rozpuštěny v 5 mL 0,5 M fosfátového pufru o pH = 7,0. Takto připravené roztoky byly rozděleny na 5 částí do krimpovacích vialek, které byly následně umístěny do sušárny nastavené na 95°C .

Vzorky byly postupně odebírány v časových intervalech 0, 1, 4, 8 a 24 hodin a po ochlazení ihned měřeny pomocí UPLC-DAD-MS.

4.3.3. Syntéza standardu anthrachrysenu

Anthrachrysen (1,3,5,7 – tetrahydroxyanthrachinon) byl připraven pomocí modifikované metody autorů Briggse a Nichollse z roku 1951 [184]. 1 g kyseliny m-hydroxybenzoové a 1,1 g kyseliny 3,5-dihydroxybenzoové byl zahříván společně s 3,9 mL koncentrované kyseliny sírové po dobu 1 hodiny na 100°C. Druhý den byl roztok zahřát na 10 minut a poté vlit do 65 mL vařící vody. Vzniklá zelená sraženina byla odfiltrována a rozpuštěna ve vodném roztoku NaOH. Po zahřátí roztoku NaOH byl tento roztok smíchán s horkým roztokem ledové kyseliny octové za vzniku sraženiny. Sraženina byla rozpuštěna v acetonu a separována pomocí sloupcové chromatografie pro izolaci oranžového pásu (Obr. 10). Jako stacionární fáze byl použit silikagel.



Obr. 10. Separace anthrachrysenu pomocí sloupcové chromatografie

4.4. Studium kondenzace flavonoidů

4.4.1. Příprava reakční směsi, frakcionace reakčních produktů a příprava extraktu z výlisků z červených hroznů

Reakční směs byla připravena smícháním (+)-katechinu a malvidin-3-glukosidu (oba 1 mmol) ve 4 ml vody. Poté bylo přidáno 0,86 μ l kyseliny mravenčí, 2,24 μ l acetaldehydu a 1 ml methanolu a vzniklá směs byla důkladně promíchána. Reakční proces a vzniklé produkty byly kontrolovány pomocí HPLC/DAD/ESI-MS. Nejvyšší koncentrace reakčních produktů byla nalezena po 8 dnech reakce. Purifikace reakčních produktů byla prováděna pomocí HPLC systému Smartline (Knauer, Německo) vybaveného semi-preparativní core-shell kolonou Ascentis C18 (250 x 10 mm; 5 μ m; tloušťka porézní vrstvy 0,5 μ m, Supelco, USA). Nástřikový objem reakční směsi byl 1 ml.

Výlisky červených hroznů (RGM) byly poskytnuty doc. Josefem Balíkem, Ph.D. z Ústavu posklizňové technologie zahradnických produktů, Zahradnické fakulty, Mendelovy univerzity v Brně. Surový materiál byl lyofilizován a uskladněn v mrazicím boxu. 250 mg lyofilizovaného materiálu bylo extrahováno 1 mL 0,1% kyseliny mravenčí v methanolu po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni za laboratorní teploty. Extrakt byl následně centrifugován při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. 0,5 mL organické fáze bylo 8x zředěno mobilní fází (0,1 % TFA ve směsi 80:20 voda:acetonitril, v/v/v). Pro identifikaci byla k tomuto vzorku přidána modelová směs studovaných látek (finální koncentrace reakčních produktů ve směsi byla přibližně 10 mg.L⁻¹).

4.4.2. Příprava kapilárních kolon

Křemenné kapilární kolony 100 µm i.d., 375 o.d. (Composite Metal Services, Hallow, Velká Británie) byly plněny pomocí LC pumpy (Perkin-Elmer series 10 LC pump, Paolo Alto, CA, USA) 3 µm částicemi stacionární fáze Chromosphere C18 (Varian, Palo Alto, CA, USA) a 2,6 µm povrchově porézními částicemi stacionární fáze Kinetex® C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Detailní postup přípravy kapilárních kolon je popsán v publikaci [181]. Na konec plněné kapiláry byla připojena mechanická frit a druhý konec byl napojen na HPLC předkolonu, která sloužila jako reservoár stacionární fáze (SF), která je následně pumpována do kapiláry. Po konci plnění byla kapilára promyta destilovanou vodou pro odstranění plnicí kapaliny (methanol). Poté byla vytvořena počáteční a konečná permanentní frita sintrováním stacionární fáze po dobu 6s při 700°C pomocí žhavicího vlákna. Detekční okénko o délce 0,5 cm bylo připraveno seškrábáním polyimidové vrstvy žiletkou.

Příprava kapilární kolony plněné povrchově porézními částicemi Kinetex probíhala odlišně. Kapilární kolona byla opět napojena na mechanickou fritu a konec kapiláry byl naplněn (v délce cca 10 cm) 5 µm částicemi LiChrospher 100 RP-C18 (suspenze v acetonu). Kolona byla poté promyta destilovanou vodou a byla vytvořena první permanentní frit. Po odstranění mechanické frity byl vymyt zbytek stacionární fáze acetonem a kapilára byla naplněna povrchově porézními částicemi Kinetex C18 (25 cm) a poté dalšími 5 cm SF LiChrospher 100 RP-C18 5 µm. Druhá koncová permanentní frit byla připravena stejným způsobem, jak je uvedeno výše. Nadbytečná SF byla vymyta z kapiláry. Částice stacionární fáze LiChrospher tvoří v kapiláře stacionární zóny dlouhé pouze pár milimetrů - dvě frity (cca 2-3 mm). Důvodem použití částic LiChrosphere je špatné sintrování povrchově porézních částic, které znemožňuje vytvoření kvalitních frit z povrchově porézního silikagelu. Všechny kolony byly plněny na délku 25 cm. Efektivní délka kolon byla 27 cm pro plně porézní SF a 32 cm pro povrchově porézní SF.

4.5. Anaerobní fermentace vinařského odpadu

4.5.1. Příprava vzorku

Vzorek vepřové kejdy (PS) byl poskytnut Květoslavem Mückem ze společnosti Cervus s.r.o. (Olomouc). PS byla přímo vzorkována ze zemědělské bioplynové stanice v Bílově-Pustějově a ihned zmrazena. Ve zmrazeném stavu byla skladována až do doby anaerobních experimentů. Vepřová kejda je charakterizována jako směs kapalných a pevných exkrementů prasat. Sušina se pohybuje v rozmezí 6-8% a obsah částic pod 3 mm je okolo 69% a částic nad 5 mm 11%. Hustota tohoto materiálu se pohybuje v rozmezí 980-1020 kg.m⁻³ a hodnota pH okolo 8. Množství organických látek v roztoku je 72-78% a poměr organických látek obsahující uhlík a dusík je 10:1 [185].

Předběžné experimenty byly provedeny na roztocích připravených smícháním PS, RGM, vody, 1 mg.mL⁻¹ roztok methanogeních bakterií APD BIO GAS (MetBac; BAKTOMA s.r.o., Velká Bystřice) a 29,8 g.L⁻¹ roztok thioglykolátového media (TGM; NEOGEN, Lansing, MI, USA) ve 4 ml skleněných vialkách opatřených kvasnou zátkou a headspace víčkem se septem tvořeným polytetrafluorethylenovou a gumovou vrstvou v různém poměru: A. 200 mg RGM + 2 mL vody; B. 100 mg RGM + 450 mg PS + 2 mL vody; C. 200 mg RGM + 2 mL vody + 1 μL MetBac; D. 100 mg RGM + 450 mg PS + 2 mL vody + 1 μL MetBac; E. 200 mg RGM + 2 mL TGM + 1 μL MetBac; F. 100 mg RGM + 450 mg PS + 2 mL TGM + 1 μL MetBac.

Vzorkování vnitřní atmosféry bylo prováděno pomocí 2,5 mL stříkačky Hamilton Gastight no. 1002 s ostrou jehlou (vzorkovací objem 1,5 mL; Hamilton, Reno, NV, USA). Další optimalizace anaerobní fermentace byla prováděna v roztocích o různých poměrech PS a RGM (tj. 750:50 mg, 500:50 mg, 250:50 mg, 100:50 mg a 50:50 mg) ve 2 ml deionizované vody ve 4 ml headspace vialkách. Do všech vzorků byl přidán hydroxid amonný pro dosažení finální koncentrace 0,254, 0,191, 0,127 a 0,064 mol L⁻¹.

Po nalezení optimálních podmínek pro anaerobní fermentaci (optimalizace složení směsi a jeho pH) byly připraveny tři samostatné vzorky smícháním 14 g PS, 1 g RGM a 40 ml deionizované vody v 60 ml vialkách (anaerobní mikro-reaktor, AMF, 139 x 27 mm). Vzorkování vnitřní atmosféry AMF bylo prováděno stejným postupem, jak je uvedeno výše. Kapalná část reaktoru byla vzorkována pomocí 5 mL plastové stříkačky s dlouhou ostrou jehlou pro dosažení kapalné části ve fermentoru (15 cm, pokaždé bylo vzorkováno 2 mL). Referenční vzorek byl tvořen 14 g PS a 40 ml deionizované vody. pH referenčního vzorku bylo stejné jako pH směsi PS-RGM (liší se pouze v přidávku 0,127 μmol.L⁻¹ NH₄OH; pH se liší méně než o 10%). Všechny vzorky byly probublávány po dobu 10 minut dusíkem pro odstranění kyslíku a nastolení anaerobních podmínek. Vzorky byly termostatovány na 35 ± 1°C.

1,5 mL kapalné části z každého vzorku (PS-RGM nebo PS) bylo smícháno s 0,75 mL 5% vodného roztoku kyseliny mravenčí (v/v). Směs byla centrifugována po dobu 5 minut při 14 000 otáčkách za minutu (surový vzorek). Poté byly 2 ml supernatantu surového vzorku nanесeny na SPE kolonku Strata SDB-L (Styren-Divinyl Benzen kopolymer; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Kolonka byla před nadávkováním vzorku kondicionována 2 mL methanolu a poté promyta 2 mL vodou a 2 mL 5% vodným roztokem kyseliny mravenčí (v/v). Po nanесení vzorku byly vysoce polární látky a anorganické soli vymyty 2 mL 5% vodného roztoku kyseliny mravenčí (v/v). Poté byl vzorek eluován 3 mL methanolu a vysušen proudem dusíku. Vysušený vzorek byl uskladněn v hlubokomrazicím boxu (-80°C). Před analýzou LC/MS byly vzorky ponechány při laboratorní teplotě po dobu 10 minut a poté rozpuštěny v 1 mL 0,1% (v/v) kyselině mravenčí.

4.5.2. Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze pro analýzu flavonoidních látek po anaerobní přeměně se skládala z 0,1% (v/v) kyseliny mravenčí ve vodě (mobilní fáze, MF A) a 0,1% (v/v) kyseliny mravenčí v acetonitrilu (MF B). Analýza probíhala v gradientu (% v/v): 0–5 min (10% B), 5–40 min (10–100% B), 40–50 min (100% B), 50–55 min (100–10% B) and 55–60 min (10% B). Poslední dva kroky slouží ke kondicionaci chromatografické kolony. Průtok mobilní fáze byl 0,35 mL.min⁻¹, teplota autosampleru 10°C a kolona byla termostatovaná na 25°C.

4.5.3. Použitý software a statistické vyhodnocování dat

Řízení LC/MS systému a sběr dat byl prováděn pomocí softwaru MassLynx (verze 4.1). Získaná LC/MS data byla zpracována programem MarkerLynx XS, softwarovou nadstavbou MassLynxu, která umožňuje jejich převedení na datovou matici pro následné statistické zpracování. Parametry metody byly následující: rozsah retenčních časů 0,5–60 min., rozsah m/z hodnot 100–1000 Da, odchylka 0,05 Da, hladina eliminace šumu 2, povoleno deizotopování hmot. Zpracovaná data byla následně převedena do modulu Extended statistics, EZinfo (Umetrics, Malmö, Švédsko) a studována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) a ortogonální projekce do latentních struktur (OPLS-DA) s Pareto škálováním a logaritmickou transformací dat. Pro interpretaci dat byly výstupy zobrazeny ve formě příslušných grafů (Score a Loadings plot, biplot a S-plot).

5. Výsledky a diskuze

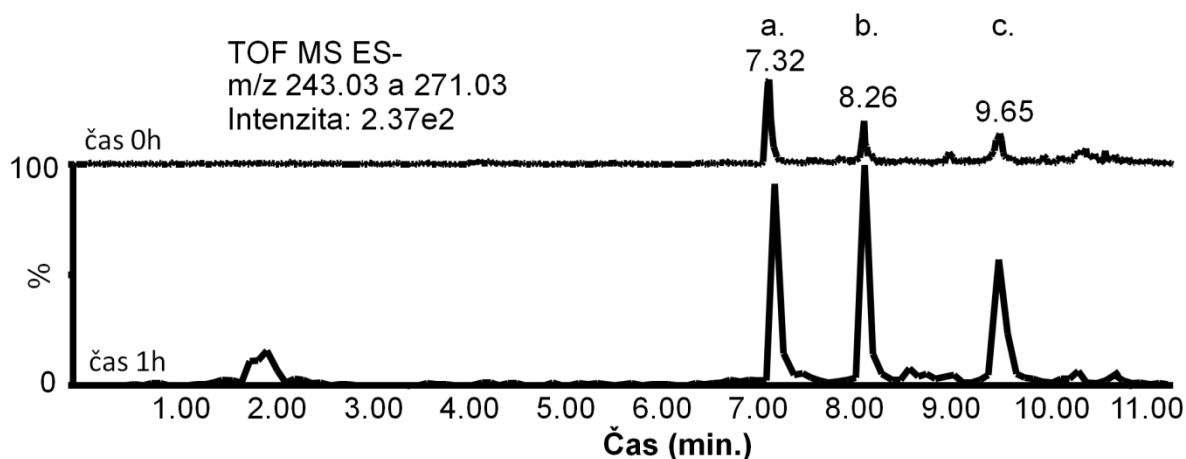
5.1. Studium rozkladu anthokyaninů

5.1.1. Modelové roztoky anthokyaninů a floroglucinaldehydu

Odpad pocházející z výroby červených vín obsahuje velké množství flavonoidů včetně anthokyaninů. Chování těchto látek je velmi závislé na pH, což bylo blíže popsáno v teoretické části. V této kapitole budou diskutovány experimenty rozkladu anthokyaninů (kyanidinu a malvidin-3-galaktosidu) a floroglucinaldehydu (PGA) při pH 7 (optimální hodnota pH pro anaerobní fermentaci) za zvýšené teploty (95°C) pro urychlení procesu transformace. Vliv pH na fermentaci bude diskutován v kapitole Anaerobní fermentace vinařského odpadu.

V roztocích anthokyaninů docházelo k jejich rychlému rozkladu a po jedné hodině nebyl ani v jednom případě detekován signál výchozí látky (tj. m/z 285,04 pro kyanidin (Cy) a m/z 491,16 pro malvidin-3-galaktosid (Mv3gl), při negativní ionizaci). Rychlý rozklad byl také pozorován u vznikajících fenolických kyselin (pro Cy kyselina protokatechová a pro Mv3gl kyselina syringová) a floroglucinaldehydu. V obou případech obsah fenolických kyselin dosáhl svého maxima po 1 hodině zahřívání a následně jejich obsah prudce klesal. U kyseliny protokatechové došlo k celkovému rozkladu po 4 hodinách a u kyseliny syringové po 24h. Floroglucinaldehyd nebyl detekován v žádném roztoku. Možným vysvětlením je následná reakce floroglucinaldehydu a tvorba nových sloučenin, které se ovšem v průběhu experimentů (např. vlivem změny složení roztoku) rozpadají opět za vzniku floroglucinaldehydu. Proto byla provedena série experimentů sledující chování samotného floroglucinaldehydu v roztoku o pH 7 a teplotě 95°C.

Nejvýraznější změna byla pozorována po 1 hodině zahřívání, kdy signál floroglucinaldehydu poklesl z výchozího hodnoty o 93,56%. Po 4 hodinách zahřívání byla v odpovídajícím rekonstruovaném chromatogramu patrná pouze stopa floroglucinaldehydu (0,15% z původní koncentrace). Důležitým momentem bylo nalezení tří látek s m/z 243,0324, 271,0255 a 271,0276. Na Obr. 11. je zobrazen rekonstruovaný chromatogram těchto tří látek získaný analýzou roztoku floroglucinaldehydu po jedné hodině zahřívání v roztoku o pH 7. Nutno zmínit, že tyto látky se vyskytují také v čase 0h a po jedné hodině se jejich obsah zvýšil o zhruba 85% (obsah látky m/z 243,0324 se zvýšil o 85,0%, látky m/z 271,0255 o 93,7% a látky s m/z 271,0276 o 79,2% oproti původní koncentraci v roztoku). To poukazuje na fakt, že uvedené procesy přeměn anthokyaninů a floroglucinaldehydu běží poměrně rychle už od počátku experimentu. Dalším zahříváním již docházelo ke snížení obsahu těchto látek. Po 4 hodinách již v roztoku nebyl nalezen pík látky s m/z 271,0255 eluující v čase 8,26 min. a obsahy dalších látek se snížily na 5 % (pro m/z 243,0324) a 8,3% (pro m/z 271,0276) jejich maximálního obsahu.



Obr. 11. Rekonstruovaný chromatogram látek s m/z 243,03 (a.); 271,03 (b.) a 271,03 (c.) v roztoku o pH 7 po 1 hodině rozkladu floroglucinaldehydu

5.1.2. Identifikace neznámých látek vznikajících rozkladem floroglucinaldehydu

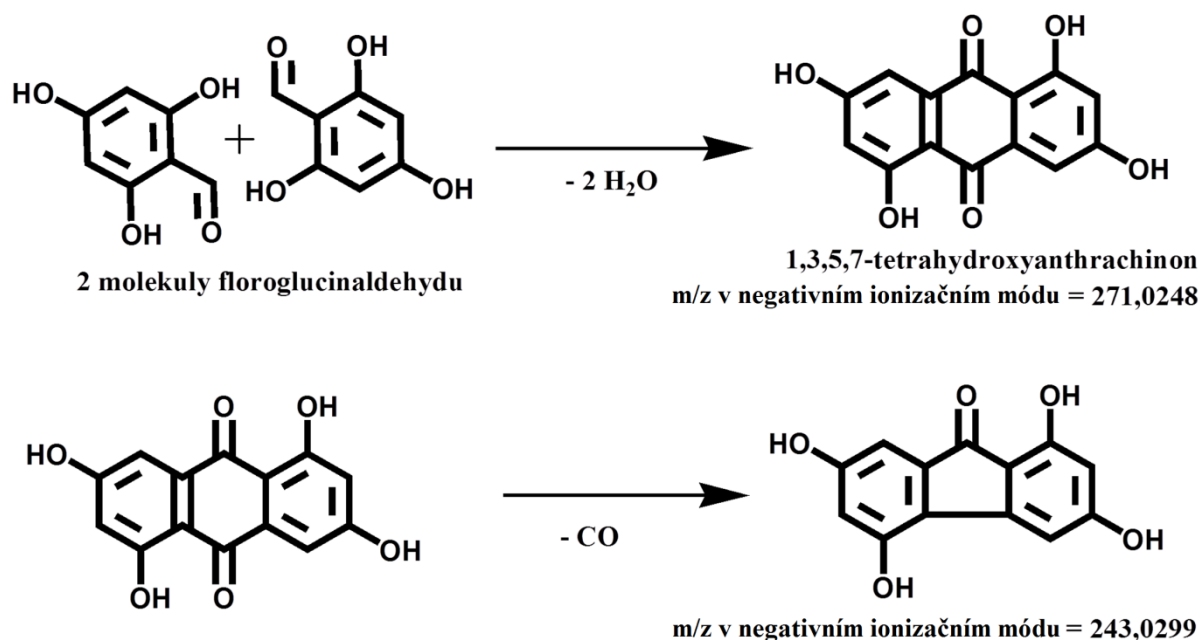
Při identifikaci jsme se zaměřili na tři látky s m/z 243,0324, 271,0255 a 271,0276. Všechny tři látky absorbují ve viditelné oblasti spektra a jsou tedy barevné (absorbanční maxima pro tyto látky jsou v rozmezí vlnových délek 444-487 nm; měřeno na UV detektoru s rozsahem 200-500 nm). Barvu vznikajících látek ukazuje Obr. 12. Jedním z možných vysvětlení vzniku barevných produktů reakcí floroglucinaldehydu je jeho kondenzace za vzniku derivátů anthrachinonu. O anthrachinonech je známo, že jsou barevné a nemají negativní vliv na lidský organismus [186]. Pouze při vyšších častých dávkách může dojít melanóze (zbarvení) tlustého střeva [187]. Na možnost vzniku tetrahydroxyanthrachinonu poukazuje také reaktivnost molekuly floroglucinaldehydu uvedené v teoretické části v kapitole 2.6.1. Na Obr. 13. je znázorněno schéma reakce dvou molekul floroglucinaldehydu za vytvoření 1,3,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu.

čas 0h, pH 7

čas 1 h, pH 7



Obr. 12. Srovnání vzorku v čase 0 a 1 hodina rozkladu v roztoku o pH 7 při 95°C



Obr. 13. Schéma reakce 1,3,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu a následného vzniku látky s m/z 243,03

Identifikace těchto produktů byla založena na LC/HRMS² experimentech. Odchyly měřených hodnot m/z od teoreticky vypočítaných jsou pro tetrahydroxyanthrachinon malé (0,7 a 2,8 mDa). Rodičovský ion látky s hodnotou m/z 243,0324 je o 27,9933 Da nižší (oproti m/z hodnotě prvně elujícího derivátu anthrachinonů). Tato diference odpovídá ztrátě jedné molekuly CO, může tedy jít o dekarboxylaci některého z izomerů s hodnotou m/z 271. Odchylna měřené hodnoty m/z navrženého dekarboxylačního produktu látky je 2,5 mDa. Na Obr. 14A-B je porovnání retenčního profilu laboratorně připraveného anthrachrysenu

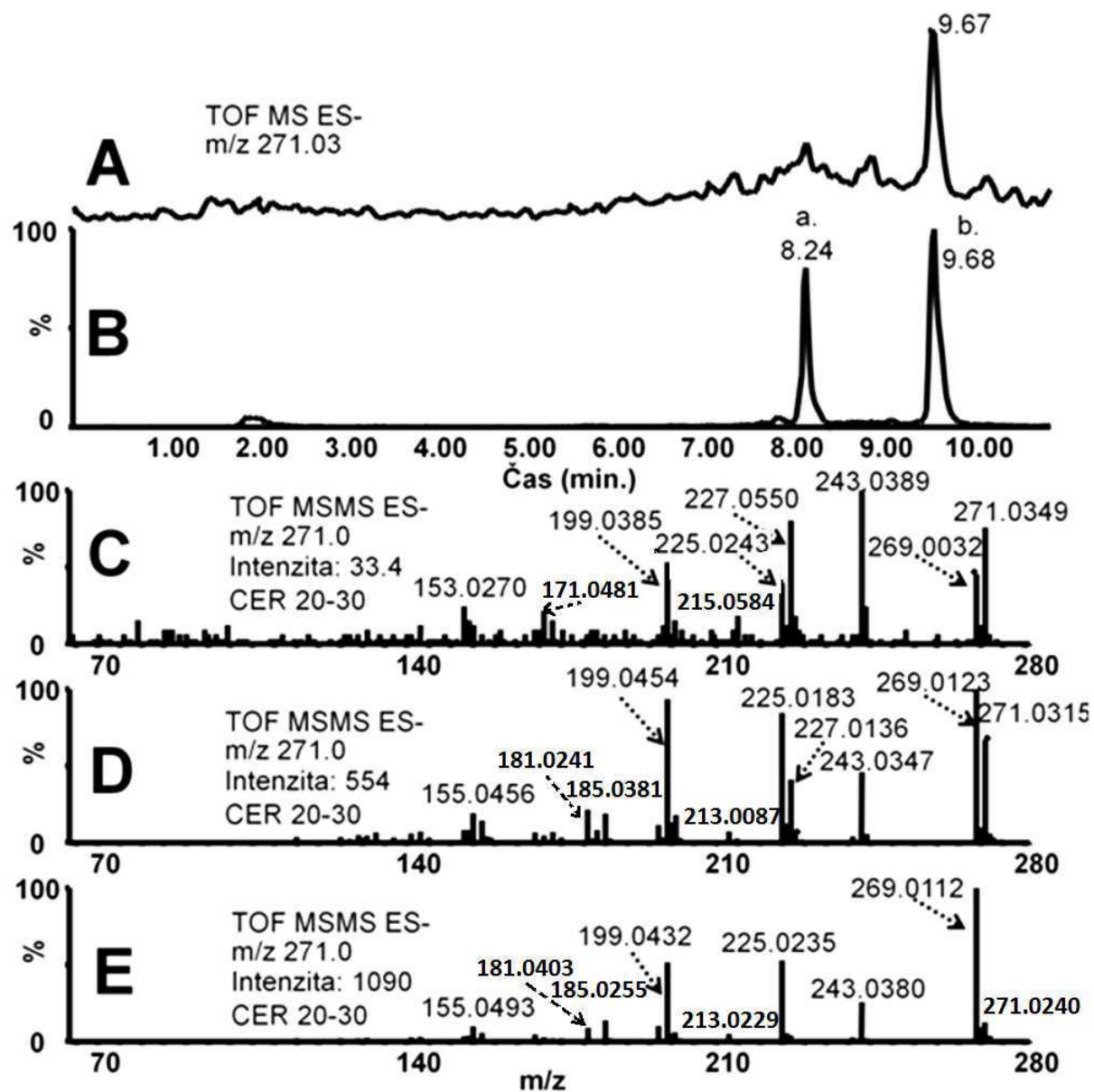
s neznámými látkami s m/z 271,03. Z obrázku je patrné, že standard má stejný eluční profil jako látka, která eluuje v čase 9,67. Při porovnání fragmentačních spekter syntetizovaného standardu anthrachrysenu a neznámých látek (Obr. 14C-E) byla pozorována shoda v určitých fragmentech, tj. 243,0389, 225,0243 a 199,0385. Tyto fragmenty odpovídají postupným ztrátám dvou molekul CO, molekuly vody a atomu kyslíku (Tab.3.). Ztráta atomu kyslíku je v negativním ionizačním módu celkem neobvyklá. Nicméně stejné fragmenty pozorovali také autoři Stodůlová a kol. při fragmentaci 1,3,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu (struktura identifikována pomocí NMR [188]) s využitím iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací [189]. Díky shodě profilů spekter standardu (STD) s neznámými látkami a literaturou můžeme předpokládat, že se jedná o 1,3,5,7-tetrahydroxyanthrachinon případně o jeho izomery.

Vycházíme-li z předpokladu, že měřené vzorky mají stejnou molekulovou hmotu jako standard, tak podle vodíkového (NMR) spektra by se mohlo jednat o 1,3,5,7-tetrahydroxyanthrachinon a/nebo 2,3,6,7-tetrahydroxyanthrachinon. Ačkoli se vznikající anthrachinonová barviva ve studovaných směsích vzhledem k jejich malé koncentraci podařilo potvrdit NMR měřením pouze částečně, je identifikace pomocí LC/MS poměrně přesvědčivá (shodný retenční čas a velmi podobné UV spektrum pořízené DAD detektorem, velmi blízké hodnoty m/z rodičovských iontů i přítomnost stejných fragmentů v MS/MS spektru, shoda s již publikovanými výsledky [188, 189]).

Tab.3. Významné fragmenty nalezené fragmentací neznámých látek s m/z 271,02

RT (min)	[M-H] ⁻	Fragmenty nalezené v MS/MS spektrech	Sumární vzorec	dtm (mDa)
8,24	271,0307	243,0368	C ₁₃ H ₇ O ₅ ⁻	-7,5
		225,0237	C ₁₃ H ₅ O ₄ ⁻	-4,9
		199,0440	C ₁₂ H ₇ O ₃ ⁻	-4,5
9,68	271,0240	243,0337	C ₁₃ H ₇ O ₅ ⁻	-4,4
		225,0182	C ₁₃ H ₅ O ₄ ⁻	0,6
		199,0454	C ₁₂ H ₇ O ₃ ⁻	-5,9

RT – retenční čas; dtm – odchylka od teoretické hmoty



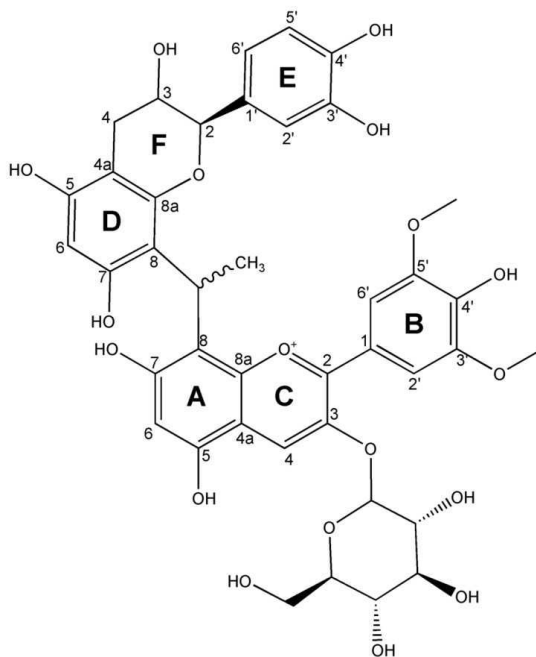
Obr. 14. Rekonstruované chromatogramy pro látku s m/z 271,03

(A – STD; B – neznámé látky s m/z 271,0255 (a.); 271,0276 (b.)) a fragmentační spektra standardu (C) a neznámých látek (D, m/z 271,0255, RT 8,24 a E, 271,0276, RT 9,68)

Výsledky studia přeměn anthokyaninů, floroglucinaldehydu a analýza nově vznikajících anthrachinonových barviv byly publikovány v Chemických Listech [190] a prezentovány na konferencích formou posterů [191, 192].

5.2. Studium kondenzace flavonoidů

Při zpracování červených hroznů révy vinné dochází k chemickým přeměnám anthokyaninových barviv a dalších flavonoidních látek a vzniku nových strukturně složitějších molekul. Jde o dlouhodobě velmi zevrubně studovanou a pozorně sledovanou problematiku [193, 194] zejména ze dvou důvodů: 1. vznikající kondenzované barviva výrazným způsobem mění sensorické vlastnosti vína, případně dalších vyráběných produktů a 2. vlastnosti těchto látek a jejich účinek na lidský organismus a životní prostředí jsou velmi málo prostudovány. Zajímavou skupinou kondenzovaných barviv jsou sloučeniny, ve kterých je molekula anthokyaninu spojena s molekulou jiného flavonoidu (např. katechinu) ethylenovým můstkem. Odpovídající produkty reakce mezi malvidin-3-glukosidem (nejběžnějším anthokyaninem vyskytujícím se v červených hroznech) a katechinem v prostředí acetaldehydu byly podrobně popsány Pissarrou a kol v roce 2005 (diastereomery (+)-katechin-ethyl-malvidin-3-glukosidu, CeM3G) [183]. Tato kapitola se zabývá vývojem nano-LC metody pro separaci těchto diastereomerních látek s ohledem na její možné nasazení při kontrole kondenzovaných barviv ve vinařských produktech a vznikajícím odpadu. Metoda byla z hlediska chromatografických parametrů porovnána s metodou paralelně vyvinutou pro běžnou kapalinovou chromatografii. Struktura připravených látek byla kontrolována NMR měřeními, viz Experimentální část a Přílohy 5-9. Jejich struktury ukazuje Obr. 15.

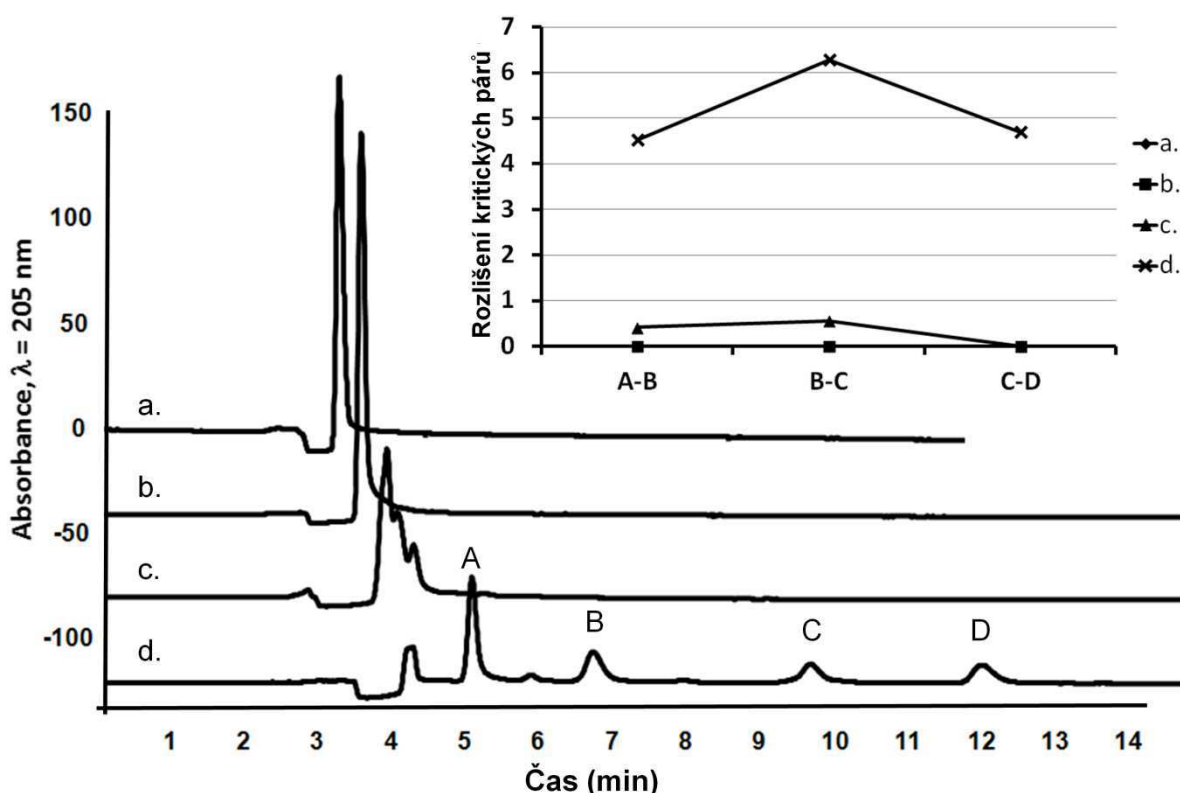


Obr. 15. Struktura diastereomerů C a D (s číslováním)

5.2.1. Nano-kapalinová chromatografie

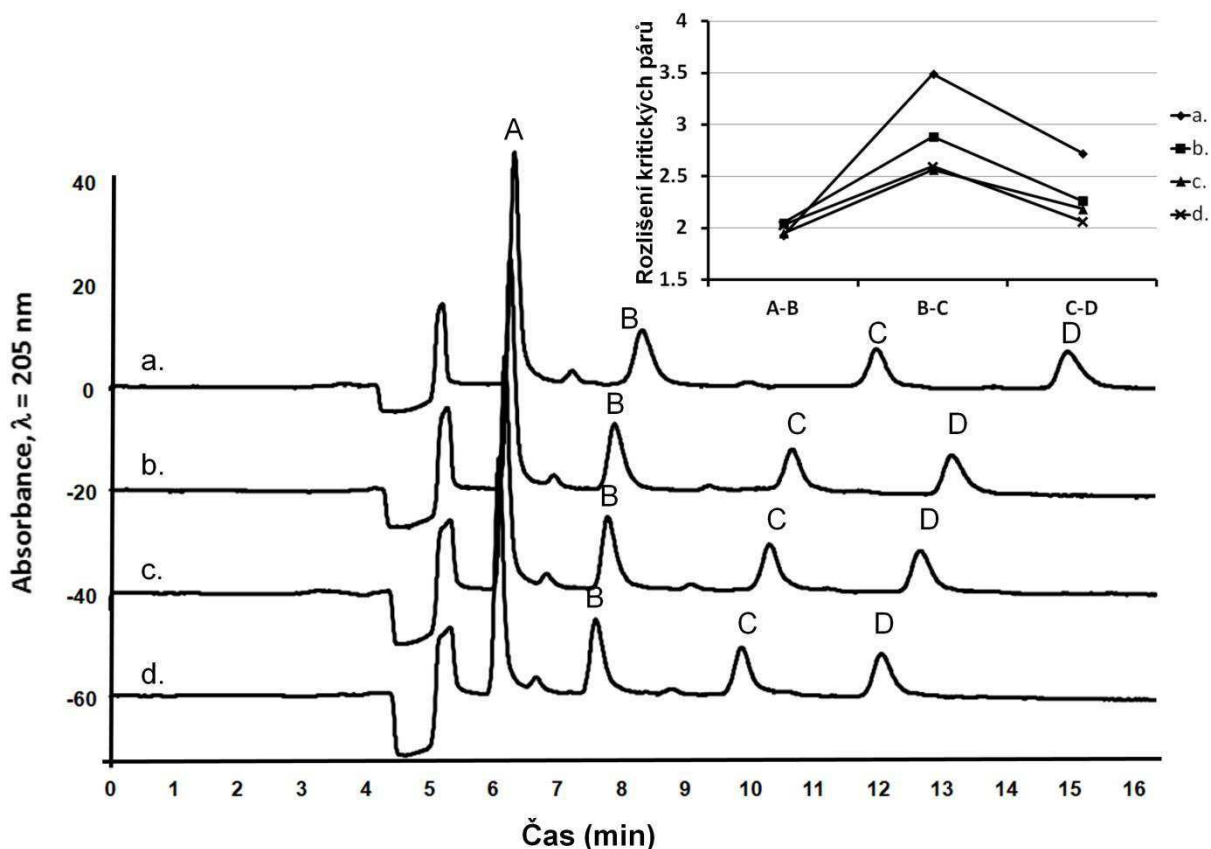
Jedním z hlavních trendů v moderní analytické chromatografii je miniaturizace. Toto samozřejmě také platí pro kapalinovou chromatografii (kapilární/nano-LC systémy). Výhody těchto systémů tkví převážně ve zmenšení chromatografického zředění v koloně s čímž souvisí vyšší separační účinnosti a rozlišení. Další výhodou je menší spotřeba vzorku a mobilní fáze a zlepšení kvality hmotnostních spekter (zvýšení citlivosti) při spojení s nanoelektrosprejem. Díky těmto vlastnostem je nanokapalinová chromatografie šetrná k životnímu prostředí a levná separační technika [181]. Prvním úkolem při vývoji nano-LC metody byla příprava kapilárních chromatografických kolon. Postup přípravy je detailně popsán v kapitole 4.4.2. Mezi nejčastěji používané sorbenty ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii a miniaturizovaných technikách patří plně porézní sorbenty. První separace byly provedeny s 250 mm dlouhou kapilární kolonou plněnou stacionární fází Chromosphere C18 s velikostí částic 3 μm . Byla sledována separace obou diastereomerů CeM3G a jejich prekurzorů (malvidin-3-glukosid a katechin). Byl prostudován vliv složení mobilní fáze na retenci a selektivitu sledovaných analytů při izokratické separaci. S ohledem na potenciální propojení nano-LC techniky s hmotnostním spektrometrem byly pro separace používány těkavé mobilní fáze. Mobilní fáze byly připraveny smícháním vody, acetonitrilu (ACN) a trifluoroctové kyseliny (TFA).

V souladu s nepolárním charakterem stacionární fáze docházelo se zvyšujícím se podílem vody v mobilní fázi k výraznému zlepšení rozlišení analytů (Obr. 16). Při použití mobilní fáze (MF) skládající se ze směsi voda:ACN (80:20) okyselené 0,1% TFA (v/v/v) došlo k oddělení všech sledovaných analytů (reaktanty - A,B; reakční produkty - C,D). Dobré účinnosti chromatografických píků anthokyaninových barviv je dosaženo v kyselých mobilních fázích ($\text{pH} < 2$), což je v souladu s dříve publikovanými separacemi [195]. Pro následující experimenty byla použita mobilní fáze s mírně upraveným poměrem voda:ACN (79:21) s 0,1% TFA (v/v/v) umožňujícím provedení analýzy za 12,5 min při zachování dostatečného rozlišení všech sledovaných analytů.



Obr. 16. Separace reakční směsi při použití MF s různým poměrem voda:ACN 25 cm kapilární kolona (100 μm id) plněna SF Chromosphere C18; mobilní fáze voda:ACN: a. 50:50; b. 60:40; c. 70:30; d. 80:20, všechny okyseleny 0,1% TFA (v/v/v); A. (+)-katechin; B. malvidin-3-glukosid; C. a D. CeM3G diastereomery. Vložený obrázek zobrazuje graf rozlišení kritických párů při různém složení MF.

Vliv množství TFA v mobilní fázi byl také sledován (Obr. 17). Nejrychlejší separace byla získána při okyselení mobilní fáze 0,4% TFA (méně než 13 min) z důvodu posunutí rovnováhy (flavyliový kation/karbinol pseudobáze) směrem k flavyliovému kationtu (vyšší polarita). Nicméně takto vysoká koncentrace TFA může poškodit chromatografickou kolonu (hydrolyza navázaných oktadecylových řetězců). Proto bylo s touto mobilní fází provedeno jen malé množství experimentů. Mobilní fáze byla následně pečlivě vymyta a stav kolony byl kontrolován sledováním retence a účinnosti píků v mobilních fázích s nižší koncentrací TFA. Žádné změny v retenci a separaci nebyly pozorovány. Z výše uvedeného důvodu byla pro další experimenty použita 0,1% TFA jako kompromis mezi dostatečným rozlišením všech látek v reakční směsi (včetně minoritních nečistot elujících mezi katechinem a malvidin-3-glukosidem a mezi malvidin-3-glukosidem a prvním z elujících diastereomerních můstkových barviv) a stabilitou analytů a stacionární fáze.



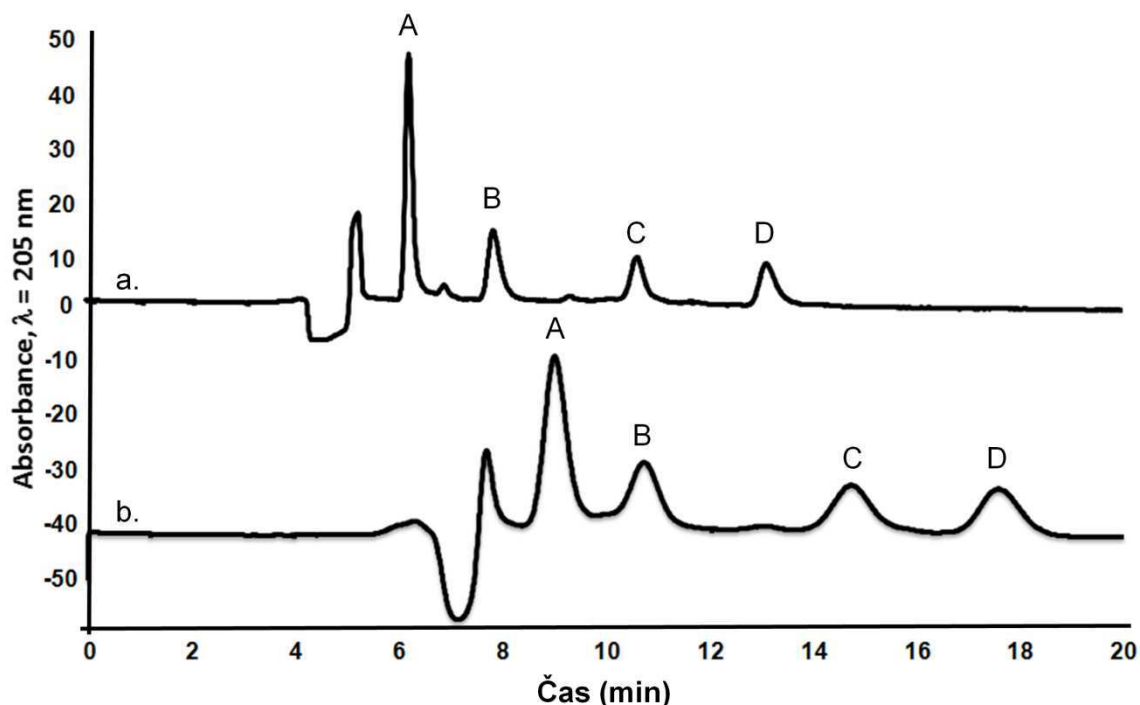
Obr. 17. Nano-LC chromatogramy reakční směsi při různé koncentraci kyseliny trifluoroctové v mobilní fázi

25 cm kapilární kolona (100 μm id) plněna SF Chromosphere C18; mobilní fáze 79:21 voda:ACN; koncentrace TFA: a. 0,05%; b. 0,1%; c. 0,2; d. 0,4 (v/v); A. (+)-katechin; B. malvidin-3-glukosid; C. a D. CeM3G diastereomery. Vložený obrázek zobrazuje graf rozlišení kritických párů při různém složení MF (hodnoty odchylek jsou uvedeny v Příloze 10).

Dále byly studovány separace s mobilní fází obsahující 0,4% kyseliny mravenčí (FA) a 0,4% kyseliny octovou (AcA) místo TFA. Separace s takto nahrazenou okyselující složkou vedly k prodloužení doby analýzy (16 min pro FA a 37 min pro AcA) i zhoršení tvaru a šířky píků. Pro CeM3G diastereomer C byla nalezena šířka píku ($w_{50\%}$) 0,22 min a výškový ekvivalent teoretického patra (HETP) 9 μm při použití 0,1% TFA v porovnání s $w_{50\%}$ 0,64 min a 129 μm při použití 0,4 % FA a $w_{50\%}$ 2,24 min a 218 μm pro AcA. Pro CeM3G diastereomer D byly rovněž nalezeny lepší parametry při použití 0,1% TFA: $w_{50\%}$ 0,26 min a HETP 8 μm v porovnání s $w_{50\%}$ 0,80 min a 133 μm pro 0,4 % FA a $w_{50\%}$ 1,53 min a 81 μm pro 0,4% AcA.

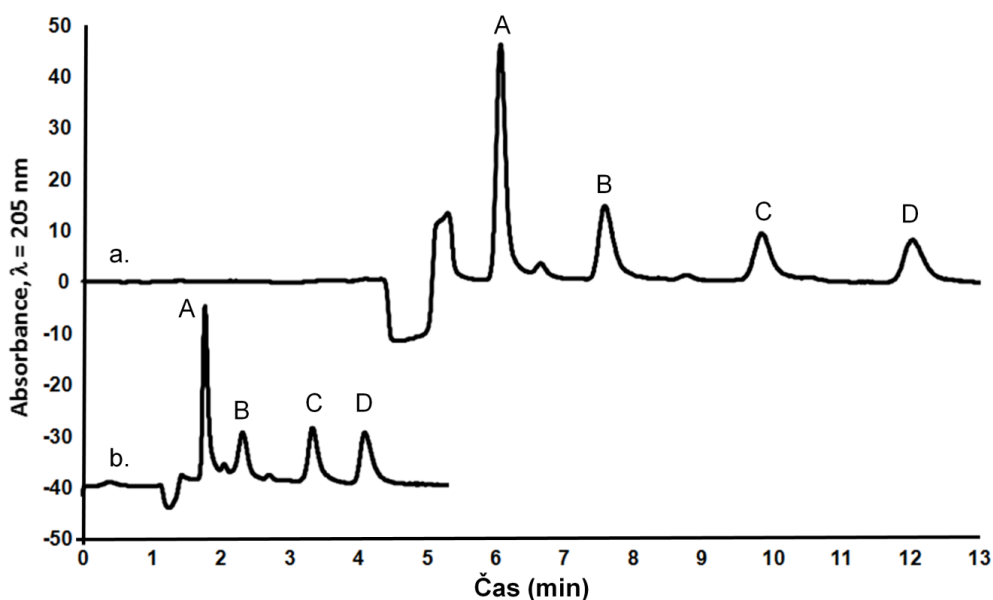
V současné době jsou velmi populární povrchově porézní stacionární fáze z důvodů vysoké účinnosti a možnosti pracovat za nízkých tlaků, což umožňuje použití konvenčního kapalinového chromatografu (pracujícího obvykle do 400 bar) [196]. Z toho důvodu byla

porovnávána plně porézní stacionární fáze Chromosphere C18 s povrchově porézní SF Kinetex C18. Pro analýzu reakční směsi byla použita optimální MF popsaná výše, tj. voda:ACN/79:21 s 0,1% TFA (v/v/v). Při použití povrchově porézní SF byla pozorována menší účinnost v porovnání s plně porézní SF (Obr. 18). Kolona naplněná SF Chromosphere C18 dosáhla 9 667 teoretických pater, zatímco kolona s SF Kinetex C18 pouhých 2 342 pater (tj. 9667 (Cat), 5117 (Mv-3-Glu), 8060 (CeM3G diasteromer, C) a 7849 (CeM3G diasteromer, D) pro Chromosphere C18 a 2342 (Cat), 1848 (Mv-3-Glu), 1893 (CeM3G diasteromer, C) a 2224 (CeM3G diasteromer, D) pro Kinetex C18) při použití kolon o stejných rozměrech. Důvodem horší separace s použitím kolony Kinetex C18 může být částečné překročení kapacity kolony. Kapacita povrchově porézních částic SF je obvykle nižší než kapacita srovnatelných částic plně porézních. To naznačují i rozdíly v retenčních faktorech: 0,17 (Cat), 0,40 (Mv-3-Glu), 0,91 (CeM3G diasteromer, C) a 1,28 (CeM3G diasteromer, D) pro povrchově porézní částice v porovnání s 0,19 (Cat), 0,50 (Mv-3-Glu), 1,02 (CeM3G diasteromer, C) a 1,49 (CeM3G diasteromer, D) pro plně porézní částice. Nižší účinnost separace může být také v určité míře ovlivněna komplikovanější přípravou povrchově porézních kolon (zejm. s ohledem na přípravu frit, viz. 3.4.2. Příprava kapilárních kolon)



Obr. 18. Nano-LC chromatografická separace reakční směsi na dvou kolonách s různou SF
a. plně porézní Chromosphere C18; b. core-shell Kinetex C18; MF 79:21 voda:ACN okyselená 0,1 TFA (v/v/v). A. (+)-katechin; B. malvidin-3-glukosid; C. a D. CeM3G diastereomery.

Pro další experimenty byla tedy použita SF Chromosphere C18. Pro další zlepšení účinnosti a zkrácení doby analýzy byla připravena kratší kolona. Na Obr. 19 je zobrazena separace reakční směsi pomocí kratší kolony (150 mm x 100 μm). Bylo dosaženo dostatečného rozlišení všech složek za méně než 6 minut (průtok kolonou po splitování je 360 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$). Separační účinnost přesáhla 9500 teoretických pater pro CeM3G diastereomer C. HETP jednotlivých složek byly u 25 cm dlouhé kolony Chromosphere C18 26 μm (Cat), 49 μm (Mv-3-Glu), 31 μm (CeM3G diastereomer, C) a 32 μm (CeM3G diastereomer, D). U 15 cm kolony se HETP snížilo na 7 μm (Cat), 15 μm (Mv-3-Glu), 7 μm (CeM3G diastereomer, C) a 7 μm (CeM3G diastereomer, D). Výrazné zlepšení účinnosti je dosaženo i proto, že kratší kolony se daří naplnit homogenněji [197].

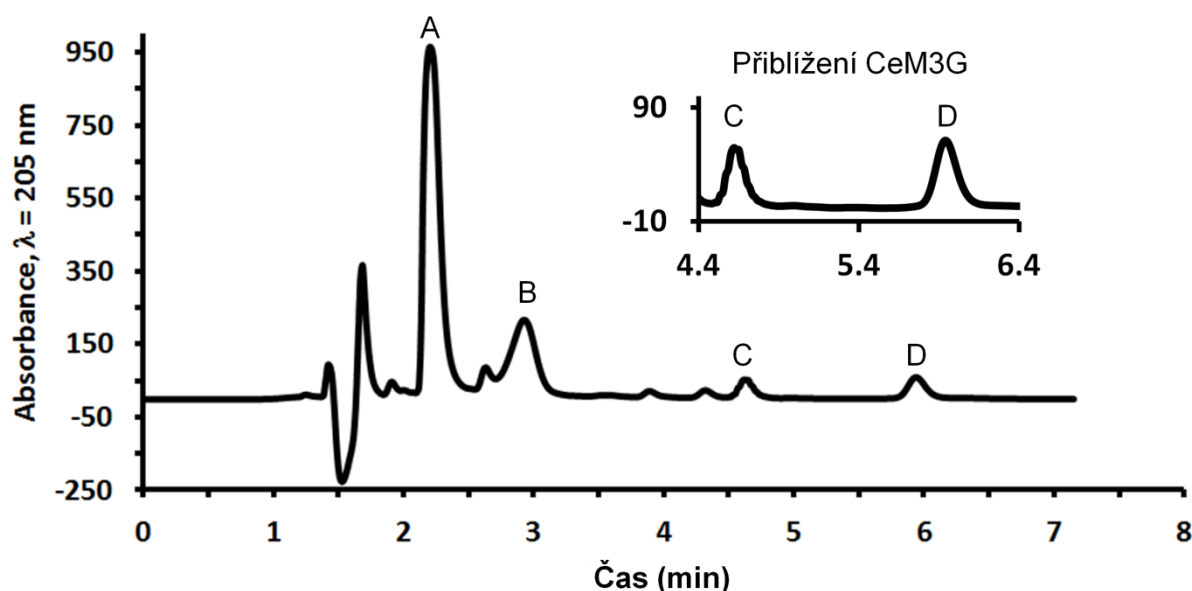


Obr. 19. Porovnání dvou různě dlouhých kolon pro separaci reakční směsi.
a. 25 cm dlouhá kolona; b. 15 cm dlouhá kolona. 80:20 voda:ACN okys. 0,1% TFA (v/v/v).
A. (+)-katechin; B. malvidin-3-glukosid; C. a D. CeM3G diastereomery.

Vedle náplňových kolon byla retence studována také na monolitické koloně Chromolith. U monolitické kolony byl HETP 34 μm (Cat), 34 μm (Mv-3-Glu), 22 μm (CeM3G diastereomer, C) a 13 μm (CeM3G diastereomer, D), což je výrazně horší než při použití 15 cm náplňové kolony Chromosphere C18 (HETP se pohybovalo v rozmezí 7-15). Selektivita pro separaci obou CeM3G diastereomerů je srovnatelná, zatímco pár katechin-malvidin nebyl oddělen za použitých podmínek pomocí monolitické kolony. Jednotlivé chromatografické parametry jsou uvedeny v Tab.4.

5.2.2. Porovnání konvenční vysoko-účinné kapalinové chromatografie s nano-kapalinovou chromatografií

Na Obr. 20 je zobrazena separace reakční směsi HPLC s kolonou Chromosphere 3 C18 běžného rozměru (100 mm x 4.6 mm, dp = 3 μ m). Průtok 0,762 mL.min⁻¹ byl nastaven tak aby odpovídal stejné lineární průtokové rychlosti MF, jaká byla použita u nano-LC metody. Pro optimalizovanou HPLC metodu byl použit nástřik 5 μ L. Tato metoda poskytla dostatečné rozlišení všech studovaných složek reakční směsi. Bylo pozorováno pouze nižší rozlišení mezi malvidin-3-glukosidem s neznámou nečistotou (R = 1,01). Analýza byla ukončena za méně než 7 min.



Obr. 20. HPLC separace reakční směsi s využitím kolony Chromosphere C18 rozměry kolony (100 x 4,6 mm, velikost částic 3 μ m), mobilní fáze 80:20 voda:ACN oks. 0,1% TFA(v/v/v); A. (+)-katechin; B. malvidin-3-glukosid; C. a D. CeM3G diastereomery.

V Tab.4. jsou uvedeny základní chromatografické parametry získané z měření pomocí nano-LC a HPLC. Nano-kolona Chromosphere poskytla vyšší retenci a separační účinnost (nižší HETP, zhruba 10krát pro (+)-katechin a malvidin-3-glukosid a 3krát pro CeM3G diastereomery) v porovnání s konvenční HPLC. Na druhou stranu lepší selektivita pro CeM3G diastereomery (rozdíl v selektivním faktoru 1,4-14,1%) a vyšší rozlišení všech látek bylo získáno pomocí konvenční HPLC (rozdíl 35,6-91,6%). Výše uvedené výsledky pro konvenční HPLC byly získány za optimálních podmínek separace. Nástřikový objem při optimalizovaných HPLC experimentech odpovídal 5,3% nástřikového objemu použitého pro

nano-LC. Pro srovnání chování nano a konvenční kolony byl v dalším experimentu nastříkovaný objem u HPLC systému zvýšen tak, aby odpovídal stejné části objemu kolony (5,3% celkového objemu kolony), který byl použit u nano-LC systému. Při tomto "škálovaném" experimentu byly plochy píků zhruba 10x větší v porovnání s optimalizovaným HPLC experimentem. U píků (+)-katechinu a malvidin-3-glukosidu bylo pozorováno zvětšení šířek píků. U CeM3G diastereomerů byly šířky píků zjištěné u „škálovaného“ experimentu srovnatelné s optimalizovaným experimentem. Nicméně u škálovaného experimentu bylo pozorováno zhoršení HETP u všech sledovaných látek v porovnání s nano-LC.

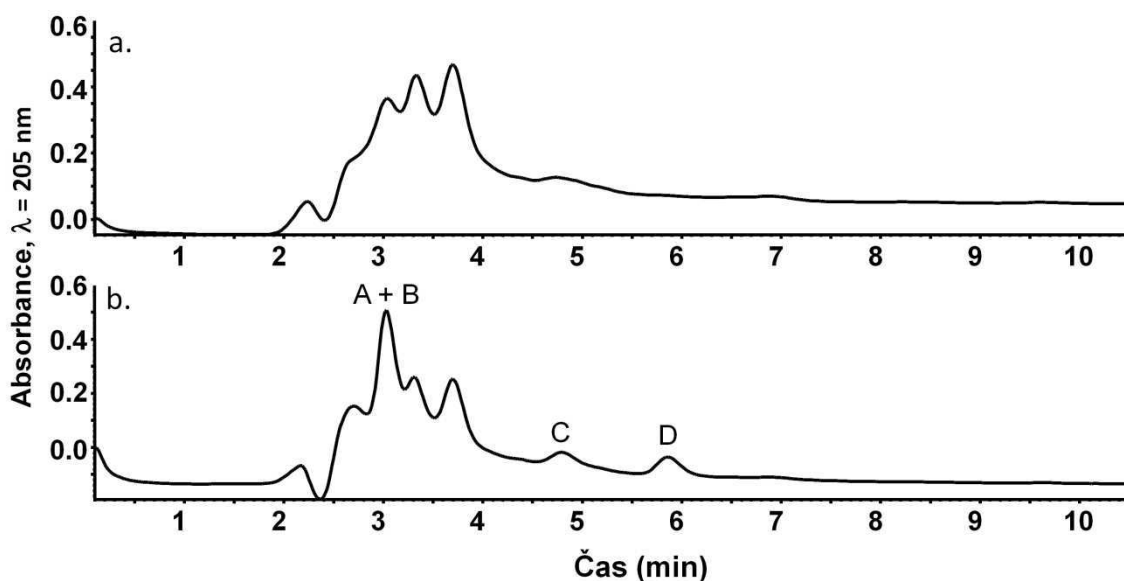
Tab.4. Hlavní parametry separace reakční směsi pomocí nano-LC a HPLC systému.

t'_R = redukovaný retenční čas; $w_{50\%}$ = šířka píku v polovině výšky; HETP = výškový ekvivalent teoretického patra; k = retenční faktor; α = selektivita; A_s = asymetrie píku; R = rozlišení (počítáno pro píky, i.e. (+)-katechin, malvidin-3-glukosid a oba CeM3G diastereomery)

	t'_R (min)	$w_{50\%}$ (min)	HETP (μm)	k	α	SD	A_s	R	SD
nanoLC: Chromosphere C18, 150 mm x 100 μm , 3 μm , průtok 360 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$, nástřik 100 nL									
(+)-katechin	0,73	0,08	7	0,61	-	-	2,33	-	-
malvidin-3-glukosid	1,60	0,17	15	1,34	1,94	$\pm 0,049$	1,11	1,73	$\pm 0,021$
CeM3G diastereomer C	3,37	0,19	7	2,83	1,84	$\pm 0,019$	1,78	2,73	$\pm 0,218$
CeM3G diastereomer D	4,70	0,25	7	3,94	1,39	$\pm 0,003$	2,13	2,01	$\pm 0,244$
nanoLC: Chromolith CapRod, 150 mm x 100 μm , 3 μm , průtok 360 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$, nástřik 30 nL									
(+)-katechin	0,59	0,34	34	0,19	-	-	1,05	-	-
malvidin-3-glukosid	0,59	0,34	34	0,19	1,00	$\pm 0,000$	1,05	0	$\pm 0,000$
CeM3G diastereomer C	1,26	0,32	22	0,41	2,16	$\pm 0,099$	1,13	1,21	$\pm 0,043$
CeM3G diastereomer D	1,69	0,28	13	0,55	1,33	$\pm 0,017$	1,31	0,84	$\pm 0,058$
HPLCopt: ChromSphere C18, 100 mm x 4,6 mm, 3 μm , průtok 0,761 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, nástřik 5 μL									
(+)-katechin	0,77	0,15	84	0,54	-	-	2,00	-	-
malvidin-3-glukosid	1,50	0,20	84	1,05	1,92	$\pm 0,028$	0,91	2,48	$\pm 0,132$
CeM3G diastereomer C	3,18	0,15	19	2,22	2,12	$\pm 0,005$	1,57	6,34	$\pm 0,502$
CeM3G diastereomer D	4,50	0,17	15	3,14	1,41	$\pm 0,004$	1,50	5,41	$\pm 0,475$
HPLCscaled: ChromSphere C18, 100 mm x 4,6 mm, 3 μm , průtok 0,761 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, nástřik 88 μL									
(+)-katechin	0,93	0,30	273	0,67	-	-	3,17	-	-
malvidin-3-glukosid	1,60	0,47	246	1,14	1,69	$\pm 0,021$	0,75	1,01	$\pm 0,025$
CeM3G diastereomer C	3,42	0,17	13	2,44	2,14	$\pm 0,013$	1,45	3,65	$\pm 0,200$
CeM3G diastereomer D	4,73	0,18	12	3,38	1,39	$\pm 0,007$	1,57	4,63	$\pm 0,199$

Pro zjištění použitelnosti nano-LC metody pro analýzu reálného vzorku byl na kapilární kolonu nastříknut extrakt vinařského opadu (matoliny červených hroznů). Obr. 21. ukazuje analýzu vzorku matolin (a) a vzorku s přidavkem malvidin-3-glukosidu, katechinu a CeM3G

diastereomerů (b). Ve vzorku s přidavkem těchto složek jsou patrné píky obou diastereomerů, které jsou dobře separovány od majoritních složek přítomných matolinách a jsou i vzájemně velmi dobře rozlišeny (matrice tedy nemá významný vliv na vzájemnou separaci těchto diastereomerních můstkových barviv) (Obr. 21b.). Vyvinutá metoda separace těchto barviv na nano-koloně může být základem rychlého analytického postupu pro kontrolu kondenzovaných barviv v odpadech z vinařského průmyslu.



Obr. 21. Analýza extraktu matolin z červených hroznů

(a) a extraktu s přidavkem (+)-katechinu (A); malvidin-3-glukosidu (B) a CeM3G diastereomerů (C, D)
 (b); kolona: Chromosphere C18 (150 mm x 100 μm i.d.), MF 80:20 H₂O:ACN okys. 0.1 % TFA (v/v/v).

Výsledky uvedené v této kapitole byly publikovány v Journal of Chromatography A [181].

5.3. Anaerobní fermentace vinařského odpadu

5.3.1. Optimalizace anaerobní fermentace

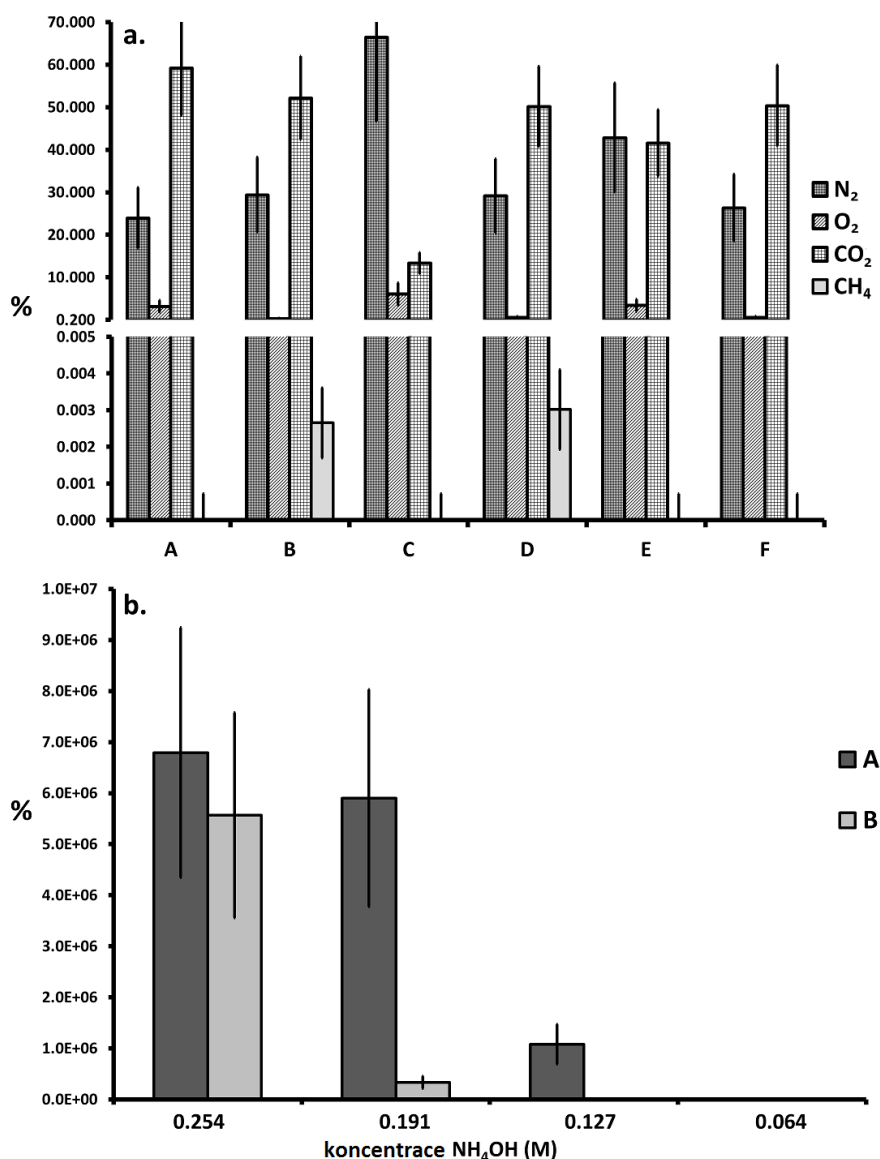
Anaerobní fermentace je efektivní ekologická metoda pro zpracování biologicky rozložitelného odpadu za současné výroby levné elektrické a tepelné energie. Odpady můžeme v tomto ohledu rozdělit na dvě velké skupiny: 1) lehce zplynitelné, kam patří například kukuřičné siláž a řepné řízky a 2) těžce zplynitelné kam patří odpad z vinařské výroby. Mezi hlavní důvody odpovědné za inhibici methanogeneze vinařského odpadu patří nízké pH a vysoký obsah flavonoidů (antibakteriální účinky). Z tohoto důvodu je nutné objasnit procesy přeměny flavonoidů za anaerobních podmínek a současného vývoje bioplynu (CO_2 a CH_4). Pro dosažení stabilní methanogeneze je nutno celý systém optimalizovat.

Optimalizace anaerobní fermentace v mikro-měřítku byla rozdělena do dvou částí. První část zahrnovala hodnocení vlivu různých aditiv v reakční směsi. Vzorky byly připraveny smícháním prasečí kejdy (PS), výlisky červených hroznů (RGM), vody, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ roztoku methanogenních bakterií (MetBac) a thioglykolátového média (TGM) v různých poměrech (MetBac a TGM byly přidány pro urychlení množení methanogenních bakterií a vyšší produkci methanu). Přípravek MetBac APD BIO GAS je hojně využíván v čistírnách odpadních vod pro urychlení a zvýšení účinnosti rozkladu organického materiálu.

Obr. 22a. zobrazuje porovnání obsahu čtyř plynů (N_2 , O_2 , CO_2 , CH_4) ve fermentačních směsích různého složení inkubovaných v objemu 2 mL po 23 denní anaerobní fermentaci (složení fermentačních směsí je uvedeno v legendě k tomuto obrázku). Nejvyšší obsah methanu byl nalezen v roztocích B a D (přibližně 0,003%). V roztocích A, C, E a F nebyl detekován žádný methan v průběhu anaerobní fermentace. Z tohoto experimentu je zřejmé, že pro efektivní náběh anaerobního zplyňování je nezbytné k vinařskému odpadu přidat prasečí kejdu. pH v roztoku A pokleslo z hodnoty 4,0 na 3,4; v roztoku B z 7,8 na 4,0; v roztoku C z 4,0 na 3,4; v roztoku D z 7,8 na 4,4; v roztoku E z 7,8 na 4,2 a v roztoku F z 7,2 na 4,4. Tyto předběžné experimenty dále ukazují, že přídavek MetBac (D) nijak nezlepší produkci methanu (porovnání se vzorkem B). Z tohoto důvodu byla v dalších experimentech použita směs PS-RGM bez přídatku MetBac a TGM.

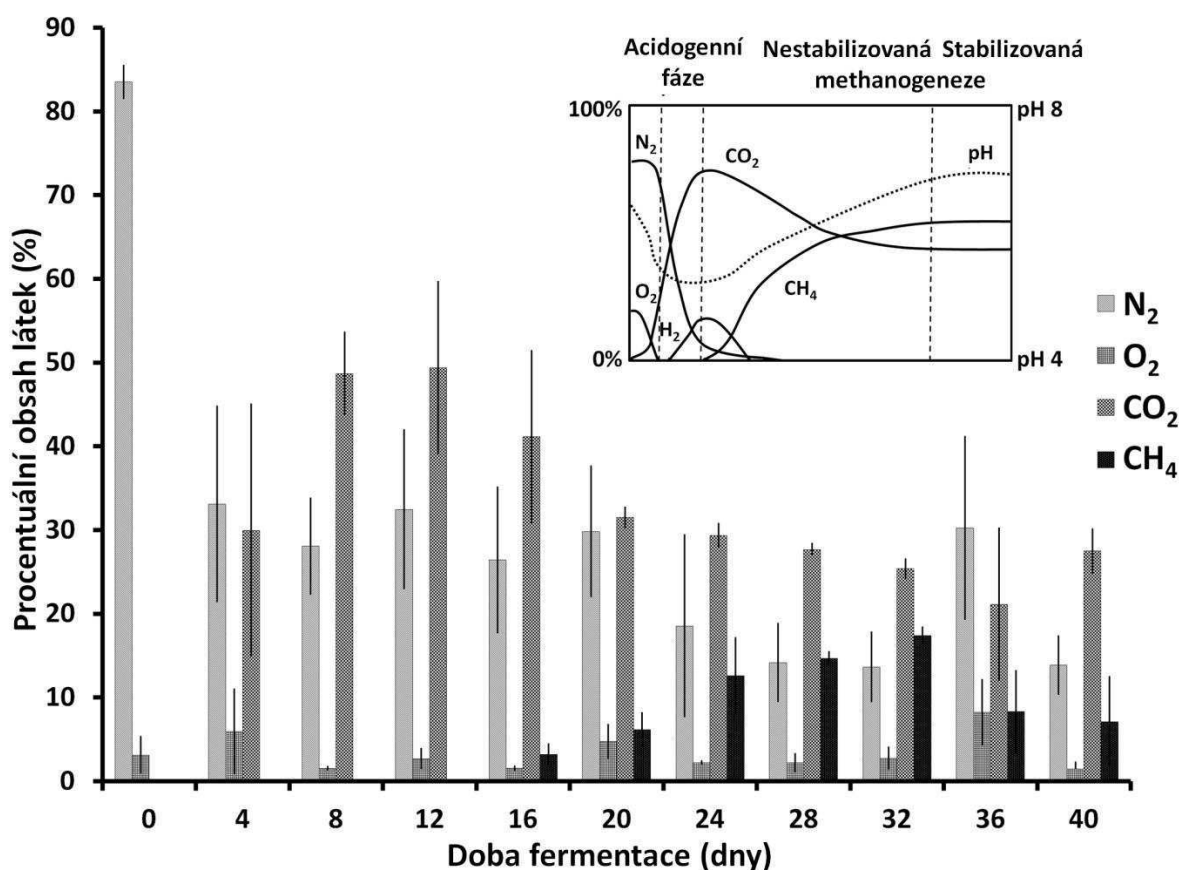
V druhé části optimalizačních experimentů byl sledován vliv hydroxidu amonného (vliv na pH směsi) na proces gasifikace fermentačních směsí o různém poměru vstupních složek (tj. PS a RGM). Obr. 22b. poukazuje na fakt, že udržování pH reakční směsi v alkalicko-neutrální oblasti je klíčová podmínka pro vznik a udržení methanogeneze, přinejmenším při anaerobní fermentaci za diskontinuálních podmínek. Větší množství PS a hydroxidu amonného zajišťují stabilní podmínky anaerobní fermentace (pH reakční směsi pokleslo

v průběhu experimentu z 9,8 na 7,4). V roztocích s malým obsahem PS (tj. poměr PS:RGM = 250:50, 100:50 a 50:50, (m/m)) nebyl detekován methan. Pro další studii byla zvolena koncentrace NH_4OH $0,127 \text{ mol.L}^{-1}$ (koncentrace v roztoku) jako kompromis zajišťující stabilní anaerobní fermentaci a udržení přímého působení amoniaku na studované polyfenolické látky v malém rozsahu oproti jejich přeměnám vlivem fermentačních procesů (pH tohoto roztoku pokleslo z 9,54 na 6,57 po 21 dnech).



Obr. 22. Procentní obsah N_2 , O_2 , CO_2 , CH_4 po 23 dnech anaerobní fermentace (a.) a efekt přidavku NH_4OH na produkci methanu v různých poměrech vepřové kejdy a matolin z červených hroznů (b); a. - A) 200 mg RGM + 2 mL vody; B) 100 mg RGM + 450 mg PS + 2 mL vody; C) 200 mg RGM + 2 mL vody + $1 \mu\text{L}$ MetBac; D) 100 mg RGM + 450 mg PS + 2 mL vody + $1 \mu\text{L}$ MetBac; E) 200 mg RGM + 2 mL TGM + $1 \mu\text{L}$ MetBac; F) 100 mg RGM + 450 mg PS + 2 mL TGM + $1 \mu\text{L}$ MetBac; b. - A) 750:50 = PS-RGM (m/m); B) 500:50 = PS-RGM (m/m).

Proces anaerobní fermentace za optimálních podmínek (poměr PS:RGM 750:50, m/m; konečná koncentrace NH_4OH $0,127 \text{ mol.L}^{-1}$; 35°C) byl kontrolován pomocí GC/MS (analýza 4 hlavních plynů). Obr. 23. zobrazuje proces anaerobní fermentace v reakční směsi probíhající v našem experimentu v mikroreaktoru a porovnává jej se změnami v obsazích hlavních plynů popsanych v literatuře [198]. V první části fermentace (při hydrolýze) dochází k rychlému poklesu kyslíku a dusíku, které jsou hlavními složkami vzduchu. Obsah oxidu uhličitého se zvyšuje za současného poklesu pH. Tento trend je rovněž pozorován v další fázi fermentace - acidogenezi. V hlavní fázi (při methanogenezi) dochází k prudkému nárůstu methanu se současným poklesem CO_2 a H_2 [198]. Diskontinuální fermentace PS-RGM vykazuje stejný profil hlavních plynů, jaký je uveden ve vloženém obrázku (Obr. 23.). Změny v profilu plyných složek v našem diskontinuálním mikro-reaktoru jsou kvalitativně ve velmi dobré shodě s optimálním (teoretickým) průběhem fermentace popsáním v literatuře. Tento fakt poukazuje na možnost simulace řady složitých průmyslových procesů zahrnujících anaerobní fermentaci v laboratorních podmínkách (v mikroreaktoru) za výrazného snížení nákladů. Výsledky z našeho experimentu anaerobní fermentace vinařského odpadu poukazují na to, že relativně snadnou modifikací vinařského odpadu je možné docílit zplynění tohoto materiálu. Získaná data rovněž kvalitativně potvrzují studii Frabbriho a kol [160] popisující analýzu plyných složek v reakční směsi složené z PS a vinařského odpadu. Současně s odebíráním plyných složek z vnitřní atmosféry mikro-reaktoru byly odebírány vzorky digestátu pro analýzu pomocí LC/MS, která je popsána v následující kapitole.

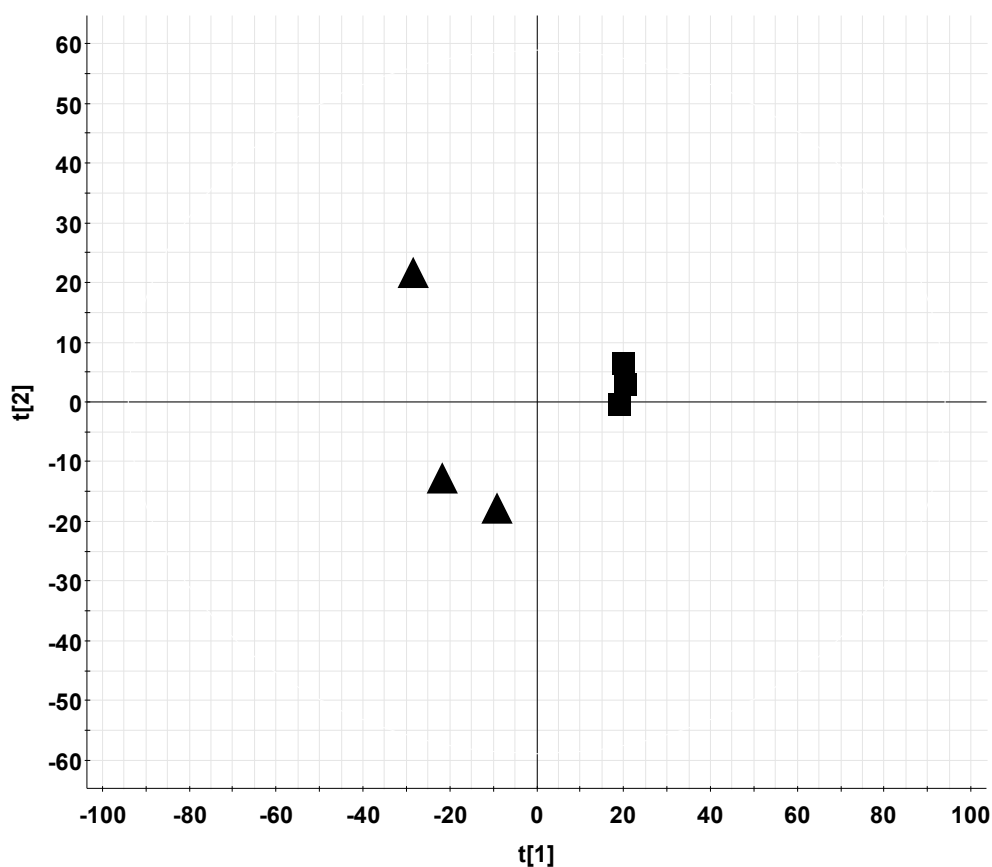


Obr. 23. Změny v zastoupení hlavních plynů během diskontinuální anaerobní fermentaci směsi PS a RGM (vložený obrázek ukazuje optimální podmínky anaerobní fermentace - publikováno s povolením autorů [15]).

5.3.2. Analýza digestátu pomocí LC/MS

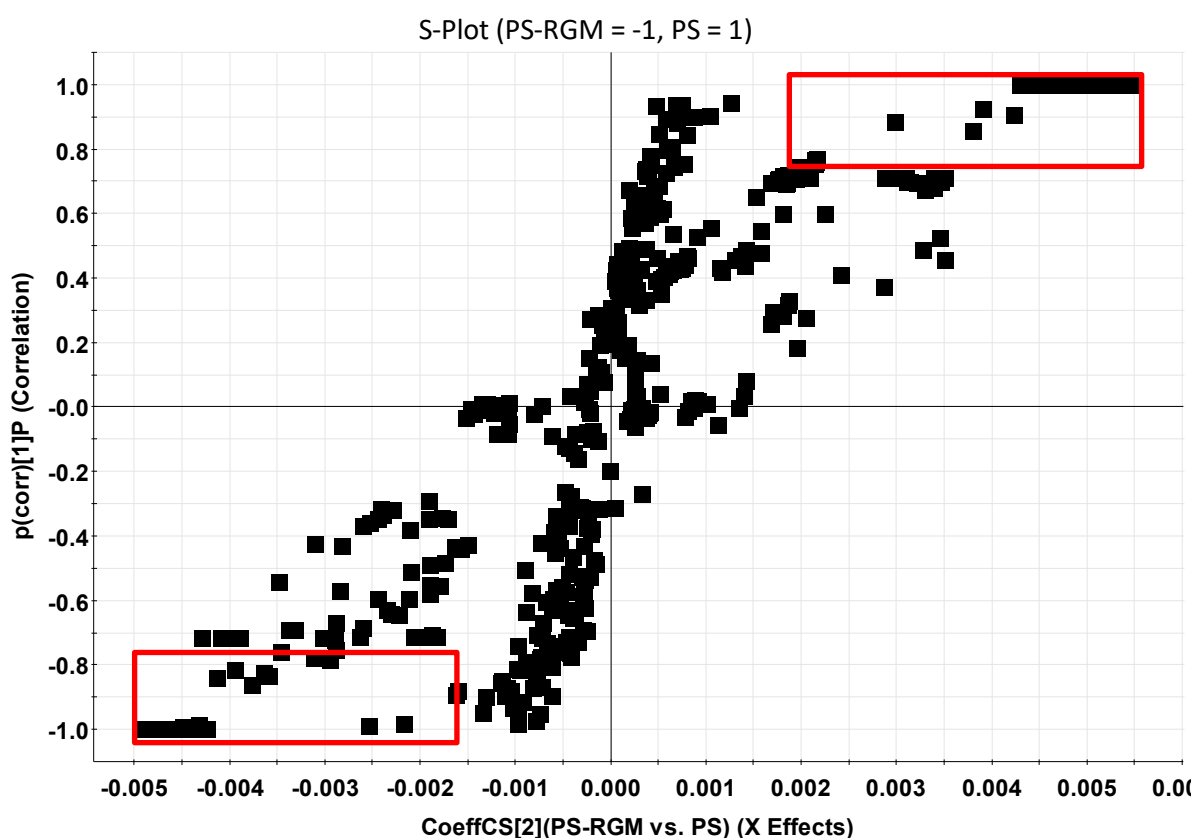
Vzorky digestátu byly odebírány z reaktoru injekční stříkačkou přes šroubovací víčko a septum uzavírající head-space vialku (použitou jako mikroreaktor) a analyzovány pomocí LC/MS. Surová LC-MS data získaná analýzou PS-RGM a PS (jako blank) směsí v počáteční fázi anaerobní fermentace (startovací podmínky, 1. fáze) byly zpracovány pomocí softwaru MarkerLynx. Pomocí tohoto softwaru byla provedena extrakce retenčních časů, m/z hodnot a intenzit, normalizace a zarovnání (alignment) dat a získána odpovídající datová matice (popisující relativní rozdíly v intenzitách mezi jednotlivými páry RT_m/z hodnot). Dále byla data upravena pomocí logaritmické transformace pro potlačení kvantitativní a zvýšení kvalitativní funkce dat. Vzniklý soubor dat byl zpracován pomocí statistického softwaru EZinfo a studován pomocí analýzy hlavních komponent (PCA). Score plot (Obr. 24) ukazuje významné rozdíly mezi vzorky PS-RGM a PS. PS-RGM vzorky jsou koncentrovány v oblasti, která může být definována jako obdélník se souřadnicemi $x_1;x_2;y_1;y_2$; -9,157; -28,497;

-17,707; 21.693. Oproti tomu vzorky PS se nacházejí v obdélníkové oblasti $x_1;x_2;y_1;y_2$; 19,067; 20,530; -0,422; 6,285.



Obr. 24. Score plot vzorků prasečí kejdy (čtverec) a směsi PS-RGM (trojúhelník)

Pro nalezení látek odpovědných za segregaci dat byla použita ortogonální projekce do latentních struktur (OPLS-DA). Obr. 25. ukazuje S-plot zobrazující nalezené RT_{m/z} páry z hlediska jejich rozdílů mezi oběma typy vzorků. Markery s největší variabilitou (vyjádřenou x-souřadnicí) a zároveň největší věrohodností (vyjádřenou y-souřadnicí) byly extrahovány z příslušného S-plotu z oblasti nejnižšího rizika (Tab.5.). V našem případě je tato oblast (v literatuře popisovaná, jako „oblast malého rizika“ – „low risk region“) definována jako obdélník se souřadnicemi: $p[1] = 30-100\%$ z nejvyšší hodnoty na ose x a $p[2] = 75-100\%$ z nejvyšší hodnoty na ose y. Nejvýznamnější markery byly detailně studovány pomocí cílených LC/MS/MS experimentů (viz. níže).



Obr. 25. S-plot vzorků PS a PS-RGM zobrazující nalezené RT_m/z páry z hlediska jejich rozdílů mezi oběma typy vzorků. Červené obdélníky vyznačují „low risk region“

Tab.5. Markery nalezené srovnáním PS-RGM a PS v počátečních roztocích pomocí grafu S-plot. (RT – retenční čas; p[1] a p[2] – souřadnice každého markeru v Loading plotu)

#	Látka	RT (min)	[M+H] ⁺	Odchylna od teoretické hmoty (mDa)	Diagnostické	p[1]	p[2]
					fragmenty nalezené v MS/MS spektrech		
1	Hydroxylovaný kaempferol	9,03	303,0530	-2,5	229,0463 183,0456 153,0221 121,0280	-0,0047	-0,9993
2	Hydroxybenzoylkatechin	11,95	411,1100	-2,0	291,1002 289,0708 259,0602 139,0542 123,0433	-0,0046	-0,9981
3	Kaempferol	9,93	287,0610	-5,4	213,0552 153,0188	-0,0045	-0,9996

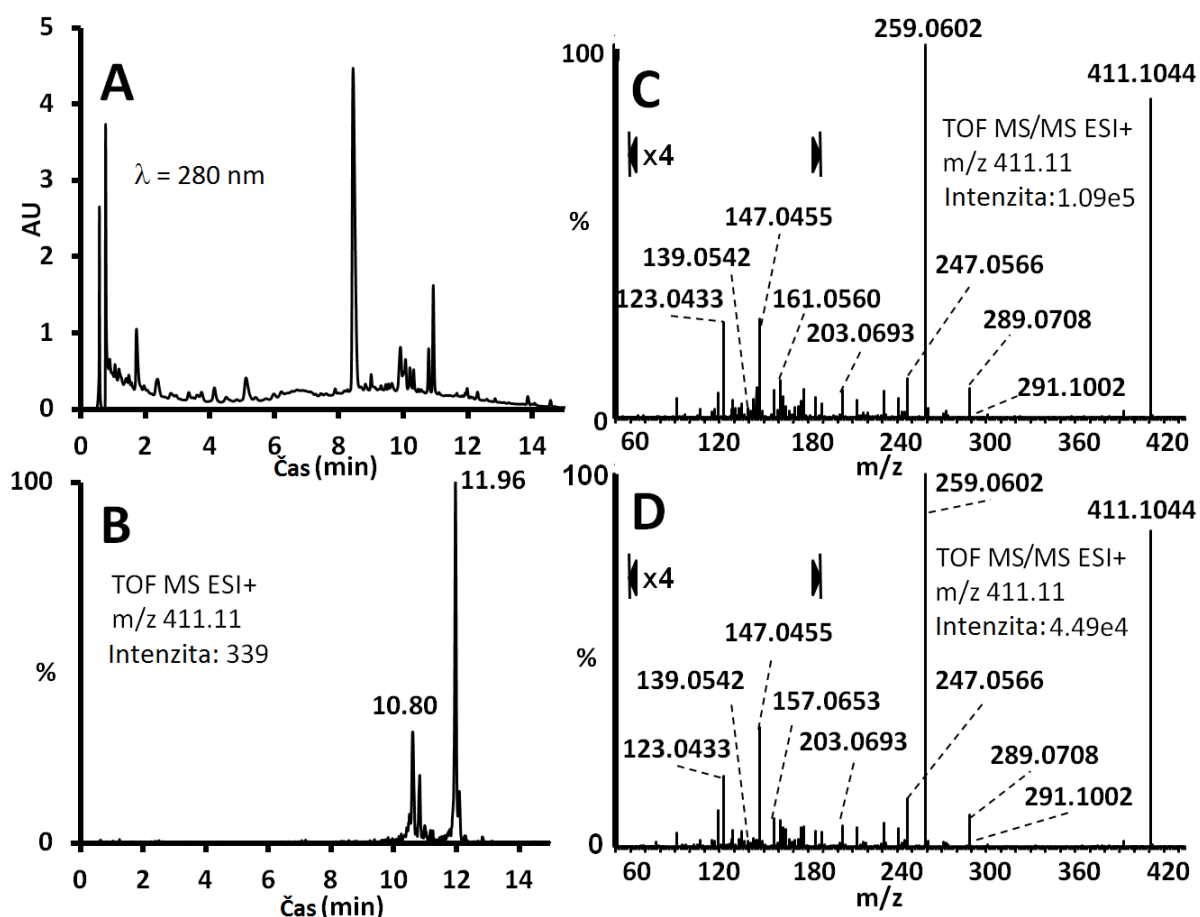
					137,0239		
					121,0290		
4	Malvidin-chalkon	7,92	349,0970	-4,7	223,0618	-0,0045	-0,9989
					181,0492		
					139,0388		
5	Neidentifikováno	0,60	203,0600	-	186,0933	-0,0045	-0,9991
					174,0879		
					159,0682		
6	Methylkvercetin nebo jeho izomer	10,09	317,0780	-11,9	229,0529	-0,0044	-0,9994
					153,0167		
					121,0280		
7	Hydroxybenzoylkatechin	10,59	411,1080	0,0	291,1002	-0,0043	-0,9981
					289,0708		
					259,0602		
					139,0542		
					123,0433		
8	Izomer kvercetinu	8,85	303,0540	-2,6	229,0529	-0,0043	-0,9993
					153,0167		
					137,0236		
9	Neidentifikováno	1,55	265,1490	-	175,0740	-0,0042	-0,9992
					159,1177		
					119,0864		
10	Malvidin-3-glukosid	6,75	493,1340	0,6	331,0787	-0,0042	-0,9967
11	Neidentifikováno	13,97	275,2070	-	257,1880	-0,0042	-0,9995
					135,0891		
					105,0697		
12	Fragment látky č.2	11,95	259,0660	-5,4	-	-0,0041	-0,9981

V MS/MS spektrech chromatograficky oddělených markerů 1 a 8 ($R = 2,34$) s hodnotami m/z 303,0530 a 303,0540 byly nalezeny charakteristické fragmenty kvercetinu [199], tj. m/z 229,0463 a 229,0529 (odchylka od teoretické hmoty, dtm, je 3,8 a -2,8 mDa); 153,0167 (dtm 2,1 mDa) a 137,0236 (dtm 0,3 mDa) - poslední dva fragmenty mají stejnou hodnotu m/z u obou markerů. Tyto fragmenty lze vysvětlit postupnými ztrátami dvou molekul oxidu uhelnatého a vody z rodičovského iontu a retro-Diels Alderovým (RDA) štěpením (produkce $^{1,3}A^+$ fragmentu). Ve fragmentačních spektrech byly dále nalezeny minoritní fragmenty vznikající dalšími ztrátami molekuly vody, CO a RDA štěpením, které potvrzují strukturu kvercetinu. Pro potvrzení identity těchto markerů byl do reakční směsi přidán standard kvercetinu. Retenční čas standardu se výrazně lišil od nalezených markerů. Detailním

studiem MS spekter obou markerů byly nalezeny ionty m/z 465,1067 a 465,1068, které mají stejný RT jako signál iontů s m/z 303,0530 a 303,0540. Zjištěné markery jsou tedy v glykosylované formě (dtm pro glykosylované formy je 3,4 a 3,5 mDa). Dominantním fragmentem v cíleně měřených MS/MS spektrech iontů těchto glykosidů je látka s m/z 303,0522 a 303,0534, což jednoznačně potvrzuje, že markery nalezené pomocí OPLS-DA vznikají z iontů s m/z 465. Detailní studium RDA fragmentů ve fragmentačních spektrech markerů umožňuje lokalizovat umístění hydroxy skupin ve flavonoidním skeletu markeru 1 (detailně jsou RDA procesy a odpovídající nomenklatura popsány v práci Cuyckense a Claves [200]). Proces určování počtu hydroxylových skupin na kruhu A a B je založen na RDA fragmentech, které jsou přítomny v MS/MS spektrech sledovaného markeru a standardu kvercetinu, tj. fragmenty s m/z 183,0456 ($^{0,2}A^+$, marker 1, dtm -16,3), 121,0280 ($^{0,2}B^+$, marker 1, dtm 1,0), 165,0183 ($^{0,2}A^+$, standard kvercetinu, dtm 0,5) a 137,0236 ($^{0,2}B^+$, standard kvercetinu, 0,3 mDa). Poměr signálů $^{0,2}A^+$ fragmentů ($Q=I_{183}/I_{165}$) ve spektru markeru 1 je $Q = 0,21$ a ve spektru kvercetinu $Q = 0,7$. Pokud provedeme stejné výpočty pro $^{0,2}B^+$ RDA fragmenty ($Q=I_{121}/I_{137}$), tak ve spektru markeru 1 získáme hodnotu $Q = 1,80$ a pro standard kvercetinu $Q = 0,25$. Tyto hodnoty podporují přítomnost jedné hydroxy skupiny na kruhu B a třech OH skupin na kruhu A (tj. struktury markeru 1 odpovídají 6- nebo 8-hydroxykaempferolu). Z důvodu nízké intenzity signálů RDA fragmentů v MS/MS spektru markeru 8 není možné určit rozmístění hydroxy skupin na molekule.

Na Obr. 26. je zobrazen chromatogram PS-RGM směsi při 280 nm (A – DAD detektor). Lze vidět, že PS-RGM je bohatá směs složek s různou strukturou a mezi nimi je i řada fenolických látek. Mezi eluovanými polyfenoly se vyskytují i tři dobře separované látky s m/z 411,11, jak ukazuje chromatogram rekonstruovaný pro tuto hmotu (B). Dvě z těchto látek patří mezi nalezené markery, RT_ m/z pár 10,59_411,1080 (marker 2) 11,95_411,1100 (marker 7). V kolizních spektrech obou látek byl nalezen fragment m/z 289,0708 ($C_{15}H_{13}O_6^+$, dtm, 0,4 mDa), který vzniká ztrátou hydroxybenzaldehydu ($\Delta m/z=122,0368$, dtm, -3,2 mDa). Tento fragment může být přiřazen protonizované molekule di-dehydrokatechinu. Dominantním fragmentem ve spektru je ion při m/z 259,0602 ($C_{14}H_{11}O_5^+$, dtm, 0,4 mDa) odpovídající ztrátě methyl esteru hydroxybenzoové kyseliny ($\Delta m/z=152,0442$, dtm, -3,1 mDa). Protonizovaná molekula hydroxybenzaldehydu byla rovněž nalezena ve spektru (m/z 123,0433, dtm -1,3). Na základě fragmentačních experimentů, byly markery 2 a 7 identifikovány jako izomery hydroxybenzoylkatechinu. Nutno zmínit, že fragmenty odpovídající protonizované molekule katechinu a kyselině hydroxybenzoové byly také nalezeny ve fragmentačním spektru hydroxybenzoylkatechinu, avšak s větší odchylkou od teoretické hodnoty m/z , což může být způsobeno nízkou intenzitou jejich signálů (tj, m/z

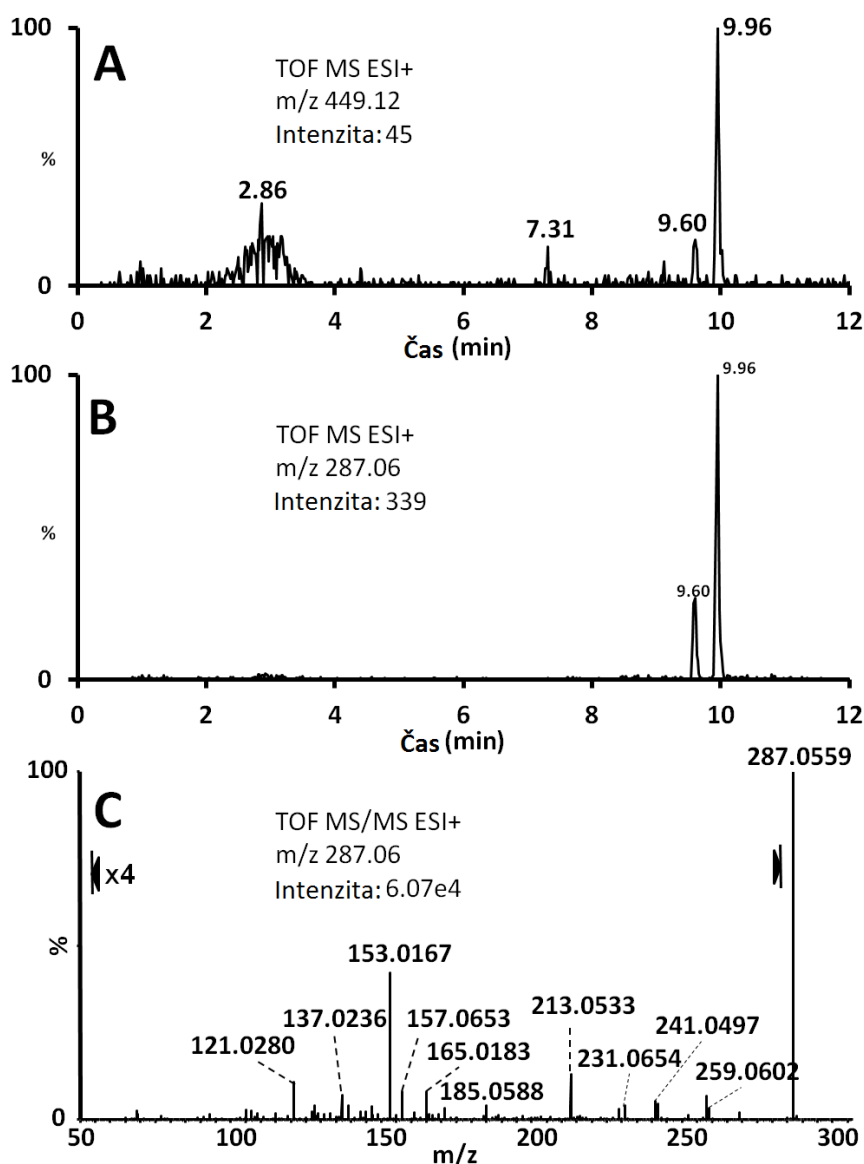
291,1002, dtm 13,3 a 139,0542; dtm 14,7 mDa). Pozice acylace na skeletu katechinu nebyla zjištěna, nicméně podle Smithe a kol., kteří se zabývali acylací prokyanidinů v různých rostlinných materiálech dochází nejčastěji k acylaci v pozici 3 [201]. Je nutné poznamenat, že signály těchto látek nebyly nalezeny v čistém extraktu vinařského odpadu a ani ve vepřové kejďě. Toto může být vysvětleno rychlou reakcí katechinu v PS-RGM směsi.



Obr. 26. Chromatogram PS-RGM směsi při 280 nm (A), rekonstruovaný chromatogram pro m/z 411,11 (B), MS/MS spektra markerů 2 a 7 (C,D; kolizní energie 10-40 eV).

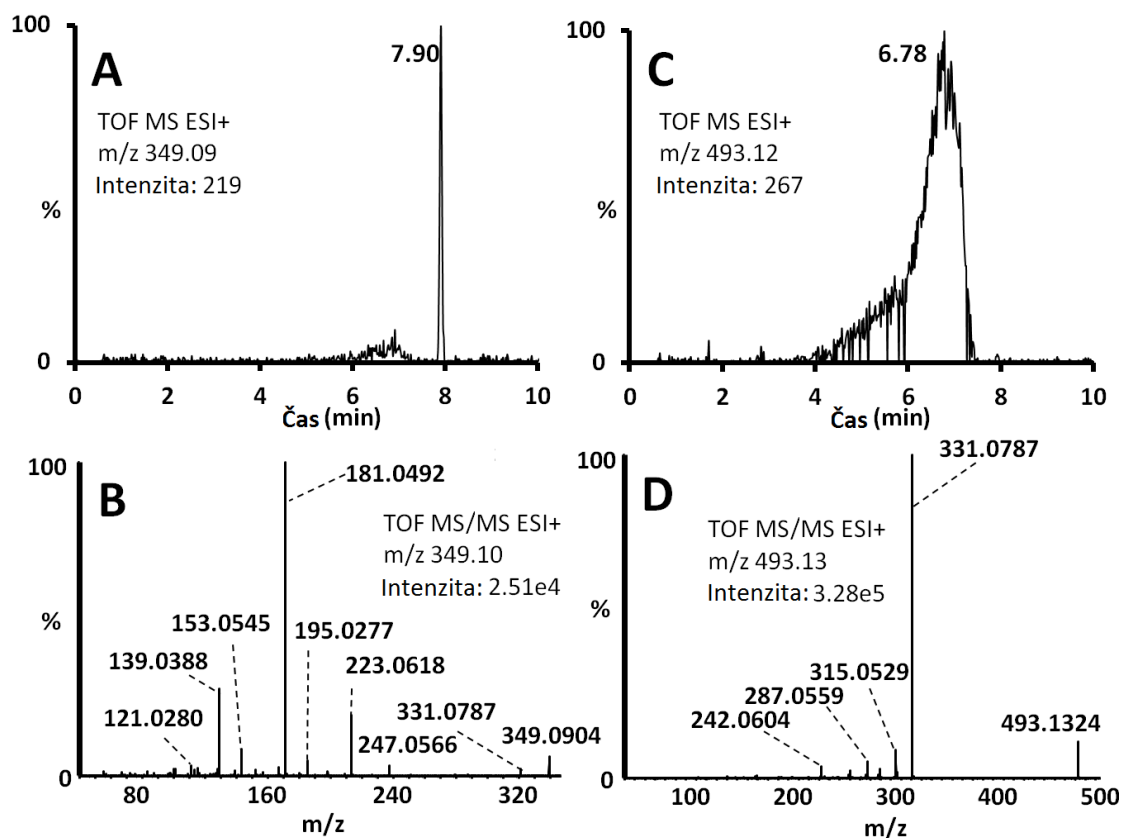
Na Obr. 27 je zobrazen chromatogram pro rekonstruované hmoty m/z 449,12 a 287,06 (A, B). Dominantní pík s m/z 287,06 a RT 9,96 min. odpovídá markeru 3 (Tab.5). Tento marker byl identifikován jako kaempferol. Postupné ztráty vody a oxidu uhelnatého poukazují na flavonoidní strukturu (tj. Obr. 27C.; fragmenty m/z 269,0457, 259,0602, 241,0497, 231,0654 atd.). Relativně silný signál RDA fragmentu m/z 121,0280 ($^{2,0}B^+$, dtm 1,0 mDa) poukazuje na přítomnost jedné hydroxy skupiny na B kruhu ($Q=I_{121}/I_{137}=1,5$). Ve spektru byly nalezeny také další RDA fragmenty, tj. 137,0236 ($^{0,3}A^+$, dtm 0,3), 153,0167 ($^{1,3}A^+$, dtm 2,1), 165,0183 ($^{0,2}A^+$, dtm 0,5). Na základě stejného elučního profilu látky s hodnotou m/z 449,12 lze usoudit, že

kaempferol je v reakční směsi v glykosylované formě (jako monohexosid). Intenzita signálu kaempferol-hexosidu byla nižší, než prahová hodnota intenzity nastavená pro filtrování markerů od šumu při zpracování dat v programu MarkerLynx (100; marker intensity threshold). Při analýze čisté kejdy (referenční vzorek) nebyl v chromatogramu nalezen pík kaempferol-hexosidu. Tato látka je tedy rovněž důležitým markerem směsi PS-RGM, i přesto, že je v odpovídajícím spektru přítomna s nižší intenzitou. V chromatogramu na obrázku Obr. 27A je patrný také široký pík kyanidin-3-glukosidu (RT 2,8 min.) a další dvě menší neidentifikované látky. Signály těchto látek byly rovněž pod nastavenou prahovou hodnotou intenzity při zpracování dat MarkerLynxem.



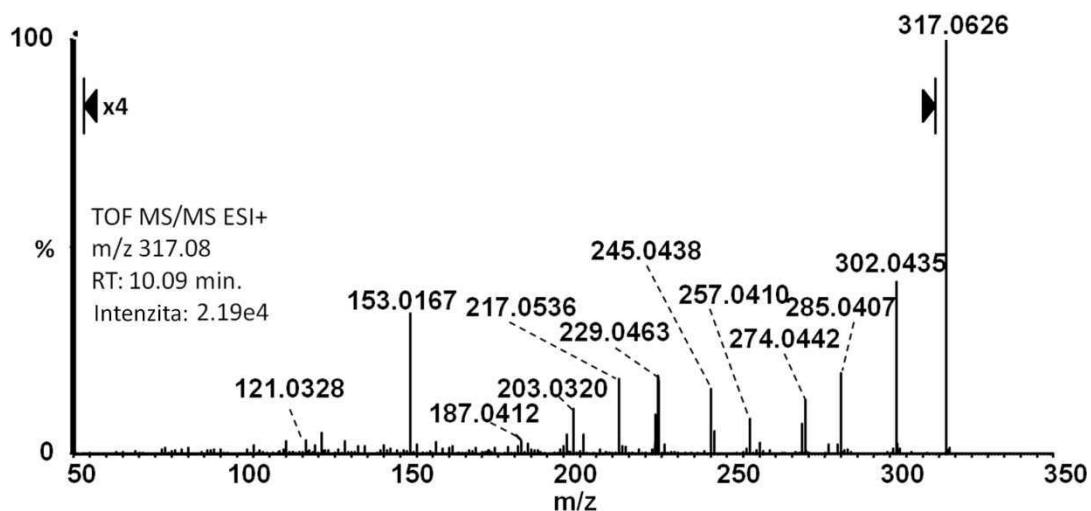
Obr. 27. Rekonstruovaný chromatogram pro m/z 449,12 (A) a 287,06 (B) a MS/MS spektrum markeru 3 (C; CER 10-50 eV).

Marker 7,92_349,0970 (RT_m/z pár) byl identifikován jako chalkon malvidinu. Na Obr. 28A je zobrazen rekonstruovaný chromatogram pro tuto hmotu. Ostrý pík indikuje, že v roztoku převládá (otevřená) forma chalkonu (vzájemná konverze jednotlivých acidobazických forem hydratovaného malvidinu neovlivňuje retenci). V kolizním spektru (Obr. 28B) můžeme pozorovat ztrátu molekuly vody (fragment s m/z 331,0787, dtm 3,1 mDa) následovanou ztrátou methylového radikálu (m/z 316,0453, dtm 13 mDa). Signál náležící ztrátě dvou molekul methanu byl také detekován v MS/MS spektru, avšak s vysokou odchylkou od teoretické hodnoty m/z z důvodu nedostatečného rozlišení od pozadí (m/z 299,0547, dtm 35,5 mDa). Popsané fragmentační procesy indikují přítomnost dvou methylových skupin v molekule. Dominantní fragment s m/z 181,0492 odpovídá odštěpení acyliového kationtu kyseliny syringové z rodičovské molekuly chalkonu ($C_9H_9O_4^+$, dtm, 0,9 mDa). Diagnostický fragment odpovídající kruhu A substituovaný třemi hydroxy skupinami (tj. (2-(2,4,6-trihydroxyfenyl)ethylidyn)oxonium, m/z 167,0316, $C_8H_7O_4^+$, dtm 2,8 mDa) byl rovněž pozorován ve spektru. Popsané fragmentační procesy této látky zcela potvrzují navrženou strukturu chalkonu malvidinu. Vyšší obsah chalkonu v reakční směsi lze očekávat z důvodu vysokého obsahu derivátů malvidinu ve výliscích z červených hroznů. Glykosylovaná forma této látky (malvidin-3-glukosid) je dalším z markerů nalezených pomocí statistického zpracování dat. Obr. 28C zobrazuje rekonstruovaný chromatogram pro jeho hmotu. Identifikace tohoto anthokyaninu byla založena na měření přesné hodnoty m/z (m/z 493,1340, dtm 0,6), fragmentačních experimentech (Obr. 28D) a porovnání RT, profilu píku (typický rozšířený pík anthokyaninů při pH MF pod 2 [195]) a MS dat s autentickým standardem.



Obr. 28. Rekonstruovaný chromatogram pro markery s m/z 349,09 (A) a 493,12 (C) a jejich MS/MS spektra (B a D, CER 10-50 eV).

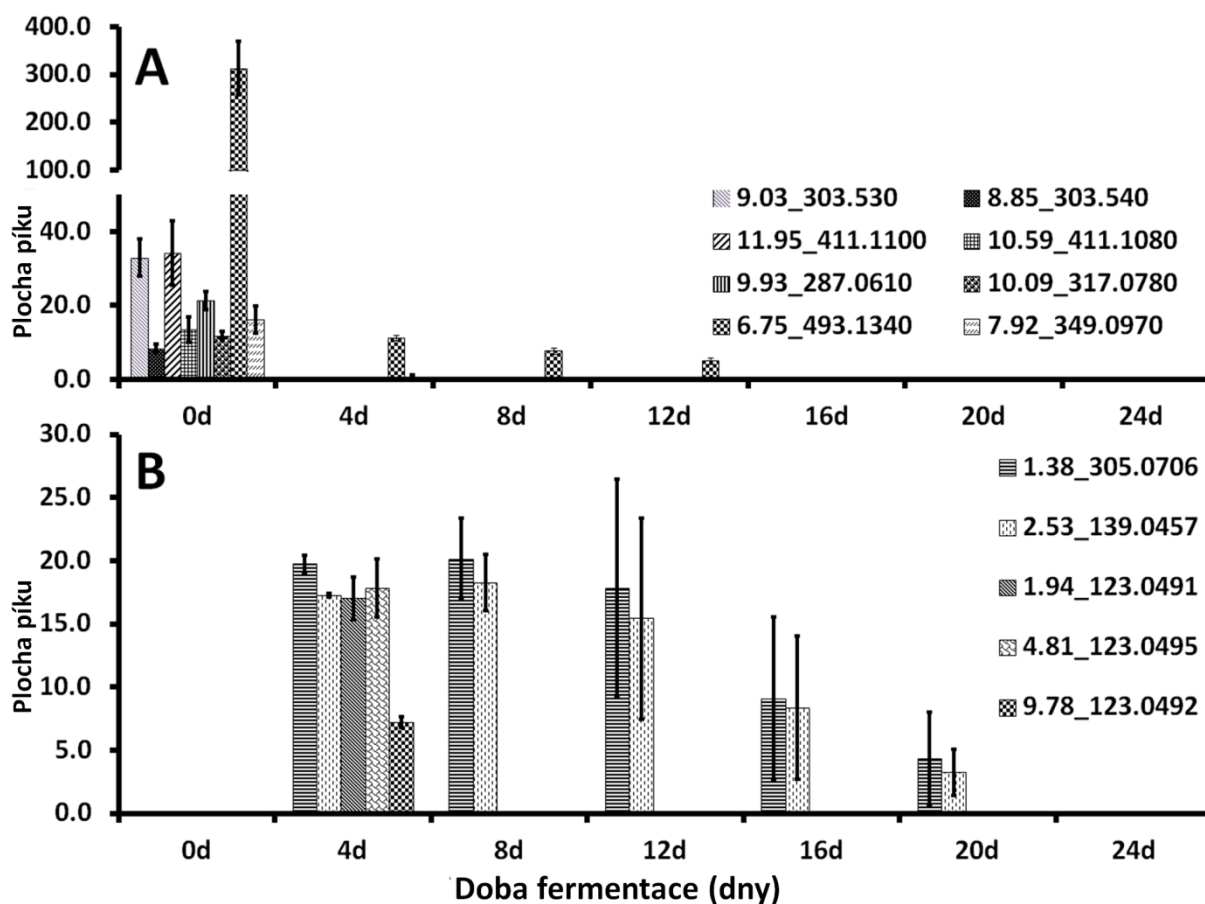
Látka definovaná RT_m/z párem 10,09_317,0780 je také uvedena mezi markery (Tab.5). V kolizním spektru této látky můžeme pozorovat ztrátu methylového radikálu (fragment s m/z 302,0435, d_{tm} -0,8 mDa), kaskádové ztráty hydroxylového radikálu, oxidu uhelnatého a vody (tj. fragmenty m/z 285,0407, 257,0410, 229,0529, 239,0279 a další) a rovněž menší fragmenty vznikající RDA štěpením (Obr. 29.). Tento marker na základě svých analytických vlastností odpovídá methylkvercetinů nebo jeho izomeru (tj. hydroxymethyl-kaempferolu nebo hydroxymethyl-luteolinu). Detailnější identifikace je komplikována složitostí fragmentačních pochodů (nedostatečně charakteristickým profilem spektra, včetně RDA štěpení) a chybějícími autentickými standardy.



Obr. 29. MS/MS spektrum markeru s m/z 317,0780 (CER 10-50 eV).

Mezi markery se nachází také další tři neidentifikované látky a fragment hydroxybenzoyl-katechinu.

Výše uvedené výsledky ukazují, že kombinace LC/HRTMS s PCA a OPLS-DA je velmi užitečný nástroj pro hledání důležitých změn ve složení směsí při anaerobní fermentaci a také, že deriváty a izomery kaempferolu, katechinu, malvidinu a kvercetinů jsou složky vinařského odpadu významně se projevující v připravených fermentačních směsích. Tyto látky mohou ovlivnit průběh zplyňovacího procesu. Změny obsahů sledovaných látek během anaerobní fermentace (vyjádřené plochami píků v rekonstruovaných chromatogramech) jsou patrné z Obr. 30A. Z obrázku je vidět, že obsahy analyzovaných flavonoidů (obsažených ve víně) rychle klesají v průběhu zplyňování za optimálních podmínek. Po čtyřech dnech (tj. v acidogenní fázi při anaerobní digesci) jsou patrné pouze stopy těchto látek.



Obr. 30. Změny v obsazích markerů z první (A) a druhé (B) fáze zplyňovacího procesu.
 A: 9,03_303,0530 - hydroxylovaný kaempferol; 11,95_411,1100 - hydroxybenzoylkatechin;
 9,93_287,0610 - kaempferol; 6,75_493,1340 - malvidin-3-glukosid; 8,85_303,0540 - izomer
 kvercetinu; 10,59_411,1080 - hydroxybenzoylkatechin; 10,09_317,0780 - methylkvercetin nebo jeho
 izomer; 7,92_349,0970 – chalkon mavidinu. B: 1,38_305,0706 - redukovaný (dihydro analog)
 kvercetinu, hydroxykaempferol nebo příslušný chalkon; 2,53_139,0457 – pravděpodobně fragment
 redukovaného kaempferolu; 1,94_123,0491 – hydroxybenzaldehyd (fragment
 dimethoxychromanonu); 4,81_123,0495 – hydroxybenzaldehyd (fragment redukovaného katechinu);
 9,78_123,0492 – hydroxybenzaldehyd (fragment neznámé látky).

Stejně zpracování dat jaké bylo popsáno výše (PCA pro sledování segregace zplyňovaných vzorků PS-RGM a PS podle jejich složení a OPLS_DA pro popis významu jednotlivých markerů) bylo aplikováno na vzorky po 4 dnech zplyňovacího experimentu (2. fáze). Nezvýznamnější markery PS-RGM nalezené v odpovídajícím S-plotu zkonstruovaném pro PS-RGM a PS po 4 dnech procesu jsou uvedeny v Tab.6. Šest markerů, tj. RT_m/z páry 1,38_305,0706, 1,39_139,0451, 1,94_123,0491, 2,53_139,0457, 4,81_123,0495, 9,78_123,0492 jsou detailně diskutovány v následujícím textu.

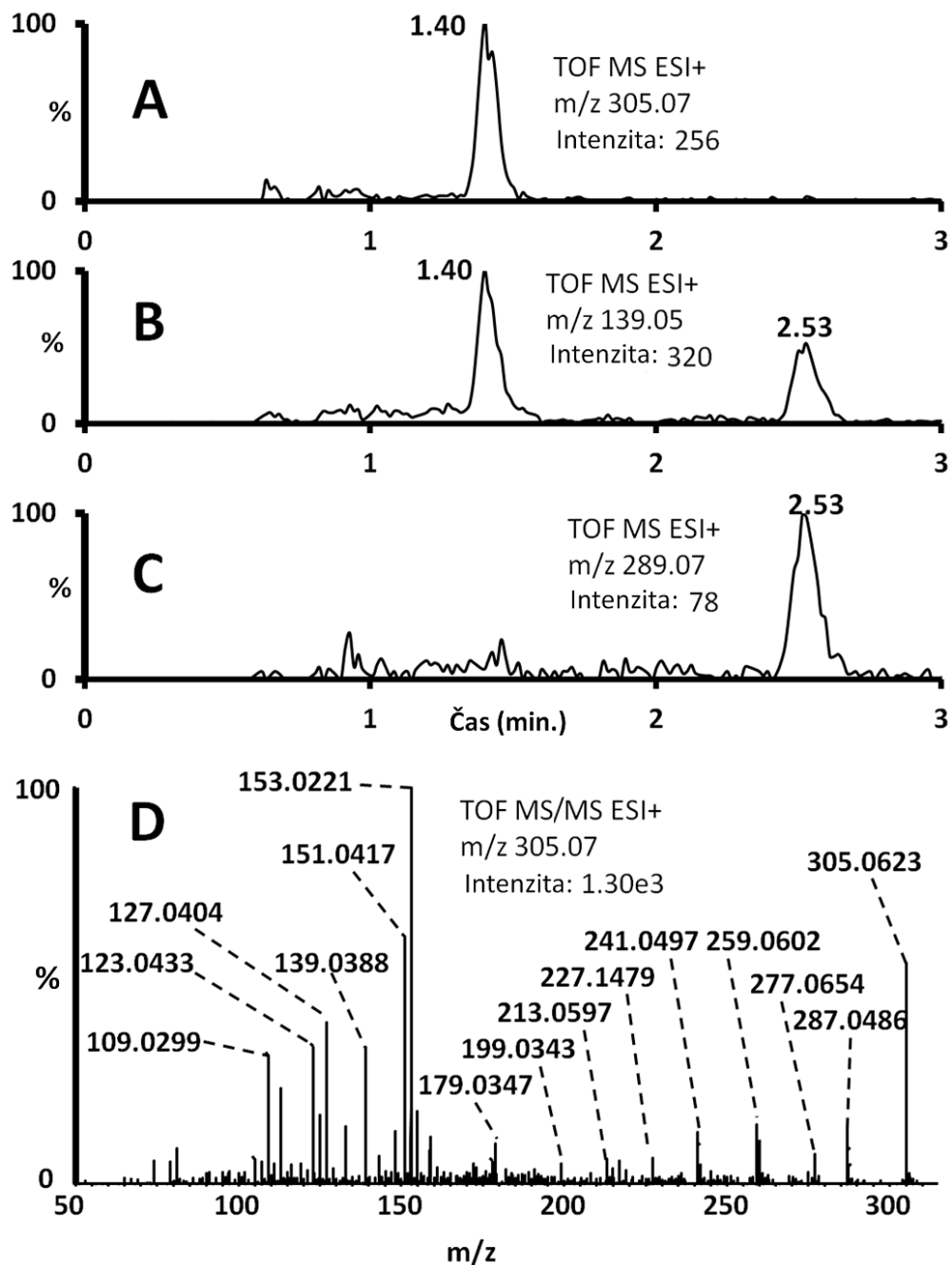
Tab.6. Markery nalezeny v druhé fázi zplyňovacího procesu PS-RGM směsi pomocí funkce S-plot (*RT* – retenční čas; *p*[1] and *p*[2] – souřadnice každého markery v Loadings plotu)

RT	[M+H] ⁺	p[1]	p[2]
1,38	305,0706	-0,00549	-0,99961
1,39	139,0451	-0,00555	-0,99957
1,42	137,1133	-0,00556	-0,99709
1,61	126,0429	-0,00565	-0,99995
1,93	149,0644	-0,00600	-0,99986
1,93	209,0878	-0,00583	-0,99932
1,93	191,0780	-0,00571	-0,99974
1,94	131,0546	-0,00567	-0,99988
1,94	123,0491	-0,00543	-0,99998
1,95	147,0508	-0,00537	-0,99987
2,53	139,0457	-0,00530	-0,99944
3,36	269,1803	-0,00555	-0,99999
4,79	131,0548	-0,00550	-0,99832
4,80	149,0654	-0,00578	-0,99861
4,81	123,0495	-0,00522	-0,99955
7,96	235,1139	-0,00556	-1,00000
8,42	869,2348	-0,00455	-0,93116
8,73	581,1668	-0,00539	-0,99962
8,89	581,1655	-0,00575	-0,99953
9,78	123,0492	-0,00527	-0,99995
9,78	121,0705	-0,00435	-0,86174
12,11	267,1458	-0,00534	-0,99999
13,97	275,2081	-0,00461	-0,87416

Na Obr. 31 je zobrazen rekonstruovaný chromatogram pro *m/z* 305,07 a 139,05 (A a B). Všechny tři píky přítomné v obou chromatogramech patří mezi významné markery PS-RGM ve 2. fázi experimentu. V kolizním spektru látky *m/z* 305,0706 byly pozorovány opakující se ztráty vody a oxidu uhelnatého, jež indikují polyfenolickou strukturu (Obr. 31D). Dominantní fragmenty při *m/z* 153,0221 a 151,0417 vznikají rozštěpením chalconu kvercetinů a/nebo redukované (dihydro-) formy kvercetinů a/nebo redukované (dihydro-) formy hydroxylovaného kaempferolu. Fragment při *m/z* 139,0388 může být vysvětlen jako ^{0,3}A⁺ RDA fragment z dihydrokvercetinů. Tento fragment je také významným markerem 2. fáze

zplyňovacího experimentu (RT_m/z pair 1,39_139,0451). Fragmenty s m/z 127,0404 a 123,0482 odpovídají protonizované molekule floroglucinaldehydu ($^{1,4}A^+$ fragment dihydrokvercetin) a protonizované molekule hydroxybenzaldehydu ($^{0,2}B^+$ RDA fragment redukovaného hydroxykaempferolu). Původ RDA fragmentů byl také potvrzen MRM experimenty. Na základě získaných dat je možno látku s m/z 305,07 přiřadit dihydrokvercetin, dihydrohydroxykaempferolu nebo odpovídajícímu chalkonu (případně jejich nerozlišené směsi).

Marker s vyšší retencí v rekonstruovaném chromatogramu pro m/z 139,05 (Obr. 31B; tj. pár s RT_m/z 2,56_139,0457) odpovídá protonizované molekule dihydroxybenzaldehydu. Identitu tohoto markeru potvrzuje MS/MS experiment. V kolizním spektru jsou patrné dvě ztráty CO a jedna ztráta vody (tj. fragmenty m/z 111,0443, 93,0384 a 65,0376). Tento marker má identický retenční profil s iontem s m/z 289,0774 (Obr. 31C), který není přímo uveden mezi markery z důvodu jeho nízké intenzity v MS spektru. S ohledem na přítomnost kaempferolu v 1. fázi experimentu lze navrhnout, že ion s m/z 289,0774 vzniká redukcí (hydrogenací) kaempferolu. Redukce flavonoidů z vinařského odpadu je tak jedním z důležitých procesů doprovázejícím anaerobní fermentaci s produkcí bioplynu, při nejmenším na začátku anaerobní digesce, tj. v acidogenní fázi. Kvalitativně jsou tyto výsledky ve shodě s modelovou in-vitro studií katabolismu kvercetin pomocí bakterií z lidských exkrementů [202].

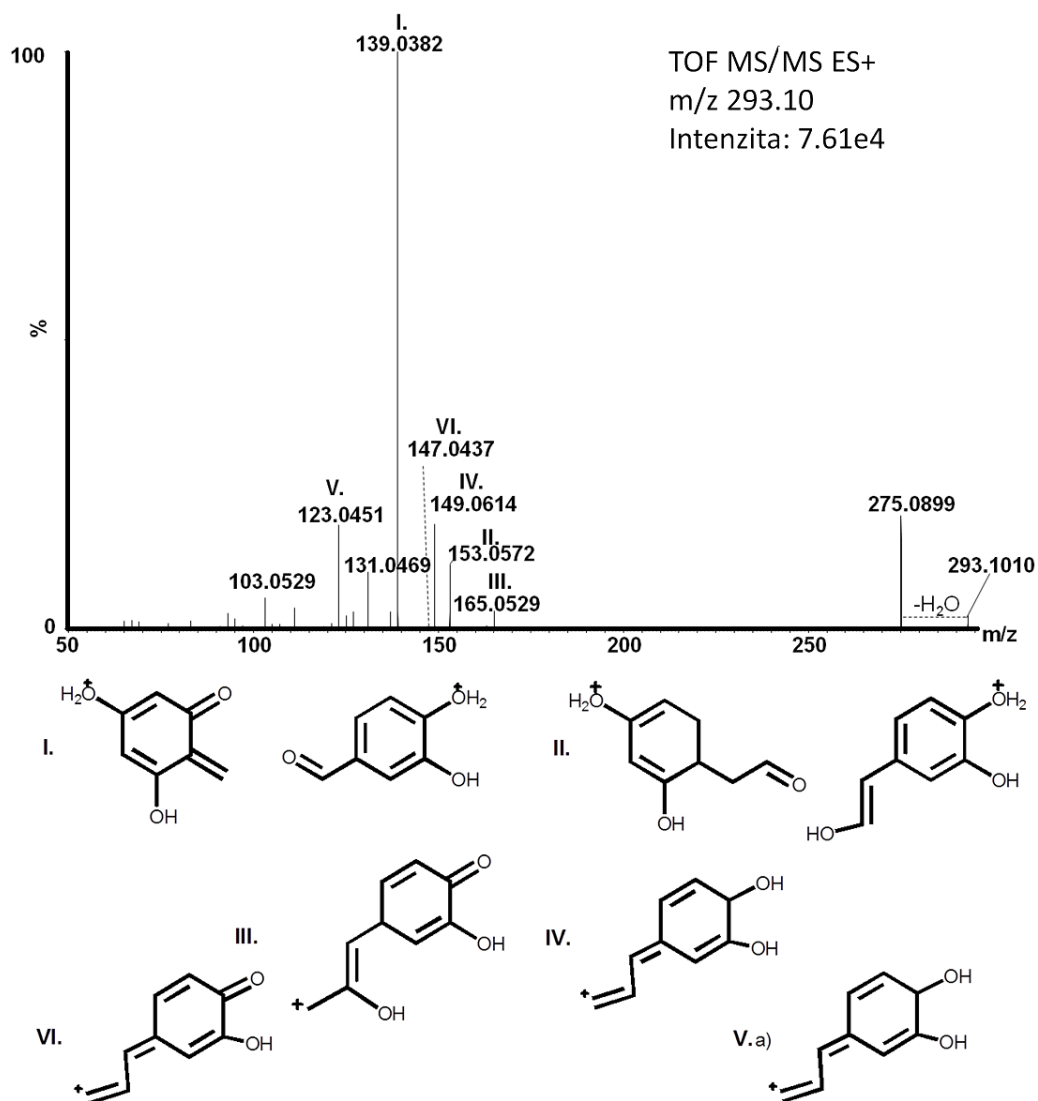


Obr. 31. Rekonstruovaný chromatogram pro m/z 305,07 (A), 139,05 (B), 289,07 (C) a MS/MS spektrum markeru s m/z 305,0706 (D, CER 10-40 eV).

Poslední tři markery označené jako RT_m/z páry 1,94_123,0491, 4,81_123,0495 a 9,78_123,0492 odpovídají hydroxybenzaldehydu ($C_7H_7O_2^+$, dtm, -4,5, -4,9 a -4,6 mDa). Jejich kolizní spektra jsou poměrně jednoduchá a vzájemně podobná. Můžeme pozorovat dominantní fragmenty odpovídající postupně ztrátě vody (m/z 105,0339, dtm 0,1 mDa) a oxidu uhelnatého (m/z 77,0413, dtm -2,2 mDa). Ve spektru jsou také pozorovatelné další minoritní ztráty. První je ztráta molekuly s 15,9959 Da z rodičovského iontu za tvorby

fragmentu m/z 107,0474. Tato ztráta může odpovídat odštěpení kyslíku z hydroxy skupiny ($\Delta m/z$ 15,9949) nebo odštěpení methanu ($\Delta m/z$ 16,0313). S ohledem na naměřenou a vypočítanou neutrální ztrátu je zřejmé, že tato ztráta odpovídá první možnosti a indikuje absenci methylové skupiny ve struktuře. Za druhé, odštěpení formaldehydu ($\Delta m/z$ 30,0049, dtm 5,7 mDa) a COH· radikálu ($\Delta m/z$ 29,0045, dtm 1,8 mDa) vedle ztráty CO potvrzuje přítomnost aldehydické skupiny v molekule. Další možností je přítomnost karboxy skupiny v molekule markeru (tj. kyselina benzoová). Tato možnost byla testována porovnáním analytických vlastností s autentickým standardem (přídavek k. benzoové k PS-RGM vzorku). Z důvodu odlišného retenčního času standardu a nalezených markerů a zejména absence CO₂ v kolizním spektru markeru byla tato možnost zavrhnuta. Nalezené markery s m/z 123,05 byly také porovnávány se standardem p-hydroxybenzaldehydu. I v tomto případě se RT standardu lišil od diskutovaných markerů. Tento fakt lze vysvětlit tak, že uvedené markery jsou fragmenty větších molekul - látky s m/z 209,0870 a 293,1053, které mají stejný retenční čas jako markery s m/z 123 eluující v RT 1,94 a 4,81.

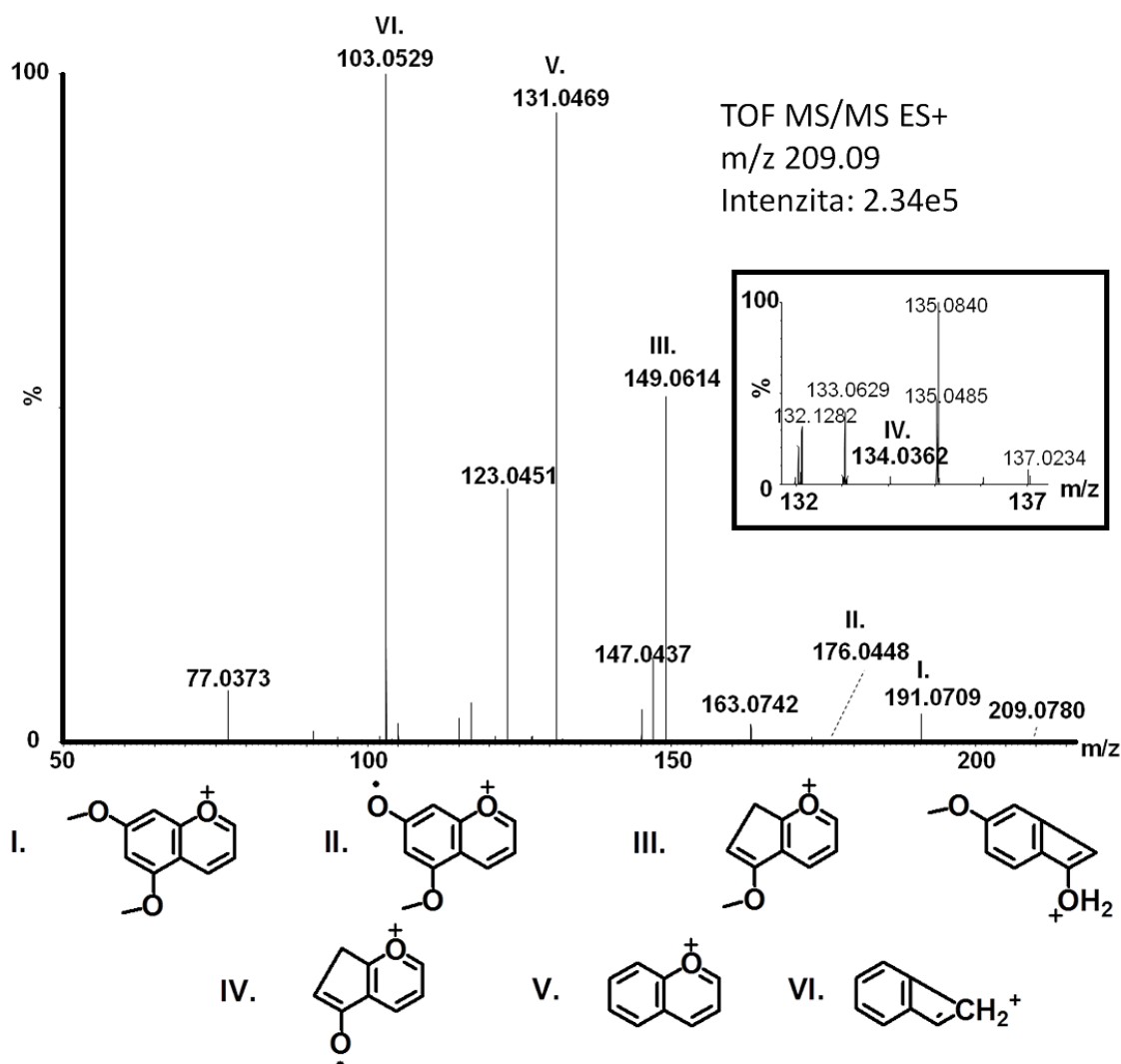
Obě látky byly podrobeny cíleným MS/MS experimentům. V MS/MS spektru látky s m/z 293,1053 byl nalezen fragment s m/z 275,0899 odpovídající ztrátě molekuly vody. Ve fragmentačním spektru byly také nalezeny typické RDA fragmenty flavan-3-olů, tj. m/z 165,0529 (C₉H₉O₃⁺, dtm -2,3 mDa), 153,0572 (C₈H₉O₃⁺, 2,0 mDa) and 139,0382 (C₇H₇O₃⁺, -1,3 mDa). Tyto fragmenty pozorovali a také důkladně popsali autoři Li a Deinzer [203]. Rodičovská molekula obsahuje o dva atomy vodíku oproti katechinu, což indikuje jeho redukci. Tato interpretace je dále potvrzena přítomností fragmentu m/z 149,0614 odpovídající ¹⁴B⁺ RDA fragmentu katechinu obsahující navíc dva atomy vodíku. Fragment m/z 123,0451 (odpovídající markeru 4,81_123,0495, dtm -4,4 mDa) vzniká katechin-benzofuranovým štěpením (catechin benzofuran forming fission) [203]. Detailní zobrazení fragmentačního procesu redukovaného katechinu je zobrazen na Obr. 32. Pozice redukce na katechinovém skeletu nebyla odhalena ze získaného fragmentačního spektra (pravděpodobně se jedná o chromatograficky nerozdělenou směs izomerů)



Obr. 32. MS/MS spektrum látky s m/z 293,1010 (CER 10-30 eV) a navržené struktury fragmentů
a) $^{1,4}B^+$ RDA fragment redukovaného katechinu.

Rodičovská molekula markeru 1,94_123,0491 (tj. m/z 209,0870) může vzniknout vlivem methanogenních bakterií v redukční atmosféře podobně jako látky popsané výše. Přítomnost běžných flavonů a flavonolů a v některých případech jejich redukovaných či methylovaných forem ve vinařském odpadu byly popsány v textu výše. Flavonoidy [204] a jejich chlankony [205] mohou být transformovány na dihydrochromony nebo deriváty kumarinu ztrátou B-kruhu. Tento proces je také pozorován v PS-RGM směsi. Molekula poskytující rodičovský ion s m/z 209,0870 byla identifikována jako dimethoxychromanon (dihydrochromony vznikají enzymatickým rozkladem flavonoidů [204]) a tyto látky mohou být následně redukovány a methylovány methanogenními bakteriemi [202]. Dominantní fragmenty získané MS/MS experimentem jsou ionty m/z 149,0614, 131,0469 a 103,0529. Tyto signály mohou být

vysvětleny jako postupné ztráty molekuly vody (pravděpodobně díky aromatizaci heterocyklického kruhu; potvrzující přítomnost hydroxy skupiny), ketenu (přítomnost methoxy skupiny) a oxidu uhlenatého (vyšťipnutého z heterocyklického kruhu). Přítomnost druhé methoxy skupiny potvrzuje slabý ale stále patrný signál fragmentu s m/z 134,0362 vznikajícího ztrátou methylového radikálu z fragmentu s m/z 149,0614 (Obr. 33.). Původ markeru 9,78_123,0492 nebyl objasněn a je předmětem dalšího výzkumu.



Obr. 33. MS/MS spektrum látky s m/z 209,0780 (CER 10-40 eV) a navržené struktury vznikajících fragmentů.

Změny v obsahu markerů z druhé fáze fermentačního procesu jsou zobrazeny na Obr. 30B. Z obrázku je patrné, že všechny tyto markery nejsou přítomny v reakční směsi v počáteční fázi fermentace. Jejich obsah v kapalné fázi dosahuje maxima zhruba po 4-8 dnech a poté jejich obsah klesá. Statisticky významný pokles identifikovaných redukovaných flavonoidů (markery s m/z 305,0706 a 139,0457) byl pozorován po 16 dnech gasifikačního

procesu. Markery s fragmentem m/z 123,05 se rozkládaly výrazně rychleji a statisticky významný pokles byl patrný po 8 dnech.

Studovaný proces zplyňování zahrnuje velké množství chemických a enzymatických procesů. Z tohoto důvodu je komplexní popis degradace polyfenolů obsažených ve víně velice komplikovaný. Nicméně naše experimenty indikují jeden obecnější významný proces, a to je vznik redukovaných forem flavonoidů v průběhu fermentace [182]. Některé z redukovaných forem flavonoidních látek těchto látek mají vyšší toxicitu než běžné flavonoidy. Například izomer dihydrokvercetin, taxifolin, má akutní intraperitoneální toxicitu měřenou na myších LD50 (AITM-LD50) 985 mg.kg^{-1} . U kvercetin byla naměřena hodnota 3000 mg.kg^{-1} . Malvidin (aglykon nevýznamnějšího anthokyaninu přítomného ve vínech a detekovaného v počáteční fázi fermentace PS-RGM) má hodnotu AITM-LD50 4110 mg.kg^{-1} (měřený jako malvidin chlorid) [206]. Ačkoli jde o velmi předběžné srovnání a vyslovení jednoznačného závěru o rozdílech v toxicitách běžných polyfenolů a jejich redukovaných forem vyžaduje daleko zevrubnější výzkum, uvedená data akcentují potřebu vhodné analytické kontroly (nestabilizovaného) digestátu i výzkumu jeho vlivu na životní prostředí v širších souvislostech.

Výsledky získané touto studií byly publikovány v časopise Chemosphere [182], který je součástí příloh této práce.

6. Závěr

Výroba bioplynu je rychle se rozvíjející se odvětví dovolující účinný a ekologický způsob zpracování odpadu a zároveň produkce relativně levné energie. V současné bioplynárenské praxi je analytická chemie používána hlavně pro kontrolu složení plynů a základních agrochemických parametrů v digestátu. Aby bylo možno rozšířit spektrum materiálů, které je možno zplyňovat, je třeba detailně znát složení vstupních surovin (včetně jejich změn probíhajících při skladování surovin před zplyňováním) i chemické změny probíhající v průběhu samotné anaerobní fermentace v bioplynovém reaktoru. Tato práce se zabývá vývojem vhodných analytických metod pro sledování složení těchto materiálů a následně jejich využitím pro studium změn v profilu vybraných látek s flavonoidní povahou za uvedených podmínek.

V prvním kroku byly provedeny experimenty studující degradaci i kondenzační reakce na chemicky čistých standardech dvou anthokyaninových barviv. Při degradaci kyanidinu a malvidin-3-galaktosidu při pH 7 a zvýšené teploty (95°C) po dobu 24 hodin docházelo ke vzniku kyseliny protokatechové (z kyanidinu) a kyseliny syringové (z malvidin-3-galaktosidu). Ani v jednom případě nebyl ve vzorku detekován společný rozkladný produkt obou anthokyaninů floroglucinaldehyd. Z toho důvodu byly provedeny rozkladné experimenty se standardem floroglucinaldehydu. Při rozkladných experimentech čistého standardu byly v roztoku nalezeny neznámé látky s m/z 243,0324, 271,0255 a 271,0276. Na základě porovnání analytických dat s laboratorně nezávisle připraveným standardem anthrachrysenem (1,3,5,7 – tetrahydroxyanthrachinon) a porovnání s již publikovanými výsledky v odborných časopisech byly látky s m/z 271,02 identifikovány jako tetrahydroxyanthrachinony (1,3,5,7-tetrahydroxyanthrachinon, 1,4,5,8-tetrahydroxyanthrachinon a/nebo 2,3,6,7-tetrahydroxyanthrachinon). Tyto látky by tedy potenciálně mohly vznikat i při zpracování potravin bohatých na sledované anthokyaniny a ovlivňovat tak jejich organoleptické vlastnosti i působení na lidský organismus.

Další studie byla zaměřena na vývoj nano-LC metody pro analýzu můstkových barviv vznikajících reakcí (+)-katechinu a malvidin-3-glukosidu v prostředí acetaldehydu. Byla provedena syntéza dvou diasteromerů (+)-katechin-ethyl-malvidin-3-glukosidu a prostudováno jejich retenční chování na laboratorně připravených kapilárních kolonách s různými stacionárními fázemi (plně porení Chromosphere C18, povrchově porézní Kinetex C18 a monolitická stacionární fáze Chromolith C18). Nejlepší výsledky poskytuje fáze Chromosphere C18, která byla rovněž testována z hlediska možného použití pro kontrolu obsahu kondenzovaných barviv ve vinařském odpadu. Nano-LC technika byla porovnána s metodou optimalizovanou pro konvenční kapalinovou chromatografii.

Pro studium anaerobní fermentace vinařského odpadu byl navržen a použit jednoduchý diskontinuální mikroreaktor. Proces průběhu anaerobní fermentace byl kontrolován pomocí headspace analýzy vnitřní atmosféry reaktoru (methan, oxid uhličitý, dusík a kyslík) plynovým chromatografem s hmotnostní detekcí. Analýzy pomohly definovat jednotlivé fáze zplyňovacího procesu (acidogenní fáze a nestabilizovaná methanogeneze) v diskontinuálním režimu. Kapalný podíl fermentační směsi (digestát) byl analyzován spojením vysokoúčinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišující tandemovou hmotnostní spektrometrií. Získaná data byla dále zpracována analýzou hlavních komponent a ortogonální projekcí do latentních struktur. Tyto postupy hodnocení dat dovolily nalézt látky (markery) výrazně odlišující směs s přidavkem vinařského odpadu od běžně používané směsi (prasečí kejda). Osm nejvýznamnějších markerů lze na základě získaných analytických dat zařadit do skupiny polyfenolů. LC/MS analýzy vzorků z acidogenní fáze a z nestabilizované methanogeneze indikují vznik redukovaných forem některých flavonoidů v počátečních fázích bioplynového procesu a jejich rozklad ve fázích následujících. Jde o látky hydroxykaempferol, hydroxybenzoylkatechin, methylkvercetin, malvidin-3-glukosid, chalkon malvidinu a redukovaný katechin. Vyšší toxicita některých dihydro-flavonoidů (např. taxifolin) může (vzhledem k rozdílům v hodnotách LD50) představovat vyšší zátěž pro životní prostředí než běžné flavonoidy vyskytující se ve víně (malvidin, kvercetin, atd.), pokud je jako hnojivo použit nestabilizovaný digestát. Tato velmi předběžná hypotéza však vyžaduje podrobnější výzkum. Výsledky ale poukazují na potřebu zevrubné analytické kontroly složení digestátu před jeho dalším použitím.

Výsledky získané v souvislosti s touto disertační prací byly publikovány ve třech impaktovaných a jednom recenzovaném časopise a byly prezentovány na řadě mezinárodních a domácích sympozií, jak je uvedeno na stranách 106-143.

Seznam symbolů a zkratek

α	separační faktor, faktor selektivity
μ -GC	mikro-plynová chromatografie
AcA	kyselina octová
ACN	acetonitrile
AES	atomová emisní spektrometrie
AITM-LD50	akutní intraperitoneální toxicita
BPS	bioplynová stanice
Cat	Katechin
CD	vodivostní detektor
CeM3G	(+)-katechin-ethyl-malvidin-3-glukosid
CER	rampa kolizní energie
COD	chemická spotřeba kyslíku
CVHAFS	atomová fluorescenční spektrometrie s generováním těkavých látek
Cy	kyanidin
CZBA	Česká bioplynová asociace
DAD	detektor diodového pole
DO	dynamická olfaktometrie
dtm	odchylka měřené od teoretické hodnoty m/z
ELCD	elektrolyticky-vodivostní detektor
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
FA-AAS	atomová absorpční spektrometrie s plamenovým atomizátorem
FID	plamenově ionizační detektor
FPD	plamenově fotometrický detektor
GC	plynová chromatografie
HETP	výškový ekvivalent teoretického patra
HGAAS	atomová absorpční spektrometrie s generováním těkavých hydridů
HMBC	heteronuclear multiple-bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple-quantum correlation
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP-AES	atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-MS	hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem
IT	iontová past
MBR	membránový biologický reaktor
MESI	membránová extrakce s pevnou fází
MetBac	roztok methanogeních bakterií
MF	mobilní fáze
MRM	multireaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie
MSC	multi-injekční chromatografie
Mv	malvidin-3-galaktosid
Mv-3-Glu	malvidin-3-glukosid
Na ₂ EDTA	ethylendiamintetraacetát sodný
nano-LC	nanokapalinová chromatografie
NMR	nukleární magnetická rezonance

OPLS-DA	ortogonální projekce do latentních struktur
OTC	organocínicí sloučeniny
PA	kyselina protokatechová
PCA	analýzy hlavních komponent
PEEK	Polyetheretherketon
PET-NY-AL-CPE	polyethylen-tereftalát-nylon-aluminium
PFPD	fotometrický detektor s pulzním plamenem
PGA	Floroglucinaldehyd
PID	fotoionizační detektor
PS	vepřová kejda
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVF	polyvinyl fluorid
RDA	retro-Diels-Alderovské štěpení
RFA	rentgenová fluorescenční analýza
RGM	výlisky z červených hroznů
ROESY	rotating frame nuclear overhauser effect spectroscopy
RT	retenční čas
SA	kyselina syringová
SCFA	těkavé mastné kyseliny
SD	směrodatná odchylka
SDB-L	styren-divinyl benzen kopolymer
SF	stacionární fáze
SIM	monitorování jedné hmoty při hmotnostně spektrometrickém měření
SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
STD	standard
TCD	tepelně-vodivostní detektor
TD	teplotní desorpce
TFA	kyselina trifluoroctová
TGM	roztok thioglykolátového média
TSD	termo-ionizační selektivní detektor
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
VMS	semitěkavé methysiloxany
VOC	těkavé organické látky
VSC	těkavé sírné látky
W _{50%}	šířka píku v polovině výšky

Literatura

1. Meynell, P.J., *Methane: Planning a Digester*. 1976, New York: Schocken Books.
2. McCabe, J. a Eckenfelder, W., *Biological Treatment of Sewage and Industrial Wastes*. 1957, New York: Reinhold Publishing.
3. Challenger, F., Higginbottom, C. a Ellis, L., *The formation of organo-metalloidal compounds by microorganisms. Part I. Trimethylarsine and dimethylethylarsine*. J. Chem. Soc., 1933: p. 95-101.
4. Bryant, M.P., *Methane-Producing Bacteria (part 13) Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. 8 ed. 1974, BA, USA: The Williams and Wilkins Co.
5. Kára, J., Pastorek, Z. a Přibyl, E., *Výroba a využití bioplynu v zemědělství*. 2007, Praha-Ruzyně: VÚZT, v.v.i.
6. Dohanyos, M., *Principy anaerobního rozkladu biomasy ve vztahu k možným kolapsům technologie*, in *Použití bioplynu v podmínkách ČR*. 2003: Říčany.
7. Pospíšil, L. *Výzkum „suché“ anaerobní fermentace různých druhů biomasy za účelem výroby bioplynu*. [citováno 04.10.2014]; Dostupné na: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/vyzkum-suche-anaerobni-fermentace-ruznych-druhu-biomasy-za-ucelem-vyroby-bioplynu>.
8. Archer, D.B. a Peck, M.W., *The Microbiology of Methane Production in Landfills*. in *Microbiology of Extreme Environments and Its Potential for Biotechnology*, 1989. **49**: p. 187-204.
9. Archer, D.B., Robertson, J.A. a Peck, M.W., *The Microbiology and Biochemistry of Biogas Production from Solid Wastes*, in *Landfill Gas and Anaerobic Digestion of Solid Waste*. 1988, Harwell Lab.: Oxfordshire.
10. Li, Y.B., Park, S.Y. a Zhu, J.Y., *Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste*. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 2011. **15**(1): p. 821-826.
11. Archer, D.B. a Kirsop, B.H., *The Microbiology and control of anaerobic digestion*, in *A Waste Treatment Technology*. 1990, Crit. Rept. Appl. Chem: London. p. 43-92.
12. Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R. a Wolfe, R.S., *Methanogens - Re-Evaluation of a Unique Biological Group*. *Microbiol. Rev.*, 1979. **43**(2): p. 260-296.
13. Heinedobbernack, E., Schoberth, S.M. a Sahm, H., *Relationship of Intracellular Coenzyme F420 Content to Growth and Metabolic-Activity of Methanobacterium-Bryantii and Methanosarcina-Barkeri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988. **54**(2): p. 454-459.
14. Touzel, J.P., G. Prensier, J.L. Roustan, I. Thomas, H.C. Dubourguier a G. Albagnac, *Description of a New Strain of Methanotherix-Soehngeni and Rejection of Methanotherix-Concillii as a Synonym of Methanotherix-Soehngeni*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1988. **38**(1): p. 30-36.
15. Straka, F., Dohányos, M., Zábranská, J., Jeníček, P., Dědek, J., Malijevský, A., Novák, J., Oldřich, J. a Kunčarová, M., *BIOPLYN příručka pro výuku, projekci a provoz bioplynových systémů*. 2. ed. 2006, GAS: Praha.
16. Guiot, S.R., Cimpoia, R. a Carayon, G., *Potential of Wastewater-Treating Anaerobic Granules for Biomethanation of Synthesis Gas*. *Environ. Sci. Technol.*, 2011. **45**(5): p. 2006-2012.
17. Sukahan. *Product Biogas yield catalyst ZH1001 methanogenic bacteria*. Dostupné na: www.sukahan.en.alibaba.com.
18. Baktoma s.r.o. *Product APD Bio Gas*. Dostupné na: www.baktoma.cz.
19. Babicka, L., Koznarova, V., Poustkova, I., Pulkrabek, J., Kourimska, L., Siskova, J. a Smolik, J., *Digestate - a Sugar Beet Fertilizer*. *Listy Cukrovarnicke a Reparske*, 2010. **126**(3): p. 106-109.

20. Švec, J., Kára, J., Váňa, J., Pastorek, J. a Machálek, E., *Využití obnovitelných zdrojů energie v zemědělství, zemědělské bioplynové stanice*. 2010, Chrudim: Vodní zdroje EKOMONITOR spol. s.r.o.
21. Babicka, L. a Poustkova, I., *A Important Benefit of Biogas Production*. Listy Cukrovarnické a Reparské, 2009. **125**(9-10): p. 277-280.
22. Habart, J. *V čem se liší zemědělská a komunální bioplynová stanice – zamyšlení u příležitosti otevření bioplynové stanice v Krásné Hoře a Vysokém Mýtě*. 2008 [citováno 04.12.2012]; Dostupné na: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/v-cem-se-lisi-zemedelska-a-komunalni-bioplynova-stanice-zamysleni-u-prilezitosti-otevreni-bioplynovy-stanice-v-krasne-hore>
23. Dvořáček, T., Rosenberg, T., Tluka, P. a Habart, J., *Výstavba komunálních bioplynových stanic s využitím BRKO*. 2009, Praha: Státní fond životního prostředí ČR.
24. CZBA. 2012; Dostupné na: <http://www.czba.cz/>.
25. Energetický regulační úřad, Dostupné na: <http://www.eru.cz/cs/>. [citováno 20.11.2012].
26. Váňa, J. *Využití digestátů jako organického hnojiva*. 2007 [citováno 04.12.2012]; Dostupné na: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/vyuziti-digestatu-jako-organickeho-hnojiva>
27. Kučera, L. a Bednář, P., *Biogas system and possibilities of control and use of digestate in Czech Republic: A Review*. Waste Forum, 2014. **2014**: p. 123-136.
28. Smatanová, M., *Digestát jako organické hnojivo*. Zemědělec, 2012. **XX**(18): p. 21-22.
29. Váňa, J. a Usták, S., *Využití odpadů a surovin ze zemědělského provozu k výrobě bioplynu*, in *Využití obnovitelných zdrojů energie v zemědělství, zemědělské bioplynové stanice*. 2010: Chrudim.
30. Dohanyos, M., *Principy tvorby bioplynu na skládce a v bioplynových stanicích – teoretické základy anaerobní fermentace*. 2008, Praha: GAS s.r.o. – EKOLOGIE spol. s.r.o.
31. Puyuelo, B., Ponsa, S., Gea, T. a Sanchez, A., *Determining C/N ratios for typical organic wastes using biodegradable fractions*. Chemosphere, 2011. **85**(4): p. 653-659.
32. Kimbrough, D.E. a Wakakuwa, J., *Interlaboratory comparison of instruments used for the determination of elements in acid digestates of solids*. Analyst, 1994. **119**(3): p. 383-388.
33. Rees, J.F., *The Fate of Carbon-Compounds in the Landfill Disposal of Organic-Matter*. J. Chem. Technol. Biotechnol., 1980. **30**(4): p. 161-175.
34. Bicakova, O. a Straka, P., *Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness*. Int. J. Hydrogen Energ., 2012. **37**(16): p. 11563-11578.
35. Gostelow, P., Longhurst, P. a Parsons, S., *Sampling for the measurement of odours*. 2003, London: IWA publishing.
36. Hobbs, P.J., Misselbrook, T.H. a Cumby, T.R., *Production and emission of odours and gases from ageing pig waste*. J. Agr. Eng. Res., 1999. **72**(3): p. 291-298.
37. Walker, J., *The performance of the human nose in odour measurement*. Water Sci. Technol., 2001. **44**(9): p. 1-7.
38. Teixeira, A.G.V., Machado, V.S., Caixeta, L.S., Pereira, R.V. a Bicalho, R.C., *Efficacy of formalin, copper sulfate, and a commercial footbath product in the control of digital dermatitis*. J. Dairy Sci., 2010. **93**(8): p. 3628-3634.
39. da Cunha, L.F.C., Chiacchio, S.B., Gaste, L., Goncalves, R.C. a Vianna, L.C., *Serum zinc concentration of dairy cow supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*, with and without hoof lesions*. Semina-Ciencias Agrarias, 2009. **30**(2): p. 435-440.
40. Sidhu, J.P.S. a Toze, S.G., *Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review*. Environ. Int., 2009. **35**(1): p. 187-201.

41. Estrada, I.B., Aller, A., Aller, F., Gomez, X. a Moran, A., *The survival of Escherichia coli, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants*. *Biores. Technol.*, 2004. **93**(2): p. 191-198.
42. Johansson, M., Emmoth, E., Salomonsson, A.C. a Albiñ, A., *Potential risks when spreading anaerobic digestion residues on grass silage crops - survival of bacteria, moulds and viruses*. *Grass Forage Sci.*, 2005. **60**(2): p. 175-185.
43. Havlicek, V., Lemr, K. a Schug, K.A., *Current Trends in Microbial Diagnostics Based on Mass Spectrometry*. *Anal. Chem.*, 2013. **85**(2): p. 790-797.
44. Maurer, C. a Muller, J., *Ammonia (NH₃) emissions during drying of untreated and dewatered biogas digestate in a hybrid waste-heat/solar dryer*. *Eng. Life Sci.*, 2012. **12**(3): p. 321-326.
45. Rehl, T. a Muller, J., *Life cycle assessment of biogas digestate processing technologies*. *Resour. Conserv. Recy.*, 2011. **56**(1): p. 92-104.
46. Bačík, O. *Komunální bioplynová stanice u Passau v Bavorsku*. 2006 [citováno 07.12.2012]; Dostupné na: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/komunalni-bioplynova-stanice-u-passau-v-bavorsku>
47. Masse, L., Masse, D.I. a Pellerin, Y., *The use of membranes for the treatment of manure: a critical literature review*. *Biosyst. Eng.*, 2007. **98**(4): p. 371-380.
48. Thorneby, L., Persson, K. a Tragardh, G., *Treatment of liquid effluents from dairy cattle and pigs using reverse osmosis*. *J. Agr. Eng. Res.*, 1999. **73**(2): p. 159-170.
49. Vaneeckhaute, C., Meers, E., Michels, E., Christiaens, P. a Tack, F.M.G., *Fate of Macronutrients in Water Treatment of Digestate Using Vibrating Reversed Osmosis*. *Water Air Soil Poll.*, 2012. **223**(4): p. 1593-1603.
50. Mihoubi, D., *Mechanical and thermal dewatering of residual sludge*. *Desalination*, 2004. **167**(1-3): p. 135-139.
51. Hjorth, M., Christensen, K.V., Christensen, M.L. a Sommer, S.G., *Solid-liquid separation of animal slurry in theory and practice. A review*. *Agron Sustain. Dev.*, 2010. **30**(1): p. 153-180.
52. Henze, M., Harremoës, P., Jansen, J.L. a Arvin, E., *Wastewater treatment: biological and chemical processes*. 2002, Springer: Berlin.
53. Gong, W.J., Li, W.Z. a Liang, H., *Application of A/O-MBR for treatment of digestate from anaerobic digestion of cow manure*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2010. **85**(10): p. 1334-1339.
54. Kratzeisen, M., Starcevic, N., Martinov, M., Maurer, C. a Muller, J., *Applicability of biogas digestate as solid fuel*. *Fuel*, 2010. **89**(9): p. 2544-2548.
55. Hirokawa, Y., Shibata, Y., Konya, T., Koike, Y. a Nakamura, T., *X-ray fluorescence analysis of Co, Ni, Pd, Ag, and Au in the scrapped printed-circuit-board ash*. *X-Ray Spectrom.*, 2013. **42**(3): p. 134-140.
56. Pirc, E.T., Novosel, B. a Bukovec, P., *Comparison of GC and OxiTop Analysis of Biogas Composition Produced by Anaerobic Digestion of Glucose in Cyanide Inhibited Systems*. *Acta Chim. Slov.*, 2012. **59**(2): p. 398-404.
57. Fernandes, J., Rao, A.V. a Wolever, T.M.S., *Different substrates and methane producing status affect short-chain fatty acid profiles produced by in vitro fermentation of human feces*. *J. Nutr.*, 2000. **130**(8): p. 1932-1936.
58. Hecht, C., Bieler, S. a Griehl, C., *Liquid chromatographic-mass spectrometric - analyses of anaerobe protein degradation products*. *J. Chromatogr. A*, 2005. **1088**(1-2): p. 121-125.
59. Mitchell, S.M., Ullman, J.L., Teel, A.L., Watts, R.J. a Frear, C., *The effects of the antibiotics ampicillin, florfenicol, sulfamethazine, and tylosin on biogas production and their degradation efficiency during anaerobic digestion*. *Biores. Technol.*, 2013. **149**: p. 244-252.

60. Robert-Peillard, F., Boudenne, J.L. a Coulomb, B., *Individual volatile fatty acids determination by chromogenic derivatization coupled to multi-syringe chromatography*. Talanta, 2013. **115**: p. 737-743.
61. Schiffels, J., Baumann, M.E.M. a Selmer, T., *Facile analysis of short-chain fatty acids as 4-nitrophenyl esters in complex anaerobic fermentation samples by high performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. A, 2011. **1218**(34): p. 5848-5851.
62. Arikan, O.A., Sikora, L.J., Mulbry, W., Khan, S.U., Rice, C. a Foster, G.D., *The fate and effect of oxytetracycline during the anaerobic digestion of manure from therapeutically treated calves*. Process Biochem., 2006. **41**(7): p. 1637-1643.
63. Mohring, S.A.I., Strzysch, I., Fernandes, M.R., Kiffmeyer, T.K., Tuerk, J. a Hamscher, G., *Degradation and Elimination of Various Sulfonamides during Anaerobic Fermentation: A Promising Step on the Way to Sustainable Pharmacy?* Environ. Sci. Technol., 2009. **43**(7): p. 2569-2574.
64. Kohrs, F., Heyer, R., Magnussen, A., Benndorf, D., Muth, T., Behne, A., Rapp, E., Kausmann, R., Heiermann, M., Klocke, M. a Reichl, U., *Sample prefractionation with liquid isoelectric focusing enables in depth microbial metaproteome analysis of mesophilic and thermophilic biogas plants*. Anaerobe, 2014. **29**: p. 59-67.
65. Riemenschneider, C., Zerr, W., Vater, N., Brunn, H., Mohring, S.A.I. a Hamscher, G., *Analysis and behavior of colistin during anaerobic fermentation*. Biores. Technol., 2014. **170**: p. 303-309.
66. Rey, M.D., Font, R. a Aracil, I., *Biogas from MSW landfill: Composition and determination of chlorine content with the AOX (adsorbable organically bound halogens) technique*. Energy, 2013. **63**: p. 161-167.
67. Eklund, B., Anderson, E.P., Walker, B.L. a Burrows, D.B., *Characterization of landfill gas composition at the fresh kills municipal solid-waste landfill*. Environ. Sci. Technol., 1998. **32**(15): p. 2233-2237.
68. Chiriac, R., Carre, J., Perrodin, Y., Fine, L. a Letoffe, J.M., *Characterisation of VOCs emitted by open cells receiving municipal solid waste*. J. Hazard. Mater., 2007. **149**(2): p. 249-263.
69. Chiriac, R., Morais, J.D., Carre, J., Bayard, R., Chovelon, J.M. a Gourdon, R., *Study of the VOC emissions from a municipal solid waste storage pilot-scale cell: Comparison with biogases from municipal waste landfill site*. Waste Manag., 2011. **31**(11): p. 2294-2301.
70. de la Rosa, D.A., Velasco, A., Rosas, A. a Volke-Sepulveda, T., *Total gaseous mercury and volatile organic compounds measurements at five municipal solid waste disposal sites surrounding the Mexico City Metropolitan Area*. Atmos. Environ., 2006. **40**(12): p. 2079-2088.
71. Eitzer, B.D., *Emissions of Volatile Organic-Chemicals from Municipal Solid-Waste Composting Facilities*. Environ. Sci. Technol., 1995. **29**(4): p. 896-902.
72. Kim, K.H. a Kim, M.Y., *The distributions of BTEX compounds in the ambient atmosphere of the Nan-Ji-Do abandoned landfill site in Seoul*. Atmos. Environ., 2002. **36**(14): p. 2433.
73. Pierucci, P., Porazzi, E., Martinez, M.P., Adani, F., Carati, C., Rubino, F.M., Colombi, A., Calcaterra, E. a Benfenati, E., *Volatile organic compounds produced during the aerobic biological processing of municipal solid waste in a pilot plant*. Chemosphere, 2005. **59**(3): p. 423-430.
74. Statheropoulos, M., Agapiou, A. a Pallis, G., *A study of volatile organic compounds evolved in urban waste disposal bins*. Atmos. Environ., 2005. **39**(26): p. 4639-4645.
75. Ward, R.S., Williams, G.M. a Hills, C.C., *Changes in major and trace components of landfill gas during subsurface migration*. Waste Manag. Res., 1996. **14**(3): p. 243-261.

76. Zou, S.C., Lee, S.C., Chan, C.Y., Ho, K.F., Wang, X.M., Chan, L.Y. a Zhang, Z.X., *Characterization of ambient volatile organic compounds at a landfill site in Guangzhou, South China*. Chemosphere, 2003. **51**(9): p. 1015-1022.
77. Davoli, E., Gangai, M.L., Morselli, L. a Tonelli, D., *Characterisation of odorants emissions from landfills by SPME and GC/MS*. Chemosphere, 2003. **51**(5): p. 357-368.
78. Francioso, O., Rodriguez-Estrada, M.T., Montecchio, D., Salomoni, C., Caputo, A. a Palenzona, D., *Chemical characterization of municipal wastewater sludges produced by two-phase anaerobic digestion for biogas production*. J. Hazard. Mater., 2010. **175**(1-3): p. 740-746.
79. Orzi, V., Cadena, E., D'Imporzano, G., Artola, A., Davoli, E., Crivelli, M. a Adani, F., *Potential odour emission measurement in organic fraction of municipal solid waste during anaerobic digestion: Relationship with process and biological stability parameters*. Biores. Technol., 2010. **101**(19): p. 7330-7337.
80. Kim, K.H., Baek, S.O., Choi, Y.J., Sunwoo, Y., Jeon, E.C. a Hong, J.H., *The emissions of major aromatic VOC as landfill gas from urban landfill sites in Korea*. Environ. Monit. Assess., 2006. **118**(1-3): p. 407-422.
81. Marine, S., Pedrouzo, M., Marce, R.M., Fonseca, I. a Borrull, F., *Comparison between sampling and analytical methods in characterization of pollutants in biogas*. Talanta, 2012. **100**: p. 145-152.
82. McGarvey, L.J. a Shorten, C.V., *The effects of adsorption on the reusability of Tedlar (R) air sampling bags*. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 2000. **61**(3): p. 375-380.
83. Akdeniz, N., Janni, K.A., Jacobson, L.D. a Hetchler, B.P., *Comparison of Gas Sampling Bags to Temporarily Store Hydrogen Sulfide, Ammonia, and Greenhouse Gases*. T. Asabe, 2011. **54**(2): p. 653-661.
84. Brown, A.S., van der Veen, A.M.H., Arrhenius, K., Murugan, A., Culleton, L.P., Ziel, P.R. a Li, J.R., *Sampling of gaseous sulfur-containing compounds at low concentrations with a review of best-practice methods for biogas and natural gas applications*. Trac-Trends Anal. Chem., 2015. **64**: p. 42-52.
85. Herrington, J.S., *Whole air canister sampling coupled with preconcentration GC/MS analysis of part-per-trillion levels of trimethylsilanol in semiconductor cleanroom air*. Anal. Chem., 2013. **85**(16): p. 7882-7888.
86. Haggmann, M., Heimbrand, E. a Hentschel, P., *Determination of siloxanes in biogas from landfills and sewage treatment plants*. SÖFW-journal, 2002. **128**(8): p. 3-7.
87. Woolfenden, E., *Sorbent-based sampling methods for volatile and semi-volatile organic compounds in air Part 1: Sorbent-based air monitoring options*. J. Chromatogr. A, 2010. **1217**(16): p. 2674-2684.
88. Cavenati, S., Grande, C.A. a Rodrigues, A.E., *Adsorption equilibrium of methane, carbon dioxide, and nitrogen on zeolite 13X at high pressures*. J. Chem. Eng. Data, 2004. **49**(4): p. 1095-1101.
89. Watson, G., May, E.F., Graham, B.F., Trebble, M.A., Trengove, R.D. a Chan, K.I., *Equilibrium Adsorption Measurements of Pure Nitrogen, Carbon Dioxide, and Methane on a Carbon Molecular Sieve at Cryogenic Temperatures and High Pressures*. J. Chem. Eng. Data, 2009. **54**(9): p. 2701-2707.
90. Heymans, N., Alban, B., Moreau, S. a De Weireld, G., *Experimental and theoretical study of the adsorption of pure molecules and binary systems containing methane, carbon monoxide, carbon dioxide and nitrogen. Application to the syngas generation*. Chem. Eng. Sci., 2011. **66**(17): p. 3850-3858.
91. Ras, M.R., Borrull, F. a Marce, R.M., *Determination of volatile organic sulfur compounds in the air at sewage management areas by thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry*. Talanta, 2008. **74**(4): p. 562-569.
92. Su, Y.C., Liu, W.T., Liao, W.C., Chiang, S.W. a Wang, J.L., *Full-range analysis of ambient volatile organic compounds by a new trapping method and gas*

- chromatography/mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 2011. **1218**(34): p. 5733-5742.
93. Lamaa, L., Ferronato, C., Fine, L., Jaber, F. a Chovelon, J., *Evaluation of adsorbents for volatile methyl siloxanes sampling based on the determination of their breakthrough volume*. Talanta, 2013. **115**: p. 881-886.
 94. Tassi, F., Capecciacci, F., Bucciati, A. a Vaselli, O., *Sampling and analytical procedures for the determination of VOCs released into air from natural and anthropogenic sources: A comparison between SPME (Solid Phase Micro Extraction) and ST (Solid Trap) methods*. Appl. Geochem., 2012. **27**(1): p. 115-123.
 95. Schweigkofler, M. a Niessner, R., *Removal of siloxanes in biogases*. J. Hazard. Mater., 2001. **83**(3): p. 183-196.
 96. Bruni, E., Ward, A.J., Kocks, M., Feilberg, A., Adamsen, A.P.S., Jensen, A.P. a Paulsen, A.K., *Comprehensive monitoring of a biogas process during pulse loads with ammonia*. Biomass Bioenerg., 2013. **56**: p. 211-220.
 97. Diamantis, V., Melidis, P. a Aivasidis, A., *Continuous determination of volatile products in anaerobic fermenters by on-line capillary gas chromatography*. Anal. Chim. Acta, 2006. **573**: p. 189-194.
 98. Ward, A.J., Bruni, E., Lykkegaard, M.K., Feilberg, A., Adamsen, A.P.S., Jensen, A.P. a Poulsen, A.K., *Real time monitoring of a biogas digester with gas chromatography, near-infrared spectroscopy, and membrane-inlet mass spectrometry*. Biores. Technol., 2011. **102**(5): p. 4098-4103.
 99. Matz, G., Loogk, M. a Lennemann, F., *On-line gas chromatography mass spectrometry for process monitoring using solvent-free sample preparation*. J. Chromatogr. A, 1998. **819**(1-2): p. 51-60.
 100. Parker, T., Dottridge, J. a Kelly, S., *Investigation of the composition and emissions of trace components in landfill gas*. Environ. Agency, R&D Technical Report P1-438/TR, 2002.
 101. Hwang, Y., Matsuo, T., Hanaki, K. a Suzuki, N., *Identification and Quantification of Sulfur and Nitrogen-Containing Odorous Compounds in Waste-Water*. Water Res., 1995. **29**(2): p. 711-718.
 102. Berube, P.R., Parkinson, P.D. a Hall, E.R., *Measurement of reduced sulphur compounds contained in aqueous matrices by direct injection into a gas chromatograph with a flame photometric detector*. J. Chromatogr. A, 1999. **830**(2): p. 485-489.
 103. Kim, K.H., Choi, Y.J., Jeon, E.C. a Sunwoo, Y., *Characterization of malodorous sulfur compounds in landfill gas*. Atmos. Environ., 2005. **39**(6): p. 1103-1112.
 104. Akdeniz, N., Jacobson, L.D., Hetchler, B.P., Bereznicki, S.D., Heber, A.J., Koziel, J.A., Cai, L., Zhang, S. a Parker, D.B., *Odor and Odorous Chemical Emissions from Animal Buildings: Part 4. Correlations between Sensory and Chemical Measurements*. T. Asabe, 2012. **55**(6): p. 2347-2356.
 105. Jacobs, M.B., *Recommended Standard Method for Continuing Air Monitoring for Hydrogen Sulfide Ultramicrodetermination of Sulfides in the Air*. J. Air Pollut. Control Assoc., 1965. **15**(7): p. 314-315.
 106. Pilch, B. a Grill, D., *Determination of Organic and Inorganic Sulfur by Ion Chromatography in Small Quantities of Plant-Material*. J. Plant Physiol., 1995. **146**(1-2): p. 10-14.
 107. Motta, O., Cucciniello, R., Scicali, C. a Proto, A., *A study on the applicability of zinc acetate impregnated silica substrate in the collection of hydrogen sulfide by active sampling*. Talanta, 2014. **128**: p. 268-272.
 108. Bramanti, E., D'Ulivo, L., Lomonte, C., Onor, M., Zamboni, R., Raspi, G. a D'Ulivo, A., *Determination of hydrogen sulfide and volatile thiols in air samples by mercury probe derivatization coupled with liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry*. Anal. Chim. Acta, 2006. **579**(1): p. 38-46.

109. Genualdi, S., Harner, T., Cheng, Y., MacLeod, M., Hansen, K.M., van Egmond, R., Shoeib, M. a Lee, S.C., *Global Distribution of Linear and Cyclic Volatile Methyl Siloxanes in Air*. Environ. Sci. Technol., 2011. **45**(8): p. 3349-3354.
110. Dewil, R., Appel, L. a Baeyen, J., *Energy use of biogas hampered by the presence of siloxanes*. Energ. Convers. Manage., 2006. **47**(13-14): p. 1711-1722.
111. Arnold, M. a Kajolinna, T., *Development of on-line measurement techniques for siloxanes and other trace compounds in biogas*. Waste Management, 2010. **30**(6): p. 1011-1017.
112. Schweigkofler, M. a Niessner, R., *Determination of siloxanes and VOC in landfill gas and sewage gas by canister sampling and GC-MS/AES analysis*. Environ. Sci. Technol., 1999. **33**(20): p. 3680-3685.
113. Raich-Montiu, J., Ribas-Font, C., de Arespacochaga, N., Roig-Torres, E., Broto-Puig, F., Crest, M., Bouchy, L. a Cortina, J.L., *Analytical methodology for sampling and analysing eight siloxanes and trimethylsilanol in biogas from different wastewater treatment plants in Europe*. Anal. Chim. Acta, 2014. **812**: p. 83-91.
114. Hill, D.T. a Bolte, J.P., *Digester Stress as Related to Iso-Butyric and Iso-Valeric Acids*. Biol. Waste., 1989. **28**(1): p. 33-37.
115. Ahring, B.K., Sandberg, M. a Angelidaki, I., *Volatile Fatty-Acids as Indicators of Process Imbalance In Anaerobic Digesters*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1995. **43**(3): p. 559-565.
116. Ziolecki, A. a Kwiatkow.E, *Gas-Chromatography of C1 to C5 Fatty-Acids in Rumen Fluid and Fermentation Media*. J. Chromatogr., 1973. **80**(2): p. 250-254.
117. Boe, K., Batstone, D.J. a Angelidaki, I., *An innovative online VFA monitoring system for the anerobic process, based on headspace gas chromatography*. Biotechnol. Bioeng., 2007. **96**(4): p. 712-721.
118. Stein, J., Kulemeier, J., Lembcke, B. a Caspary, W.F., *Simple and Rapid Method for Determination of Short-Chain Fatty-Acids in Biological-Materials by High-Performance Liquid-Chromatography with Ultraviolet Detection*. J. Chromatogr.-Biomed., 1992. **576**(1): p. 53-61.
119. Pind, P.F., Angelidaki, I. a Ahring, B.K., *A new VFA sensor technique for anaerobic reactor systems*. Biotechnol. Bioeng., 2003. **82**(1): p. 54-61.
120. Gonzalez-San Miguel, H.M., Alpizar-Lorenzo, J.M. a Cerda-Martin, V., *Development of a new high performance low pressure chromatographic system using a multisyringe burette coupled to a chromatographic monolithic column*. Talanta, 2007. **72**(1): p. 296-300.
121. Fernandez, C., Larrechi, M.S., Forteza, R., Cerda, V. a Callao, M.P., *Multisyringe chromatography (MSC) using a monolithic column for the determination of sulphonated azo dyes*. Talanta, 2010. **82**(1): p. 137-142.
122. Chocholous, P., Solich, P. a Satinsky, D., *An overview of sequential injection chromatography*. Anal. Chim. Acta, 2007. **600**(1-2): p. 129-135.
123. Robert-Peillard, F., Palacio-Barco, E., Coulomb, B. a Boudenne, J.L., *Development of a fluorescence-based microplate method for the determination of volatile fatty acids in anaerobically digested and sewage sludges*. Talanta, 2012. **88**: p. 230-236.
124. Hoch, M., *Organotin compounds in the environment - an overview*. Appl. Geochem., 2001. **16**(7-8): p. 719-743.
125. Pinel-Raffaitin, P., Amouroux, D., LeHecho, I., Rodriguez-Gonzalez, P. a Potin-Gautier, M., *Occurrence and distribution of organotin compounds in leachates and biogases from municipal landfills*. Water Res., 2008. **42**(4-5): p. 987-996.
126. Allen, M.R., Braithwaite, A. a Hills, C.C., *Trace organic compounds in landfill gas at seven UK waste disposal sites*. Environ. Sci. Technol., 1997. **31**(4): p. 1054-1061.
127. Ghosh, A., Seeley, S.K., Nartker, S.R. a Seeley, J.V., *Analysis of siloxanes in hydrocarbon mixtures using comprehensive two-dimensional gas chromatography*. J. Chromatogr. A, 2014. **1360**: p. 258-263.

128. Hayes, H.C., Graening, G.J., Saeed, S. a Kao, S.. *A summary of available analytical methods for the determination of siloxanes in biogas*. in *26TH SWANA landfill gas symposium*. 2003. Citeseer.
129. Martinez-Carballo, E., Gonzalez-Barreiro, C., Scharf, S. a Gans, O., *Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria*. Environ. Pollut., 2007. **148**(2): p. 570-579.
130. Berger, K., Petersen, B. a Buningpfaue, H., *Persistence of Drugs Occurring in Liquid Manure in the Food-Chain*. Archiv Fur Lebensmittelhygiene, 1986. **37**(4): p. 99-102.
131. Boxall, A.B.A., Blackwell, P., Cavallo, R., Kay, P. a Tolls, J., *The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems*. Toxicol. Lett., 2002. **131**(1-2): p. 19-28.
132. Nielsen, A.T. a Jonsson, S., *Quantification of volatile sulfur compounds in complex gaseous matrices by solid-phase microextraction*. J. Chromatogr. A, 2002. **963**(1-2): p. 57-64.
133. Roels, J. a Verstraete, W., *Occurrence and origin of phosphine in landfill gas*. Sci. Total Environ., 2004. **327**(1): p. 185-196.
134. Roels, J., Van Langenhove, H. a Verstraete, W., *Determination of phosphine in biogas and sludge at ppt-levels with gas chromatography-thermionic specific detection*. J. Chromatogr. A, 2002. **952**(1): p. 229-237.
135. Cushnie, T.P.T. a Lamb, A.J., *Antimicrobial activity of flavonoids*. Int. J. Antimicrob. Ag., 2005. **26**(5): p. 343-356.
136. Murray, M., *Quercetin: Nature's antihistamine*. Better Nutr., 1998. **60**(10).
137. Tsuchiya, H., *Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity*. Food Chem., 2010. **120**(4): p. 1089-1096.
138. de Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C. a Brinkman, U.A.T., *Analytical separation and detection methods for flavonoids*. J. Chromatogr. A, 2006. **1112**(1-2): p. 31-63.
139. Sahu, S.C. a Gray, G.C., *Pro-oxidant activity of flavonoids: Effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei*. Cancer Lett., 1996. **104**(2): p. 193-196.
140. Cook, N.C. a Samman, S., *Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources*. J. Nutr. Biochem., 1996. **7**(2): p. 66-76.
141. O'Prey, J., Brown, J., Fleming, J. a Harrison, P.R., *Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells*. Biochem. pharmacol., 2003. **66**(11): p. 2075-2088.
142. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. a Bobilya, D.J., *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. J. Nutr. Biochem., 2002. **13**(10): p. 572-584.
143. Aderogba, M., Ogundaini, A. a Eloff, J., *Isolation of two flavonoids from Bauhinia monandra (Kurz) leaves and their antioxidative effects*. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med., 2006. **3**(4): p. 59-65.
144. Chakraborty, T., Verotta, L. a Poddar, G., *Evaluation of Azadirachta-Indica Leaf Extract for Hypoglycemic Activity in Rats*. Phytother. Res., 1989. **3**(1): p. 30-32.
145. Qin, Y., Xia, M., Ma, J., Hao, Y., Liu, J., Mou, H., Cao, L. a Ling, W., *Anthocyanin supplementation improves serum LDL-and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects*. Am. J. Clinic. Nutr., 2009. **90**(3): p. 485-492.
146. Grant, D.C. a Helleur, R.J., *Rapid screening of anthocyanins in berry samples by surfactant-mediated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Comm. Mass Spectr., 2008. **22**(2): p. 156-164.
147. Tian, Q., Giusti, M.M., Stoner, G.D. a Schwartz, S.J., *Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization*

- tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring.* J. Chromatogr. A, 2005. **1091**(1): p. 72-82.
148. de Pascual-Teresa, S., Moreno, D.A. a Garcia-Viguera, C., *Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence.* Int. J. Mol. Sci., 2010. **11**(4): p. 1679-1703.
 149. Lila, M.A., *Anthocyanins and human health: An in vitro investigative approach.* J. Biomed. Biotechnol., 2004(5): p. 306-313.
 150. Viskelis, P., Rubinskiene, M., Jasutiene, I., Sarkinas, A., Daubaras, R. a Cesoniene, L., *Anthocyanins, Antioxidative, and Antimicrobial Properties of American Cranberry (Vaccinium macrocarpon Ait.) and their Press Cakes.* J. Food Sci., 2009. **74**(2): p. C157-C161.
 151. Kano, N., T. Takayanagi, K. Harada, K. Makino a F. Ishikawa, *Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, Ipomoera batatas cultivar Ayamurasaki.* Biosci. Biotechnol. Biochem., 2005. **69**(5): p. 979-988.
 152. Nielsen, I.L.F., Haren, G.R., Magnussen, E.L., Dragsted, L.O. a Rasmussen, S.E., *Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and antioxidative potency.* J. Agr. Food Chem., 2003. **51**(20): p. 5861-5866.
 153. Tamura, H. a Yamagami, A., *Antioxidative Activity of Monoacylated Anthocyanins Isolated from Muscat-Bailey-a Grape.* J. Agr. Food Chem., 1994. **42**(8): p. 1612-1615.
 154. Pal, R.S., Ariharasivakumar, G., Girhepunje, K. a Upadhyay, A., *In-vitro antioxidative activity of phenolic and flavonoid compounds extracted from seeds of Abrus precatorius.* Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 2009. **1**(2): p. 136-140.
 155. *Helmholtz Association of German Research Centres. Role of oxidative stress in diseases needs to be re-evaluated: Preventive detention for oxidizing agents.* 2012; Dostupné na: www.sciencedaily.com/releases/2012/12/121217102653.htm.
 156. Markesbery, W.R., *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease.* Free Radical Bio. Med., 1997. **23**(1): p. 134-147.
 157. Riddle, D.R., *Brain aging: models, methods, and mechanisms.* 2007, New York: CRC Press.
 158. Bustamante, M.A., Moral, R., Paredes, C., Perez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J. a Perez-Murcia, M.D., *Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry.* Waste Manage., 2008. **28**(2): p. 372-380.
 159. Da Ros, C., Cavinato, C., Pavan, P. a Bolzonella, D., *Winery waste recycling through anaerobic co-digestion with waste activated sludge.* Waste Manage., 2014. **34**(11): p. 2028-2035.
 160. Fabbri, A., Bonifazi, G. a Serranti, S., *Micro-scale energy valorization of grape marcs in winery production plants.* Waste Manage., 2015. **36**: p. 156-165.
 161. Leiva, M.B., Koupaie, E.H. a Eskicioglu, C., *Anaerobic co-digestion of wine/fruit-juice production waste with landfill leachate diluted municipal sludge cake under semi-continuous flow operation.* Waste Manage., 2014. **34**(10): p. 1860-1870.
 162. Li, J., Kong, C., Duan, Q., Luo, T., Mei, Z. a Lei, Y., *Mass flow and energy balance plus economic analysis of a full-scale biogas plant in the rice-wine-pig system.* Biores. Technol., 2015. **193**: p. 62-67.
 163. Melamane, X.L., Tandlich, R. a Burgess, J.E., *Treatment of wine distillery wastewater by high rate anaerobic digestion.* Water Sci Technol., 2007. **56**(2): p. 9-16.
 164. Macek, T., Mackova, M. a Kas, J., *Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation.* Biotechnol. Adv., 2000. **18**(1): p. 23-34.
 165. Jurado, J., Alejandreduran, E., Alonsomoraga, A. a Pueyo, C., *Study on the Mutagenic Activity of 13 Bioflavonoids with the Salmonella Ara Test.* Mutagenesis, 1991. **6**(4): p. 289-295.

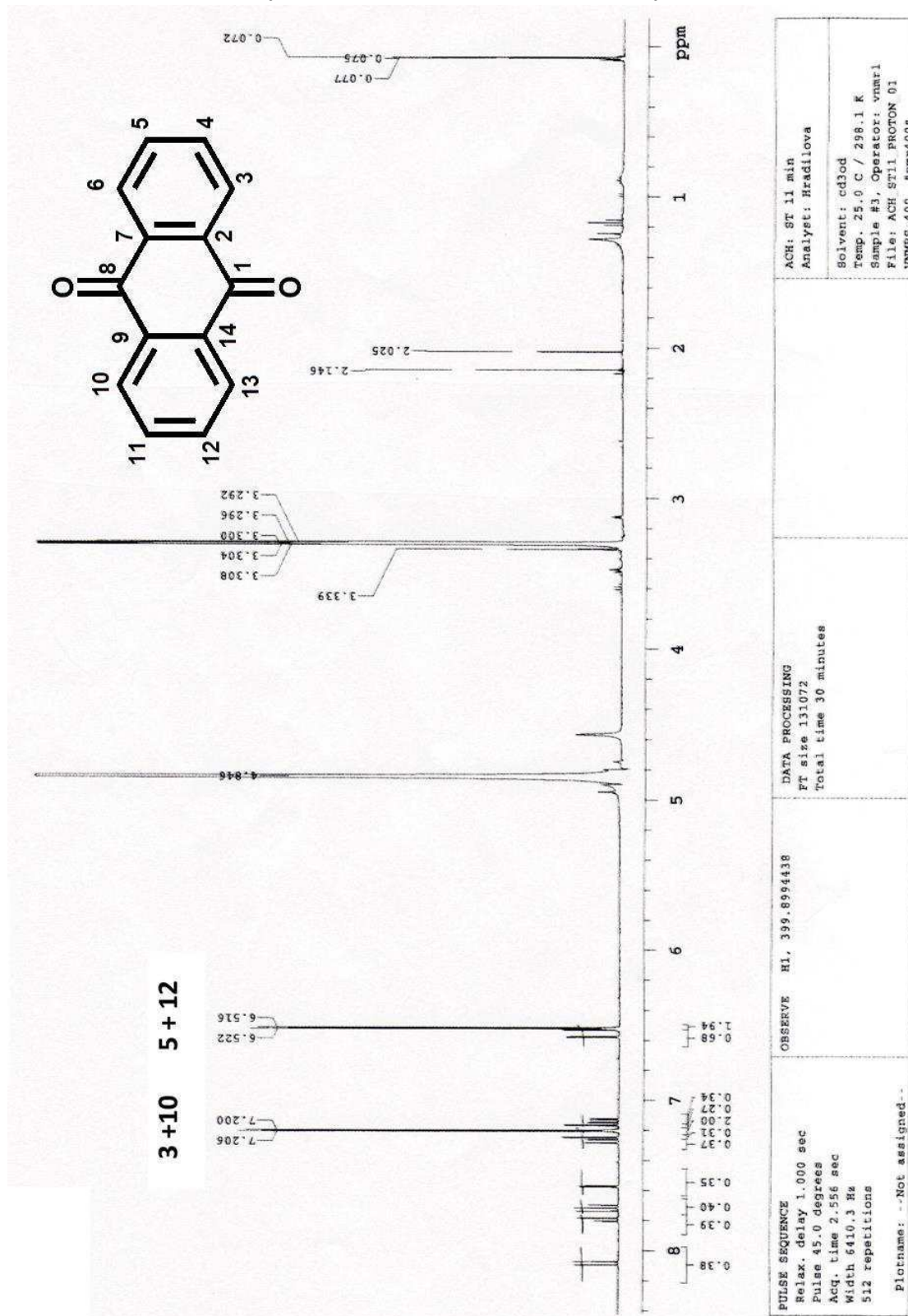
166. Popp, R. a Schimmer, O., *Induction of Sister-Chromatid Exchanges (Sce), Polyploidy, and Micronuclei by Plant Flavonoids in Human Lymphocyte-Cultures - a Comparative-Study of 19 Flavonoids*. Mutation Res., 1991. **246**(1): p. 205-213.
167. Suzuki, S., Takada, T., Sugawara, Y., Muto, T. a Kominami, R., *Quercetin Induces Recombinational Mutations in Cultured-Cells as Detected by DNA Fingerprinting*. Jap. J. Cancer Res., 1991. **82**(10): p. 1061-1064.
168. Skibola, C.F. a Smith, M.T., *Potential health impacts of excessive flavonoid intake*. Free Radical Biol. Med., 2000. **29**(3-4): p. 375-383.
169. Herrmann, A.P. a Janke, H.D., *Cofefermentation of rutin and hesperidin during two-stage anaerobic pre-treatment of high-loaded brewery wastewater*. Water Res., 2001. **35**(11): p. 2583-2588.
170. Herrmann, A.P., Willems, M. a Janke, H.D., *Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge*. Water Res., 2001. **35**(11): p. 2575-2582.
171. Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M.D., Paez-Hernandez, M.E., Rodriguez, J.A. a Galan-Vidal, C.A., *Chemical studies of anthocyanins: A review*. Food Chem., 2009. **113**(4): p. 859-871.
172. Markakis, P., Livingston, G.E. a Fellers, C.R., *Quantitative Aspects of Strawberry Pigment Degradation*. Food Technol., 1956. **10**(12): p. 31-31.
173. Hrazdina, G., *Reactions of Anthocyanidin-3,5-Diglucosides - Formation of 3,5-Di-(O-Beta-D-Glucosyl)-7-Hydroxy Coumarin*. Phytochem., 1971. **10**(5): p. 1125-&.
174. Tanchev, S. a Ioncheva, N., *Products of Thermal Degradation of the Anthocyanins Cyanidin-3-glucoside, Cyanidin-3-rutinoside and Cyanidin-3-sophoroside*. Food/Nahrung, 1976. **20**(10): p. 889-893.
175. Adams, J.B., *Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin. I. In acidified aqueous solution at 100 °C*. J. Sci. Food Agr., 1973. **24**(7): p. 747-762.
176. Sadilova, E., Stintzing, F.C. a Carle, R., *Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins*. J. Food Sci., 2006. **71**(8): p. C504-C512.
177. Avila, M., Hidalgo, M., Sanchez-Moreno, C., Pelaez, C., Requena, T. a de Pascual-Teresa, S., *Bioconversion of anthocyanin glycosides by Bifidobacteria and Lactobacillus*. Food Res. Int., 2009. **42**(10): p. 1453-1461.
178. Kučera, L., *Vývoj metody pro stanovení degradačních produktů anthokyaninových barviv*, in *Katedra analytické chemie*. 2011, Univerzita Palackého v Olomouci: Olomouc.
179. McMurry, J., *Organická chemie*. 2007: Vysoké učení technické v Brně, Nakladatelství VUTIUM.
180. Serra, A., Macia, A., Romero, M.P., Reguant, J., Ortega, N. a Motilva, M.J., *Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids*. Food Chem., 2012. **130**(2): p. 383-393.
181. Kucera, L., Fanali, S., Aturki, Z., Pospisil, T. a Bednar, P., *Comparison of nano and conventional liquid chromatographic methods for the separation of (+)-catechin-ethylmalvidin-3-glucoside diastereoisomers*. J. Chromatogr. A, 2016. **1428**: p. 126-133.
182. Kučera, L., Kurka, O., Barták, P. a Bednar, P., *Liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry - tool for the study of polyphenol profile changes during micro-scale biogas digestion of grape marcs*. Chemosphere, 2017. **166**: p. 463-472.
183. Pissarra, J., Lourenco, S., Gonzalez-Paramas, A.M., Mateus, N., Buelga, C.S., Silva, A.M.S. a De Freitas, V., *Isolation and structural characterization of new anthocyanin-alkyl-catechin pigments*. Food Chem., 2005. **90**(1-2): p. 81-87.
184. Briggs, L. a Nicholls, G., *Some hydroxyanthraquinones and derivatives*. 1951, Royal soc chemistry Thomas Graham House. p. 1138-1139.
185. Mužík, O. a Abrham, Z., *Utilization and economy of biogas plants in agribusiness*. 2006, Praha: Researche Institute of Agricultural Engineering, p.r.i.

186. Singh, N.P., Gupta, A.P., Sinha, A.K. a Ahuja, P.S., *High-performance thin layer chromatography method for quantitative determination of four major anthraquinone derivatives in Rheum emodi*. J. Chromatogr. A, 2005. **1077**(2): p. 202-206.
187. *Bezpečnostní list - Antrachinon*. Dostupné na: www.pentachemicals.eu/
188. Stodůlková, E., Kolařík, M., Křesinová, Z., Kuzma, M., Šulc, M., Man, P., Novák, P., Maršík, P., Landa, P., Olšovská, J., Chudíčková, M., Pažoutová, S., Černý, J., Bella, J. a Flieger, M., *Hydroxylated anthraquinones produced by Geosmithia species*. Folia Microbiol., 2009. **54**(3): p. 179-187.
189. Stodůlková, E., Man, P., Kolařík, M. a Flieger, M., *High-performance liquid chromatography–off line mass spectrometry analysis of anthraquinones produced by Geosmithia lavendula*. J. Chromatogr. A, 2010. **1217**(40): p. 6296-6302.
190. Kučera, L., Kurka, O. a Bednář, P., *LC/MS method development for the determination of degradation products of anthocyanin dyes*. Chem. Listy, 2012. **106**: p. 298.
191. Kučera, L., Kurka, O. a Bednář, P., *Study of degradation of anthocyanins dyes using liquid chromatography with mass detection*, in *29th International Symposium on Chromatography (9. 9. - 15. 9.)*. 2012: Toruň, Polsko.
192. Kučera, L., Kurka, O. a Bednář, P., *Analysis of degradation products of anthocyanin dyes using LC/MS*, in *Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiral 2012*. 2012: Olomouc, Česká republika.
193. Francia-Aricha, E.M., Guerra, M.T., Rivas-Gonzalo, J.C. a Santos-Buelga, C., *New Anthocyanin Pigments Formed after Condensation with Flavanols*. J. Agr. Food Chem., 1997. **45**(6): p. 2262-2266.
194. Jackman, R.L., Yada, R.Y., Tung, M.A. a Speers, R., *Anthocyanins as food colorants—a review*. J. Food Biochem., 1987. **11**(3): p. 201-247.
195. Papouskova, B., Bednar, P., Hron, K., Stavek, J., Balik, J., Myjavcova, R., Bartak, P., Tomankova, E. a Lemr, K., *Advanced liquid chromatography/mass spectrometry profiling of anthocyanins in relation to set of red wine varieties certified in Czech Republic*. J. Chromatogr. A, 2011. **1218**(42): p. 7581-7591.
196. Fanali, C., Rocco, A., Aturki, Z., Mondello, L. a Fanali, S., *Analysis of polyphenols and methylxantines in tea samples by means of nano-liquid chromatography utilizing capillary columns packed with core-shell particles*. J. Chromatogr. A, 2012. **1234**: p. 38-44.
197. Guiochon, G., *The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography*. J. Chromatogr. A, 2006. **1126**(1-2): p. 6-49.
198. Straka, F., Dohányos, M., Zábranská, J., Jeníček, P., Dědek, J., Malijevský, A., Novák, J., Oldřich, J. a Kunčarová, M., *Biogas - a handbook for teaching, design and operation of biogas system*. 2 ed. 2006, Praha /in Czech/: GAS s.r.o.
199. Wittig, J., Herderich, M., E.U. Graefe a M. Veit, *Identification of quercetin glucuronides in human plasma by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. B, 2001. **753**(2): p. 237-243.
200. Cuyckens, F. a Claeys, M., *Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids*. J. Mass Spectrom., 2004. **39**(1): p. 1-15.
201. Smith, A.H., Kandil, F.E., Seigler, D.S. a Mackie, R.I., *5-Deoxyflavan-3-ol-based proanthocyanidins with antinutritional and antimicrobial properties from the forage legume Acaciella angustissima*. J. Appl. Bot. Food Qual., 2011. **84**(2): p. 142-150.
202. Peng, X.C., Zhang, Z.C., Zhang, N., Liu, L., Li, S.T. a Wei, H., *In vitro catabolism of quercetin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites*. Food Nutr. Res., 2014. **58**.
203. Li, H.-J. a Deinzer, M.L., *Tandem Mass Spectrometry for Sequencing Proanthocyanidins*. Anal. Chem., 2007. **79**(4): p. 1739-1748.

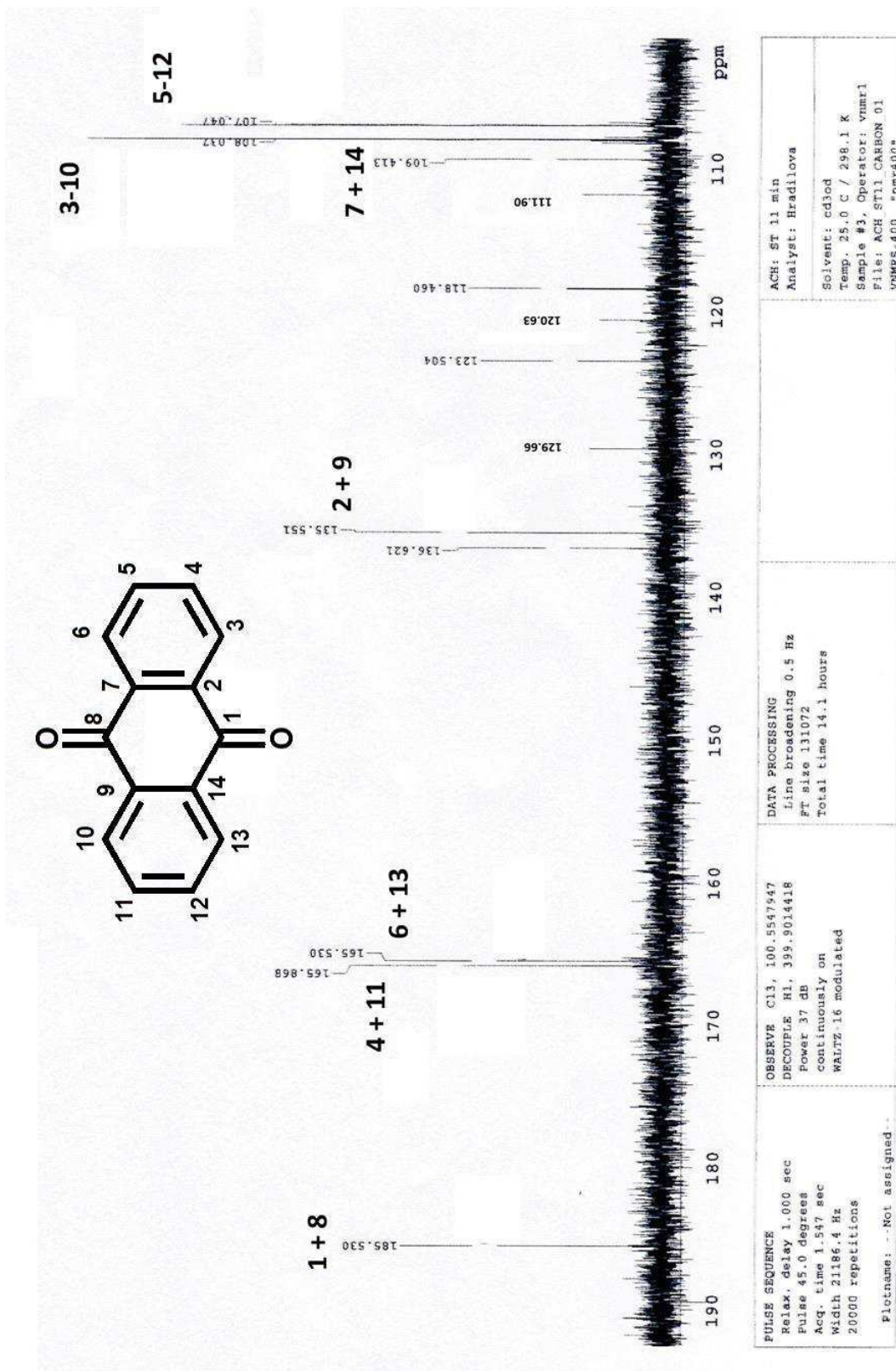
204. Barz, W. a Hoesel, W., *Metabolism and Degradation of Phenolic Compounds in Plants*, in *Biochemistry of Plant Phenolics*, Swain, T., Harbone, J.B. a Van Sumere, C.F., Editors. 1979, Springer US: Boston, MA. p. 339-369.
205. Adams, J.B., *Thermal-Degradation of Anthocyanins with Particular Reference to 3-Glycosides of Cyanidin .1. Acidified Aqueous-Solution at 100 Degrees C*. J. Sci. Food Agr., 1973. **24**(7): p. 747-762.
206. <http://datasheets.scbt.com>.

Přílohy

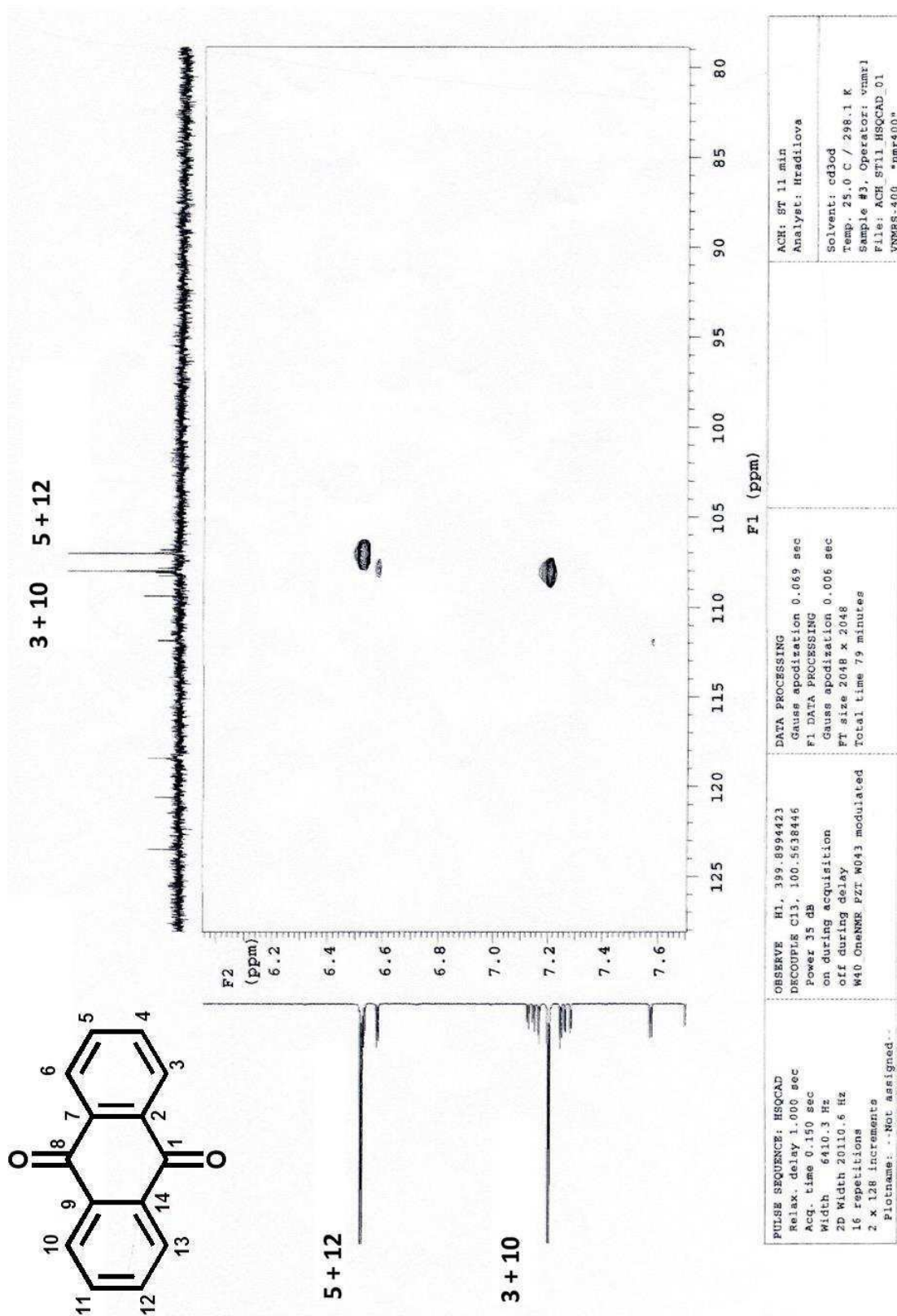
Příloha 1: ¹H spektrum syntetizovaného standardu anthrachrysenu



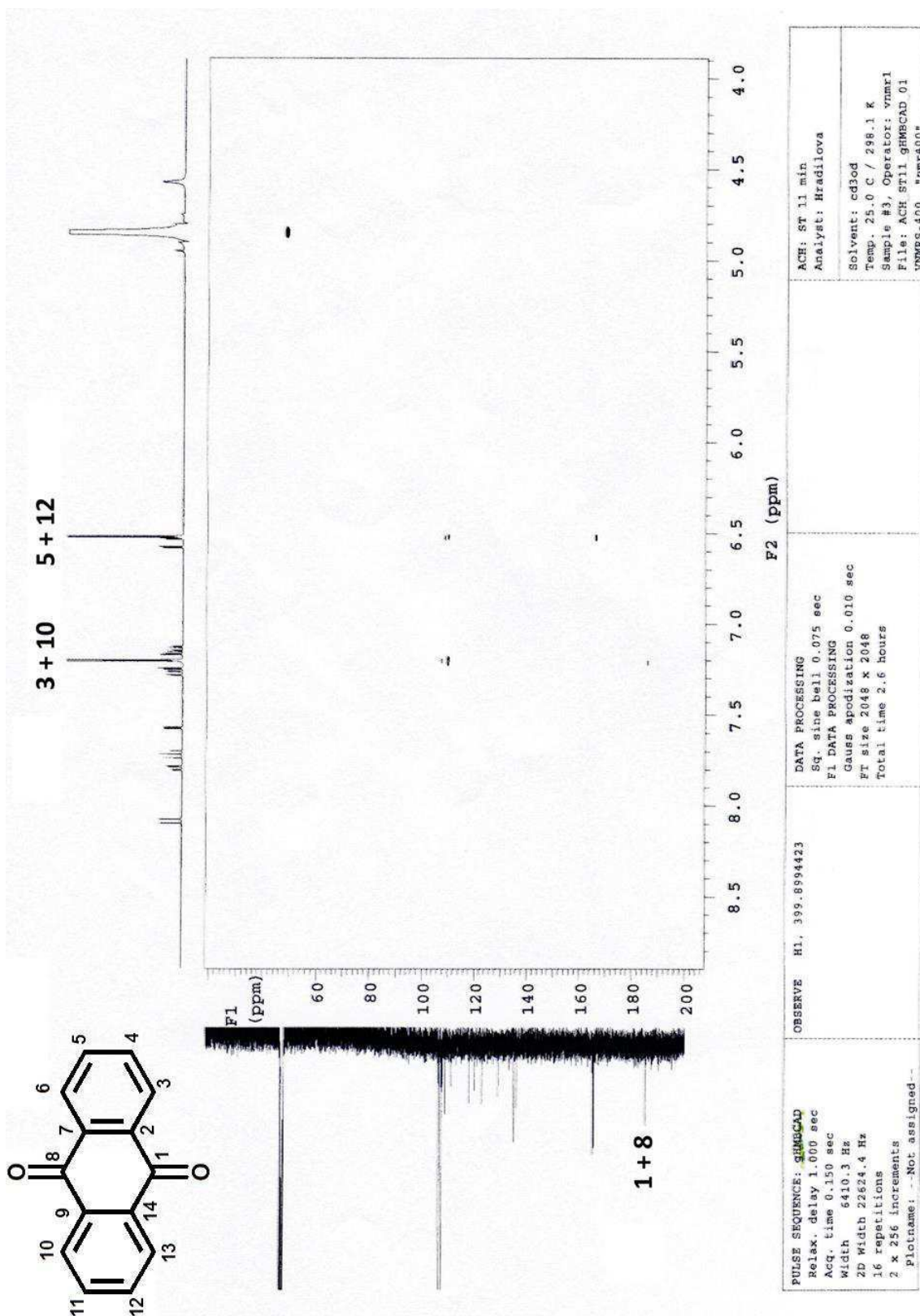
Příloha 2: ¹³C spektrum syntetizovaného standardu anthrachrysenu



Příloha 3: HSCQ spektrum syntetizovaného standardu anthrachrysenu



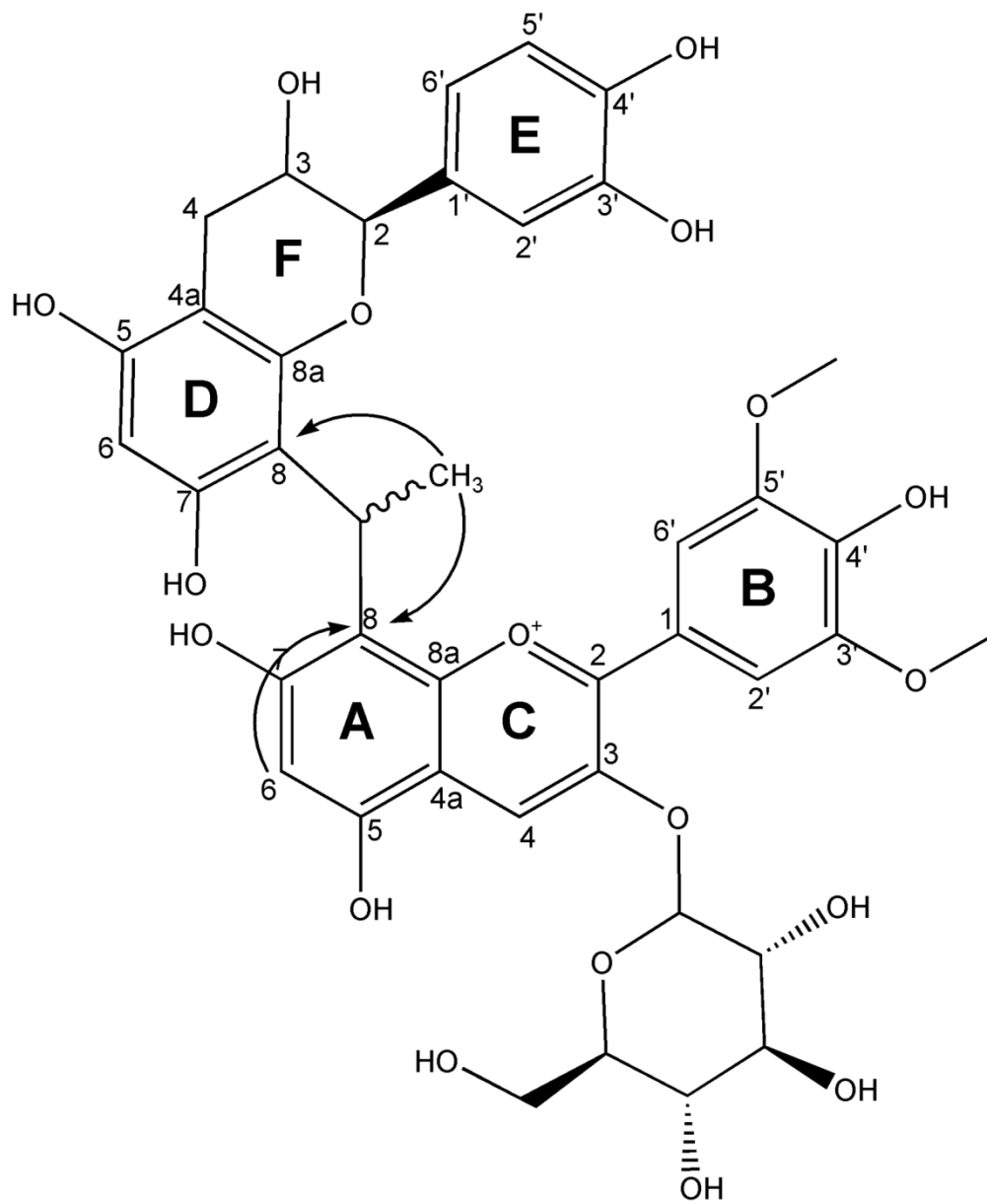
Příloha 4: HMBC spektrum syntetizovaného standardu anthrachrysenu



Příloha 5. ^1H , ^{13}C a 2D korelace pro vybrané atomy látky C.

Pozice	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	HMQC
<i>Anthokyanidinová část</i>				
2C	x	160.9	H-2,6B	x
4C	8.76	134.3		H-4C
6A	6.82	115.0		H-6A
8A	x	112.1	CH3, H-6A	x
2,6B	7.86	110.1		H-2,6B
3,5B	x	148.2	OMe; H-2,6B	x
4B	x	143.7	H-2,6B	x
OMe	3.98	56.8		OCH3
<i>Flavonolová část</i>				
8D	x	108.2	CH3	x
<i>Cukerná část</i>				
GI-1	5.29	103.0		H-GI-1
<i>Propylový můstek</i>				
CH	5.31	26.2	CH3	
CH3	1.76	19.2	x	CH3

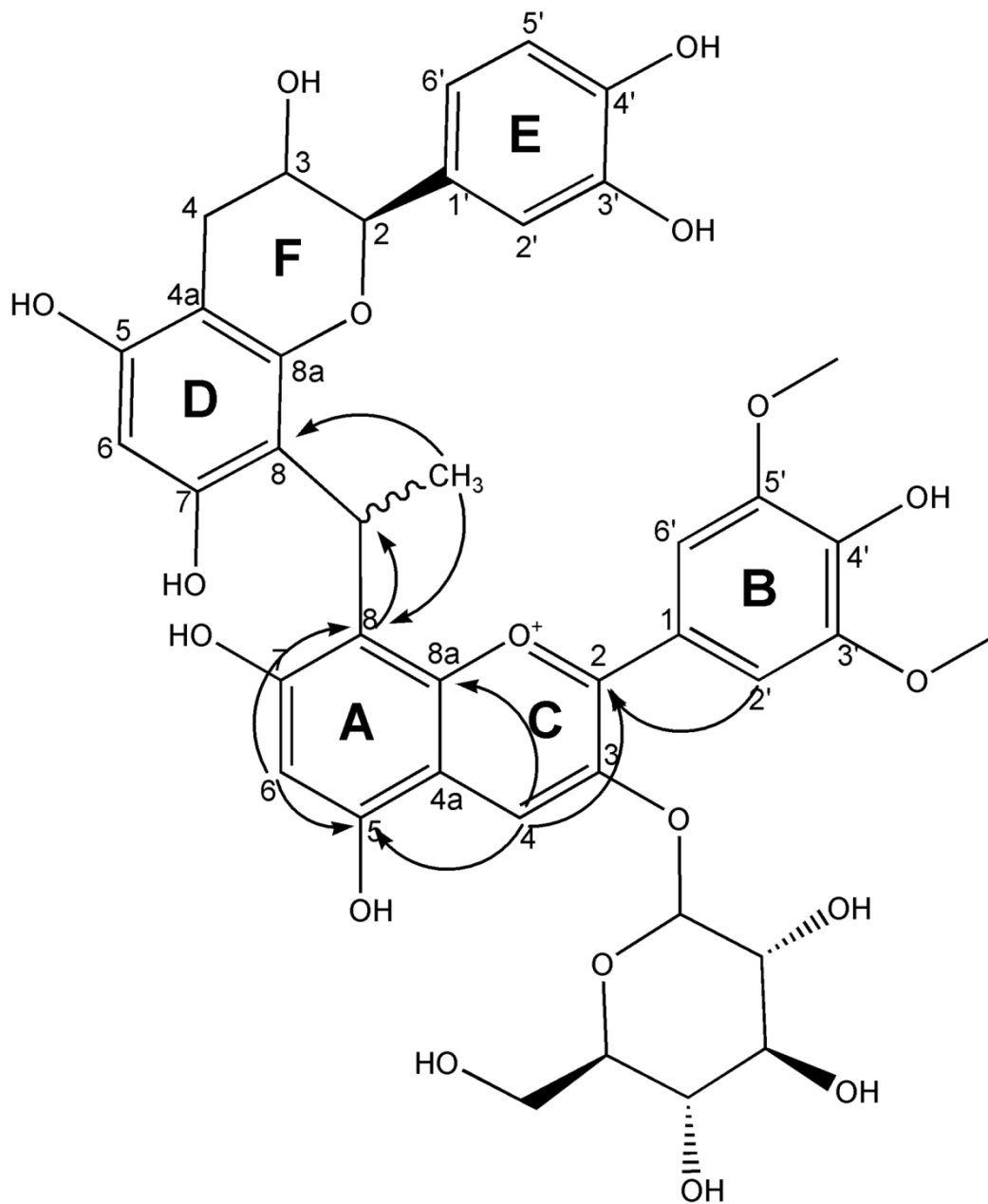
Příloha 6. Nejdůležitější korelace nalezené v HMBC pro látku C.



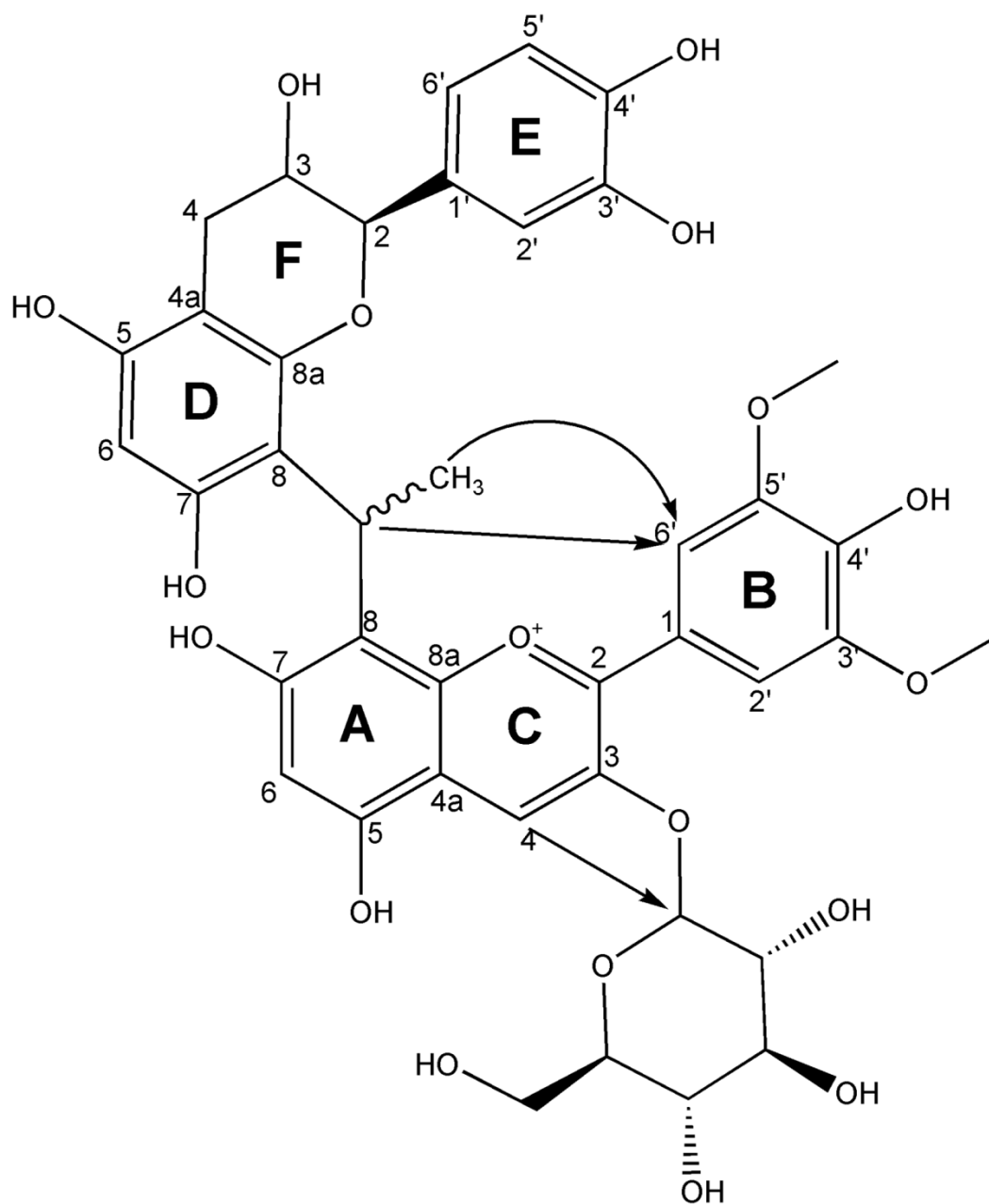
Příloha 7. ¹H, ¹³C and 2D korelace vybraných atomů pro látku D.

Pozice	δ ¹ H	δ ¹³ C	HMBC	HMQC	ROESY
<i>Anthokyanidinová část</i>					
2C	x	162.2	H-4C; H-2,6B	x	-
3C	x	145.6	H-4C	x	-
4C	8.82	134.5		H-4C	H-H (G11); H (G12); H (G13)
5A	x	155.8	H-4C, H-6A	x	-
6A	6.76	115.8		H-6A	-
8A	x	112.1	CH; CH ₃ , H-6A	x	-
8aA	x	153.1	H-4C	x	-
1B	x	120.3	H-2,6B	x	-
2,6B	7.89	109.2		H-2,6B	H-H (CH); H (CH ₃); H (OMe)
OMe	3.97	57.1		OCH ₃	H-H (CH); H (2',6'B)
<i>Flavonolová část</i>					
1E	x	130.9	H-6E	x	-
4aD	x	101.9	H-4αF; H-4βF	x	-
4αF	2.43	29.5		H-4F	-
4βF	2.92	29.5		H-4F	-
6E	6.29	116.5		H-6E	-
8D	x	107.7	CH ₃	x	-
<i>Cukerná část</i>					
Gl-1	5.39	102.7	H-3C	H-Gl-1	H-H (4C)
<i>Propylová část</i>					
CH	5.48	26.0	CH ₃	CH	H-H (2',6'B)
CH ₃	1.77	19.1	X	CH ₃	H-H (2',6'B); H (OMe)

Příloha 8. Nejdůležitější korelace nalezené v HMBC pro látku D.



Příloha 9. Nejdůležitější korelace nalezené při ROESY experimentech pro látku D.



Příloha 10. Rozlišení (R) kritických párů získaných při separaci reakční směsi při různém obsahu TFA v mobilní fázi (koncentrace TFA: (a) – 0,05 %; (b) – 0,1 %; (c) – 0,2 %; (d) – 0,4 % (v/v; kolona Chromosphere C18, MF 79:21 H₂O:ACN. (A) (+)-katechin; (B) malvidin-3-glukosid; (C) a (D) CeM3G diastereomery.

	A-B		B-C		C-D	
	R	SD	R	SD	R	SD
a.	1,930	± 0,007	3,489	± 0,095	2,723	± 0,063
b.	2,050	± 0,008	2,885	± 0,079	2,266	± 0,052
c.	1,948	± 0,007	2,561	± 0,070	2,185	± 0,050
d.	2,034	± 0,008	2,597	± 0,071	2,063	± 0,047

Curriculum vitae

RNDr. Lukáš Kučera
narozen 29. října 1986 ve Vítkově, ČR
bydliště: Nábřeží 7, 77900 Olomouc

Vzdělání

2011-doposud postgraduální studium na PŘF UP v Olomouci, obor „analytická chemie“
2015 udělen titul RNDr. – PŘF UP v Olomouci, obor „analytická chemie“
2009-2011 studium na PŘF UP v Olomouci, obor Chemie životního prostředí (Mgr.)
2006-2009 studium na PŘF UP v Olomouci, obor Chemie - Geologie a ochrana životního prostředí (Bc.)

Zaměstnání:

2013-doposud výzkumný pracovník, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc
2006-2012 manažer výroby, skladový a logistický referent, Cervus s.r.o., Olomouc (firma se zabývá výrobou krmiv a směsí pro bioplynové stanice)

Studijní pobyty:

2013, Italian Academy of Science (CNR), Řím, Itálie, celkem 3 měsíce (prof. S. Fanali)

Odborné vědecké zaměření:

Analytická chemie, separační metody, hmotnostní spektrometrie, analýza biologicky aktivních látek, studium vlastností polyfenolů, analýza složitých matric, analýza archeologických artefaktů a organických reziduí v nich.

Pedagogická činnost:

vedoucí laboratorních cvičení, konzultant diplomové práce

Publikační činnost:

- **Kučera L.**, Fanali S., Aturki Z., Pospisil T., Bednar P.: Comparison of nano and conventional liquid chromatographic methods for the separation of (+)-catechin-ethylmalvidin-3-glucoside diastereoisomers. *J. Chromatogr. A* 1428 (2015) 126-133.
- **Kučera L.**, Kurka O., Bartak P., Bednar P.: Liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry – Tool for the study of polyphenol profile changes during micro-scale biogas digestion of grape marcs. *Chemosphere* 166 (2017) 463-472.
- **Kučera L.**, Kurka O., Bednar P.: LC/MS method development for the determination of degradation products of anthocyanin dyes. *Chem. Listy* 106 (2012) 298.
- **Kučera L.**, Bednar P.: Biogas system and possibilities of control and use of digestate in Czech Republic: A Review. *Waste Forum* 3 (2014) 123-136.

Impaktované časopisy (mimo disertační práci)

- **Kučera L.**, Papoušek R., Kurka O., Barták P., Bednář P.: Study of composition of espresso coffee prepared from various roast degrees of *Coffea arabica* L. coffee beans, *Food Chem* 199 (2016), 727-735.
- Kučerová P., Skopalová J., **Kučera L.**, Táborský J., Švecová H., Lemr K., Cankař P., Barták P.: Electrochemical oxidation of 5-hydroxymethyl tolterodine and identification of its oxidation products using liquid chromatography and mass spectrometry, *Electrochimica Acta* 215 (2016) 131-139.
- Kurka O., **Kučera L.**, Bednář P.: Analytical and semipreparative chiral separation of *cis*-itraconazole on cellulose stationary phases by high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 36 (2016) 2736-2745.
- Kučerová P., Skopalová J., **Kučera L.**, Hrbáč J., Lemr K.: Electrochemical oxidation of fesoterodine and identification of its oxidation products using liquid chromatography and mass spectrometry, *Electrochimica Acta* 159 (2015) 131-139.
- Škríba, A., Janková, Š., Váňa, J., Barták, P., Bednář, P., Fryčák, P., **Kučera, L.**, Kurka, O., Lemr, K., Macíková, P., Marková, E., Nováková, P., Papoušková, B., Skopalová, J., Švecová, H., and Roithová, J. (2013) Protonation sites and fragmentations of para-aminophenol, *Int J Mass Spectrom* 337, 18-23.

Recenzované časopisy (mimo disertační práci)

- Richtera, L.; Zmrzlý, M.; Videman, J.; Grossmannová, D.; **Kučera, L.** (2011) Moravské denáry fenikového typu Přemysla Otakara II. z nálezů Třebíč-Borovina (II) a jejich analýza. *Folia Numismatica* 25(1), 3-17.
- **Kučera, L.** (2011) Dvě dobová falza pražských grošů Karla IV. nalezená na území bývalého Litevského velkoknížectví. *Num.Listy* 66 (1), 119-122
- **Kučera, L.**, Cycoňová, L. (2013) Hromadný nález 63 pražských grošů se dvěma neobvyklými kusy. *Folia Numismatica* 27(1), 171-177.
- **Kučera, L.** (2013) Nález 23 pražských grošů v okr. Hodonín, *Folia Numismatica* 27(2), 233-236.

Prezentace na konferencích formou posterů:

- **Kučera L.**, Kurka O., Bednář P. *Analysis of degradation products of anthocyanin dyes using LC/MS*; Acta UPOL, Chemica 50S (2012), s. 118. International Symposium Advances in Chromatography and Electrophoresis Chiranal 2012.
- **Kučera L.**, Kurka O., Bednář P., *Study of degradation of anthocyanin dyes using liquid chromatography with mass detection*, Book of Abstracts S5-P27, str. 555, 29th International Symposium on Chromatography, Toruň, 9.-13.9. 2012
- **Kučera, L.**, Bednář, P., *UPLC/MS² study of composition of espresso coffee prepared from various roasting stages of coffee beans Coffea arabica L.*, 30th International Symposium on Chromatography, Salzburg, 14.-18.9. 2014.
- **Kučera, L.**, Bednář, P., *Analysis of espresso coffee prepared from various roasting stages of coffee beans Coffea arabica L.*, 42nd International Symposium of High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques – HPLC 2015, Ženeva, 21.-25.6. 2015.

- **Kučera, L.**, Kurka, O., Barták, P., Bednář, P., *Study of changes of polyphenols in red grape marcs during anaerobic digestion by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry*, Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2016, 6.-9. červen, Olomouc 2016.
- **Kučera L.**, Cechová M., Fanali S., Aturki Z., Bednář P.: *Nano-liquid chromatography for analysis of plant extract*. 31st International Symposium on Chromatography 2016, 28. 8. - 1. 9., Cork 2016.



Comparison of nano and conventional liquid chromatographic methods for the separation of (+)-catechin-ethyl-malvidin-3-glucoside diastereoisomers



Lukáš Kučera^{a,b}, Salvatore Fanali^b, Zeineb Aturki^b, Tomáš Pospíšil^c, Petr Bednář^{a,*}

^a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, 779 00 Olomouc, Czech Republic

^b Institute of Chemical Methodologies, Italian National Research Council, Area della Ricerca di Roma I, Via Salaria Km 29,300, Monterotondo, 00015 Rome, Italy

^c Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Chemical Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 June 2015

Received in revised form

11 September 2015

Accepted 21 September 2015

Available online 26 September 2015

Keywords:

Nano-liquid chromatography

Capillary column

High-performance liquid chromatography

Anthocyanins

Bridged dyes

ABSTRACT

Nano-liquid chromatography and conventional HPLC were used for the separation of diastereomers of (+)-catechin-ethyl-malvidin-3-glucoside. Those bridged anthocyanin dyes were obtained by reaction of (+)-catechin with malvidin-3-glucoside in the presence of acetaldehyde. Both diastereomers were isolated with semipreparative chromatography and their structures were confirmed by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. In-laboratory prepared capillary columns packed with fully porous particles Chromosphere C18, dp = 3 μm, core-shell particles Kinetex C18, dp = 2.6 μm (100 μm i.d.) and monolithic column Chromolith CapRod (100 μm i.d.) were used for the separation of (+)-catechin, malvidin-3-glucoside and both diastereomers. Chromosphere C18 stationary phase provided the best chromatographic performance. Mobile phase containing water:acetonitrile (80:20) acidified with trifluoroacetic acid (0.1%, v/v/v) was used in an isocratic elution mode with a flow rate of 360 nL min⁻¹. Separation of studied compounds was achieved in less than 7 min under optimized conditions. The nano-liquid chromatographic method and a conventional HPLC one using the same fully porous particles (Chromosphere C18, 3 μm, 100 mm × 4.6 mm) were compared providing higher separation efficiency with the first analytical method and similar selectivity. A better peak symmetry and higher resolution of the studied diastereomers was achieved by conventional chromatography. Nevertheless, nano-liquid chromatography appeared to be useful for the separation of complex anthocyanin dyes and can be utilized for their analysis in plant and food micro-samples. The developed method was used for analysis of red wine grape pomace.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Anthocyanins are water soluble natural dyes having a number of protection and regulatory functions in plant world. These compounds are found in relatively high concentrations in fruits (e.g. red grapes and various berries) as well as in foods produced from plants. Anthocyanins have many beneficial effects on human health [1,2]. Native anthocyanins show relatively low chemical stability influenced by many factors such as pH, temperature, their concentration in solution, presence of oxygen or enzymes, irradiation, etc.

[3,4]. Anthocyanins can be stabilized by reaction with certain small molecules including aldehydes, ketones and organic acids resulting in more complex dyes (e.g. pyranoanthocyanins, compounds consisting of several covalently connected flavonoid units, etc.). Study of different spatial distribution of anthocyanins and related complex dyes in plant tissue and related plant food represents a challenging analytical task allowing elucidation of many functional processes in living plant as well as during storage of a food (effect of mechanical damage of tissue, microbial attack and many others). The most common methods for such purposes are based on direct surface scanning (imaging) by means of scanning microscopy methods and matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry [5,6]. On the other hand, since the plant and food material represents a complex mixture of chemically various compounds,

* Corresponding author.

E-mail address: petr.bednar@upol.cz (P. Bednář).

chromatographic analysis of a scission of small part of tissue after extraction would be unavoidable in many cases.

The most common approach for the separation of anthocyanins combines HPLC coupled to photodiode-array (PDA) detection, where selective detection of anthocyanins is possible since they absorb in the visible range around 500–550 nm [7,8]. The hyphenation of HPLC with mass spectrometry (MS) or tandem mass spectrometry (MS/MS) provides increased sensitivity and structural elucidation capabilities [9,10].

Miniaturization represents one of the main trends in modern analytical chemistry. Recently, great attention has been paid to the development of miniaturized versions of LC, like capillary/nano-LC, that have become an important area of research, resulting attractive especially for industries, due to their reliability and reproducibility. The use of these methodologies provides numerous benefits, such as higher separation efficiency and resolution, lower sample and solvent consumption and in particular higher analysis speed, making these techniques environmentally friendly and cost-effective [11–13]. Capillary columns can be laboratory made by using small amounts of stationary phase making possible the use of expensive (e.g. chiral packing sorbents) and/or novel materials [11,14]. Furthermore, the small internal diameter of the columns leads to a decrease of sample dilution eluted from the column resulting in a signal to noise improvement [15]. Considering the low flow rate of miniaturized systems, they are particularly compatible with low flow ionization techniques like nanospray interfaces for efficient coupling with mass spectrometry [16]. A critical aspect related to nano-LC can be the low sample loading due to the small dimension of the capillary column which leads to loss of detection sensitivity. In order to increase the detection limit and to obtain benefit from the smaller dilution factors, different large-volume injection methods called on-column focusing procedures have been investigated [17]. Among them, the selection of the appropriate composition of the sample solvent in which a large sample volume dissolved in a solvent with a lower elution strength than the one present in the mobile phase is introduced in the column without compromising the chromatographic performance of the system [11,18] or a mobile phase composition programming [19]. Another approach is to use a trapping column technique, in which a pre concentration procedure as well as a clean up step of real samples can be performed [20]. NanoLC has a great applicability in proteomic [21,22]. As an example of successful application in plant research, a nanoLC-ESI-MS/MS analysis of proteins in excised spots from gel after two-dimensional electrophoretic purification and digestion of *Arabidopsis thaliana* leaves (i.e. analysis of small pieces of material) has been published [23].

The aim of the present work was to optimize a nano-liquid chromatographic method for the separation of catechin, malvidin-3-glucoside and pigments formed by their mutual condensation in the presence of acetaldehyde (following reaction described elsewhere [24]) and to compare it with a conventional chromatographic method. Pigments produced by linkage of anthocyanins with flavanols appear in significant content in different foods such as red wine vineyard [25] and red wine [26–28]. This study represents one of the initial steps in development of a comprehensive analytical platform for targeted monitoring of condensation of anthocyanins in micro-samples of plant material and related food.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All used chemicals were of analytical reagent grade. Acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were purchased from Carlo Erba (Milan, Italy) and VWR International (Radnor, PA, USA), acetaldehyde was from Merck Schuchardt (Hohenbrunn, Germany), glacial

acetic acid (99.8% pure), formic acid (99% pure) and trifluoroacetic acid (99% pure) were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Carlo Erba (Milan, Italy). Double distilled water was provided by Milli-Q water purification system (Millipore, Waters Milford, USA). Standards of (+)-catechin (Cat) and malvidin-3-glucoside (Mv3Glu) were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Preparation of reaction mixture, chromatographic purification of reaction products and preparation of sample of red wine grape pomace extract

Reaction mixture was prepared by mixing of (+)-catechin and malvidin-3-glucoside (both 1 mmol) in 4 mL of water. Then 0.86 μL of formic acid, 2.24 μL of acetaldehyde and 1 mL of methanol were added and the reaction mixture was immediately well mixed. Reaction process and the yield of the product was controlled by chromatographic analysis using HPLC/DAD/ESI-MS system (see Section 2.3). The highest concentration of products were found after 8 days of reaction. Purification of reaction products was performed using HPLC system Smartline (Knauer, Germany) equipped with semi-preparative core-shell column Ascentis C18 (250 mm \times 10 mm; 5 μm ; shell layer 0.5 μm , Supelco, USA). Injection volume 1 mL was used for those experiments.

Red wine grape pomace was kindly provided by Department of Post-Harvest Technology of Horticultural Products, Faculty of Horticulture in Lednice, Mendel University in Brno. The crude material was lyophilized and stored in freezing box. 250 mg of lyophilized material was extracted using 1 mL of 0.1% formic acid in methanol for 10 min in ultrasonic bath at laboratory temperature. Then the formed mixture was centrifuged (1400 rpm for 5 min). 0.5 mL of the supernatant was separated and 8 times diluted with mobile phase (0.1% TFA in mixture 80:20 water:acetonitrile, v/v/v). This sample was spiked by mixture of studied compounds (final concentration of added analytes was roughly 10 mg L^{-1}).

2.3. Instrumentation

Nano-LC experiments were carried out using a laboratory made apparatus composed by SpectraSYSTEM P2000 conventional HPLC pump, a Spectra System UV1000 detector, all purchased from Thermo Separation Products (San Jose, CA, USA). A modified injector valve (Enantiosepp GmbH, Münster, Germany) with a 50 μL loop and a nano-injector (100 nL) (VICI Valco, Houston, TX, USA) were used as reservoir for the mobile phase and for the introduction of the samples into the column, respectively. Mobile phase reservoir and nano-injector were connected each other via another T-piece using a fused silica capillary (50 μm \times 11 cm). A split flow system was assembled to reduce the flow from $\mu\text{L}/\text{min}$ to nL/min range. The pump was connected to a stainless steel tee (VICI Valco, Houston, TX, USA) using a polyetheretheretherketone (PEEK) tube (50 cm \times 130 μm). The second entry of the T was coupled to the injection valve via a stainless steel tube of 7 cm \times 500 μm i.d. and joined to the waste through a 50 cm \times 50 μm i.d. fused silica capillary. The capillary chromatographic column was directly connected to the nano-injector. The separation of samples was performed in laboratory-made capillary columns (100 μm i.d., 375 o.d.) packed with stationary phases in our laboratory (packing procedure is described below) and on Chromolith CapRod column FR (150 mm \times 100 μm i.d.) purchased from Merck (Merck, Darmstadt, Germany). Data were recorded using ChromQuest software (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA). The wavelength for UV detection was 205 nm.

Conventional high performance chromatography experiments were done using an HPLC Smartline (Knauer, Germany) equipped with columns Chromosphere C18 (100 \times 4.6 mm, 3 μm , Agilent

Technologies, Santa Clara, CA, USA) and Kinetex 2.6 μm C18 100A (100×2.1 mm, $\text{dp} = 2.6$ μm (porous layer 0.5 μm), Phenomenex, USA). Sample volume of 5 μL was injected at optimal conditions while 88 μL in “scaled up” experiments. For the control of the reaction mixture composition during the bridged dyes synthesis and their purity the HPLC instrument was hyphenated with high resolution tandem mass spectrometer Q-TOF Premier (Waters, Milford, USA) equipped with electrospray ion source (Z-spray).

2.4. Capillary column preparation

Fused silica capillary columns 100 μm i.d., 375 o.d. (Composite Metal Services, Hallow, UK) were packed using an LC pump (Perkin-Elmer series 10 LC pump, Paolo Alto, CA, USA) with Chromosphere C18 stationary phase, 3 μm particle size (Varian, Palo Alto, CA, USA) and Kinetex[®] C18 stationary phase, 2.6 μm particle size (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The packing procedure was similar to that reported in previous work [29]. Briefly, one end of the capillary was connected with a mechanical frit and the second end to an HPLC pre-column serving as reservoir for the slurry. The stationary phase suspended in methanol was pumped into the capillary. The column was then flushed to remove the packing solvent. The inlet and outlet frits were prepared by sintering the stationary phase particles for 6 s at 700 °C with an electrically heated wire. The detection window was prepared by removing of 0.5 cm of the polyimide layer with a razor.

The packing procedure with Kinetex core shell particles is a little bit different. The fused silica capillary with attached temporary mechanical frit on its outlet end was packed for about 10 cm with LiChrospher 100 RP-C18 of 5 μm particle size suspended in acetone. The column was then washed with water and the first frit was prepared by sintering the reverse phase particles for 6 s at 700 °C while water was flushing. After removing the temporary frit, the capillary was washed with acetone in both directions to eliminate the excess material. Afterwards, the capillary was packed for 25 cm with the core-shell stationary phase suspended in acetone and then for other 5 cm with LiChrospher 100 RP-C18 5 μm . The outlet frit was prepared in the same manner of the inlet one and the free packing material finally eliminated. The LiChrospher particles length into the capillary was only a few millimeters, corresponding to the two frits. All the capillary columns were packed for 25.0 cm, the effective and total lengths were 27.0 and 32.0 cm, respectively.

In this study, the chromatographic performance of each column was tested analysing a model mixture containing five aromatic hydrocarbons including benzene, toluene, ethylbenzene, n-propylbenzene and n-butylbenzene in isocratic mode using a mobile phase composed by water/ACN. The column to column reproducibility was also evaluated performing the analysis of the five aromatic hydrocarbons obtaining satisfactory results with RSD values of retention time and peak area in the range of 2.55–4.68% and 3.24–5.36%.

2.5. NMR experiments

1D and 2D NMR spectra were recorded on a JEOL ECA-500 spectrometer operating at frequencies of 500.16 MHz (¹H) and 125.76 MHz (¹³C). The following parameters were used for the 2D experiments: HMQC (J -constant = 140 Hz); HMBC (J -constant max = 163 Hz, J -constant min = 128 Hz, long range J = 8 Hz); and ROESY (mixing time = 0.25 ms). For all of the experiments, a relaxation time of 1.5 s was used. Samples were dissolved in mixture of deuterated methanol (CD₃OD) and trifluoroacetic acid (TFA) in ratio 98:2, respectively.

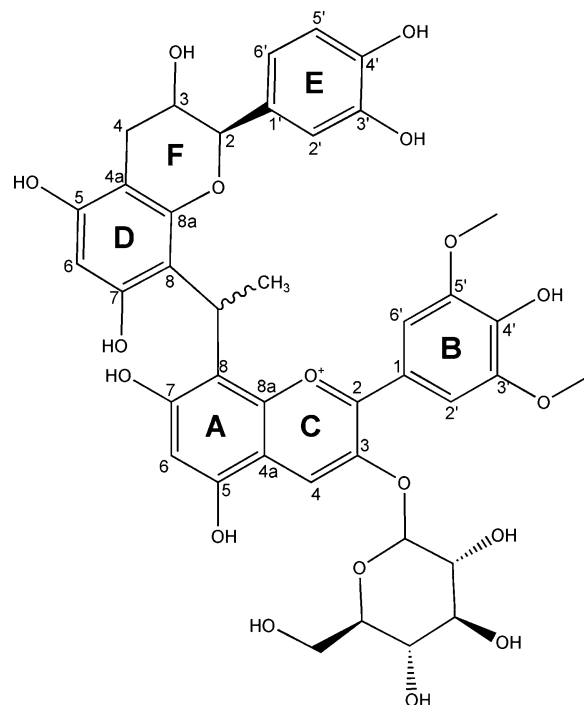


Fig. 1. Structure of diastereomers C and D (with numbering).

3. Results and discussion

3.1. Identification of bridged dyes by NMR

The reaction between malvidin-3-glucoside, catechin and acetaldehyde and structure of arising products has already been described [30]. This helped to control the synthesis in our experiments. In spite of limited amount of obtained fractions and a lower purity of compound isolated from fraction 1 (compound C), the interpretation of NMR spectra of both isolated bridged dyes and their comparison with literature data [30] confirm the structure given in Fig. 1 and the fact that both the synthesized compounds (C and D) are diastereomers of (+)-catechin-ethyl-malvidin-3-glucoside (CeM3G). Important shifts and 2D correlations are shown in Supplements 1–5.

3.2. Nano-liquid chromatography

Fully porous sorbents represent standard stationary phases in present high performance liquid chromatography and their miniaturized counterparts. The first experiments were carried out using a 250 mm long silica capillary column packed with 3 μm particles of Chromosphere C18 phase, investigating in details the effect of mobile phase composition on the retention and selectivity. Mobile phases composed by water/ACN at different ratios, all containing 0.1% TFA were evaluated under isocratic conditions. The possibility to separate all the compounds in isocratic mode allowed not losing time for the conditioning of the columns.

As shown in Fig. 2, by increasing the water content in the mobile phase, a general improvement of the resolution mixture was achieved. A mobile phase containing water:ACN (80:20) acidified with trifluoroacetic acid (TFA, 0.1%, v/v/v) allowed the separation of reactants (A, B) as well as the diastereomeric pair of bridged dyes (C, D). Addition of TFA to mobile phase improves efficiency of anthocyanins separation (pH < 2) [31]. For consecutive analysis a mobile phase containing H₂O:ACN (79:21) acidified with 0.1% (v/v/v) of TFA was used to reach a shorter run time (12.5 min) preserving the sufficient resolution of all the studied compounds.

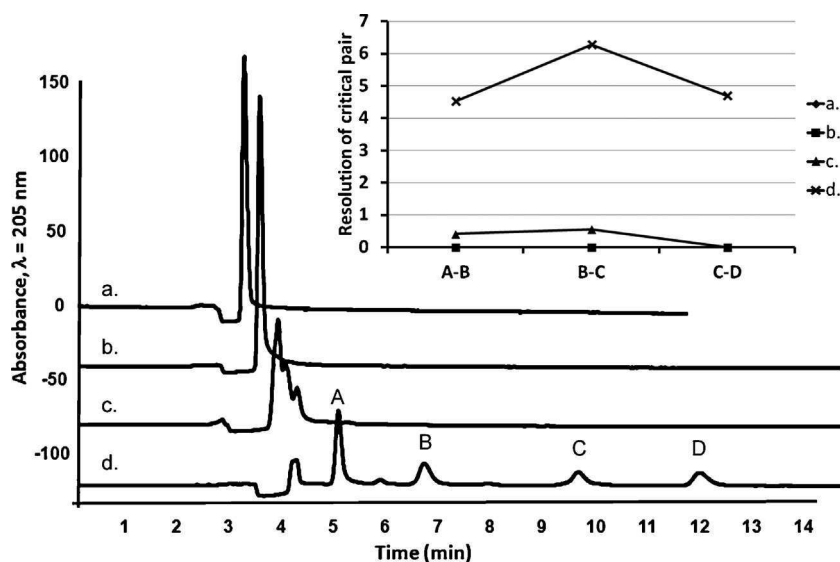


Fig. 2. Separation of reaction mixture with various ratios of water:ACN (capillary column (100 μm id) packed with Chromosphere C18 for 25 cm; mobile phases water:ACN: (a) – 50:50; (b) – 60:40; (c) – 70:30; (d) – 80:20), all acidified with 0.1% TFA (v/v/v); (A) (+)-catechin; (B) malvidin-3-glucoside; (C) and (D) CeM3G diastereomers. Inset: plot of resolution of critical pairs achieved for different compositions of mobile phase.

The influence of TFA concentration was also investigated (see Fig. 3). The fastest separation was achieved in less than 13 min with 0.4% TFA. This fact can be explained by a shift of the flavylum cation–carbinol pseudobase/quinoidal base equilibrium towards the charged flavylum form resulting in a higher polarity of analytes. Instead, ion pairing mechanism, which is expectable in such concentrations of TFA, does not increase the retention significantly. Note that the mobile phase containing the highest studied concentration of TFA could cause some changes in column chromatographic performance due to hydrolysis. Thus only few experiments with 0.4% TFA were performed and no changes in retention and separation were observed. The concentration 0.1% TFA was selected for further experiments as a compromise providing sufficient resolution of all components of the reaction mixture

including small impurities and still acceptable analyte and stationary phase stability.

Mobile phases containing other acids with $\text{pH} > 2$ were examined as well, i.e. addition of formic acid (0.4%, abbrev. FA) and acetic acid (0.4%, abbrev. AcA). However, the separations with formic and acetic acid were longer (run times 16 and 37 min, respectively) compared to separation with the addition of TFA in any of the studied concentrations. Shapes and widths of chromatographic peaks were also better when TFA was used. For CeM3G diastereomer C, peak width at half height ($w_{50\%}$) 0.22 min and height equivalent of theoretical plate (HETP) $9 \mu\text{m}$ was found compared to $w_{50\%}$ 0.64 min and $129 \mu\text{m}$ for 0.4% formic acid and $w_{50\%}$ 2.24 min and $218 \mu\text{m}$ for acetic acid, respectively. Similarly for CeM3G diastereomer D, $w_{50\%}$ 0.26 min and HETP $8 \mu\text{m}$ was found compared to

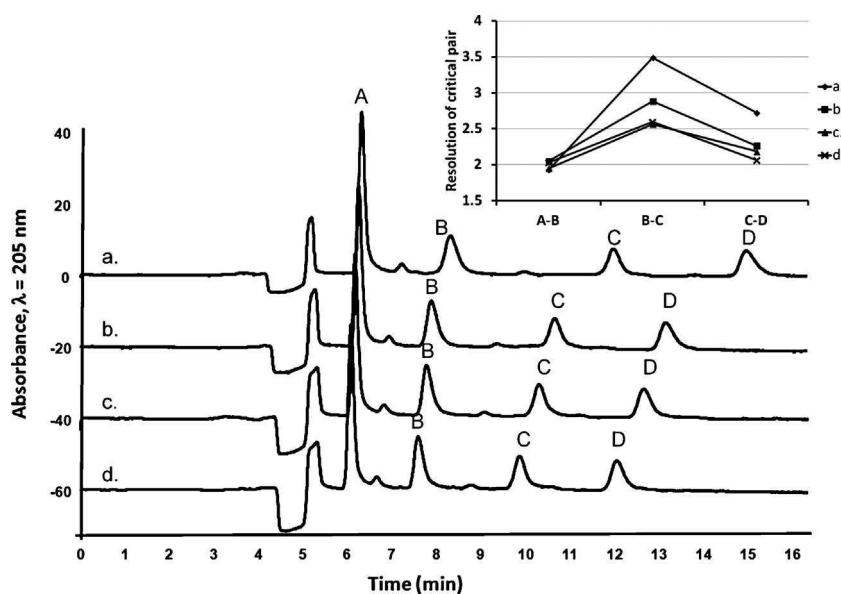


Fig. 3. Nano-LC chromatograms of reaction mixture with different amounts of trifluoroacetic acid (concentration of TFA: (a) – 0.05%; (b) – 0.1%; (c) – 0.2%; (d) – 0.4% (v/v) on totally porous column Chromosphere C18, mobile phase 79:21 = H_2O :ACN). (A) (+)-Catechin; (B) malvidin-3-glucoside; (C) and (D) CeM3G diastereomers. Inset: plot of resolution of critical pairs achieved for different concentrations of TFA in mobile phase (for exact values of resolution of critical pairs with standard deviations of measurement see Supplement 6).

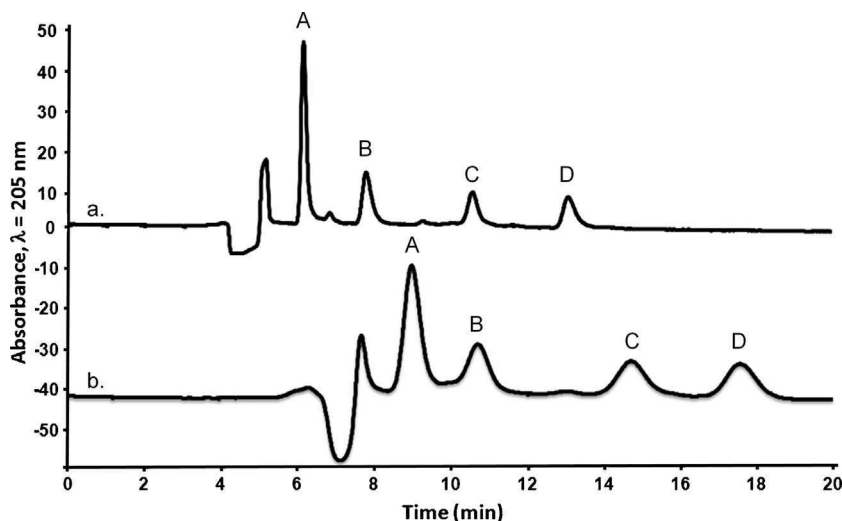


Fig. 4. Nano-LC chromatographic separation of reaction mixture using two different stationary phases: (a) – fully porous Chromosphere C18; (b) – core-shell Kinetex C18; Mobile phase 79:21 = H₂O:ACN acidified with 0.1% TFA (v/v/v). (A) (+)-Catechin; (B) malvidin-3-glucoside; (C) and (D) CeM3G diastereomers.

$w_{50\%}$ 0.80 min and 133 μm for 0.4% formic acid and $w_{50\%}$ 1.53 min and 81 μm for acetic acid, respectively. Experiments demonstrated that both acids were not suitable for the analysis of the studied compounds.

Core-shell stationary phases are very popular nowadays providing fast and efficient separations. Besides the improved chromatographic performance, it is possible to perform the analysis with low pressures, operating with conventional pumps [32]. Therefore commercially available core-shell sorbent Kinetex C18 was compared with the fully porous Chromosphere C18 in nano-LC system. The experiments were carried out using a mobile phase 0.1% TFA in 79:21 water:ACN. The porous shell stationary phase showed significantly lower efficiency, compared to the fully porous one with a similar particle size, as shown in Fig. 4. The efficiency observed using Chromosphere C18 exceeded 9500 theoretical plates when compared to Kinetex C18 with 2000 plates (i.e. 9667 (Cat), 5117 (Mv-3-Glu), 8060 (CeM3G diastereomer, C) and 7849 (CeM3G diastereomer, D) for Chromosphere C18 and 2342 (Cat), 1848 (Mv-3-Glu), 1893 (CeM3G diastereomer, C) and 2224 (CeM3G diastereomer, D) for Kinetex C18, respectively) using the same capillary column dimensions.

A less separation achieved with Kinetex C18 nano-column can be due to a partial column overloading. This is indicated by a lower retention factors, 0.17 (Cat), 0.40 (Mv-3-Glu), 0.91 (CeM3G diastereomer, C) and 1.28 (CeM3G diastereomer, D) for core-shell particles compared to 0.19 (Cat), 0.50 (Mv-3-Glu), 1.02 (CeM3G diastereomer, C) and 1.49 (CeM3G diastereomer, D) for fully porous particles, respectively. The lower efficiency of core shell nano-column could be affected in part also by a different (somewhat more complicated) preparation of core-shell nano-columns (see Section 2).

Due to the greater performance, Chromosphere C18 stationary phase was selected for further experiments. In order to investigate the potential of the Chromosphere C18 stationary phase in terms of separation efficiency and analysis time a column packed for a shorter length was prepared. Fig. 5 shows the separation of the studied compounds using the shorter column (150 mm \times 100 μm). Separation of all components of the reaction mixture including impurities was achieved with a mixture 80:20 = H₂O:ACN containing 0.1% TFA in less than 6 min (flow rate 360 nL min⁻¹). The separation efficiency exceeded 9500 theoretical plates. HETP was decreased from 26 μm (Cat), 49 μm (Mv-3-Glu), 31 μm (CeM3G diastereomer, C) and 32 μm (CeM3G diastereomer, D) calculated for Chromosphere C18 25 cm long nano-column to 7 μm (Cat),

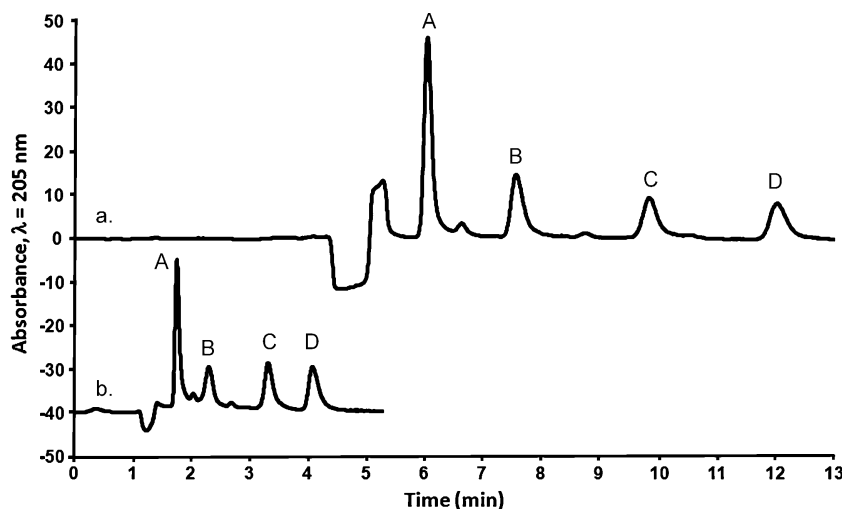


Fig. 5. Comparison of two columns packed for a different length on the mixture resolution. (a) – 25.0 cm packed length; (b) – 15.0 cm packed length, mobile phase 80:20 = H₂O:ACN acidified with 0.1% TFA (v/v/v). (A) (+)-Catechin; (B) malvidin-3-glucoside; (C) and (D) CeM3G diastereomers.

Table 1
Main parameters of separation of reaction mixture with nanoLC and HPLC system.

	t_R' (min)	$w_{50\%}$ (min)	HETP (μm)	k	α	SD	As	R	SD
nanoLC: Chromosphere C18, 150 mm \times 100 μm , 3 μm , flow rate 360 nL min ⁻¹ , injection 100 nL									
(+)-Catechin	0.73	0.08	7	0.61	–	–	2.33	–	–
Malvidin-3-glucoside	1.60	0.17	15	1.34	1.94	± 0.049	1.11	1.73	± 0.021
CeM3G diastereomer C	3.37	0.19	7	2.83	1.84	± 0.019	1.78	2.73	± 0.218
CeM3G diastereomer D	4.70	0.25	7	3.94	1.39	± 0.003	2.13	2.01	± 0.244
nanoLC: Chromolith CapRod, 150 mm \times 100 μm , 3 μm , flow rate 360 nL min ⁻¹ , injection 30 nL									
(+)-Catechin	0.59	0.34	34	0.19	–	–	1.05	–	–
Malvidin-3-glucoside	0.59	0.34	34	0.19	1.00	± 0.000	1.05	0.00	± 0.000
CeM3G diastereomer C	1.26	0.32	22	0.41	2.16	± 0.099	1.13	1.21	± 0.043
CeM3G diastereomer D	1.69	0.28	13	0.55	1.33	± 0.017	1.31	0.84	± 0.058
HPLC _{opt} : ChromSphere C18, 100 mm \times 4.6 mm, 3 μm , flow rate 0.761 mL min ⁻¹ , injection 5 μL									
(+)-Catechin	0.77	0.15	84	0.54	–	–	2.00	–	–
Malvidin-3-glucoside	1.50	0.20	84	1.05	1.92	± 0.028	0.91	2.48	± 0.132
CeM3G diastereomer C	3.18	0.15	19	2.22	2.12	± 0.005	1.57	6.34	± 0.502
CeM3G diastereomer D	4.50	0.17	15	3.14	1.41	± 0.004	1.50	5.41	± 0.475
HPLC _{scaled} : ChromSphere C18, 100 mm \times 4.6 mm, 3 μm , flow rate 0.761 mL min ⁻¹ , injection 88 μL									
(+)-Catechin	0.93	0.30	273	0.67	–	–	3.17	–	–
Malvidin-3-glucoside	1.60	0.47	246	1.14	1.69	± 0.021	0.75	1.01	± 0.025
CeM3G diastereomer C	3.42	0.17	13	2.44	2.14	± 0.013	1.45	3.65	± 0.200
CeM3G diastereomer D	4.73	0.18	12	3.38	1.39	± 0.007	1.57	4.63	± 0.199

t_R' : reduced retention time; $w_{50\%}$: peak width at half height; HETP: height equivalent of theoretical plate; k: retention factor; α : selectivity factor; As: peak asymmetry; R: resolution (calculated for consecutive peaks, i.e. (+)-catechin, malvidin-3-glucosid and both CeM3G diastereomers), SD: standard deviation of the measured value (α : 0.05, 3 repeated measurements).

15 μm (Mv-3-Glu), 7 μm (CeM3G diastereomer, C) and 7 μm (CeM3G diastereomer, D) for Chromosphere C18 15 cm long nano-column, respectively. Commonly the packing of shorter column length improves the quality of packing as well as reproducibility [33].

Besides packed nano-columns, chromatographic performance of comparable monolithic column was tested. In Table 1 basic chromatographic parameters of developed nano-LC methods are reported. It can be seen that nano-column packed with Chromosphere particles provides higher retention and efficiency for all the studied compounds compared to monolithic stationary phase (HETP values are roughly 2–5 times lower for Chromosphere column). Selectivity for the separation of both CeM3G diastereomers is comparable while the separation of the catechin-malvidin pair is not provided under given conditions using monolithic column at all.

3.3. Conventional high performance liquid chromatography and comparison with nano liquid chromatography

Fig. 6 shows the separation of the reaction mixture using a conventional HPLC system (Chromosphere 3 C18, 100 mm \times 4.6 mm, $d_p = 3 \mu\text{m}$). Flow rate 0.762 mL min⁻¹ was set up in order to

maintain the same linear mobile phase velocity as used for nano-chromatography. Injection volume for optimized experiment was 5 μL . Separation of all compounds of interest is achieved with sufficient resolution. The only exception represents first non-identified impurity partially co-eluting with malvidin-3-glucoside ($R = 1.01$). Isocratic analysis is completed in less than 7 min.

It can be seen in Table 1 that Chromosphere nano-LC column offered higher retention and separation efficiency (lower HETP value, roughly 10 times for (+)-catechin and malvidin-3-glucoside and 3 times for CeM3G diastereomers) compared to conventional HPLC as well. On the other hand slightly better selectivity for separation of CeM3G diastereomers (given by selectivity factor, difference 1.4–14.1%) and higher resolution for all components of the tested mixture (difference 35.6–91.6%) was found for conventional HPLC system compared to nano-LC system (Chromosphere nano-column). Those results represent optimal parameters for conventional chromatography. In the case of nano-LC, the injected volume corresponds to 5.3% of the column volume. We were interested in changes of chromatographic parameters when the volume injected in the conventional system is “scaled up” to the same part of the column volume (the same percentage as used for nano-column). Roughly 10 times higher peak areas were measured in the scaled system compared to the optimized one. In “scaled

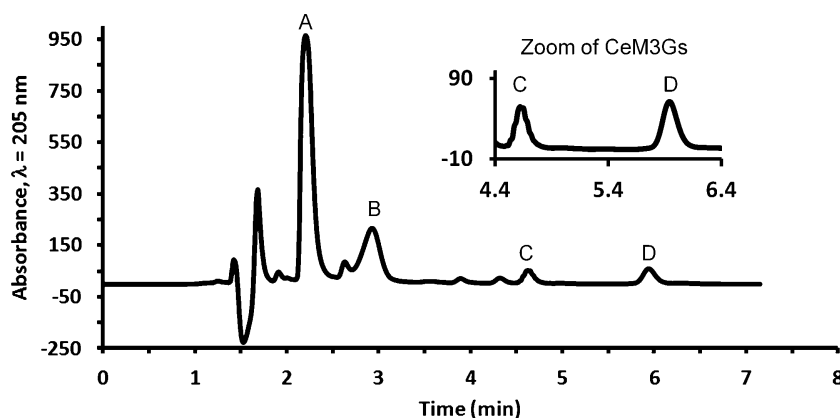


Fig. 6. HPLC separation of sample using Chromosphere C18 column mobile phase 80:20 = H₂O:ACN acidified with 0.1% TFA (v/v/v). (A) (+)-Catechin; (B) malvidin-3-glucoside; (C) and (D) CeM3G diastereomers.

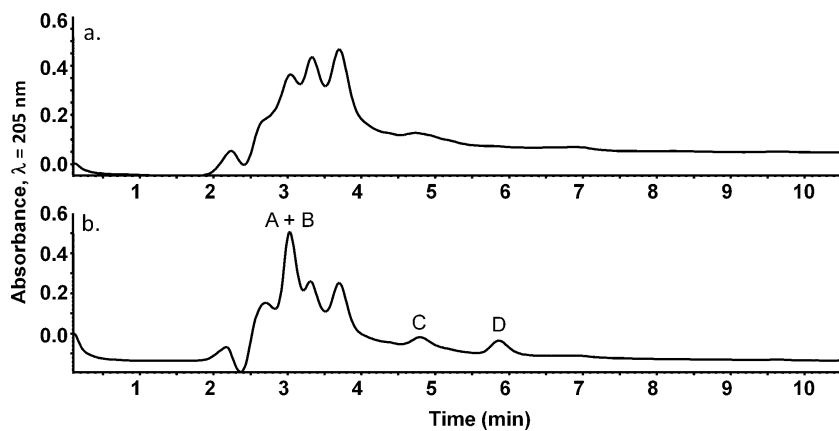


Fig. 7. Analysis of red wine grape pomace extract (a) and extract spiked with (+)-Catechin (A); malvidin-3-glucoside (B) and CeM3G diastereomers (C, D) (b) column: Chromosphere C18 (150 mm \times 100 μ m i.d.), mobile phase 80:20 = H₂O:ACN acidified with 0.1% TFA (v/v/v).

up” conditions much higher peak widths and HETP value were observed for (+)-catechin and malvidin-3-glucoside but the appropriate parameters measured for CeM3G diastereomers remained almost unchanged. However, resolution decreased for all the studied compounds compared to the optimized system. Nevertheless, higher values of resolution were observed for separation of CeM3G diastereomers in conventional HPLC system which can be related to better asymmetry of peaks.

To demonstrate the applicability of the developed nano-LC method, the analysis of extract of waste pomace from red wine grapes was done. During storage and treatment of the pomace the formation of more complex anthocyanin dyes can be expected. Their content is strongly dependent on temperature, oxygen content, moisture and other parameters. Fig. 7a shows the analysis of the waste pomace extract. Well separated peaks of both CeM3G diastereomers can be seen in spiked extract (Fig. 7b) showing that the developed method can be easily adopted for their control in wastes from wineries.

4. Conclusion

A reversed phase nano-LC method using an in-laboratory packed capillary column Chromosphere C18, 150 mm \times 100 μ m, 3 μ m for the separation of (+)-catechin-ethyl-malvidin-3-glucoside diastereomers and their precursors, i.e. (+)-catechin and malvidin-3-glucoside was proposed. Isocratic elution with water:ACN (80:20) acidified with trifluoroacetic acid (0.1%, v/v/v) used as mobile phase at a flow rate 360 nL min⁻¹ allowed the complete resolution in less than 7 min. Fully porous particles (Chromosphere C18, 3 μ m) appeared to provide superior results compared to a core-shell particles (Kinetex C18, 2.6 μ m). The optimized nano-LC method was compared with a conventional HPLC system (Chromosphere C18, 3 μ m, 100 mm \times 4.6 mm). The nano-LC column provided higher separation efficiency. Nevertheless peak symmetry and resolution was better for conventional HPLC system. Nano-liquid chromatography system appeared to be a suitable tool for the analysis of complex anthocyanin dyes. The positive results achieved have proved that nano-LC can be used as a complementary technique to well-established LC method and it can be potentially used for study of plant and food micro-samples composition. The developed method was used for analysis of both condensed diastereomers spiked in red wine grape pomace extract with satisfactory resolution.

Acknowledgements

Authors gratefully acknowledge the support of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project LO1305) and

Grant Agency of the Czech Republic (14-11782S) for financial support. T.P. thanks for the support of grant No. LO1204 (Sustainable development of research in the Centre of the Region Haná) from the National Program of Sustainability I, MEYS. Authors would like to thank to Assoc. Prof. Josef Balík from Department of Post-Harvest Technology of Horticultural Products, Faculty of Horticulture in Lednice, Mendel University in Brno for providing of red wine grape pomace sample.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.074>.

References

- [1] K.G. Yousuf, A.A. Wani, P. Singh, Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2013.805316>.
- [2] J. Fang, Bioavailability of anthocyanins, *Drug Metab. Rev.* 46 (2014) 508–520.
- [3] A. Castaneda-Ovando, M.D. Pacheco-Hernandez, M.E. Paez-Hernandez, J.A. Rodriguez, C.A. Galan-Vidal, Chemical studies of anthocyanins: a review, *Food Chem.* 113 (2009) 859.
- [4] E.K. Khlestkina, The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals, *Cereal Res. Commun.* 41 (2013) 185.
- [5] Y. Yoshimura, H. Enomoto, T. Moriyama, Y. Kawamura, M. Setou, N. Zaima, Visualization of anthocyanin species in rabbiteye blueberry *Vaccinium ashei* by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1885.
- [6] Y. Yoshimura, N. Zaima, T. Moriyama, Y. Kawamura, Different localization patterns of anthocyanin species in the pericarp of black rice revealed by imaging mass spectrometry, *PLoS ONE* 7 (2012) 1.
- [7] J.A. Kennedy, A.L. Waterhouse, Analysis of pigmented high-molecular-mass grape phenolics using ion-pair, normal-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 866 (2000) 25–35.
- [8] A. de Villiers, G. Vanhoenacker, P. Majek, P. Sandra, Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis, *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 195–204.
- [9] P. Alberts, M.A. Stander, A. de Villiers, Advanced ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for the screening of red wine anthocyanins and derived pigments, *J. Chromatogr. A* 1235 (2012) 92–102.
- [10] X. Wu, R.L. Prior, Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2589–2599.
- [11] C. Fanali, A. Rocco, G. D’Orazio, L. Dugo, L. Mondello, Z. Aturki, Determination of key flavonoid aglycones by means of nano-LC for the analysis of dietary supplements and food matrices, *Electrophoresis* 36 (2015) 1073–1081.
- [12] J.P.C. Vissers, Recent developments in microcolumn liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 117–143.
- [13] J. Hernandez-Borges, Z. Aturki, A. Rocco, S. Fanali, Recent applications in nano-liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1589–1610.
- [14] S. Rocchi, S. Fanali, T. Farkas, B. Chankvetadze, Effect of content of chiral selector and pore size of core-shell type silica support on the performance of amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)-based chiral stationary phases

- in nano-liquid chromatography and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1363 (2014) 363–371.
- [15] B.L. Karger, M. Martin, G. Guiochon, Role of column parameters and injection volume on detection limits in liquid-chromatography, *Anal. Chem.* 46 (1974) 1640.
- [16] V. Ranc, V. Havlíček, P. Bednář, K. Lemr, Nanoelectrospray versus electrospray in chiral analysis by the kinetic method, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74 (2009) 313.
- [17] M.R. Gama, C.H. Collins, C.B.G. Bottoli, Nano-liquid chromatography in pharmaceutical and biomedical research, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 694–703.
- [18] G. D'Orazio, S. Rocchi, S. Fanali, Nano-liquid chromatography coupled with mass spectrometry: separation of sulfonamides employing non-porous core-shell particles, *J. Chromatogr. A* 1255 (2012) 277–285.
- [19] E. Prinsen, W. Van Dongen, E.L. Esmans, H.A. Van Onckelen, Micro and capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry: a new dimension in phytohormone research, *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 25–37.
- [20] J. Hernández-Borges, G. D'Orazio, Z. Aturki, S. Fanali, Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines, *J. Chromatogr. A* 1147 (2007) 192.
- [21] Q. Luo, J.S. Page, K. Tang, R.D. Smith, MicroSPE-nanoLC-ESI-MS/MS using 10- μ m-i.d. Silica-based monolithic columns for proteomics, *Anal. Chem.* 79 (2007) 540.
- [22] R.B.H. Braakman, M.M.A. Tilanus-Linthorst, N.Q. Liu, C. Stingl, L.J.M. Dekker, T.M. Luider, J.W.M. Martens, J.A. Foekens, A. Umar, Optimized nLC-MS workflow for laser capture microdissected breast cancer tissue, *J. Proteomics* 75 (2012) 2844.
- [23] M. Rocco, S. Arena, G. Renzone, G.S. Scipia, T. Lomaglio, F. Verrillo, A. Scalonì, M. Marra, Proteomic analysis of temperature stress-responsive proteins in *Arabidopsis thaliana* rosette leaves, *Mol. Biosyst.* 9 (2013) 1257.
- [24] J.C. Rivas-Gonzalo, S. Bravoharo, C. Santos-Buelga, Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 1444.
- [25] A.B. Cerezo, E. Cuevas, P. Winterhalter, M.C. Garcia-Parrilla, A.M. Troncoso, Anthocyanin composition in Cabernet Sauvignon red wine vinegar obtained by submerged acetification, *Food Res. Int.* 43 (2010) 1577.
- [26] V. Atanasova, H. Fulcrand, W. Cheynier, M. Moutounet, Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making, *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 15–27.
- [27] M. Cano-Lopez, F. Pardo-Minguez, J.M. Lopez-Roca, E. Gomez-Plaza, Effect of microoxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wines, *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (2006) 325–331.
- [28] M. Monages, V. Nunez, B. Bartolome, C. Gomez-Cordoves, Anthocyanin-derived pigments in Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon wines produced in Spain, *Am. J. Enol. Vitic.* 54 (2003) 163–169.
- [29] A. Rocco, A. Maruska, S. Fanali, Cyclodextrins as a chiral mobile phase additive in nano-liquid chromatography: comparison of reversed-phase silica monolithic and particulate capillary columns, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2935.
- [30] J. Pissarra, S. Lourenco, A.M. Gonzalez-Paramas, N. Mateus, C.S. Buelga, A.M.S. Silva, V. De Freitas, Isolation and structural characterization of new anthocyanin-alkyl-catechin pigments, *Food Chem.* 90 (2005) 81–87.
- [31] B. Papoušková, P. Bednář, K. Hron, J. Stávek, J. Balík, R. Myjavcová, P. Barták, E. Tománková, K. Lemr, Advanced liquid chromatography/mass spectrometry profiling of anthocyanins in relation to set of red wine varieties certified in Czech Republic, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7581–7591.
- [32] C. Fanali, A. Rocco, Z. Aturki, L. Mondello, S. Fanali, Analysis of polyphenols and methylxantines in tea samples by means of nano-liquid chromatography utilizing capillary columns packed with core-shell particles, *J. Chromatogr. A* 1234 (2012) 38–44.
- [33] G. Guiochon, The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 6–49.



Liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry – Tool for the study of polyphenol profile changes during micro-scale biogas digestion of grape marcs



Lukáš Kučera, Ondřej Kurka, Petr Barták, Petr Bednář*

Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, 779 00, Olomouc, Czech Republic

HIGHLIGHTS

- Optimization of anaerobic fermentation of wine waste material in micro-scale.
- Evaluation of differences in gasification of wine waste and commonly used materials.
- Study of the fate of flavonoids during gasification in complex waste mixture.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2016

Received in revised form

22 September 2016

Accepted 26 September 2016

Available online 3 October 2016

Handling Editor: Y Liu

Keywords:

Anaerobic digestion

Chromatography

Mass spectrometry

Polyphenols

Wine grape marcs

ABSTRACT

A microscale discontinuous fermenter was used for anaerobic digestion of wine waste – a hardly gasifiable feedstock material. Efficiency of biogas production, i.e. changes in content of nitrogen, oxygen, carbon dioxide and methane in gas phase, was monitored by gas chromatography/mass spectrometry. Liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry in combination with principal component analysis and orthogonal projection to latent structures was used to reveal main chemical differences of gasified wine waste mixture from commonly used ones in agricultural biogas plants. Compounds with particular polyphenolic structures appeared among the most distinctive markers. Analysis of samples collected during acidogenic phase and unstabilized methanogenesis indicates formation of certain dihydro-flavonoids in early stages of the process and their consequent degradation. Due to formerly described higher toxicity of some dihydroflavonoids (e.g. taxifolin) compared to their more common counterparts (e.g. quercetin, malvidin etc.), unstabilized digestate would represent a potential environmental risk when used as a fertilizer deserving a proper control.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Anaerobic fermentation is an effective ecological waste treatment process and a method for production of cheap electrical and thermal energy. The most widespread biogas production method is a “wet” anaerobic fermentation based on fermenting of feedstock material mixed with a liquid medium. The process of biogas formation has already been well described (Weiland, 2010). Briefly, it consists of several stages; i) decomposition of lipids, proteins and polysaccharides (mainly by hydrolysis) in feedstock by aerobic microorganisms (oxygen content is still high) (Archer and Peck,

1989), ii) acidogenesis – decomposition of higher fatty acids to lower ones, i.e. acetic, caproic, valeric, butyric, propionic acids and their iso forms and iii) methanogenesis – action of Acetotrophic and Hydrogenotrophic Archaea (Li et al., 2011).

One of the easily available source of plant residua for biogas production is wine industry, which generates huge amount of various kinds of waste, i.e. grape stalk, grape marcs, exhausted yeast and wine lees (Bustamante et al., 2008). The efficiency of anaerobic digestion of wine waste was already studied by many authors mainly using gas chromatography (Melamane et al., 2007; Da Ros et al., 2014; Leiva et al., 2014; Fabbri et al., 2015; Li et al., 2015). However, the lack of nutrients, low pH of feedstock material and the inhibition of biodegradation by the presence of polyphenols and copper significantly complicates the process of wine waste anaerobic fermentation as described in the study by

* Corresponding author.

E-mail address: petr.bednar@upol.cz (P. Bednář).

Melamane et al. The average polyphenol removal efficiency for the 130 days of anaerobic fermentation was only 63%. Note, that the total polyphenols were considered (determined by Folin-Ciocalteu's method) and present polyphenols were not specified in this study. pH of fermentation mixture was maintained at 7 by CaCO_3 and K_2HPO_4 to make gasification stable and robust. Inhibitory properties of polyphenols were ascribed to their strong antibacterial and cytostatic effects (Melamane et al., 2007). The effect of polyphenols on cell is quite multiple. It was recently proven that fertilizers enriched by flavonoids, phenolics and terpenes can induce bacterial degradation of polychlorinated biphenyls (Macek et al., 2000). On the other hand, some studies indicate mutagenic and/or genotoxic effects of particular flavonoids in bacterial and mammalian cells (Jurado et al., 1991; Popp and Schimmer, 1991; Suzuki et al., 1991). Skibola et al. describes that high intakes of these compounds could potentiate deleterious effects on cells due to modulation of the activity of environmental genotoxicants and alter the activity of key metabolizing enzymes (Skibola and Smith, 2000). Thus a change of flavonoid profile due to anaerobic fermentation in a large scale could affect the natural function of flavonoids in ecosystem.

To the best of the authors' knowledge, only two research studies have been performed in the past which describe the fate of polyphenolic standards (i.e. hesperidin, rutin, catechin, naringenin, chrysin, luteolin, quercetin, kaempferol, cyanidin and petunidin) pertaining to anaerobic process and biogas generation (without control of $\text{CH}_4:\text{CO}_2$ ratio in produced biogas). The analyses of polyphenols and their degradation products in digestate (i.e. residual liquid produced during gasification) were performed by liquid chromatography combined with photodiode array detector possessing limited identification capability (Herrmann and Janke, 2001; Herrmann et al., 2001). There is no study in the literature dealing with the fate of particular polyphenols in real waste sample during biogas production. In this paper we describe development and utilization of method for preparation of samples by micro-scale discontinuous anaerobic fermentation of red grape marcs (solid remains of red grapes after pressing) and their analysis by combination of liquid chromatography with high resolution tandem mass spectrometry (LC/HRTMS) followed by advanced statistical data treatment. This study contributes to the understanding of the processes of polyphenol transformation in complex plant waste material (after its first usage in winemaking process) under conditions simulating biogas production (second usage).

2. Materials and method

2.1. Chemicals and reagents

Deionized water was obtained from two-stage deionization station Milipore Direct Q UV (Millipore S.A.S, Molsheim, France). Methanol (gradient grade, Biosolve; Valkensward, Netherlands and gradient grade, Malinckrodt Baker, Derenter, Netherlands) and formic acid (99.7%, Sigma-Aldrich, St. Luis, Mi, USA) were used for preparation of mobile phases and standard solutions. Ammonium hydroxide solution used for adjustment of pH of samples was purchased from Penta Ltd. (Prague, Czech Republic). Standards of malvidin-3-glucoside, quercetin, *p*-hydroxybenzaldehyde and benzoic acid (all analytical purity grade, Sigma-Aldrich) were used for confirmation of identity of markers.

2.2. Sample preparation

Red grape marcs (RGM) were kindly provided by Assoc. Prof. Josef Balík from Department of Post Harvest Technology of Horticultural Products, Faculty of Horticulture in Lednice, Mendel

University in Brno. The material was sampled directly after pressing of red grapes during winemaking, transported to laboratory and frozen until gasification experiments and analysis. Pure pig slurry (PS) was provided by Květoslav Mück from CERVUS Ltd. (Olomouc). The PS was directly sampled from agricultural biogas station at Bílov-Pustějov, Czech Republic and then frozen until anaerobic fermentation experiments. Pig slurry can be generally described as a mixture of solid and liquid excrements of pigs. Dry matter is about 6–8%. The content of particles below 3 mm is 69% and content of those above 5 mm is 11%. Density of this material is in the range of 980–1020 kg m^{-3} and pH value varies around 8. Amount of organic compounds in solution is 72–78% and C:N ratio (measured by elemental analysis) is 10:1 (Mužík and Abrham, 2006).

Preliminary experiments were done with solutions prepared by mixing PS, RGM, water, 1 mg mL^{-1} solution of methanogenic bacteria APD BIO GAS (MetBac; BAKTOMA Ltd.), Velká Bystrice, Czech Republic and 29.8 g.L^{-1} fluid thioglycollate medium (TGM; NEOGEN, Lansing, MI, USA) in 4 mL vials (45.5 × 14.5 mm) equipped with fermentation lock and head-space screw cap with PTFE/rubber septum (9.5 × 15.5 mm, septum thickness 1.3 mm) in different ratios, i.e.: A. 200 mg of RGM + 2 mL of water; B. 100 mg of RGM + 450 mg of PS + 2 mL of water; C. 200 mg of RGM + 2 mL of water + 1 μL of MetBac; D. 100 mg of RGM + 450 mg of PS + 2 mL of water + 1 μL of MetBac; E. 200 mg of RGM + 2 mL of TGM + 1 μL of MetBac; F. 100 mg of RGM + 450 mg of PS + 2 mL of TGM + 1 μL of MetBac.

Sampling of gas phase was done using a 2.5 mL Hamilton syringe Gastight no. 1002 (sampling volume 1.5 mL; Hamilton, Reno, NV, USA). Following experiments were performed with mixtures of different amounts (ratios) of PS and RGM (i.e. 750:50 mg, 500:50 mg, 250:50 mg, 100:50 mg and 50:50 mg, respectively) in 2 mL of deionized water in 4 mL headspace vials as described above. Ammonium hydroxide was added to all samples to achieve its final concentrations of 0.254, 0.191, 0.127 and 0.064 M, respectively.

After finding the optimal conditions for anaerobic digestion of RGM activated by PS (from previous experiments based on optimization of pH and composition of reaction mixture), three samples of pig slurry – red grape marcs mixture (PS-RGM) were prepared as follows. 14 g of pig slurry were mixed with 1 g of lyophilized red grape marcs and 40 mL of deionized water in 60 mL vial (anaerobic micro-scale fermenter, AMF; 139 × 27 mm) equipped with fermentation lock and head-space screw cap (12 × 26 mm) with PTFE/rubber septum (septum thickness 3 mm). After that, 0.8 mL of 25% NH_4OH was added into each sample (40 mL) to reach pH close to 9 (natural pH value in homogenized PS). Reference samples were prepared by mixing 14 g of PS with 40 mL of deionized water in 60 mL vial serving as AMF. All samples were bubbled with nitrogen for 10 min to remove oxygen and to set up anaerobic conditions. All cultures were maintained at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ without stirring. Sampling of the gas phase was done in the same way as described above. Liquid phase (small amount of digestate) collection was done using a plastic syringe with long sharp needle to safely reach the liquid part in fermenter without disturbance of anaerobic conditions (15 cm, 2 mL of digestate was collected each time). Note that the pH of reference samples was similar to pH of PS-RGM solutions and the mixture composition differs only by the addition of 0.127 M of NH_4OH (the pH value differs less than 10%).

1.5 mL of liquid part from each sample (PS-RGM or PS) were mixed with 0.75 mL of 5% aqueous solution of formic acid (v/v) and centrifuged for 5 min at 14 000 rpm (crude sample). Then, 2 mL of solution were applied to preconditioned solid-phase extraction (SPE) column Strata SDB-L (Styrene-Divinyl Benzen copolymer; Phenomenex, Torrance, CA, USA). SPE column preparation was conditioned with 2 mL of methanol, then 2 mL of water and 2 mL of

5% aqueous solution of formic acid (v/v). Consequently, 2 mL of sample were introduced. Inorganic salts and highly polar organic contaminants were removed by washing the column with 2 mL of 5% aqueous solution of formic acid (v/v). Finally, purified analytes were eluted using 3 mL of methanol and evaporated to dryness by a fine stream of nitrogen. The dried samples were stored in deep freezer ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Before LC/HRTMS analysis the samples were left at laboratory temperature for 10 min and finally dissolved in 1 mL of 0.1% aqueous solution of formic acid (v/v).

2.3. Control of anaerobic conditions and biogas production process

Composition of the gas phase in the upper part of the anaerobic micro-scale fermenter was analyzed by gas chromatograph Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled with mass spectrometer Agilent 5975C (Agilent Technologies). Following experimental setup was used: initial temperature of column: $70\text{ }^{\circ}\text{C}$; temperature gradient: 0–5 min ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$), 5–16.33 min ($70\text{--}240\text{ }^{\circ}\text{C}$), 16.33–20.33 min ($240\text{--}300\text{ }^{\circ}\text{C}$), 20.33–25.33 min ($300\text{ }^{\circ}\text{C}$); splitless injection, injection volume: 1 mL; column: Zebtron ZB-5ms (5%-phenyl-arylene-95% dimethylpolysiloxane); gas type: helium; gas flow: 0.9 mL min^{-1} ; MS scan range: 12–120 Da; electron ionization; ionization energy: 70 eV. Quantification was done by internal normalization (the peak area in chromatogram reconstructed for particular studied gas was divided by the peak area in total ion current chromatogram in related retention window) and expressed in percentage.

2.4. LC/HRTMS analysis

An Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) equipped with binary solvent manager, sample manager, column manager and DAD detector was used. The separation of digestate samples was performed using a reversed phase core-shell column Ascentis Express ($100\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$, $2.7\text{ }\mu\text{m}$, Supelco, USA). The mobile phase consisted of two components: 0.1% (v/v) formic acid aqueous solution (mobile phase, MP, A) and 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile (MP B). Gradient elution with the following profile of gradient (% v/v): 0–5 min (10% B), 5–40 min (10–100% B), 40–50 min (100% B), 50–55 min (100–10% B) and 55–60 min (10% B) was used (last two steps for the column reequilibration). The mobile phase flow rate was 0.35 mL min^{-1} , the temperature of the autosampler was $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the column oven was set at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. The injection volume was $10\text{ }\mu\text{L}$. A Q-TOF Premier mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) coupled to the UPLC system was used for detection of present compounds and confirmation of suggested structures on the basis of exact mass measurement and study of their fragmentation pattern. Optimized electrospray ionization (ESI) parameters for the mass spectrometer were as follows: capillary voltage for positive ionization mode 2.5 kV, source temperature $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, sampling cone 30 V, desolvation temperature $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, cone gas flow rate 50 L h^{-1} and desolvation gas flow rate 400 L h^{-1} . Nitrogen was used as the desolvation gas and argon as a collision one.

Experiments were done using MS^E mode recording spectra without discrimination of ions or their pre-selection [alternation of MS scans with low collision energy ($\text{CE} = 5\text{ eV}$) and elevated collision energy (ramp of $\text{CE} = 10\text{--}30\text{ eV}$), i.e. $\text{MS}(1)$ and $\text{MS}(2)$ scans]. Targeted MS^2 scans were recorded in subsequent experiments (LC/ESI-HRTMS) for further confirmation of identity of detected compounds (isolation width 1 Da) using Q-TOF Premier. MassLynx 4.1 software (Waters) was used for UPLC/MS system control and data collection.

Additional fragmentation experiments were done using Acquity UPLC system (Waters) coupled to high-resolution tandem mass

spectrometer Synapt G2-S (Waters). The separation and electrospray ionization parameters for analysis of PS-RGM and PS samples were the same as mentioned for experiments with Q-TOF Premier mass spectrometer. MS/MS measurements were done using collision energy ramp 10–40 or 10–50 eV, respectively (details given in Results and discussion). For multi-reaction monitoring experiments (MRM) the Acquity UPLC system (Waters) coupled to triple quadrupole mass spectrometer Xevo-TQD (Waters) was used. MRM transitions analyzed were $305 \rightarrow 127$, $305 \rightarrow 139$, $305 \rightarrow 151$ and $305 \rightarrow 153$, with following parameters: electrospray ionization (positive mode), capillary voltage: 3.7 V, desolvation temperature: $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, desolvation gas flow: 650 L h^{-1} , cone voltage: 60 V, collision energy: 15 eV.

2.5. Data processing

The obtained LC-ESI-HRTMS data were processed by MarkerLynx XS – software extension of MassLynx platform allowing to find chemical markers in raw LC/MS data (Waters). Method parameters were set as follows: retention time range 0.5–60 min, mass range 100–1000 Da, mass tolerance 0.05 Da, noise elimination level 2, allowed function for data deisotoping. The processed data (after extraction, normalization and alignment of retention times (RT), m/z values and intensities) were transferred to eXtended Statistics (XS) module, EZinfo (Umetrics, Malmö, Sweden) and studied by principal component analysis (PCA) and orthogonal projections to latent structures (OPLS-DA) with Pareto scaling and Logarithmic data transformation (construction of appropriate biplots and S-plots and their evaluation).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of anaerobic fermentation

Optimization of conditions for effective anaerobic fermentation in small scale was divided into two parts. First part deals with evaluation of influence of different additives in sample solution on the process of gasification. Mixture of PS, RGM, water, 1 mg mL^{-1} solution of methanogenic bacteria APD BIO GAS and fluid thioglycollate medium in different ratios was used to study the gasification efficiency. Note that MetBac and TGM is used to facilitate the degradation of organic material in sewage disposal plant when the anaerobic bacterial activity is decreased. Fig. 1a compares the content of four gases (N_2 , O_2 , CO_2 , CH_4) after 23 days of anaerobic fermentation process at various compositions of fermented mixture. A higher amount of methane was found in solutions B and D (approx. 0.003%) compared with the other microscale reactors in this part of experiment (i.e. A, C, E, F). Virtually no production of methane in solutions A, C, E and F was observed due to the absence of PS in those fermented mixtures. The pH decreased from 4.0 to 3.4 for solution A, from 7.8 to 4.0 for solution B, from 4.0 to 3.4 for solution C, from 7.8 to 4.4 for solution D, from 7.8 to 4.2 for solution E and from 7.2 to 4.4 for solution F, respectively. Moreover, those preliminary experiments showed that the addition of MetBac (B) does not improve the methane production (in comparison with the sample D). Therefore, solutions without addition of this methanogenic bacteria culture were prepared and studied in the subsequent experiments.

During second part of optimization the effect of addition of ammonia in various ratios with respect to PS and RGM was studied. Fig. 1b shows that maintaining the pH of reaction mixture in alkaline-neutral region is the key condition for effective methane production at least in discontinuous small scale conditions. Apparently, higher PS and ammonia contents ensure stable conditions for anaerobic fermentation as a necessary precondition for

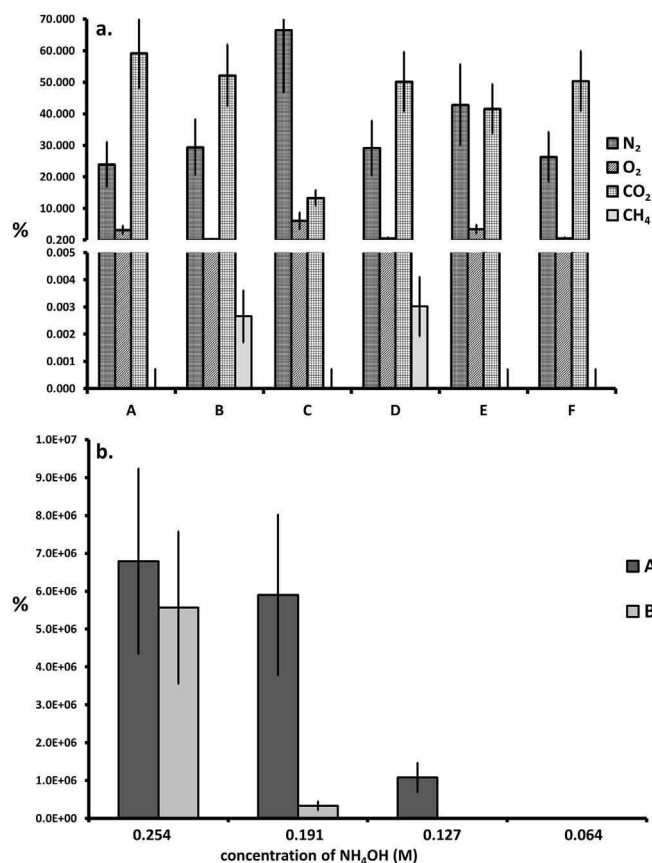


Fig. 1. Percentage of N₂, O₂, CO₂, CH₄ after 23 days of anaerobic fermentation (a.) and effect of addition of NH₄OH on methane production in various ratios of pig slurry and red grape marcs (b.). a. – A) 200 mg of RGM + 2 mL of water; B) 100 mg of RGM + 450 mg of PS + 2 mL of water; C) 200 mg of RGM + 2 mL of water + 1 μ L of MetBac; D) 100 mg of RGM + 450 mg of PS + 2 mL of water + 1 μ L of MetBac; E) 200 mg of RGM + 2 mL of TGM + 1 μ L of MetBac; F) 100 mg of RGM + 450 mg of PS + 2 mL of TGM + 1 μ L of MetBac. b. – A) 750:50 = PS-RGM (m/m); B) 500:50 = PS-RGM (m/m).

following LC/HRTMS study of polyphenol profile changes (note that pH decreased during this experiment from 9.8 to 7.4). No methane was detected in solutions with low amount of pig slurry (i.e. ratio 250:50, 100:50 and 50:50 of PS:RGM (m/m), respectively). For further experiments the solution containing 0.127 M of NH₄OH (final concentration in the reaction mixture) was chosen as a compromise ensuring stable anaerobic fermentation and maintaining the direct effect of ammonia on studied polyphenols minor (pH in this sample declined from 9.54 to 6.57 after 21 days of anaerobic fermentation). High pH of the reaction mixture causes direct hydrolysis of flavonoids which is not prevailing process in anaerobic fermenters and would thus distort the results of digestate analysis.

The fermentation process at optimized conditions (i.e. ratio of PS:RGM 750:50, m/m; final concentration of NH₄OH 0.127 M, 35 °C) was repeated to simulate anaerobic polyphenol transformations under GC/MS control of the four major gases. Fig. 2 shows processes occurring during optimal anaerobic digestion and compares them with a gas profile described for biogas production in literature. In the first phase of fermentation (hydrolysis) a very fast decrease of oxygen and nitrogen as main parts of air was observed. The amount of carbon dioxide increased with simultaneous decrease of pH. This trend is still observed in acidogenic phase. In the final phase (i.e. methanogenesis) the content of methane escalated with simultaneous reduction of content of CO₂ and H₂. Discontinuous

fermentation of PS-RGM exhibits similar profile of main gasses as was described for continuous fermentation process (inset in Fig. 2, Straka et al., 2006). This very good agreement of the gas components profile of our microscale discontinuous fermentation experiment with that described in the literature for optimal biogas production conditions is noteworthy. It shows that many chemical processes occurring during fermentation in industrial scale can be well simulated in microscale conditions making more parallel and cheaper in-laboratory experiments possible. This experiment clearly shows in the same time that anaerobic gasification of waste from winemaking technologies can run by relatively easy modification of standard procedure utilized in biogas stations and thus qualitatively confirms the study done by Fabbri et al. (Fabbri et al., 2015) dealing with gaseous components arising in reaction mixture. Microsamples of digestate were collected during this experiment and analyzed by LC/HRTMS as described in the next chapter.

3.2. Analysis of digestate composition by LC/HRTMS

The samples of digestate from fermenter were collected by a syringe through a head-space screw cap with PTFE/rubber septum and analyzed by LC/HRTMS. Raw data obtained by analysis of PS-RGM and PS (as reference) mixtures at initial stage (starting conditions, 1st stage) were treated by MarkerLynx software (extraction of RT, *m/z* and intensities, data normalization and alignment). Further, logarithmic transformation was applied to normalized marker responses and the obtained dataset was submitted to EZInfo statistic software and studied by PCA. Distinct segregation of PS-RGM and PS samples (measured in three chemical replications) was observed in related Score plot. Data points of PS-RGM were concentrated in rectangular area defined by following coordinates (x1,x2; y1,y2; –9.157, –28.497; –17.707, 21.693), while PS data lay in a separated rectangle (x1,x2; y1,y2; 19.067, 20.530; –0.422, 6.285) of the Score plot. Both areas of PS-RGM and PS samples are well separated from each other. This segregation confirms that LC/HRTMS is sufficiently sensitive analytical tool to describe differences in fermentation mixtures due to presence of wine waste components. OPLS-DA was used to reveal compounds present in wine waste mainly responsible for PS-RGM and PS segregation and detectable by the used analytical technique. Markers (compounds present in PS-RGM sample in significantly higher amount compared to PS sample) with the highest variability and reliability at the same time taken from low risk region of appropriate S-plot (Wiklund et al., 2008; Wiklund, 2008) are listed in Table 1. For our purposes the low risk region was defined as a box with following coordinates: p[1] = 30–100% and p[2] = 75–100% from the highest value at x-axis and y-axis, respectively. The identity the most significant markers was studied in detail by targeted MS/MS experiments as given in the following discussion.

Characteristic fragments of quercetin were found in fragmentation spectra of two chromatographically separated markers 1 and 8 (*R* = 2.34). According to Wittig et al. (Wittig et al., 2001) the fragments at *m/z* 229.0463 and 229.0529 can be ascribed to the loss of two carbon monoxide and one water molecules from parent ion. Fragments at *m/z* 153.0167 and 137.0236 (with identical *m/z* for both markers) correspond to retro-Diels alder (RDA) cleavage (formation of ¹³A⁺ fragment). Those signals correspond well with theoretical values calculated for elemental composition of particular fragments – following deviations from theoretical *m/z* values, dtm, were found: 3.8, –2.8, 2.1 and 0.3. Other minor fragments arising from combined loss of water and CO molecules and RDA processes (Ma et al., 2013; March and Brodbelt, 2008) were also found in MS/MS spectra and support identification of quercetin structure in those markers. Authentic quercetin standard was used

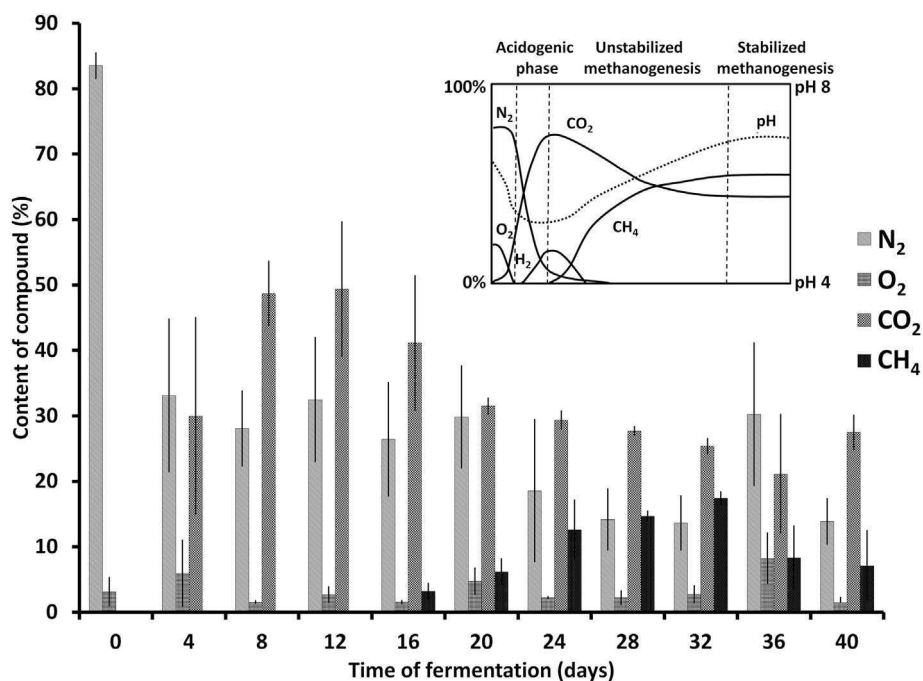


Fig. 2. Description of discontinuous anaerobic fermentation in solution of pig slurry and grape marcs (inset shows the optimal anaerobic fermentation process, published with permission (Straka et al., 2006)).

Table 1

Markers reflecting differences between PS-RGM and PS found at initial conditions using S-plot function. (RT – retention time; p[1] and p[2] – coordinates of each compound in Loadings plot.

No.	Compound	RT (min)	[M+H] ⁺	Deviation from theoretical mass (mDa)	Diagnostic fragments found in MS/MS spectra	p[1]	p[2]
1	Hydroxylated kaempferol	9.03	303.0530	-2.5	229.0463 183.0456 153.0221 121.0280	-0.0047	-0.9993
2	Hydroxybenzoylcatechin	11.95	411.1100	-2.0	291.1002 289.0708 259.0602 139.0542	-0.0046	-0.9981
3	Kaempferol	9.93	287.0610	-5.4	123.0433 213.0552 153.0188 137.0239	-0.0045	-0.9996
4	Malvidin-chalcone	7.92	349.0970	-4.7	121.0290 223.0618 181.0492	-0.0045	-0.9989
5	Not identified	0.60	203.0600	-	139.0388 186.0933 174.0879 159.0682	-0.0045	-0.9991
6	Methylquercetin or its isomer	10.09	317.0780	-11.9	229.0529 153.0167 121.0280	-0.0044	-0.9994
7	Hydroxybenzoylcatechin	10.59	411.1080	0.0	291.1002 289.0708 259.0602 139.0542	-0.0043	-0.9981
8	Isomer of quercetin	8.85	303.0540	-2.6	123.0433 229.0529 153.0167	-0.0043	-0.9993
9	Not identified	1.55	265.1490	-	137.0236 175.0740 159.1177	-0.0042	-0.9992
10	Malvidin-3-glucoside	6.75	493.1340	0.6	119.0864 331.0787	-0.0042	-0.9967
11	Not identified	13.97	275.2070	-	257.1880 135.0891 105.0697	-0.0042	-0.9995
12	Fragment of compound no. 2	11.95	259.0660	-5.4	-	-0.0041	-0.9981

to evaluate retention of quercetin based markers. The retention time of quercetin differs from that of the detected markers. Similarity of collision spectra suggests that the evaluated markers are isomers of quercetin. Detailed study of retro-Diels Alder (RDA) fragments allowed to locate position of hydroxyl groups in the molecule (for the details of RDA fragmentation and nomenclature see the review of Cuyckens and Claeys (Cuyckens and Claeys, 2004) and literature cited herein). Briefly, fragments at m/z 183.0456 and 121.0280 found in collision spectrum of the marker 1 correspond with complementary $^{0,2}A^+$ and $^{0,2}B^+$ RDA fragments (dtm -16.3 and 1.0 mDa, respectively). In collision spectrum of quercetin standard the $^{0,2}A^+$ and $^{0,2}B^+$ RDA fragments have the m/z values 165.0183 and 137.0236 (dtm 0.5 and 0.3 mDa, respectively). The ratio of signals of $^{0,2}A^+$ fragment of the marker 1 and the standard (i.e. $Q = I_{183}/I_{165}$) reaches the value 0.21 in the marker 1 spectrum and 0.07 in the spectrum of quercetin spiked into the studied solution. The ratio calculated in the same way for $^{0,2}B^+$ RDA fragments (i.e. $Q = I_{121}/I_{137}$) reaches the value 1.80 in the marker 1 spectrum and 0.25 in the quercetin standard spectrum. These values clearly support the presence of one hydroxy group on the B-ring of the marker 1 and three hydroxy groups on the A-ring (i.e. 6- or 8-hydroxykaempferol). Due to lower intensity of signals of RDA fragments the position of hydroxy groups cannot be distinguished in the case of marker 8. Retention times and peak profiles are identical with those reconstructed for m/z 465.1067 and 465.1068 (dtm, 3.4 and 3.5 mDa), respectively. Supplementary MS/MS experiments confirm that markers 1 and 8 rise from the collision induced dissociation of ions isolated at m/z 465.11. These ions correspond with hydroxykaempferol-hexosides and/or quercetin-hexoside in the case of marker 8 (main fragmentation process corresponds with loss of dehydrated hexoses; $\Delta m/z = 162.0537$ and 162.0528 ; dtm 0.9 and 0.0 mDa, respectively). Regardless of the using electrospray as relatively soft ionization technique, it is apparent from our experiments that beside parent ions also fragment ions arising in ion source, collision cell or during ion transfer through ion optics can appear among significant markers during OPLS-DA data treatment. Due to selectivity or sensitivity differences, fragments can be in some cases even better markers for evaluation than their parent ions. Interpretation of results thus must be done with extreme care and on the basis of detailed study of MS spectra.

Fig. 3 shows the chromatogram of PS-RGM sample at 280 nm (trace A, DAD detector). Among the eluted polyphenols, three separated compounds at m/z 411.11 occur as clearly visible in appropriate chromatogram reconstructed for this mass (B). Two of them, i.e. RT_ m/z pairs 10.59_411.1080 and 11.95_411.1100, correspond to markers 2 and 7, respectively (Table 1). Fragmentation of both markers (Fig. 3C and D) provided fragment at m/z 289.0708 ($C_{15}H_{13}O_6^+$, dtm, 0.4 mDa) corresponding to a loss of hydroxybenzaldehyde ($\Delta m/z$ 122.0368 , dtm, -3.2 mDa) from parent ion. This fragment can be ascribed to protonized di-dehydrocatechin. Dominant fragment in the spectrum rising at m/z 259.0602 would be explained by a loss of methyl ester of hydroxybenzoic acid ($\Delta m/z$ 152.0442 , dtm, -3.1 mDa) ($C_{14}H_{11}O_5^+$, dtm, 0.4 mDa). Protonized hydroxybenzaldehyde 123.0433 can be also found in the spectrum (m/z 123.0433 , dtm -1.3). Based on the collision spectra, compounds 2 and 7 were ascribed to isomers of hydroxybenzoylcatechin. Note, that fragments corresponding with protonized catechin and hydroxybenzoic acid were found in both collision spectra as well. A higher deviation of their masses from calculated ones were probably due to a lower intensity of their signal (i.e. m/z 291.1002 and 139.0542 ; dtm 13.3 and 14.7 mDa, respectively). Position of acylation of catechin skeleton was not revealed. However, paper of Smith et al. can be taken into account suggesting the preference of the acylation into position 3 of

proanthocyanidin skeleton studied on different plant material (Smith et al., 2011). Note, that the signal of those markers was found neither in pure grape marcs extract nor in PS. This fact can be explained by a fast reaction of catechin in PS-RGM mixture.

Fig. 4 shows chromatograms reconstructed for m/z 449.12 and 287.06 (A, B). The dominant peak at m/z 287.06 and RT 9.96 min corresponds to marker 3 listed in Table 1. This marker was identified as kaempferol. Cascade losses of water and carbon monoxide (i.e. fragments at m/z 269.0457, 259.0602, 241.0497, 231.0654 etc.) indicate flavonoid structure. Relatively abundant signal of RDA fragment at m/z 121.0280 ($^{2,0}B^+$, dtm 1.0 mDa) indicates the presence of one hydroxy group on B-ring ($Q = I_{121}/I_{137} = 1.5$). Other corresponding RDA fragments can be found in the spectra as well, i.e. 137.0236 ($^{0,3}A^+$), 153.0167 ($^{1,3}A^+$), 165.0183 ($^{0,2}A^+$) etc.; dtm 0.3 , 2.1 , 0.5 mDa, respectively (for MS/MS spectrum see Fig. 4C). The same elution profile of the signal at m/z 449.12 suggests that kaempferol is present in glycosylated form (mono hexoside). The signal of kaempferol hexoside itself, however, is below the marker intensity threshold set on 100 counts used for data filtration method. It is important to note that no peak at m/z 449.12 appears in PS sample used as reference and in this view kaempferol hexoside also belongs among markers – but with low abundance. Beside the peak of kaempferol hexoside a broad peak of cyanidin-3-glucoside (RT 2.8 min) and two minor non-identified compounds can be seen in the chromatogram at Fig. 4A, but those compounds are below the threshold as well.

Marker with RT_ m/z pair 7.92_349.0970 was identified as malvidin chalcone. Sharp peak indicates that chalcon (open) form dominates in the solution (mutual conversion of individual acid-base forms of hydrated malvidin does not influence the retention of the compound). Loss of water (formation of fragment at m/z 331.0787, dtm 3.1 mDa), followed by a loss of methyl radical (m/z 316.0453, dtm 13 mDa) was observed in related collision spectrum. Loss of two methane molecules was observed as well, albeit with a higher deviation from calculated mass due to insufficient resolution from background signals (m/z 299.0547, dtm 35.5 mDa). Those fragmentation processes indicate the presence of two methyl groups in the molecule. Dominant fragment corresponds to the result of cleavage of syringic acid acylium cation (m/z 181.0492, $C_9H_9O_4^+$, dtm, 0.9 mDa) from the parent chalcone. The diagnostic fragment corresponding to A-ring substituted with three hydroxy groups (i.e. (2-(2,4,6-trihydroxyphenyl)ethylidene)oxonium, m/z 167.0316, $C_8H_7O_4^+$, dtm 2.8 mDa) is observed in related collision spectrum as well. Fragmentation pattern of this compound unambiguously confirms the proposed structure. The presence of the chalcone in high content is expectable since high amounts of malvidin derivatives remain in marcs after red grape pressing. In fact, malvidin-3-glucoside is the most abundant marker present in RGM-PS. More details concerning the malvidin-3-glucoside, malvidin and its chalcone identification can be found in Supplement 1. Unambiguous identification of this dye was based on exact mass measurement (m/z 493.1340, dtm 0.6), fragmentation pattern and comparison of RT time, peak profile and MS data with authentic standard. Note that broadened peaks of anthocyanins are typically observed when pH of mobile phase is above 2 (Papoušková et al., 2011).

A compound with RT_ m/z pair 10.09_317.0780 appeared among markers in Table 1 as well. A loss of methyl radical (formation of fragment at m/z 302.0435, dtm -0.8 mDa), consequent cascade losses of hydroxyl radical, carbon monoxide and water (i.e. fragments at m/z 285.0407, 257.0410, 229.0529, 239.0279 etc.) and number of lower mass fragments rising by RDA fragmentations appeared in its collision spectrum. Based on those data, the marker corresponds to a methylquercetin or related isomers (i.e. hydroxymethyl kaempferol or hydroxymethyl luteolin). More detailed

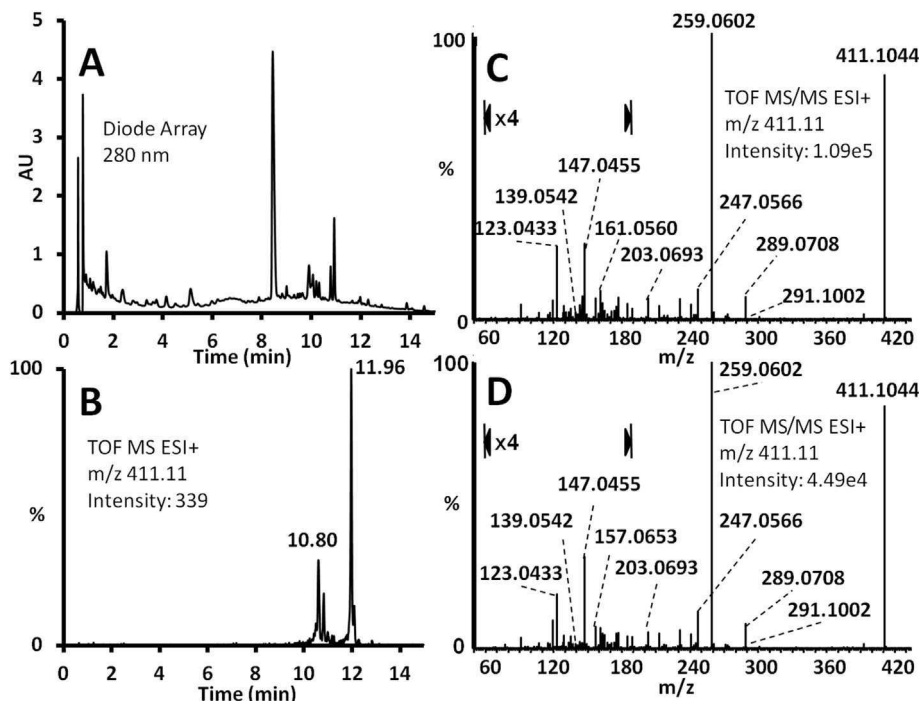


Fig. 3. Chromatogram of PS-RGM sample at 280 nm (A), reconstructed chromatogram at m/z 411.11 (B), MS/MS spectra of markers 2 and 7 (C, D, resp.; collision energy ramp (CER): 10–40 eV). Selected area zoomed 4 \times .

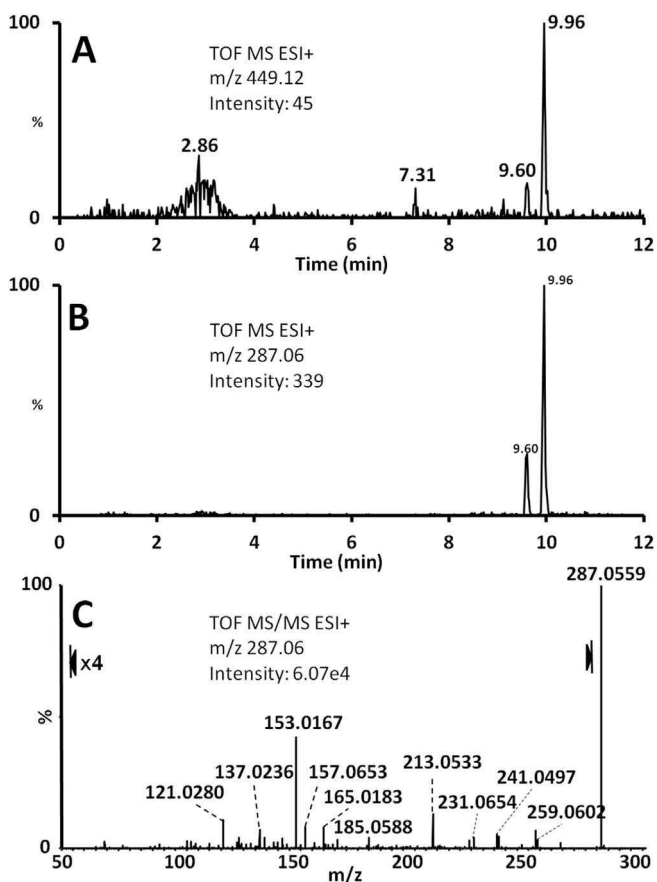


Fig. 4. Chromatogram reconstructed at m/z 449.12 (A) and m/z 287.06 (B) and MS/MS spectrum of marker 3 (C; CER: 10–50 eV). Selected area zoomed 4 \times .

identification is complicated by a complex and insufficiently distinctive fragmentation pattern (including RDA processes) and lack of authentic standard (for more details see Supplement 2). Another three unidentified compounds and a fragment of hydroxybenzoylcatechin appeared among markers as well. In conclusion to this part, our experiments prove that LC/HRTMS in combination with PCA and OPLS-DA is effective tool for searching of important changes in composition of anaerobic fermentation mixtures and that some further specified derivatives and isomers of kaempferol, catechin, malvidin and quercetin are important components of wine waste fermentation mixtures. Their presence in fermentation mixture can potentially influence the gasification process. The profile of the monitored compounds is given in Fig. 5A. It can be clearly seen that the amount of analyzed flavonoids (present in wine waste) is quickly decreasing during gasification under optimal conditions and the compounds are almost totally degraded in four days of experiment (corresponding to acidogenic phase of anaerobic digestion).

The same analytical procedure and data processing as applied to initial conditions was used to the samples taken after 4 days (2nd stage) of gasification experiment. The most significant markers of PS-RGM found in S-plot obtained by measurement of RGM-PS and PS after 4 days of gasification are given in Supplement 3. Six markers, i.e. RT- m/z pairs 1.38_305.0706, 1.39_139.0451, 1.94_123.0491, 2.53_139.0457, 4.81_123.0495, 9.78_123.0492 are of a particular importance and will be discussed in more details.

Fig. 6 shows chromatograms reconstructed for m/z 305.07 and 139.05 (A and B). All the three peaks are significant markers of PS-RGM in 2nd stage experiments. Two repeated losses of water and carbon monoxide are observed in the collision spectrum of the marker at m/z 305.0706 indicating a polyphenolic structure (Fig. 6D). Dominant fragments at m/z 153.0221 and 151.0417 rise by a split of quercetin chalcone and/or reduced (dihydro-) form of quercetin and/or reduced (dihydro-) form of hydroxylated kaempferol. Fragment at m/z 139.0388 can be explained as

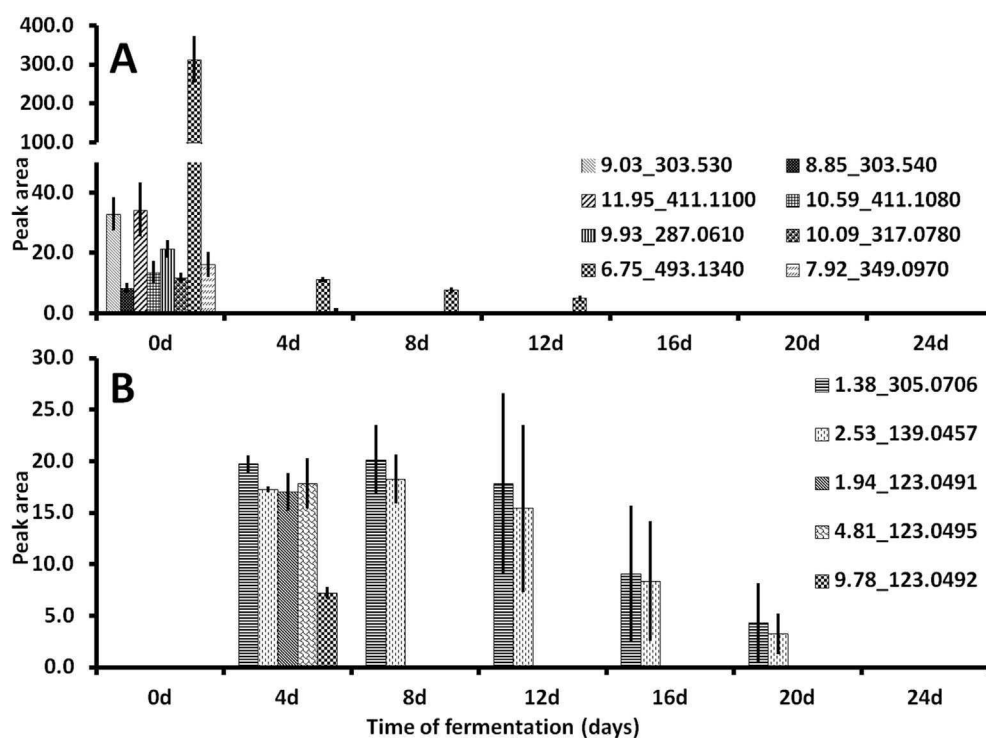


Fig. 5. Changes in profile of significant markers from 1st (A) and 2nd (B) stage of gasification process. A: 9.03_303.530 – hydroxylated kaempferol; 11.95_411.1100 – hydroxybenzoylcatechin; 9.93_287.610 – kaempferol; 6.75_493.1340 – malvidin-3-glucoside; 8.85_303.0540 – isomer of quercetin; 10.59_411.1080 – hydroxybenzoylcatechin; 10.09_317.0780 – methylquercetin or related isomer; 7.92_349.0970 – malvidin-chalcone. B: 1.38_305.0706 – reduced (dihydro analogue of) quercetin, hydroxykaempferol or related chalcones; 2.53_139.0457 – tentatively a fragment of reduced kaempferol; 1.94_123.0491 – hydroxybenzaldehyde (fragment of dimethoxychromanone); 4.81_123.0495 – hydroxybenzaldehyde (fragment of reduced catechin); 9.78_123.0492 – hydroxybenzaldehyde (fragment of unknown molecule).

$^{0.3}A^+$ RDA fragment from dihydroquercetin. This fragment itself is also listed among markers of the 2nd stage experiments (RT_ m/z pair 1.39_139.0451). Fragments at m/z 127.0404 and 123.0482 can be explained as protonized phloroglucinol ($^{1,4}A^+$ fragment of dihydroquercetin) and protonized hydroxybenzaldehyde ($^{0.2}B^+$ RDA fragment of reduced hydroxykaempferol), respectively. The presence of the RDA fragments was further confirmed by independent LC/MS/MS experiments using triple quadrupole mass spectrometer. Based on the above data we explain the marker at m/z 305.07 as dihydroquercetin, dihydrohydroxykaempferol or related chalcones (or their unresolved mixture). The marker with higher retention time in the chromatogram reconstructed for m/z 139.05 (Fig. 6B), i.e. RT_ m/z pair 2.56_139.0457 corresponds to protonized dihydroxybenzaldehyde. Identity of this marker is confirmed by two losses of carbon monoxide and one loss of water in related MS/MS spectrum (i.e. formation of fragments at m/z 111.0443, 93.0384 and 65.0376). This marker has an identical retention profile with ion at m/z 289.0774 as can be seen from the chromatogram in Fig. 6C. This ion is not listed directly among markers due to its low intensity in MS spectra. Considering the presence of kaempferol in 1st stage experiments we suggest that the ion 289.0774 rises by reduction (hydrogenation) of kaempferol. Apparently, the reduction (hydrogenation) of flavonoids coming from wine waste represent an important process accompanying biogas production at least in beginning of anaerobic digestion, i.e. during acidogenic phase. Qualitatively those results are in agreement with a model study of in-vitro catabolism of quercetin by human fecal bacteria (Peng et al., 2014).

Last three markers with RT_ m/z pairs 1.94_123.0491, 4.81_123.0495 and 9.78_123.0492 correspond by mass with hydroxybenzaldehyde ($C_7H_7O_2^+$, dtm, -4.5 , -4.9 , -4.6 mDa, respectively). Their collision spectra are simple and very similar to

each other. Consequent loss of water (m/z 105.0339, dtm 0.1 mDa) and carbon monoxide (m/z 77.0413, dtm -2.2 mDa) represent dominant collision processes. Besides, several minor but important fragmentation processes were observed. First, loss of 15.9959 from parent ion was observed (formation of fragment at m/z 107.0474). This difference can be explained either as a loss of oxygen (from hydroxyl group, i.e. $\Delta m/z$ 15.9949) or as a loss of methane ($\Delta m/z$ 16.0313). Comparison of measured and calculated differences confirms the first possibility and absence of methyl group in the structure. Second, cleavage of formaldehyde (i.e. loss of ($\Delta m/z$ 30.0049, dtm 5.7 mDa) and COH· radical ($\Delta m/z$ 29.0045, dtm 1.8 mDa) beside the main loss of CO confirms the presence of aldehyde group in the molecule. Another possibility is presence of a carboxy group in the molecule of the marker (i.e. benzoic acid). This possibility was tested by comparison of retention time with authentic standard (spiked to the PS-RGM sample) and its fragmentation. Different retention times of standard and detected markers and in particular the absence of a loss of CO₂ in the collision spectrum of marker while its occurrence during benzoic acid fragmentation observed under identical MS setup excluded this possibility. Finally, retention times of markers at m/z 123.05 were compared with retention of authentic standard of *p*-hydroxybenzaldehyde. Retention times of markers differ significantly from the standard. The fact suggests that those markers are fragments of some bigger molecules. In fact, signals at m/z 209.0870 and 293.1053 have identical retention times with those markers at RT 1.94 and 4.81 min, respectively. Collision induced dissociation of parent ion with m/z 293.1053 provided fragment at m/z 275.0899 corresponding to a loss of water. Besides, fragments typical for RDA cleavage of flavan-3-ols were formed, i.e. m/z 165.0529 ($C_9H_9O_3^+$, dtm -2.3 mDa), 153.0572 ($C_8H_9O_3^+$, 2.0 mDa) and 139.0382 ($C_7H_7O_3^+$, -1.3 mDa). Those fragments were already observed and

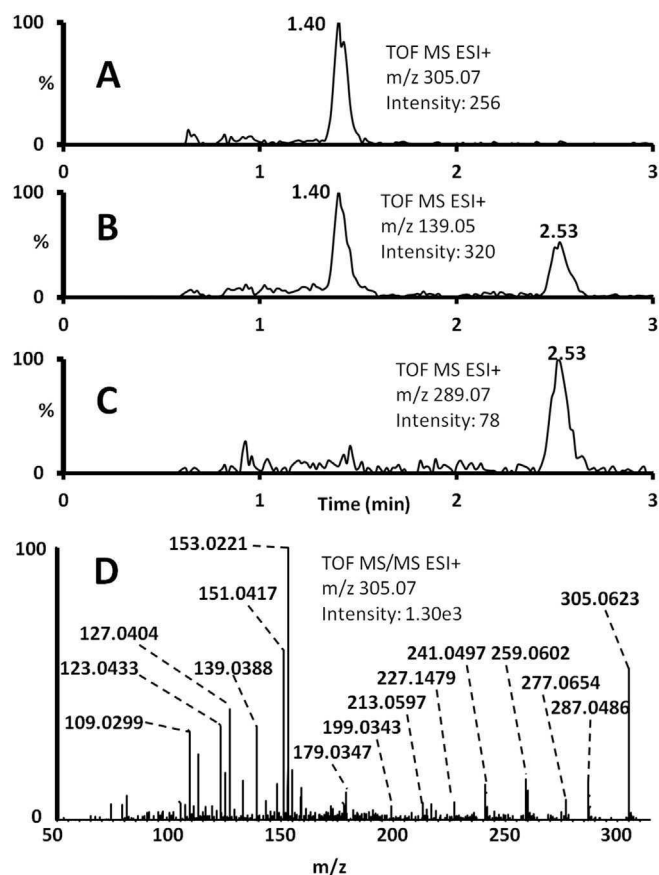


Fig. 6. Reconstructed chromatograms for m/z 305.07 (A), 139.05 (B) and 289.07 (C) and MS/MS spectrum of marker at m/z 305.0706 (D, CER 10–40 eV).

thoroughly explained for catechin by Li and Deinzer (Li and Deinzer, 2007). The parent compound contains two hydrogen atoms more compared to catechin – indicating its reduction. This interpretation is further supported by the presence of fragment at m/z 149.0614 corresponding to the gain of two hydrogens to the $^{14}B^+$ RDA fragment of catechin. Fragment at m/z 123.0451 (corresponding with the marker 4.81_123.0495, dtm –4.4 mDa) is formed by previously also described catechin benzofuran forming fission (Li and Deinzer, 2007). More detailed information about the reduced catechin fragmentation can be found in Supplement 4. The position of reduction in the catechin skeleton was not deduced from the available spectra and a mixture of chromatographically non-resolved isomers is likely.

By analogy, the parent ion of the marker 1.94_123.0491, i.e. signal at m/z 209.0870, could be formed by an action of methanogenic archaea in reductive atmosphere. The presence of common flavons and flavonols and in some cases consequently their reduced or methylated forms were described above. Flavonoids (Barz and Hoessel, 1979) and their chalcon forms (Adams, 1973) can be transformed to dihydroxychromones or coumarin derivatives by a loss of side B-ring. This process can occur also in PS-RGM mixture. The identity of parent ion at m/z 209.0870 can be ascribed to a protonized dimethoxychromanone (dtm 5.6 mDa). Dihydroxychromones were described to occur by enzymatic degradation of flavonoids (Barz and Hoessel, 1979) and those compounds can be consequently reduced and methylated by methanogenic bacteria (Peng et al., 2014). Dominant fragments obtained by MS/MS experiment are ions at m/z 149.0614, 131.0469 and 103.0529. These signals can be explained by successive elimination of water

(perhaps driven by the heterocyclic ring aromatization and evidencing the presence of hydroxyl group), ketene (evidencing the presence of methoxy group) and carbon monoxide (chipped from heterocyclic ring). Note, that the presence of the second methoxy group in the parent molecule is evidenced by a weak but evidential signal of fragment at m/z 134.0362 rising by a loss of methyl radical from the fragment at m/z 149.0614 (Supplement 5). The identity of marker 9.78_123.0492 was not revealed based on the available analytical data and it is an objective of a future research.

The changes of markers profile from 2nd stage during the fermentation process are shown in Fig. 5B. It can be seen that all those markers are not present in the initial stage of fermentation. Their content in liquid phase reaches maximum approximately in 4–8 days and then their degradation is observed. Statistically significant decrease of identified reduced flavonoid(s) (markers at m/z 305.0706 and 139.0457) after 16 days of gasification was reached as can be seen from the changes of peak areas and their error bars (Fig. 5B). Compounds providing signal of fragment at m/z 123.05 were degraded much faster (significant decrease after 8 days is reached).

The studied gasification process comprises of many chemical and enzymatic processes and thus comprehensive explanation of wine polyphenols degradation is difficult to reach. However, our experiments indicate that reduced forms of particular flavonoids rise during gasification process. Some of them exhibit higher toxicity (taxifolin as one of dihydroquercetin isomers has acute intraperitoneal toxicity for mouse LD50 (AITM-LD50) equal to 985 mg kg⁻¹) than their oxidized counterparts (e.g. quercetin with AITM-LD50 value of 3000 mg kg⁻¹) or than aglycone of one from dominant flavonoids present in initial PS-RGM sample, i.e. malvidin-3-glucoside (malvidin aglycon in the form of chloride has AITM-LD50 value 4110 mg kg⁻¹) (<http://datasheets.scbt.com>).

4. Conclusion

The process of anaerobic fermentation to reach methanogenic phase of gasification of wine waste was studied in microscale discontinuous fermenter. The unstabilized methanogenesis was reached and maintained during the study as proven by appropriate control by GC/MS. LC/HRTMS analysis combined with PCA and OPLS-DA revealed main chemical distinctions of gasified wine waste (PS-RGM) from commonly used mixture at agricultural biogas plants (e.g. PS). Eight compounds with polyphenolic structure were revealed among the most significant markers distinguishing mixture enriched with wine waste (red grape marcs) from common gasified materials. LC/HRTMS analysis of samples collected during acidogenic phase and unstabilized methanogenesis indicates the formation of reduced forms of some flavonoids in early stages of the process and their consequent degradation. Considering a higher toxicity of some dihydro flavonoids (e.g. taxifolin) compared to common wine flavonoids (malvidin, quercetin etc.), a potential environmental risk of utilization of unstabilized digestate as a fertilizer can be taken into account. This hypothesis points out the necessity of appropriate analytical control of digestate.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the support of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic [project LO1305], European Fund of Regional Development and MEYS [project CZ.1.05/2.1.00/19.0377] and Palacky University Olomouc [project IGA_PrF_2016_016]. Authors would like to thank to Assoc. Prof. Josef Balík from Department of Post-Harvest Technology of Horticultural Products, Faculty of Horticulture in Lednice, Mendel

University in Brno for providing of red wine grape marcs and Květoslav Mück from CERVUS Ltd. in Olomouc for pig slurry sample.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.124>.

References

- Adams, J.B., 1973. Thermal-degradation of anthocyanins with particular reference to 3-glycosides of cyanidin .1. Acidified aqueous-solution at 100 degrees C. *J. Sci. Food Agric.* 24, 747–762.
- Archer, D.B., Peck, M.W., 1989. The microbiology of methane production in landfills. *Fems Symp.* 49, 187–204.
- Barz, W., Hoesel, W., 1979. Metabolism and degradation of phenolic compounds in plants. In: Swain, T., Harbone, J.B., Van Sumere, C.F. (Eds.), *Biochemistry of Plant Phenolics*. Springer US, Boston, MA, pp. 339–369.
- Bustamante, M.A., Moral, R., Paredes, C., Perez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Perez-Murcia, M.D., 2008. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manag.* 28, 372–380.
- Cuyckens, F., Claeys, M., 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* 39, 1–15.
- Da Ros, C., Cavinato, C., Pavan, P., Bolzonella, D., 2014. Winery waste recycling through anaerobic co-digestion with waste activated sludge. *Waste Manag.* 34, 2028–2035.
- Fabbri, A., Bonifazi, G., Serranti, S., 2015. Micro-scale energy valorization of grape marcs in winery production plants. *Waste Manag.* 36, 156–165.
- Herrmann, A.P., Janke, H.D., 2001. Cofermentation of rutin and hesperidin during two-stage anaerobic pre-treatment of high-loaded brewery wastewater. *Water Res.* 35, 2583–2588.
- Herrmann, A.P., Willems, M., Janke, H.D., 2001. Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge. *Water Res.* 35, 2575–2582.
- Jurado, J., Alejandreduran, E., Alonsomoraga, A., Pueyo, C., 1991. Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the salmonella ara test. *Mutagenesis* 6, 289–295.
- Leiva, M.B., Koupaie, E.H., Eskicioglu, C., 2014. Anaerobic co-digestion of wine/fruit-juice production waste with landfill leachate diluted municipal sludge cake under semi-continuous flow operation. *Waste Manag.* 34, 1860–1870.
- Li, H.-J., Deinzer, M.L., 2007. Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. *Anal. Chem.* 79, 1739–1748.
- Li, J., Kong, C., Duan, Q., Luo, T., Mei, Z., Lei, Y., 2015. Mass flow and energy balance plus economic analysis of a full-scale biogas plant in the rice-wine-pig system. *Bioresour. Technol.* 193, 62–67.
- Li, Y.B., Park, S.Y., Zhu, J.Y., 2011. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renew. Sust. Energy Rev.* 15, 821–826.
- Ma, C., Lv, H., Zhang, X., Chen, Z., Shi, J., Lu, M., Lin, Z., 2013. Identification of regioisomers of methylated kaempferol and quercetin by ultra high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight (UHPLC–QTOF) tandem mass spectrometry combined with diagnostic fragmentation pattern analysis. *Anal. Chim. Acta* 795, 15–24.
- Macek, T., Mackova, M., Kas, J., 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol. Adv.* 18, 23–34.
- March, R., Brodbelt, J., 2008. Analysis of flavonoids: tandem mass spectrometry, computational methods, and NMR. *J. Mass Spectrom.* 43, 1581–1617.
- Melamane, X.L., Tandlich, R., Burgess, J.E., 2007. Treatment of wine distillery wastewater by high rate anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 56, 9–16.
- Mužik, O., Abrahm, Z., 2006. Utilization and Economy of Biogas Plants in Agribusiness. Research Institute of Agricultural Engineering (p.r.i., Praha).
- Papouskova, B., Bednar, P., Hron, K., Stavek, J., Balik, J., Myjavcova, R., Bartak, P., Tomankova, E., Lemr, K., 2011. Advanced liquid chromatography/mass spectrometry profiling of anthocyanins in relation to set of red wine varieties certified in Czech Republic. *J. Chromatogr. A* 1218, 7581–7591.
- Peng, X.C., Zhang, Z.C., Zhang, N., Liu, L., Li, S.T., Wei, H., 2014. In vitro catabolism of quercetin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. *Food Nutr. Res.* 58.
- Popp, R., Schimmer, O., 1991. Induction of sister-chromatid exchanges (sce), polyploidy, and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte-cultures – a comparative-study of 19 flavonoids. *Mutat. Res.* 246, 205–213.
- Skibola, C.F., Smith, M.T., 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Bio Med.* 29, 375–383.
- Smith, A.H., Kandil, F.E., Seigler, D.S., Mackie, R.I., 2011. 5-Deoxyflavan-3-ol-based proanthocyanidins with antinutritional and antimicrobial properties from the forage legume *Acaciella angustissima*. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 84, 142–150.
- Straka, F., Dohányos, M., Záborská, J., Jeníček, P., Dědek, J., Malíjevský, A., Novák, J., Oldřich, J., Kunčarová, M., 2006. *Biogas – a Handbook for Teaching, Design and Operation of Biogas System*, 2 ed. (GAS s.r.o., Praha /in Czech/).
- Suzuki, S., Takada, T., Sugawara, Y., Muto, T., Kominami, R., 1991. Quercetin induces recombinational mutations in cultured-cells as detected by DNA fingerprinting. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 1061–1064.
- Weiland, P., 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 849–860.
- Wiklund, S., Johansson, E., Sjöström, L., Mellerowicz, E.J., Edlund, U., Shockcor, J.P., Gottfries, J., Moritz, T., Trygg, J., 2008. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal. Chem.* 80, 115–122.
- Wiklund, S., 2008. *Multivariate Data Analysis for Omics*. Umetrics AB, p. 228. /E-Book/, available at: <http://metabolomics.se>.
- Wittig, J., Herderich, M., Graefe, E.U., Veit, M., 2001. Identification of quercetin glucuronides in human plasma by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 753, 237–243.

LC/MS METHOD DEVELOPMENT FOR THE DETERMINATION OF DEGRADATION PRODUCTS OF ANTHOCYANIN DYES

LUKÁŠ KUČERA*, **ONĚŘEJ KURKA,**
and **PETR BEDNÁŘ**

*RCPTM, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic
lukaskucera@volny.cz*

Anthocyanins are water soluble pigments belonging to the group of flavonoids. Those compounds are responsible for color of plant tissues. Anthocyanins are considered as natural and safe food colorants with many positive effects on human health¹. The stability of anthocyanins is strongly influenced by many factors such as pH, temperature, concentration, presence of oxygen or enzymes, irradiation, etc.². Quality of food with respect to anthocyanins is therefore sensitive to insufficient change of technology or storage conditions. During degradation of anthocyanins a cleavage of sugar moiety and formation of phenolic acids (i.e. protocatechuic, *p*-hydroxybenzoic, 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoic, syringic, vanillic and gallic acid depending on B-ring substitution) and phloroglucinaldehyde is commonly described to occur³. Those compounds can be therefore used as potential markers of food quality (e.g. controlling of winemaking technology and/or wine storage). However, such application requires a minute knowledge of degradation products profile. The aim of the contribution is to investigate the processes of anthocyanin degradation in detail by means of combination of liquid chromatography with high resolution tandem mass spectrometry.

First part of the study involved development of HPLC method with UV/VIS detection. Separation selectivity and efficiency towards standard mixture of six commercially available phenolic acids and phloroglucinaldehyde was tested on three chromatographic reversed-phase columns – one fully porous column Gemini C18 and two core-shell columns Kinetex C18 and Ascentis Express C18. The best results described by resolution of critical pairs and COF function⁴ were achieved using core-shell column Ascentis Express C18. This column was used for consequent experiments.

Then, optimized LC system was hyphenated with mass spectrometer (Acquity UPLC/Q-TOF Premier, Waters, Milford, USA) and used for study of degradation of cyanidin chloride, malvidin-3-galactoside and floroglucinaldehyde. Very fast decomposition was observed when the model solutions was heated (i.e. $T = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 1.0$; 3.5 or 7.0). In one hour anthocyanins completely disappeared and significant increase of phenolic acids (syringic in solution of malvidin-3-galactoside and protocatechuic in solution of cyanidin) was observed. Surprisingly phloroglucinaldehyde was not observed at all. When a solution of phloroglucinaldehyde standard was heated, a very fast decomposition was observed as well (in one hour decrease on 11.3 % of total amount, calculated from peak areas). From those experiments we can conclude that concentration of phenolic acids is potentially utilizable parameter describing the anthocyanin decomposition. On the other hand stability of phloroglucinaldehyde is not sufficient for such purpose at least at heated solutions (used for instance during a “hot maceration“ involved in some winemaking processes). Identification of products of phloroglucinaldehyde decomposition and study of real wine degradation is now in progress.

Authors thank to the Grant Agency of Czech Republic (GAČR P206/10/0625), Ministry of Education Youth and Sports of Czech Republic (project CZ.1.05/2.1.00/03.0058, Operational Program Research and Development for Innovations – European Social Fund) and Palacky University (project No.: PrF_2012_020) for financial support.

REFERENCES

1. Gris E. F., Ferreira E. A., Falcao L. D., Bordignon-Luiz M. T.: *Food Chem.* 100, 1289 (2007).
2. Castaneda-Ovando A., Pacheco-Hernandez M. D., Paez-Hernandez M. E., Rodriguez J. A., Galan-Vidal C. A.: *Food Chem.* 113, 859 (2009).
3. Sadilova E., Stintzing F. C., Carle R.: *J. Food Sci.* 71, C504 (2006).
4. Churáček J., et. al. *Analytická separace látek*, SNTL, Praha 1990.

Biogas system and possibilities of control and use of digestate in Czech Republic: A Review

Lukáš KUČERA, Petr BEDNÁŘ

Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17.listopadu 12, 779 00, Olomouc, Czech Republic; e-mail: petr.bednar@upol.cz

Abstract

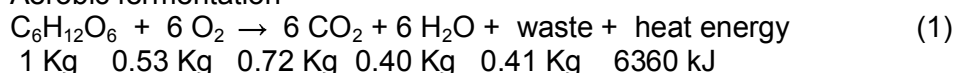
Anaerobic fermentation is excellent ecological waste treatment and the way how to produce cheap electrical and thermal energy. Biogas stations are divided in three main groups – agricultural, waste and industrial. Agricultural biogas stations are the most frequent due to the purchase price of energy which is higher than for waste biogas stations. In future we can expect greater construction of waste biogas stations according to new European Notice 1999/31/EC, which plan to reduce the amount of biodegradable waste going to landfill to 35% until year 2020. Considering this notice a higher production of digestate can be anticipated. At present, analytical control of digestate comprise only basic parameters, which are important for its use as fertilizer or as fuel (pellets form). However, detailed research on processes occurring in digestate as well as routine control of pollutants such as pesticides, PCBs, herbicides, fungicides and heavy metals for routine analysis is still in development. The aim of this review is to reflect the state of art of biogas production namely with regard to control and use of digestate produced by biogas stations in European Community and especially in Czech Republic.

Key words: biogas system, digestate, fermentation, anaerobic, methanogenic bacteria, digestate control, digestate usage

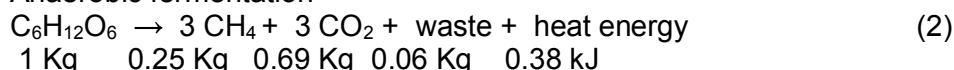
1. Introduction

The beginnings of biogas systems can be dated to the turn of the 19th and 20th century, but first notes debating the possibility of producing biogas appeared earlier. These historical "biogas stations" were situated in sewage disposal plants, where the resulting biogas was used for lighting and heating. The first anaerobic biogas station was built in leper colony in Bombay, India in 1859¹. Anaerobic digestion reached to England in 1895, where the biogas plants were optimized for sewage treatment and the biogas was used as fuel to street lamps in Exeter². Research in the area of anaerobic fermentation and biogas stations began in 1930s³. Gradual research discovered many types of anaerobic methanogenic bacteria that can produce methane. Anaerobic microorganisms producing methane significantly influenced composition of the atmosphere of Earth in past, until oxygen appeared. Oxygen is toxic for anaerobic bacteria causing their recession⁴. The differences between aerobic and anaerobic fermentation are shown on the decomposition of glucose (Eq.: 1-2)⁵.

Aerobic fermentation



Anaerobic fermentation



In the aerobic process, more amount of solid substrate (waste) was observed compared to anaerobic process. Moreover, this waste is heated by released thermal energy. In the anaerobic process, the amount of released heat is not high enough to cause warming of the solid substrate and additional heating of material is at the beginning of the process required. On the other hand, after the process of anaerobic fermentation is established the material releases enough energy to maintain optimal

temperature and chemical energy of biogas represents the benefit of the process⁶. During anaerobic fermentation, the bacteria propagate and gradually increase the production of methane versus carbon dioxide. Waste material remains in the reactor after the fermentation process is over.

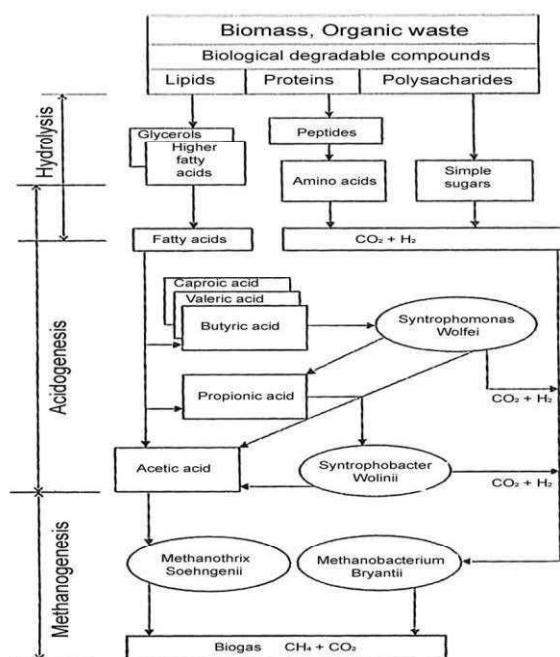
There are two basic approaches for anaerobic fermentation; i) "wet" anaerobic fermentation is based on fermentation of stirred feedstock mixed with liquid medium. The residue from the fermentation process is called digestate. ii) second fermentation technique is known as "dry" anaerobic fermentation. Feedstock is inserted into a metal sieve in the upper part of the reactor and showered by water in timed cycles. The resulting liquid residue is called percolate, which can be used later as liquid fertilizer⁷. The solid part is usually composted after fermentation. The process of biogas formation is relatively well described. On the other hand, the chemical composition of digestate would deserve a higher attention especially from the point of view of its utilization, safety and effect on environment. The aim of this communication is to inform comprehensively about the state-of-the-art of investigation of biogas production process and control of rising products. Particular attention is given to digestate formation, analysis of its composition and possibilities of its use.

2. Biogas systems

2.1. Principle of biogas production

Biogas is a mixture of two gases, CO₂ and CH₄. The gases however do not appear right after inserting the material into the reactor and their gradual production consists of several stages (see Figure 1). In initial stage, residual oxygen is present in the reactor and therefore this phase does not include action of methanogenic bacteria, but only aerobic ones^{8, 9}. The initial stage can be described as decomposition (mostly hydrolysis) of biopolymers. Lipids turn into glycerol and higher fatty acids, proteins decompose to peptides and consequently to amino acids, polysaccharides to simple sugars. Hydrolysis is followed by acidogenesis (both phases partially overlap). Higher fatty acids are further decomposed to lower ones (caproic, valeric, butyric, propionic and acetic acid), and the other substances to CO₂ and H₂. Hydrolysis and acidogenesis are mostly constituted by hydrolytic and acidogenic bacteria¹⁰. Final phase of anaerobic fermentation is called methanogenesis. This process is driven mainly by acetotrophic bacteria (*Methanotrix Soehngenii*, *Methanomicrobiales*) and hydrogenotrophic bacteria (*Methanobacterium Bryantii*, *Methanobacteriales*)^{4, 11}. The first mentioned bacterium is responsible for conversion of acetate into methane and carbon dioxide. This bacterium is not able to reuse substrates such as CO₂, H₂^{12, 13}. The latter one is able to use carbon dioxide and hydrogen for its growth^{12, 14}. Note that for effective biogas production both kinds of bacteria should be present in reaction mixture.

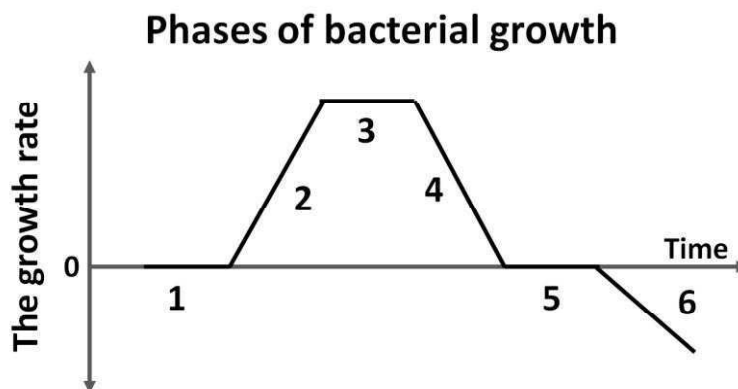
Figure 1: Scheme of processes in biogas reactor (published with permission of the authors¹⁵)



The growth rate of bacteria in the methanogenic stage is of course greatly influenced by composition of feedstock. Bacterial reproducibility can be characterized by the growth curve that can be described by six stages⁵ (**Figure 2**):

- 1) Lag phase - adaptation of bacteria to environmental conditions
- 2) Phase of accelerated growth - part of (already adapted) microorganisms begins to multiply
- 3) Exponential growth phase - the bacteria are fully adapted and multiply rapidly
- 4) Phase of slow growth - growth rate of microorganisms lowers
- 5) Stationary phase – nutrients go down, vitality and mortality of bacteria is in equilibrium
- 6) Decline (death) phase - lack of nutrients kills the bacteria and they decompose

Figure 2: Phases of bacterial growth, 1) lag phase, 2) phase of accelerated growth, 3) exponential growth phase, 4) phase of slow growth, 5) stationary phase, 6) decline phase

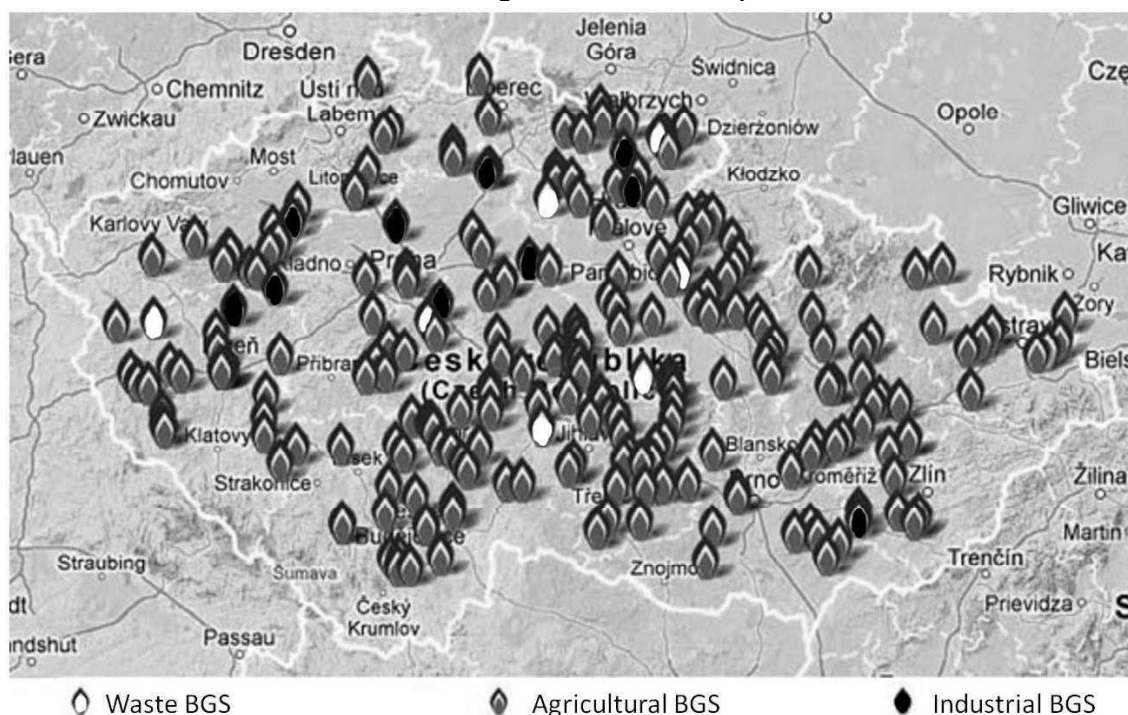


To speed up the first and second phase of the fermentation process, vaccine (inoculum) from the fermenter at stable state can be used. Second option for starting up the fermentation process is use of a dried methanogens in their inactive state¹⁶. Some of these inactive bacteria are commercially available and in some case even enriched with another kind of bacteria, such as cellulolytic bacteria, half-cellulolytic bacteria, amylolytic decomposing bacteria and protein decomposing bacteria for increasing anaerobic fermentation^{17,18}.

2.2. Biogas stations

Most of the biogas stations are located near the big stock farms (hog and cattle ones). Those farms produce a lot of manure and energy crops (corn silage, grass, sugar beet)¹⁹. Public Notice of the Czech Republic Notice 482/2005 Sb.²⁰ about determination of the types and the use of biomass for electricity generation was novelized by Notice 5/2007 Sb.²¹ and then by Notice 477/2012 Sb.²² about determination of the types and the use of biomass for electricity, heat and biogas generation. All these notices specify that the biogas station must be registered in the category AF1 to achieve the highest purchasing price of electricity. AF1 category means that more than 50 % (m/m) of feedstock per month must come from biogas crops²³. The rest of the input material must be represented by one of approved organic ecological ingredients, such as: cereal grain and oilseeds, grass material including other plant tissues, slops from the production of fermented spirits¹⁹ or intermediates of livestock production (manure, dung, dung water, separated slurry)²³⁻²⁵. If the requirements regarding input material are not fulfilled, the biogas station is classified as AF2, which results in lower purchase price of electrical energy²⁶. Suitable substrates for AF2 biogas stations can be characterized as waste (e.g. waste from the food, brewing, dairy, canning, sugar, and tobacco industry)^{23, 25}. The biogas stations which process animal waste are relatively specific and they follow European Notice 1774/2002²⁷.

Figure 3: Biogas stations (BGS) in Czech Republic (year 2012) (Published with permission of Czech Biogas Association²⁸)



The map of biogas stations (**Figure 3**) on websites of the Czech Biogas Association²⁸ shows that the agricultural biogas stations are more common than waste and industry biogas stations. Currently are in Czech Republic around 500 biogas plants. The precise number on the date July 31st 2013 was 487 biogas plants, of which 317 are agricultural, 7 municipal, 11 industrial, 55 on junkyard and 97 as parts of wastewater treatment plants. The fact that agricultural plants are more frequent can be explained with the purchase price of energy. The most common capacity of biogas station built in Czech Republic is around 1000kW, the highest capacity of biogas station is 3858 kW and the lowest is 47kW.²⁸ According to the Energy Regulatory Office (ERU), the purchase price is 4120 CZK/MWh in group AF1 and 3550 CZK/MWh in group AF2 (roughly 150 EUR/MWh in AF1 and 130 EUR/MWh in AF2, respectively; decision of ERU 2011)²⁹. It can be expected, that this imbalance will change due to the new Notice 1999/31/EC³⁰ on the waste landfill. This directive obligated member states to reduce the amount of

biodegradable waste going to landfill to 75% of weight of this type of waste produced in 1995 until 2010. Consequently, next reduction to 50% until 2013 and to 35% until 2020 is required³¹. For this reason a unification of those two categories of biogas stations can be expected. Expectable consequence is an increase of amount of digestate with different parts of ecological and waste feedstock and with various agriculture parameters.

2.3. Analysis of digestate composition during the fermentation process

Composition of digestate is obviously related to the nature of used feedstock and the circumstances of its genesis³². Digestate can be used as a fertilizer, but the initial registration in Central Controlling and Testing Institute of Agriculture in Prague is needed. Only if the digestate is produced solely from cattle manure (manure, slurry, etc.) or roughage (silage, haylage, hay, etc.), it is considered a fertilizer and can be used for personal use without any registration³³.

As mentioned in previous paragraph, analyses of feedstock are an important part of any proper operation of biogas system. Total dry matter content (total solid, % of weight) and content of organic solids in input material should be monitored for theoretical calculation of amount of organic substances decomposable by anaerobic fermentation. Stability of gasification process is endangered in materials where the content of organic nitrogen exceeds the limit of 10% of weight of organic solids, since microorganisms could be poisoned by free ammonia (commonly going with an unusual stink) and the pH value will change^{10, 24}. The pH of the material together with its buffering capacity is important parameter for good biogas production and therefore it is important to monitor pH of feedstock material before fermentation. For example animal faeces are rich in ammonia (more than 4 g.l⁻¹), so if animal faeces indicate low dry matter and potential threat of ammonia, it is necessary to mix them with energy-rich material^{6, 34}.

In this regard, plant materials with the C:N ratio of 20-100:1 should not cause problems. Pork slurry with C:N ratio 12 – 13:1, bone meal (meat-bone meal) with C:N ratio 4 – 7:1, blood with C:N ratio 3 – 4:1 and rapeseed slices with C:N ratio 8 – 12:1 could be on the other hand viewed as hardly gasifiable materials. For fully stabilized process the C:N ratio about 20 – 30:1^{10, 14, 24} appears to be optimal. The ratio of C:N can be adjusted by addition of plant substrate (straw, grass, etc.). Note however, that some kind of plant tissues with protein legumin (vegetable casein) contain more than 5% (m/m) of nitrogen are inappropriate for the C:N ratio adjustment. Another parameter influencing both the biogas yield and composition of digestate is the load of material into the biogas station³⁴. A smaller amount of feedstock is required in the first phase of fermentation. If the amount of feedstock material in batch is too big, the input solution is exceedingly acidified during acidogenesis and the reaction mixture becomes inappropriate for bacterial growth. Also, in such a case, the composition of digestate would not be optimal for its use as fertilizer, because it would contain poorly decomposed feedstock material and the pH would be too low (amount of CO₂) or too high (amount of NH₃) depending on feedstock composition^{10, 35, 36}. Besides, it is useful to monitor the content of easily degradable components (starch, lipids and proteins) and the amount of hardly degradable fiber. Furthermore, we can determine the content of macroelements in input mixture, which can be later found in the digestate. Main analyses of feedstock are shown in Table 1. Microelements such as Cd, Pb, Hg, As, Cr, Ni, Cu, Zn, Fe, Mn are not analysed in feedstock material, but only in digestate if using as fertilizer is planned^{32, 37}.

In **Table 1** standard analytical procedures (mostly Standard Operating Procedures, SOP) implementable by accredited laboratories are listed. Commonly they are done by specialized sites (e.g. laboratories of Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture of Czech Republic). Unfortunately, main analyses, do not provide any information about pollutants (pesticide etc.) or metabolites (animal, plant or microbial), that could form another compounds during biogas fermentation in (nearly) anaerobic conditions. It would be appropriate to put more effort into the analysis of input material.

Table 1: Parameters controlled in feedstock

Parameter	Symbol, unit	Indication of used method/basic principle	
Main parameters			
Dry matter content (total solid)	TS, % (m/m) in dry matter	SOP 32 (ČSN EN 12879)	drying, weighing
Combustible compounds	% (m/m) in dry matter	SOP 32 (ČSN EN 12879)	annealing, weighing
Total organic carbon	TOC, % (m/m) in dry matter	SOP 56 (ČSN EN 13370)	oxidation to carbon dioxide, spectrophotometry
Total carbon	CT, % (m/m) in dry matter	SOP 32 (ČSN EN 12879)	combustion, detection of CO ₂
Chemical oxygen demand	COD _{Cr} , mg.dm ⁻³	SOP 05 (TNV 757520)	titration with potassium dichromate
Acid neutralization capacity	ACN, mmol.dm ⁻³	SOP 50 (ČSN EN ISO 9963-1)	acidimetric titration
pH	-	SOP 44 (JPP ÚKZUZ, Brno)	potentiometry
Lipids	g.kg ⁻¹ in dry matter	SOP 66 (JPP ÚKZUZ, Brno)	extraction, solvent evaporation, weighing
Proteins	g.kg ⁻¹ in dry matter	O – 14	coagulation by Barnstein method, kjeldahlization
Starch	g.kg ⁻¹ in dry matter	C – 6	hydrolysis, polarimetry
Fibre	g.kg ⁻¹ in dry matter	SOP 64 (ČSN ISO 6541)	modified Scharrer method
Content of nutrients			
Total nitrogen	N _C , % (m/m) in dry matter	SOP 61 (JPP - ÚKZÚZ, Brno)	kjeldahlization
Ammoniac nitrogen	N _{NH4+} , mg.kg ⁻¹ in dry matter	SOP 65 (JPP - ÚKZÚZ, Brno)	distillation, titration/spectrophotometry
Nitrous nitrogen	N _{NO3-} , mg.kg ⁻¹ in dry matter	SOP 65 (JPP - ÚKZÚZ, Brno)	mineralization, spectrophotometry
Total phosphate	P _C , mg.kg ⁻¹ in dry matter	SOP 62 (JPP - ÚKZÚZ, Brno)	mineralization, spectrophotometry
Calcium	Ca, % (m/m) in dry matter	SOP 60 (JPP - ÚKZÚZ, Brno)	mineralization, AES
Potassium	K, % (m/m) in dry matter	SOP 60 (JPP - ÚKZÚZ, Brno)	mineralization, AES
Magnesium	Mg, % (m/m) in dry matter	SOP 60 (JPP - ÚKZÚZ, Brno)	mineralization, AAS
Total sulfur	S _T , mg.kg ⁻¹ in dry matter	SOP 94	mineralization, gravimetry as BaSO ₄

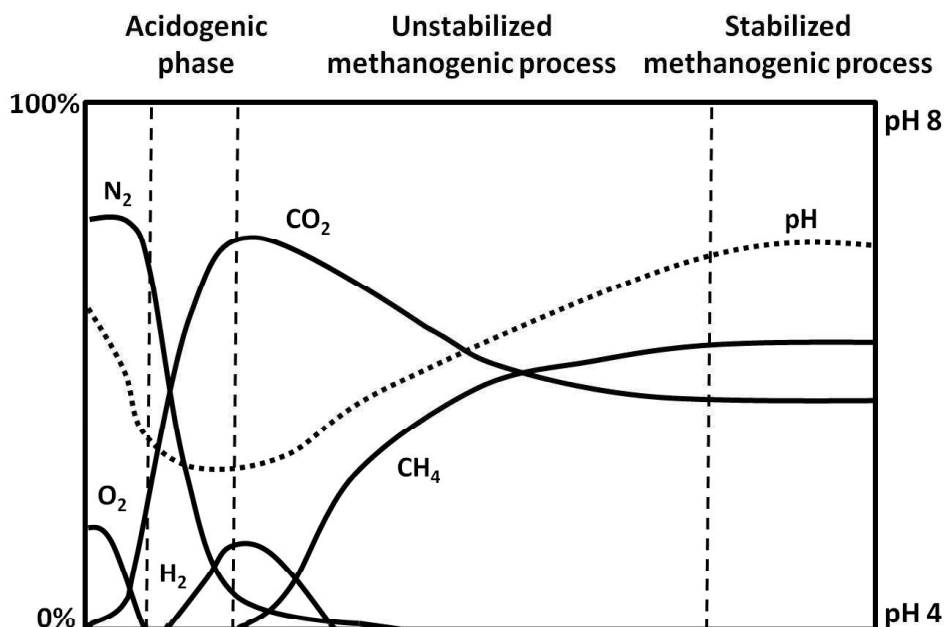
AES – atomic emission spectroscopy; AAS – atomic absorption spectroscopy

2.4. Analysis of gas phase during anaerobic fermentation

Analysis of gaseous compounds arising during fermentation is very important for maintaining of the biogas production in optimal conditions. Carbon dioxide and methane are two main gases in the internal atmosphere of the reactor. Figure 4 shows the rising of the amount of the gaseous components during anaerobic process and changes of pH. In the first phase of fermentation (hydrolysis) a very fast decrease of oxygen and nitrogen as main parts of air was observed. The amount of carbon dioxide increased with simultaneous decrease of pH. This process is still observed in acidogenic phase. In the final phase (methanogenesis) the content of methane escalates with simultaneous reduction of content of CO₂ and H₂. Then acidity of reaction mixture and content of carbon dioxide decreases (pH ≥ 7)^{38, 39}. Beside aliphatic, alicyclic and aromatic hydrocarbons, alcohols and thiols, aldehydes and ketones, esters, ethers, sulphides and disulphides, halogenderivatives of hydrocarbons (among them also environmental contaminants – PCBs, herbicides, pesticides, fungicides), amines and furan with its

derivatives were detected. All of these environmental pollutants were determined in digestate in laboratory using Membrane Biological Reactor (MBR)^{40, 41}. It is necessary to find appropriate analytical method for fast and cheap analyses of digestate and reactor atmosphere focus to main pollutants.

Figure 4: Composition of gases during digestion with changes of pH (published with permission of authors¹⁵)



Some of mentioned minor compounds are responsible for air contamination in the surroundings of biogas stations and to a certain extent also digestate. Kind of odour can roughly indicate functional groups present in volatile compounds as described elsewhere^{42 - 44}. Arising smell during anaerobic fermentation indicate inconvenient fermentation process. Main factors which influence production of biogas are feedstock material (slaughterhouse waste, sludge from sewage treatment plants, fats and blood from slaughterhouses) and time of fermentation. The formed digestate must be then stored in hermetic reservoir for stabilized and reduce smell. Another important tool for prevention of smell is bio-filter (limestone, ammonium sulphate, phosphate, microorganisms), which must be installed in every potential critical biogas plant⁴⁵.

Sampling of the gas samples around biogas stations is by itself an objective of extensive research. There are many comprehensive reviews dealing with different kinds of sample collection and analysis^{42, 44-48}. Among analytical techniques used gas chromatography and its combination with mass spectrometry represents the most common procedure^{46 - 47, 49}. Another procedure is based on Open-Path Fourier Transform Infrared Spectrometry (OP-FTIR)⁵⁰. Sensory evaluation of volatile compounds released from biogas systems is based on dynamic olfactometry (DO). Results are evaluated in Odour Units (ouE, European odour unit). This method is set by European Norm (EN 13725)^{51, 52}.

3. Constitution of digestate and its control

The knowledge of chemical composition of digestate is important for its future use. At present, the analytical control of digestate includes only main basic parameters which are demanded by related legislation. Main controlled items include agrochemical parameters (Total Carbon, COD_{Cr}, content of N, P, K, Ca, Mg, S, total solid)³² and content of some elements, especially metals (Cd, Pb, Hg, As, Cr, Ni, Cu, Zn, Fe, Mn) are usually determined using atomic absorption spectrometry (FA-AAS). Another methods for quantification of metals are inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-

AES), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS)^{32, 37}.

Electrothermic atomization – atomic absorption spectrometry (ETA-AAS) is standardized technique for speciation of arsenic (Norm EN ISO 15586)⁵³ and analysis of cadmium (Norm EN ISO 5961)⁵⁴. Atomic absorption spectrometry is a recommended method for determination of Mo, Zn, Pb, Cu, Ni (Norm ISO 8288)⁵⁵ and Cr (Norm EN 1233)⁵⁶. Determination of mercury is based on AMA analyzer (Advanced Mercury Analyzer) (Norm ČSN 757440)⁵⁷.

Other determined parameters are fat (gravimetric method; Norm ČSN 757509)⁵⁸, hydrolysable and extractable compounds, unhydrolysable rest of fibre and ash (Henneberg – Stohmann – Ruškovsky method)³⁴. The amount of microelements is varied and strongly depends on history of feedstock. Cu and Zn belong to hazardous elements in cow manure for instance. Copper appears in bovine manure in the form of copper sulphate usually used to clean hoofs⁵⁹. Zinc comes from zinc oxide used to adjust enteral microflora of cattle⁶⁰.

In some cases, the amount of chitin is determined in the input mixture. Chitin is an important component of wood, but it is very poorly degradable by methanogenic bacteria. Chemically it is a homopolymer of (1-4)-BN-acetyl-D-glucosamine. Decomposition to N-acetyl-D-glucosamine is carried out by two hydrolases – chitinase (EC 3.2.1.14) and N-acetyl-D-glucosaminidase (EC 3.2.1.52)⁶¹. Yasir et al. (2009)⁶² recently discovered that earthworms produce large amount of chitinase allowing increasing the degradability of chitin. Furthermore earthworms prevent the formation of pathogenic fungi. Obviously, it is possible to use compost as an additive for better decomposition of chitin to smaller organic substances.

It was also found that some pathogenic bacteria could survive in the digestate (e.g. *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Listeria monocytogenes*, *Giardia*)⁶³ and they can subsequently proliferate when the digestate is used as a soil fertilizer^{64, 65}. Microbial analysis is thus another required tool to control gasification process and subsequent use of digestate. Details of microbiological analyses exceed however the scope of this article. On the other hand, modern analytical chemistry offers analysis of biomarkers of the presence of some kinds of bacterial colonies⁶⁶.

Analysis of digestate includes mostly agrochemical parameters and hazardous elements (especially heavy metals). However, the question is what happens with particular organic compounds during anaerobic digestion. The compounds could react with each other or can be transformed during the gasification process. Those processes are undoubtedly subjects of future research (potential negative/positive effects of arising derivatives).

4. Physicochemical treatment of digestate for further use

Many agricultural biogas plants are part of the farms and the digestate they produce is used as a fertilizer. However, digestate contains relatively large amounts of nitrogen compounds, which could be accumulated on farms or fields, respectively. At the present time, the export of digestate to agricultural land is governed by appropriate directives – Law No.9/2009 Sb. (Czech Republic)⁶⁷ and Regulation 834/2007 (European Union)⁶⁸ and Directive 91/676/EEC (European Union)⁶⁹. Those laws protect aquatic ecosystems against pollution (eutrophication risk). The farmers are constraining to transport the digestate to distant places in order to avoid release of excessive macroelements (i.e. NH_4^+ and PO_4^{3-} first of all) from soil to phreatic water around biogas plants^{70, 71}. This is documented by an example from a biogas station located in Bavaria, close to Passau. This biogas station treats approximately 46,000 tons of bio-waste per year and produces about 15,000 tons of digestate per year. This huge amount of digestate cannot be exported to one location (field, meadow, etc.) and there is a need to modify it and export or sell it⁷². Digestate may contain up to 95% of water, which often has to be removed. Reason for this is to reduce transport costs and to save storage space. Excess of water can be removed using membrane filtration⁷³, reverse osmosis^{74, 75} or combination of mechanical (filtration) and thermal dewatering (stream of hot air)⁷⁶. Thanks to commercial availability of specific devices, these mentioned methods have been already utilized in Czech Republic. Another very often described thing is reduction of the content of unwanted elements in digestate⁷⁵. The first step is the separation of the liquid and the solid part of the digestate. This is usually made by flocculation using polyacrylamide. Flocculation can be

further supplemented with inorganic salts – optimally $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ and FeCl_3 ⁷⁶. Second method of separation involves capturing the solid components using emulsion or powder based polymers for flocculation then is used rotating drum for separation to two parts (solid and liquid). Solid material is remaining on rotating drum. The solid residue is pasteurized by high temperature, which kills all potentially pathogenic organisms. Then, the solid material is stabilized by conversion into an organic soil conditioner rich in phosphorus. The liquid residue still contains a large amount of potassium and inorganic nitrogen. Nitrogen can be converted using nitrifying-denitrifying bioreactor to N_2 ⁷⁵. More detailed description of the biological removal of nitrogen is provided in a publication of Henze et.al. (2002)⁷⁸. Briefly, the process of conversion of ammonia to gaseous nitrogen is divided into two steps. The first is the autotrophic nitrification, which involves the oxidation of NH_4^+ to NO_2^- and then to NO_3^- by nitrifying bacteria in an aerobic environment. The second step is heterotrophic denitrification, which leads to the reduction of NO_3^- to gaseous nitrogen (N_2) using denitrifying bacteria in an anaerobic environment with organic carbon as electron donor (methanol was used in this case)⁷⁸.

As an alternative way, anaerobic oxidation of NH_4^+ can be used for biodegradation of nitrogen without organic carbon served as an electron donor. Autotrophic anaerobic bacteria oxidize NH_4^+ -N (electron donor) to N_2 , where NO_2^- -N is an electron acceptor⁷⁹. There are remaining macroelements in the liquid after removal of surplus nitrogen. The most effective method for preconcentration of these nutrients is a membrane filtration^{73, 80}. The concentrate is usable as a high nutrition fertilizer. Another option is to use reverse osmosis^{73, 76, 81, 82}.

Next very important indicator of the quality of digestate is the chemical oxygen demand (COD). COD helps us to specify the amount of organic components in the digestate. Organic substances are decomposed during anaerobic fermentation. If the COD parameter is very low at the end of the fermentation process, it means that gasification run with a high efficiency. To reduce the COD in the digestate, Gong, Li and Liang (2010) suggested applying consecutive aerobic fermentation of the digestate. Digestate is pumped from the anaerobic digester to an aerobic digester where it is fermented again. This fermentor is equipped by a membrane module for the removal of NH_4^+ and PO_4^{3-} ions from the fermented digestate. After 120 days of total fermentation process (anaerobic-aerobic-membrane fermentation), the amount of NH_4^+ ion is reduced to 1.9 %, the amount of PO_4^{3-} to 23.4 %, and chemical oxygen demand decreased to 3.7 % of total amount. The modified digestate can be applied to agricultural land in large quantities, because there is no problem with transcending the limits of nutrients⁸³.

Detailed comparison of various methods for treatment of digestate is described by Rehl and Müller (2011)⁷¹. Especially composting process deserves a proper attention and it is commented here in more details. The process can be in principle divided into three parts – mechanical pretreatment, composting and treatment of the solid rest. Mechanical pretreatment uses flocculation with polyacrylamide and a centrifugal force is applied for separation of liquid and solid parts. Separation to liquid-solid parts is commonly used as a physical pre-treatment of animal waste. The liquid phase is used as liquid fertilizer. However, if the liquid fraction is low in nutrients, the target area would not be fully supplied with macroelements. Increasing the amount of sprayed liquid fraction could be a solution to this but the concentration of unwanted microelements and compounds could then increase above their emission standard. Solid phase is stored for 10 weeks in closed system assigned for composting. Solid matter is aerated by stirring. After the termination of the composting process, the material can be transported in open boxes to the field or to the warehouse^{84–88}.

In some cases, the digestate contains large amount of ammonia which is released to atmosphere. This represents an environmental problem since ammonia belongs to greenhouse gases, negatively affecting atmosphere. A possible solution to reduce the level of ammonia in the digestate is suggested by Maurer and Müller (2012)⁷⁰. Their technology combines classical glasshouse and solar heater which heats the digestate from biogas station (hybrid waste-heat/solar dryer). In the glass house a conversion of NH_3 to N_2 due to sunlight occurs. The process of reducing ammonia was monitored by Fourier transform infrared spectrometry. The final dried digestate contained around 35% of water and minimum of ammonia and can be directly apply on the field or transport to the place of need^{89, 90}. Another method is based on separation mixture on solid and liquid part using a decanter. The solid component is immediately used as a fertilizer after separation. The liquid phase is then heated, and when liquid starts

boiling, a hot sulphuric acid is added to remove CO₂ and reduce pH (final pH ranges from 4.4 to 4.8). The acidified liquid containing NH₄⁺ cation can be then used as fertilizer. The negative effect of this method is significant emission of carbon dioxide representing important component of greenhouse gas⁷¹. Czech biogas station in Plevnice is using a combination of mentioned method for reduction of the amount of ammonia. Briefly, the digestate is separated into solid and liquid part using centrifugation and then is liquid part distilled for removing of ammonia and arising ammonia is absorbed in CO₃ solution. Liquid and solid part is used as fertilizer.

Interesting idea for the use of digestate is described in a paper of Kratzeisen et al. (2010)⁹¹. Authors mention utilization of the digestate as a fuel in the form of pellets. However, the process of combustion as already mentioned is strongly influenced by the quality of input mixture (presence of heavy metals, hardly degradable organic substances etc.). The necessity of appropriate analytical control before and during the production of pellets is obvious. Authors analysed heavy metals in digestate using two techniques with inductively coupled plasma: ICP-OES for potassium and ICP-MS for As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn. These two methods are recommended by German National Norm DIN 38406-22⁹² and Norm DIN 38406-29⁹³. Two digestates were studied: digestate 1. contained 50 % of maize silage, 40 % of grass and grass silage and 10% of potatoes. Digestate 2. contained of 81 % of maize silage, 9 % of sugar sorghum, 7% of poultry manure and 3 % of corn cob mix. The concentration of As, Pb, Cd, Hg, Tl in the ash was under threshold value. In digestate 2 the content of Ni was 3.5 time higher (285 mg.kg⁻¹) than threshold value defined by German National Norms. The concentration of Cr also exceeded appropriate threshold value in both digestates (76 mg.kg⁻¹ for digestate 1; 184 mg.kg⁻¹ for digestate 2)⁹¹. Another way for determination of composition of ash from pellets is X-ray fluorescence (XRF). Hirokawa et al. (2013)⁹⁴ compared AAS and XRF for analysis of 5 metals (Co, Ni, Pd, Ag, Au). These methods were compared using a sample of ash enriched with standards of the above metals. The X-ray fluorescence shows greater results of those metals except cobalt than AAS. Those differences were due to their incomplete decomposition using aqua regia⁹⁴. Note, the production of pellets from digestate in Czech Republic is only fractional that up to now and its progress (including technology) is question of future development.

5. Conclusion

Production of biogas is fast-growing branch allowing efficient and ecological waste treatment and production of a relatively cheap energy. This mini-review covers various aspects of biogas plants operation including feedstock control and adjustment, description of processes in reactor and ways to optimize gas production. Main attention is paid to the process of digestate formation, analytical control of its composition, possibilities of its treatment and safe use. Although digestate is routinely characterized by non-specific parameters and content of macro-components is relatively well known, many processes remained unresolved and hopefully they become subject of systematic research.

Acknowledgements

Authors thank to Operational Program Research and Development for Innovations – European Social Fund [project CZ.1.05/2.1.00/03.0058], Operational Program Education for Competitiveness – European Social Fund [project CZ.1.07/2.2.00/28.0029] and Palacky University Olomouc [project IGA_PrF_2014031] for financial support.

References

1. Meynell, P.-J., *Methane: Planning a Digester*. Schocken Books, New York 1976.
2. McCabe, J.; Eckenfelder, W., *Biological Treatment of Sewage and Industrial Wastes*. Reinhold Publishing. New York (1957).
3. Challenger, F. et al, J. Chem. Soc., 95 – 101, (1933).
4. Bryant, M.P. Methane-Producing Bacteria (part 13) Bergey's Manual of determinative Bacteriology. 8 ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA (1974).
5. Kára, J., Pastorek, Z. and Příbyl, E., *Výroba a využití bioplynu v zemědělství*. VÚZT, v.v.i., Praha-Ruzyně (2007).
6. Dohanyos M., *Principy tvorby bioplynu na skládce a v bioplynových stanicích – teoretické základy anaerobní fermentace*, in: Konference bioplyn a bioplynových stanice, GAS s.r.o. – EKOLOGIE spol. s.r.o., Praha (2008).
7. Pospíšil, L., *Výzkum „suché“ anaerobní fermentace různých druhů biomasy za účelem výroby bioplynu*. [online] Biom.cz: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/vyzkum-suche-anaerobni-fermentace-ruznych-druhu-biomasy-za-ucelem-vyroby-bioplynu> (2014-04-10).
8. Archer, D.B., Robertson, J.A., and Peck, M.W. *The Microbiology and Biochemistry of Biogas Production from Solid Wastes*, in Landfill Gas and Anaerobic Digestion of Solid Waste, Harwell Lab., Oxfordshire, (1988).
9. Archer, D.B. and Peck, M.W., Microbiol. Extr. Environ. Pot. for Biotech., 49, 187 – 204, (1989).
10. Li, Y.B., Park, S.Y. and Zhu, J.Y. Renewable Energy Environ. Sustainable Dev., 15(1), 821 – 826, (2011).
11. Archer, D.B. and Kirsop, B.H. The Microbiology and control of anaerobic digestion, in A Waste Treatment Technology, E.A. Sci., Editor. pp. 43 – 92, London (1990).
12. Balch, W.E., Fox, G.E., et al., Microbiol. Rev., 43(2), 260 – 296, (1979).
13. Touzel, J. P., Prensier, G. et al., Int. J. Syst. Bacteriol. 38(1), 30 – 36, (1988).
14. Heinedobbernack, E., Schoberth, S. M. et al., Appl. Environ. Microbiol., 54(2), 454 – 459, (1988).
15. Straka, F., a kol, *BIOPLYN příručka pro výuku, projekci a provoz bioplynových systémů*. 2. ed., GAS, Praha (2006).
16. Guiot, S.R., Cimpioia, R. and Carayon, G., Environ. Sci. Technol., 45(5), 2006 – 2012, (2011).
17. Sukahan, Product Biogas yield catalyst ZH1001 methanogenic bacteria, www.sukahan.en.alibaba.com
18. Baktoma, Product APD Bio Gas: www.baktoma.cz
19. Babicka, L., et al. Listy Cukrov. Reparske, 126(3), 106 – 109, (2010)
20. Notice 482/2005 Sb. from date 21. December 2006 about determination of the types and the use of biomass for electricity generation, Czech Republic: www.eagri.cz
21. Notice 5/2007 Sb. from date 2. December 2005 about determination of the types and the use of biomass for electricity generation, Czech Republic: www.eagri.cz
22. Notice 477/2012 Sb. from date 20. December 2012 about determination of the types and the use of biomass for electricity, heat and biomethan generation, Czech Republic: www.eagri.cz
23. Švec, J., and Nelibová, B. *Právní předpisy vztahující se k výstavbě a provozu BPS*. in sborník příspěvků: Využití obnovitelných zdrojů energie v zemědělství, zemědělské bioplynové stanice 2010, Chrudim (2010).
24. Babicka, L. and Poustková, I., Listy Cukrov. Reparske, 125(9 – 10), 277 – 280, (2009).
25. Habart, J., *V čem se liší zemědělská a komunální bioplynová stanice – zamyšlení u příležitosti otevření bioplynové stanice v Krásné Hoře a Vysokém Mýtě*. [online] Biom.cz: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/v-čem-se-liši-zemedelska-a-komunalni-bioplynova-stance-zamysleni-u-prilezitosti-otevreni-bioplynové-stance-v-krasne-hore> (December 4, 2012).
26. Dvořáček, T., et al. *Výstavba komunálních bioplynových stanic s využitím BRKO*, Státní fond životního prostředí ČR, Praha (2009).
27. Notice 1774/2002 from date 3. October 2002 about laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption, European Union: <http://eur-lex.europa.eu>
28. CZBA – Czech biogas association, <http://www.czba.cz/>. (June 30, 2012)

29. ERU (2011) The substantiation of the proposed changes to the draft of pricing decision of the Energy Regulatory Office, for support of electricity from renewable energy sources, combined heat and power production and secondary energy sources for year 2012. <http://www.eru.cz/> (January 17, 2012).
30. Notice 1999/31/EC from date 26.April 1999 the landfill of waste, European Union: <http://eur-lex.europa.eu>
31. Hřebíček, J., Hejč, M., Piliar, F. and Zhylytsova, J., Nakládání s biologicky rozložitelným odpadem v ČR pro zabezpečení plnění cílů Směrnice Rady 1999/31 ES z 26. dubna 1999 o skládkách odpadů. DEKONT INTERNATIONAL, s.r.o., Brno (2007).
32. Váňa, J. *Využití digestátů jako organického hnojiva*. [online] Biom.cz: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/vyuziti-digestatu-jako-organickeho-hnojiva> (December 04, 2012)
33. Smatanová, M., Zemědělec, XX(18), 21 – 22, (2012).
34. Váňa, J., Usták S., *Využití odpadů a surovin ze zemědělského provozu k výrobě bioplynu*, in. Sborník příspěvků: Využití obnovitelných zdrojů energie v zemědělství, zemědělské bioplynové stanice. 2010, Chrudim (2010).
35. Kratochvílová Z., et al., *Průvodce výrobou a využitím bioplynu*, CZ Biom – České sdružení pro biomasu, Praha (2009).
36. Puyuelo, B., et al., *Chemosphere*, 85(4), 653 – 659, (2011).
37. Kimbrough, D.E. and Wakakuwa, J., *Analyst*, 119(3), 383 – 388, (1994).
38. Rees, J.F., *J. Chem. Tech. and Biotech.*, 30(4), 161 – 175, (1980).
39. Bičáková, O. and Straka, P. *Int. J. Hydrogen Energy*, 37(16), 11563 – 11578, (2012).
40. Bertin, L., et al., *J. Hazardous Mat.*, 186(2-3), 2060 – 2067, (2011).
41. Christiansen, N., et al., *Water Sci. Technol.*, 31(1), 249 – 259, (1995).
42. Gostelow, P., et al., *Sci. Tech. Rep. No.17*, IWA Publ. London (2003).
43. Hobbs, P.J., et al., *J. Agricultural Eng. Res.* 72, 291 – 298, (1999).
44. Walker, J.C., The performance of the human nose in odour measurement. Proc. 1st IWA Int. Conf. on Odour and VOC's measurement, regulation and control techniques. Univ. NSW Sydney Australia, 25. – 28.3., (2001).
45. CZ Biom, Odborné stanovisko sekce Bioplyn k problematice zápachu z bioplynových stanic. [online] Biom.cz: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/odborne-stanovisko-sekce-bioplyn-k-problematice-zapachu-z-bioplynovych-stanic>, (August 20, 2014)
46. Kim, K. H. and Kim D., *Microchem. J.*, 91(1), 16 – 20, (2009).
47. Trabue, S., Kerr, B., et al., *J. Environ. Qual.*, 40(5), 1510 – 1520, (2011).
48. Kim, K. H., Anthwal, A. et al., *Microchim. Acta*, 170(1-2), 83 – 90, (2010).
49. Parker, D.B., Perschbacher-Buser, Z.L., Cole, N.A. and Koziel, J.A., *Sensors*.10(9), 8536 – 8552, (2010).
50. Tsao, Y.-C., et al., *Sci. Total. Environ.*, 409(17), 3158 – 3165, (2011).
51. Senante, E., Martel, J.L. and Bruchet, A. *Environ. Odour Manag.*, 1850, 83 – 90, (2004).
52. Akdeniz, N., Jacobson, L. D., et al., *Trans. Asabe*, 55(6), 2347 – 2356, (2012).
53. Norm EN ISO 15586 from date 1.August 2004 about water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace, www.iso.org
54. Norm EN ISO 5961 from date 1.February 1996 about water quality – Determination of cadmium by atomic absorption spectrometry: www.iso.org
55. Norm EN ISO 8288 from date 1.February 1995 about water quality – Determination of cobalt, nickel, zinc, cadmium and lead. Flame atomic absorption spectrometric methods: www.iso.org
56. Norm EN 1233 from date 1.November 1997 about water quality – Determination of chromium – Atomic absorption spectrometric methods, European Union: <http://eur-lex.europa.eu>
57. Norm ČSN 757440 from date 1.April 2009 about water quality – Determination of total mercury by thermal decomposition, amalgamation and atomic absorption spectrometry, Czech Republic: <http://csnonline.unmz.cz>
58. Norm ČSN 757509 from date 1.May 2008 about Water quality – Determination of grease and oils in waste water – Gravimetric method following sample evaporation, Czech Republic: <http://csnonline.unmz.cz>

59. Teixeira, A.G.V., et al., *J. Dairy Sci.*, 93(8), 3628 – 3634, (2010).
60. Cunha de, L.F.C., et al., *Semina-Ciencias Agrarias*, 30(2), 435 – 440, (2009).
61. Chen, G.Y., et al., *Waste Manag.*, 30(10), 1834 – 1840, (2010).
62. Yasir, M., et al., *Biores. Technol.*, 100(19): p. 4396 – 4403, (2009).
63. Sidhu, J.P.S. and Toze, S.G., *Environment Intern.*, 35(1), 187 – 201, (2009).
64. Estrada, I.B., et al. *Biores. Technol.*, 93(2), 191 – 198, (2004).
65. Johansson, M., et al., *Grass Forage Sci.*, 60(2), 175 – 185, (2005).
66. Havlíček, V., Lemr, K. et al., *Current Trends in Microbial Diagnostics Based on Mass Spectrometry. Anal. Chem.*, 85(2), 790 – 797, (2012).
67. Law 9/2009 Sb. from date 12. December 2008 about Fertilizers, Czech Republic: www.eagri.cz
68. Regulation 834/2007 from date 28. June 2007 about organic production and labelling of organic products and repealing, European Union: <http://eur-lex.europa.eu>
69. Directive 91/676/EC from date 12. December 1991 concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources, European Union: <http://eur-lex.europa.eu>
70. Maurer, C. and Muller, J., *Eng. Life Sci.*, 12(3), 321 – 326, (2012).
71. Rehl, T. and Muller, J., *Resour., Conserv. Recycl.*, 56(1), 92 – 104, (2011).
72. Bačík, O. *Komunální bioplynová stanice u Passau v Bavorsku*. [online] [Biom.cz](http://biom.cz): <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/komunalni-bioplynova-stanice-u-passau-v-bavorsku> (December 7, 2012)
73. Masse, L., Masse, D.I. and Pellerin, Y., *Biosys. Eng.*, 98(4), 371 – 380, (2007).
74. Thorneby, L., Persson, K. and Tragardh, G., *J. Agricul. Eng. Res.*, 73(2), 159 – 170, (1999).
75. Vaneeckhaute, C., et al., *Water, Air, Soil Pollut.*, 223(4), 1593 – 1603, (2012).
76. Mihoubi, D., *Desalination*, 167(1-3), 135 – 139, (2004).
77. Hjorth, M., et al., *Agron. Sustainable Dev.*, 30(1), 153 – 180, (2010).
78. Henze, M., et al. *Wastewater treatment: biological and chemical processes*. Springer, Berlin, (2002).
79. Vandegraaf, A.A., et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(4), 1246 – 1251, (1995).
80. Kertesz, S., et al. *Desalin. Water Treat.*, 14(1-3), 233 – 238, (2010).
81. Kucera, J. *Reverse Osmosis: Design, Processes, and Applications for Engineers*. Wiley-Scrivener, Hoboken, New Jersey, (2012).
82. Roeper, H., et al., *Integrated concept for decentralized wastewater and biowaste treatment – Experiences at the pilot plant stage.*, in *Eleventh International Waste Management and Landfill Symposium 2007*, CISA Publisher, Italy, (2007).
83. Gong, W.J., Li, W.Z. and Liang, H., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 85(10), 1334 – 1339, (2010).
84. Tiquia, S.M., Richard, T.L. and Honeyman, M.S., *Nutr. Cycling Agroecosyst.*, 62(1), 15 – 24, (2002).
85. Amlinger, F., Peyr, S. and Cuhls, C., *Waste Manag. Res.*, 26(1), 47 – 60, (2008).
86. Clift, R., Doig, A. and Finnveden, G., *Process Saf. Environ. Prot.*, 78(B4), 279 – 287, (2000).
87. Ekvall, T. and Finnveden, G., *Process Saf. Environ. Prot.*, 78(B4), 288 – 294, (2000).
88. Fricke, K., Santen, H. and Wallmann, R., *Waste Manag.*, 25(8), 799 – 810, (2005).
89. Vaxelaire, J., et al. *Water Res.*, 34(17), 4318 – 4323, (2000).
90. Seginer, I., Ioslovich, I. and Bux, M. *Drying Technol.*, 25(1-3), 401 – 415, (2007).
91. Kratzeisen, M., et al. *Fuel*, 89(9), 2544 – 2548, (2010).
92. Norm DIN 38406-22 from date May 1988: German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; cations (group E); determination of Ag, Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, Si, Sn, Sr, Ti, V, W, Zn and Zr by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, Germany: <http://www.beuth.de>
93. Norm DIN 38406-29 from date May 1999 German standard methods for the examination of water, waste water and sludge – Cations (group E) – Part 29: Determination of 61 elements by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), Germany: <http://www.beuth.de>
94. Hirokawa, Y., Shibata, Y. et al. *X-Ray Spectrom.* 42(3), 134 – 140, (2013).

Bioplynový systém a možnosti kontroly a využití digestátu v České republice: Review

Lukáš KUČERA, Petr BEDNÁŘ *

Regionální centrum pokročilých technologií, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 779 00, Olomouc, Česká republika; e-mail: petr.bednar@upol.cz

Souhrn

Anaerobní fermentace je jednou z vhodných metod pro zpracování ekologického odpadu za současné produkce levné elektrické a termální energie. Podle současné legislativy můžeme bioplynové stanice (BPS) rozdělit na tři základní skupiny – zemědělské, odpadové a průmyslové. Zemědělské bioplynové stanice patří k nejrozšířenějším v České republice z důvodů jejich umístění v blízkosti velkochovů zemědělských zvířat (převážně chov skotu a vepřů). Další z důvodů tak velkého rozšíření zemědělských BPS je vyšší výkupní cena energie ve srovnání s odpadovými bioplynovými stanicemi.

V budoucnu můžeme očekávat srovnání tohoto cenového rozdílu v souvislosti s plánovanou výstavbou odpadových bioplynových stanic, aby došlo k naplnění nové evropské směrnice 1999/31EC, podle níž musí dojít ke snížení vývozu biologicky rozložitelného odpadu na skládky do roku 2020 na 35 %. Je tedy nutné hledat nové postupy ke zpracovávání tohoto druhu odpadu a odpadové bioplynové stanice jsou jednou z možností. S tímto nárůstem odpadových BPS můžeme očekávat vyšší produkci digestátu.

V současnosti je analýza digestátu zaměřena pouze na základní parametry, jako je celkový uhlík, chemická spotřeba kyslíku, obsah N, P, K, Ca, Mg, S a sušiny a obsah některých těžkých kovů (Cd, Pb, Hg, As, Cr, Ni, Cu, Zn, Fe, Mn), které jsou důležité pro jeho použití jako hnojiva či paliva v podobě pelet. Anaerobní fermentací odpadu může docházet k obohacování digestátu látkami, které mohou být polutanty životního prostředí. Bylo by tedy vhodné rozšířit kontrolu digestátu o např. pesticidy, polychlorované bifenoly, herbicidy a fungicidy.

Tento přehledový článek si klade za cíl popsat postupy využití a analytické kontroly digestátu s ohledem na historii a současnost bioplynových stanic v České republice a v kontextu právních předpisů Evropské Unie.

Klíčová slova: bioplynový systém, digestát, fermentace, anaerobní, methanogenní bakterie, kontrola digestátu, použití digestátu

Analysis of degradation products of anthocyanin dyes using LC/MS

Lukáš Kučera*, Ondřej Kurka, Petr Bednář

*RCPTM, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University,
17. listopadu 12, 77146 Olomouc*

e-mail: lukaskucera@volny.cz

Introduction

Anthocyanins are water soluble dyes, which are responsible for color of plant tissues. Those natural pigments belong to the group of flavonoids. Beside their use as safety food colorants, they have many positive effects on human health¹. The stability of anthocyanins is strongly influenced by many factors such as pH, temperature, concentration, presence of oxygen or enzymes, irradiation, etc.²

Anthocyanins are sensitive to food production technology and storage conditions. Therefore concentration profile of those dyes and their degradation products reflects insufficient manipulation with food. Products of anthocyanin degradation involves cleavage of sugar moiety and consequent formation of phenolic acids (i.e. protocatechuic, p-hydroxybenzoic, 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoic, syringic, vanillic and gallic acid depending on B-ring substitution of anthocyanin) and phloroglucinaldehyde³. Those compounds can be considered as potential markers of food quality (e.g. controlling of winemaking technology and/or wine storage). The aim of the contribution is to investigate the processes of anthocyanin degradation in detail by means of combination of liquid chromatography with high resolution tandem mass spectrometry.

Experimental

Mass spectrometer:

Q-TOF Premier (Waters, Milford, USA), equipped with electrospray (Z-spray).

Chromatographic systems:

HPLC Smartline (Knauer, Germany) equipped with columns Gemini C18 110A (150 x 2.0 mm, dp = 5 μm, Phenomenex, USA), Kinetex 2.6 μ C18 100A (100 x 2.1 mm, dp = 2.6 μm (porous layer 0.5 μm), Phenomenex, USA) and Ascentis Express C18 (100 x 2.1 mm, dp = 2.7 μm (porous layer 0.5 μm), Sigma-Aldrich); mobile phase A: 0.1% HCOOH in water; B: 0.1% HCOOH in methanol (v/v).

UPLC Acquity (Waters, USA) equipped with Ascentis Express C18; mobile phase A: 0.1% HCOOH in water; B: 0.1% HCOOH in methanol (v/v). Gradient elution: A: 0-4.28 min 20 % B, 4.28-7.85 min 20 – 60 % B, 7.85-13.56 min 60 % B, 13.56-14.99 min 60-20 % B, 14.99-22.13 min. 20 % B.

Preparation and purification of mixture of phenolic acid and phloroglucinaldehyde:

One milligram of each standard was dissolved in 1 ml 1% HCOOH in water (v/v) and diluted on concentration 10 mg/l. Standards of vanillic, gallic, p-hydroxybenzoic, syringic and protocatechuic acid and phloroglucinaldehyde were used for method development.

Preparation of a model solution of anthocyanins and phloroglucinaldehyde:

0.5 mg of each standard (i.e. cyanidin chloride, malvidin-3-galactoside chloride and phloroglucinaldehyde) was dissolved in 0.9 mL of methanol and divide on three parts. Then each aliquot part of standard solution was dried up using fine stream of nitrogen and dissolved in appropriate solvent (pH 1, 3.5 or 7).

Results

First part of the study involved development of HPLC method with UV/VIS detection. Separation selectivity and efficiency towards standard mixture of six commercially available phenolic acids and phloroglucinaldehyde was tested on three chromatographic reversed-phase columns – one fully porous column Gemini C18 and two core-shell columns Kinetex C18 and Ascentis Express C18. The best results described by resolution of critical pairs and COF function⁴ were achieved using core-shell column Ascentis Express C18. This column was used for consequent experiments.

Then, optimized LC system was hyphenated with mass spectrometer (Q-TOF Premier) and used for study of degradation of anthocyanins. Relatively fast decomposition of anthocyanin was observed when solutions were heated mimicking hot maceration involved in some winemaking processes. More than 90 % of anthocyanin content was decomposed in one hour. Concurrently rising of content of phenolic acids was observed (i.e. syringic acid in case of malvidin-3-galactoside and protocatechuic acid in case of cyanidin). Beside phenolic acids also a content of phloroglucinaldehyde was followed, however, the changes of its concentration are not straightforward and reproducible during repeated experiments. Thus the fate of phloroglucinaldehyde was studied in detail.

Standard of phloroglucinaldehyde was heated in various pH (1, 3.5, 7). A pronounced decrease of its content was observed after one hour of heating. In strongly acidic solution (pH 1) the amount of phloroglucinaldehyde decreased in 82.5 % of original content. At less acidic solution (pH 3.5), which is typical pH for young wine, decomposition of phloroglucinaldehyde was not observed at all. Very fast decrease of phloroglucinaldehyde in neutral solution (buffered, pH 7) was observed (after one hour of heating the amount of phloroglucinaldehyde decreased in 34.9 % of original content).

Conclusion

Our experiments show that fast degradation of anthocyanin occurs when their solutions are heated. During the decomposition increase of concentration of appropriate phenolic acids was observed. Concentration of phloroglucinaldehyde during heating process is not reproducible and its using as a marker for food quality control is questionable. Identification of products of phloroglucinaldehyde decomposition and study of real wine degradation is now in progress.

Acknowledgement

Authors thank to Grant Agency of Czech Republic (GAČR P206/10/0625), Ministry of Education Youth and Sports of Czech Republic (project CZ.1.05/2.1.00/03.0058, Operational Program Research and Development for Innovations – European Social Fund) and Palacky University (project No.: PrF_2012_020) for financial support.

References

1. E. F. Gris, E. A. Ferreira, L. D. Falcao and M. T. Bordignon-Luiz, *Food Chem.* 2007, 100, 1289-1296.
2. A. Castaneda-Ovando, M. D. Pacheco-Hernandez, M. E. Paez-Hernandez, J. A. Rodriguez and C. A. Galan-Vidal, *Food Chem.* 2009, 113, 859-871.
3. E. Sadilova, F. C. Stintzing and R. Carle, *J. Food Sci.* 2006, 71, C504-C512.
4. J. Churáček, et. al. *Analytická separace látek*, SNTL, Praha, 1990.

Analysis of degradation products of anthocyanin dyes

Lukáš Kučera, Ondřej Kurka, Petr Bednář

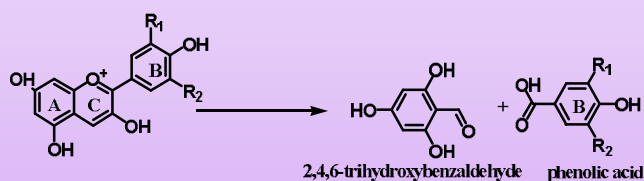
Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky Olomouc, 17. listopadu, 771 46, Olomouc

lukas.kucera@

Introduction

Anthocyanins are water soluble dyes, which are responsible for color of plant tissues. Those natural pigments belong to the group of flavonoids. Beside their use as safety food colorants, they have many positive effects on human health¹. The stability of anthocyanins is strongly influenced by many factors such as pH, temperature, concentration, presence of oxygen or enzymes, irradiation, etc.² Therefore concentration profile of those dyes and their degradation products reflects insufficient manipulation with a food and its storage. Products of anthocyanin degradation involves cleavage of sugar moiety and consequent formation of phenolic acids (i.e. protocatechuic, p-hydroxybenzoic, 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoic, syringic, vanillic and gallic acid depending on B-ring substitution of anthocyanin) and phloroglucinaldehyde³ (fig. 1). Those compounds can be considered as potential markers of food quality (e.g. controlling of winemaking technology and/or wine storage). The aim of the contribution is to investigate the processes of anthocyanin degradation in detail by means of combination of liquid chromatography with high resolution tandem mass spectrometry

Figure 1: Degradation of anthocyanin



Experimental

Chromatographic systems:

HPLC Smartline (Knauer, Germany) equipped with columns Gemini C18 110A (150 x 2.0 mm, dp = 5µm, Phenomenex, USA), Kinetex 2.6µ C18 100A (100 x 2.1 mm, dp = 2.6µm (porous layer 0.5 µm), Phenomenex, USA) and Ascentis Express C18 (100 x 2.1 mm, dp = 2.7 µm (porous layer 0.5 µm), Sigma-Aldrich); various mobile phases and gradient were used, but the best results were observed with mobile phase A: 0.1% HCOOH in water; B: 0.1% HCOOH in methanol (v/v) and gradient elution: 0-5 min 20 % B, 5-10 min 20 – 60 % B, 10-18 min 60 % B, 18-20 min 60-20 % B.

UPLC Acquity (Waters, USA) equipped with Ascentis Express C18; the same mobile phase was used as previously. Gradient elution: 0-4.28 min 20 % B, 4.28-7.85 min 20 – 60 % B, 7.85-13.56 min 60 % B, 13.56-14.99 min 60-20 % B, 14.99-22.13 min 20 % B.

Mass spectrometers:

Q-TOF Premier (Waters, USA), electrospray ionization (Z-spray)
Ion trap LCQ Deca (Thermo Fisher Scientific, USA), electrospray

Preparation of a model solution of anthocyanins and phloroglucinaldehyde:

0.5 mg of each standard (i.e. cyanidin chloride, malvidin-3-galactoside chloride and phloroglucinaldehyde) was dissolved in 0.9 mL of methanol and divided into three parts. Then each aliquot part of standard solution was dried up using fine stream of nitrogen and dissolved in appropriate solvent (pH 1, 3.5 or 7).

Preparation of anthrachryson (1,3,5,7-tetrahydroxy-anthraquinone):

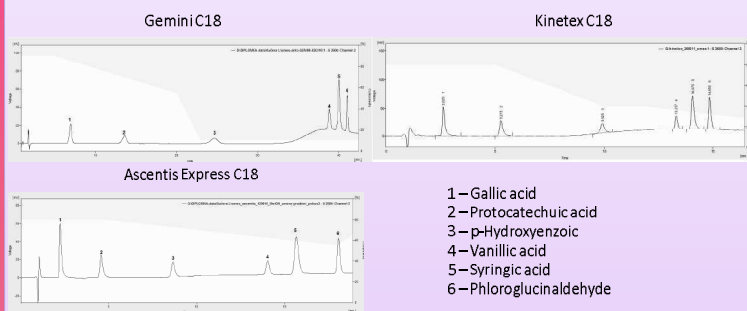
Anthrachryson was prepared using modified method described by Briggs and Nicholls in 1951⁴. Briefly: Solution of m-hydroxybenzoic acid and 3,5-dihydroxybenzoic acid was heated with concentrated H₂SO₄ for one hour (100°C). Next day the solution was heated for 10 minutes and poured into boiling water. The green precipitate was dissolved in aqueous NaOH and reprecipitated from hot solution using glacial CH₃COOH. Product of this reaction was dissolved in acetone and separated on column chromatography (silicagel as stationary phase). Orange band was isolated and dried using fine stream of nitrogen

Results and discussion

Method development

First part of the study involved development of HPLC method with UV/VIS detection. Separation selectivity and efficiency towards standard mixture of six commercially available phenolic acids and phloroglucinaldehyde was tested on three chromatographic reversed-phase columns – one fully porous column Gemini C18 and two core-shell columns Kinetex C18 and Ascentis Express C18 (fig. 2). The best results described by resolution of critical pairs and COF function⁵ were achieved using core-shell column Ascentis Express C18. This column was used for consequent experiments.

Figure 2: Chromatograms of analysis of standards mixures using three chromatographic



Study of degradation processes

Then, optimized LC system was hyphenated with mass spectrometer (Q-TOF Premier) and used for study of degradation of anthocyanins. Relatively fast decomposition of anthocyanin was observed when solutions were heated mimicking hot maceration involved in some winemaking processes. More than 90 % of anthocyanin content was decomposed in one hour (Fig. 3 and 4), rising of content of phenolic acids was observed (i.e. syringic acid in case of malvidin-3-galactoside and protocatechuic acid in case of cyanidin) (Fig. 5 and 6). Beside phenolic acids also a content of phloroglucinaldehyde was followed, however, the changes of its concentration are not straightforward and reproducible during repeated experiments. Thus the fate of phloroglucinaldehyde was studied in detail.

Figure 4: Reconstructed chromatograms for m/z 285 (cyanidin)

Figure 5: Reconstructed chromatograms for m/z 491 (malvidin-3-galactoside)

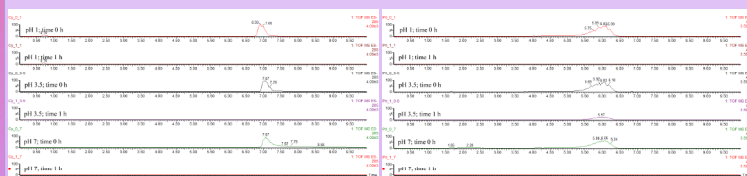
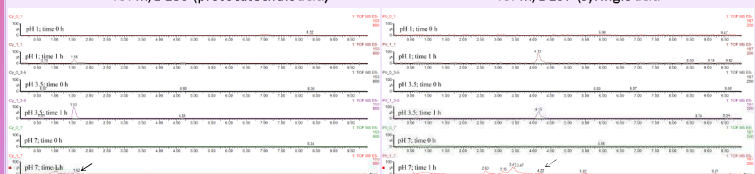


Figure 6: Reconstructed chromatograms for m/z 153 (protocatechuic acid)

Figure 7: Reconstructed chromatograms for m/z 197 (syringic acid)



Standard of phloroglucinaldehyde was heated in various pH (1, 3.5, 7). A pronounced decrease of its content was observed after one hour of heating. In strongly acidic solution (pH 1) the amount of phloroglucinaldehyde decreased in 82.5 % of original content. At less acidic solution (pH 3.5), which is typical pH for young wine, decomposition of phloroglucinaldehyde was not observed at all. Very fast decrease of phloroglucinaldehyde in neutral solution (buffered, pH 7) was observed (after one hour of heating the amount of phloroglucinaldehyde decreased in 34.9 % of original content. Chromatogram of phloroglucinaldehyde after one hour of heating process in pH 7 shows rising of two peaks with m/z = 271 (fig. 8). Figure 9 shows MS/MS spectra of both peaks.

Figure 8: Reconstructed chromatograms for m/z 271

Figure 9: Reconstructed MS/MS spectrum of m/z 271

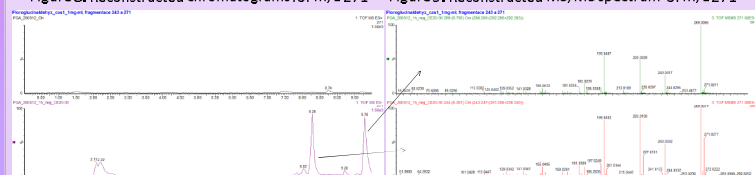
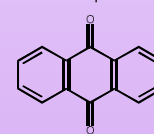
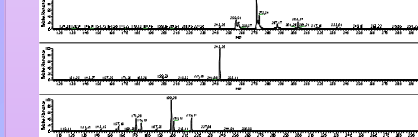


Figure 10 shows MS and tandem MS spectra of anthrachryson (ion trap). In those spectra, fragments at m/z 243, 225 and 199 can be seen. Corresponding fragmentation processes are similar with those observed in MS/MS spectra of unknown compounds rising during temperature driven transformation of phloroglucinaldehyde in neutral solution (buffered, pH 7). Thus we suggest that those compounds possess anthraquinone skeleton (fig. 11). Definite structure assignment is now in progress.

Figure 10: Reconstructed MS and tandem MS spectrum of anthrachryson

Figure 11: Anthraquinone skeleton



References

1. E. F. Gris, E. A. Ferreira, L. D. Falcao and M. T. Bordignon-Luiz, Food Chem. 2007, 100, 1289-1296.
2. A. Castaneda-Ovando, M. D. Pacheco-Hernandez, M. E. Paez-Hernandez, J. A. Rodriguez and C. A. Galan-Vidal, Food Chem. 2009, 113, 859-871.
3. E. Sadilova, F. C. Stintzing and R. Carle, J. Food Sci. 2006, 71, C504-C512.
4. L. H. Briggs, G. A. Nicholls, J. Chem. Soc. 1951, 1138-1139
5. J. Churáček, et. al. Analytická separace látek, SNTL, Praha, 1990.

Acknowledgement

Authors thank to Grant Agency of Czech Republic (GACR P206/10/0625), Ministry of Education Youth and Sports of Czech Republic (project CZ.1.05/2.1.00/03.0058, Operational Program Research and Development for Innovations European Social Fund) and Palacky

55-P27**Study of degradation of anthocyanin dyes
using liquid chromatography with mass detection**

L. Kučera, O. Kurka, P. Bednář

*RCPTM, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University,
17. listopadu 12, 77146 Olomouc, lukaskucera@volny.cz*

Stability of anthocyanin dyes is strongly influenced by many factors such as pH, temperature, concentration, etc. During degradation of anthocyanin a cleavage of sugar moiety and formation of a phenolic acid and phloroglucinaldehyde (PGA) is commonly described to occur. Those compounds can be therefore used as potential markers of food quality (e.g. controlling of winemaking technology and/or wine storage). First, development of HPLC method was done. Standard mixture was tested on three chromatographic columns (Gemini C18 and core-shell columns Kinetex C18 and Ascentis Express C18). Next, degradation products of two anthocyanins (i.e. malvidin-3-galactoside and cyanidin) were studied using column Ascentis Express C18. Relatively fast decomposition of both anthocyanins was observed when their solutions were heated. More than 90% of anthocyanin content was decomposed in one hour. Concurrently rising of content of phenolic acids was observed. Beside, also a content of PGA was followed, however, the changes of its concentration are not straightforward and reproducible during repeated experiments. Chromatogram of PGA after one hour of heating process in pH 7 shows rising of two peaks with $m/z = 271$. Possible explanation concerning the identity of those two compounds is that two molecules of PGA condensed and anthraquinone derivative is formed. To prove this idea anthrachryson was synthesized and its mass spectra were compared with the PGA transformation products ones. Parent and main fragment masses of unknown compounds correspond well with anthrachryson. Definite structure assignment is now in progress.

Acknowledgement:

Authors thank to Grant Agency of Czech Republic (GAČR P206/10/0625), Ministry of Education Youth and Sports of Czech Republic (project CZ.1.05/2.1.00/03.0058, Operational Program Research and Development for Innovations – European Social Fund) and Palacky University (project No.: PrF_2012_020) for financial support.

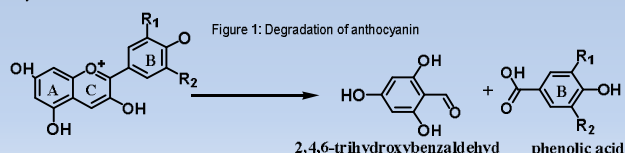
STUDY OF DEGRADATION OF ANTHOCYANIN DYES USING LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH MASS DETECTION

Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palack University of Olomouc, 17. listopadu

lukas.kucera@

Introduction

Anthocyanins are water soluble compounds belonging among plant dyes. Red color is the most frequent one they impart to the plant tissues. These compounds are found in relatively high concentrations in red grapes, strawberries, raspberries, etc. as well as in foods prepared from plants. Anthocyanins have many positive effects on human health¹. Stability of anthocyanins is strongly influenced by many factors such as pH, temperature, concentration, presence of oxygen or enzymes, irradiation, etc.² Because of their use as food colorants and their content in a lot of beverages their reliable control is of a high importance. Monitoring of degradation of anthocyanins in food seems to be an effective tool for detection of change of technology or improper storage conditions. During degradation of anthocyanins a cleavage of sugar moiety and formation of phenolic acids (i.e. protocatechuic, p-hydroxybenzoic, 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoic, syringic, vanillic and gallic acid depending on B-ring substitution) and phloroglucinaldehyde is commonly described to occur³. Those compounds can be therefore used as potential markers of food quality (e.g. time and temperature of cooking, way of food storage or winemaking technology). However, such application requires a minute knowledge of degradation products profile. The aim of the contribution is to investigate the processes of anthocyanin degradation in detail by means of combination of liquid chromatography with high resolution tandem mass spectrometry.



Results and discussion

First part of the study involved development of HPLC method with UV/VIS detection. Separation selectivity and efficiency towards standard mixture of six commercially available phenolic acids and phloroglucinaldehyde was tested on three chromatographic reversed-phase columns – one fully porous column Gemini C18 and two core-shell columns Kinetex C18 and Ascentis Express C18. The best results described by resolution of critical pairs and COF function⁴ were achieved using core-shell column Ascentis Express C18. This column was used for consequent experiments. Then, optimized LC system was hyphenated with mass spectrometer (Q-TOF Premier) and used for study of degradation of anthocyanins. Relatively fast decomposition of anthocyanin was observed when solutions were heated mimicking hot maceration or cooking involved in food technology. Regardless of pH of solution more than 90 % of anthocyanin content was decomposed in one hour. Concurrently rising of content of phenolic acids (i.e. syringic acid in case of malvidin-3-galactoside and protocatechuic acid in case of cyanidin) was observed in pH 1 and 3.5. In neutral buffered solution further decomposition those phenolic acids occurred. Those processes are demonstrated by figures 3 and 4. Beside phenolic acids also a content of phloroglucinaldehyde was followed, however, the changes of its concentration are not straightforward and reproducible during repeated experiments. The fate of phloroglucinaldehyde was studied in detail.

Experimental

Chromatographic systems:

HPLC SmartLine (Knauer, Germany) equipped with columns Gemini C18 110A (150 x 2.0 mm, dp = 5µm, Phenomenex, USA), Kinetex 2.6µ C18 100A (100 x 2.1 mm, dp = 2.6µm (porous layer 0.5 µm), Phenomenex, USA) and Express C18 (100 x 2.1 mm, dp = 2.7 µm (porous layer 0.5 µm), Sigma-Aldrich); various mobile phases and gradient were used, but the best results were observed with mobile phase A: 0.1% HCOOH in water; B: 0.1% HCOOH in methanol (v/v) and gradient elution: 0-5 min 20 % B, 5-10 min 20 – 60 % B, 10-18 min 60 % B, 18-20 min 60-20 % B. UPLC Acquity (Waters, USA) equipped with Ascentis Express C18; the same mobile phase was used as previously. Gradient elution: 0-4.28 min 20 % B, 4.28-7.85 min 20 – 60 % B, 7.85-13.56 min 60 % B, 13.56-14.99 min 60-20 % B, 14.99-22.13 min 20 % B.

Mass spectrometers:

Q-TOF Premier (Waters, USA), electrospray ionization (Z-spray)

Preparation of a model solution of anthocyanins and phloroglucinaldehyde

0.5 mg of each standard (i.e. cyanidin chloride, malvidin-3-galactoside chloride and phloroglucinaldehyde) was dissolved in 0.9 mL of methanol and divided into three parts. Then each aliquot part of standard solution was dried up using fine stream of nitrogen and dissolved in appropriate solvent (pH 1, 3.5 or 7).

Preparation of anthrachryson (1,3,5,7-Tetrahydroxy-anthraquinone):

Anthrachryson was prepared using a modified method described by Briggs and Nicholls in 1951. Briefly: Solution of m-hydroxybenzoic acid and 3,5-dihydroxybenzoic acid was heated with concentrated H₂SO₄ for one hour (100°C). Next day the solution was heated for 10 minutes and poured into a boiling water. The green precipitate was dissolved in a hot aqueous NaOH and reprecipitated from the solution using glacial CH₃COOH. Product of this reaction was dissolved in acetone and separated on column chromatography (silicagel as stationary phase). Band was isolated (fig. 2) and dried using fine stream of nitrogen.

Figure 2: Orange band on silicagel



Since during anthocyanin degradation in neutral buffered solution phloroglucinaldehyde was not observed at all we suggest that its decomposition is the most pronounced. Therefore we decided to focused on system in detail. Standard of phloroglucinaldehyde was heated in pH 7 (fig.5). Very fast decrease of phloroglucinaldehyde was observed, after one hour of heating the amount of phloroglucinaldehyde decreased in 34.9 % of original content and after 8 hours peak of phloroglucinaldehyde disappeared. Chromatogram of the reaction mixture after one hour of heating process in pH 7 shows rising of two peaks with m/z = 271 (fig. 6). Figure 7 shows MS/MS spectra of both peaks

Figure 5: Reconstructed chromatogram for m/z 153

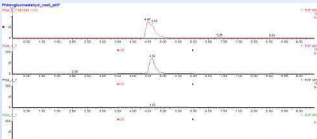


Figure 6: Reconstructed chromatograms for m/z 271

Figure 7: Reconstructed MS/MS spectrum of m/z 271

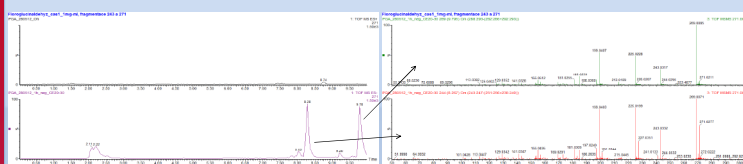


Figure 8 shows MS/MS spectrum of anthrachryson. In this spectrum, fragments at m/z 243, 227, 215, 201 and 199 can be seen. Corresponding fragmentation processes are similar with those observed MS/MS spectra of unknown compounds rising during temperature driven transformation of phloroglucinaldehyde in neutral solution (buffered, pH 7). Fragmentation pattern is consistent also with experiment of Stodulkova et al. devoted to natural anthraquinones⁵. Thus we suggest that those compounds possess anthraquinone skeleton (fig. 9). Definite structure assignment is now in progress

Figure 8: Reconstructed MS/MS spectrum of anthrachryson

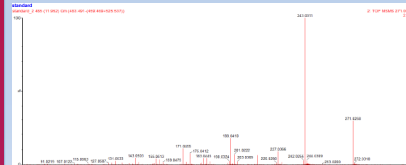


Figure 9: Anthraquinone

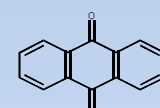


Figure 3: Reconstructed chromatograms for m/z 285 (cyanidin), m/z 153 protocatechuic acid and m/z 153 phloroglucinaldehyde

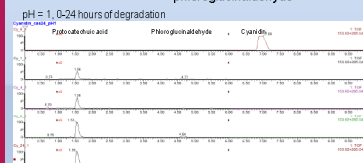


Figure 4: Reconstructed chromatograms for m/z 491 (malvidin-3-galactoside), m/z 197 syringic acid and m/z 153

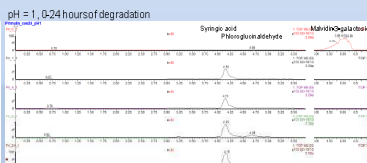


Figure 3: Reconstructed chromatograms for m/z 285 (cyanidin), m/z 153 protocatechuic acid and m/z 153 phloroglucinaldehyde

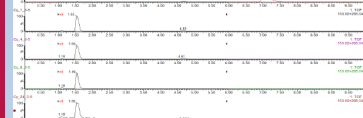


Figure 4: Reconstructed chromatograms for m/z 491 (malvidin-3-galactoside), m/z 197 syringic acid and m/z 153

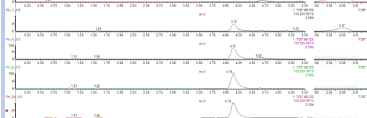


Figure 3: Reconstructed chromatograms for m/z 285 (cyanidin), m/z 153 protocatechuic acid and m/z 153 phloroglucinaldehyde

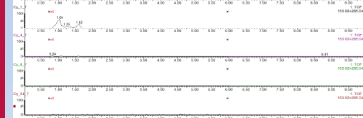
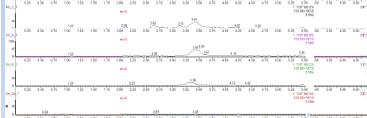


Figure 4: Reconstructed chromatograms for m/z 491 (malvidin-3-galactoside), m/z 197 syringic acid and m/z 153



References

1. E. F. Gris, E. A. Ferreira, L. D. Falcao and M. T. Bordignon-Luiz, Food Chem. (2007) 100, 1289-1296.
2. A. Castaneda-Ovando et al., Food Chem. (2009) 113, 859-871.
3. E. Sadijova, F. C. Stintzing and R. Carle, J. Food Sci. (2006) 71, C504-C512.
4. L. H. Briggs, G. A. Nicholls, J. Chem. Soc., (1951) 1138-1139.
5. J. Churáček, et al. Analytická separace látek, SNTL, Praha, (1990).
6. E. Stodulková et al., J. Chromatogr. A 1217 (2010) 6296-6302

Acknowledgement

Authors thank to Grant Agency of Czech Republic (GACR P206/10/0625), Ministry of Education Youth and Sports of Czech Republic (project CZ.1.05/2.1.00/03.0058, Operational Program Research and Development for Innovations European Social Fund) and Palacký

Conclusion

Our experiments show that fast degradation of anthocyanin occurs when their solutions are heated. During the decomposition increase of concentration of appropriate phenolic acids was observed. Concentration of phloroglucinaldehyde during heating process is not reproducible and its using as a marker for food quality is questionable. In pH 7 is main degradation product of anthocyanin dyes transform to another substances, which are resembling anthraquinone structure. Exhaustive identification of products of phloroglucinaldehyde decomposition including the effect of pH and study of real wine degradation is now in progress

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

AUTOREFERÁT

k disertační práci

**Vývoj metod pro analýzu odpadů z vinařské výroby
a kontrolu jejich zpracování**

Autor: RNDr. Lukáš Kučera

Studijní program: Analytická chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Olomouc 2016

Summary

This thesis is devoted to analytical control of composition of anaerobic fermentation mixture used for biogas production. The process of anaerobic digestion, presence of compounds in feedstock material and digestate (liquid part in reactor after anaerobic fermentation process) is discussed in first part of the work. Detailed review of published results showed that the process of analytical control of digestate is still in development. The proper control of many pollutants such as pesticides, herbicides, fungicides, and heavy metals, but also nonfermented sugars, fatty acids, proteins and monitoring of the profile of flavonoid compounds is still missing. With respect to new European Notice 1999/31/EC, which plan to reduce the amount of biodegradable waste going to landfill to 35% until year 2020, the processing and analysis of digestate will be necessary. Detailed research of methods used for biogas production and digestate control was published as a review article.

During winemaking process a huge amount of waste is produced. Effective treatment of the waste is still a challenging task. Its utilization in biogas stations is one logical possibility. This work is focused on development and utilization of analytical methods for control of waste produced during winemaking and its anaerobic fermentation during gasification. The attention was paid especially to the profile of flavonoids.

The attention was paid to both decomposition and condensation processes occurring in wine waste and in the rising digestate. The first part of thesis deals with processes that can be expected in fermentation mixture during anaerobic fermentation of wine waste. Flavonoids are effective inhibitors of microbial growth and thus their presence in fermentation mixture affects the whole gasification process. The fate of flavonoids during storage and anaerobic fermentation was not described yet. In this work a degradation process was studied on anthocyanin dyes (cyanidin, malvidin-3-galactoside) by high temperature and pH. The phenolic acids (protocatechuic and syringic acids) and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde were found and monitored in model solutions. After one hour of degradation of floroglucinaldehyde standard three new compounds were found. These compounds were identified as 1,3,5,7-tetrahydroxyanthrachinon using exact mass measurement, fragmentation experiments, retention time, comparison with appropriate literature and in one case also by comparison with authentic standard prepared by independent synthesis.

Condensation of anthocyanins with other flavonoids occurs in plant materials and extracts as well. Second part of this thesis deals with the development of chromatographic methods for analytical control of diastereomeric bridged dyes - (+)-catechin-ethyl-malvidin-3-glucosides rising by condensation of (+)-catechin, malvidin-3-glucoside and acetaldehyde. A nano-liquid chromatographic method was optimized for their separation and compared with high performance liquid chromatography utilizing analytical columns with common dimensions. Nano-LC column offered higher retention and separation compared with conventional HPLC. On the other hand slightly better selectivity for the separation of diastereomers and higher resolution for all

components of the tested mixture was found for conventional HPLC system compared to nano-LC system

Final part of this work is devoted to the study of anaerobic fermentation of hardly gasifiable wine waste in discontinuous microscale reactor. A series of gasifying experiments was performed to optimize conditions for anaerobic fermentation, i.e. optimization of ratio of pig slurry and winery waste, addition of methanogens and/or thioglycolate medium and pH value (adjusted with ammonium hydroxide). Efficiency of biogas production was monitored by gas chromatography/mass spectrometry. Liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry in combination with advanced data treatment, i.e. principal component analysis and orthogonal projection to latent structures, was used to reveal main chemical differences of gasified winery waste mixture from commonly used fermentation mixtures in agricultural biogas plants. Compounds with particular polyphenolic structures appeared among the most distinctive markers. Analysis of samples collected during acidogenic phase and unstabilized methanogenesis revealed formation of certain dihydro-flavonoids in early stages of the process and their consequent degradation, i.e. hydroxykaempferol, hydroxybenzoylcatechin, methylquercetin, malvidin-3-glucoside, malvidin chalcon and reduced catechin. Unstabilized digestate would represent a potential environmental risk when used as a fertilizer since higher toxicity of some dihydroflavonoids (e.g. taxifolin) compared to their common counterparts present naturally in wine waste (e.g. quercetin, malvidin, etc.) was reported in literature.

Souhrn

Disertační práce se zabývá možnostmi analytické kontroly fermentační směsi při výrobě bioplynu. Popisuje celý proces anaerobní fermentace, složky přítomné ve vstupním materiálu i v reakční směsi s důrazem na složení digestátu (kapalného podílu fermentační směsi, která v bioreaktoru zůstává po ukončení fermentace) a analytické metody používané pro kontrolu jejich složení. Detailní průzkum literatury, který byl v průběhu přípravy disertační práce zpracován do přehledového článku, ukazuje, že analytická kontrola složení digestátu je doposud ve vývoji. Chybí průběžná kontrola řady složek, zejména polutantů, jako jsou pesticidy, herbicidy, fungicidy a těžkých kovů, ale také nezfermentovaných cukrů, mastných kyselin a bílkovin a v neposlední řadě i kontrola profilu flavonoidních látek. Vzhledem k očekávanému nárůstu produkce digestátu v souvislosti s evropskou vyhláškou 1999/31/EC, která plánuje redukci skládkového biologicky rozložitelného odpadu do roku 2020 na 35% současně produkovaného množství, bude význam dalšího zpracování digestátu a tedy i jeho analytické kontroly narůstat.

Při vinařské výrobě vzniká velké množství rostlinného odpadu, které by bylo vhodné dále zpracovat. Mezi mnoha možnými postupy je anaerobní fermentace logickou cestou. Tato práce je zaměřena na studium anaerobní fermentace vinařského odpadu a přeměny flavonoidů za anaerobních podmínek.

První část práce je zaměřena na popis procesů, které mohou podle nastavených podmínek probíhat ve skladovaném odpadním materiálu a ve fermentační směsi během zplyňování vinařského odpadu. Vlivem působení mikroorganismů, teploty a vzájemných reakcí složek vinařského odpadu při jeho skladování a následné anaerobní fermentaci v bioreaktoru dochází k řadě rozkladných i kondenzačních procesů. Významnou roli hrají v těchto procesech flavonoidní látky. Jejich obsah ve vinařském odpadu je poměrně vysoký a tyto látky inhibují práci anaerobních mikroorganismů a komplikují proces zplyňování. Detailně nebyl osud flavonoidů během skladování odpadu a jeho anaerobní fermentace doposud popsán. V této práci byly studovány procesy rozkladu anthokyaninových barviv (kyanidin a malvidin-3-galaktosid) při pH 7 a vysoké teplotě (95°C). V roztoku byly sledovány hlavní rozkladné produkty - fenolické kyseliny (kys. protokatechová a kys. syringová) a 2,4,6 – trihydroxybenzaldehyd. Při rozkladu standardu floriglucinaldehydu byly v roztoku nalezené po jedné hodině tři nové látky. Tyto látky byly na základě fragmentačních experimentů, porovnání s autentickým standardem a literaturou identifikovány jako kondenzační produkty floriglucinaldehydu, tj. 1,3,5,7-tetrahydroxyanthrachinony.

Vedle rozkladných procesů, lze ve vinařské technologii, při skladování vinařského odpadu a v průběhu jeho fermentace očekávat v malé míře také kondenzační reakce. Objektem zájmu této práce byl vývoj chromatografických metod pro sledování diastereomerních můstkových barviv (+)-katechin-ethyl-malvidin-3-glukosidů vznikajících kondenzací (+)-katechinu, malvidin-3-glukosidu a acetaldehydu. Pro separaci můstkových barviv a jejich prekurzorů byla optimalizována metoda

nano-kapalinové chromatografie. Její parametry byly porovnány s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií využívající analytické kolony běžných rozměrů. Nano-kolona poskytla vyšší retenci a separační účinnost v porovnání s konvenční HPLC. Na druhou stranu lepší selektivita pro oba diastereomery a vyšší rozlišení všech látek bylo získáno pomocí konvenční HPLC.

V další části této práce je popsán gasifikační proces těžko-zplynitelného vinařského odpadu v diskontinuálním mikroreaktoru. Před samotným zplyňovacím experimentem byla provedena řada experimentů pro nalezení optimálních podmínek, tj. různé poměry prasečí kejdy a vinařského odpadu, přídavek methanogenních bakterií a/nebo thioglykolátového média a úprava pH pomocí hydroxidu amonného. Účinnost bioplynového procesu byla kontrolována plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Pro odhalení chemických odlišností zplyňovaného vinařského odpadu oproti běžně používaným materiálům byla použita kapalinová chromatografie s detekcí vysokorozlišující tandemovou hmotnostní spektrometrií v kombinaci s analýzou hlavních komponent a ortogonální projekcí do latentních struktur. Mezi hlavními markery bylo nalezeno velké množství látek s polyfenolickou strukturou. Analýzy vzorků odebraných v průběhu acidogenní fáze a nestabilizované methanogeneze při anaerobní fermentaci v mikroreaktoru poukazují na vytvoření dihydro-flavonoidů v počátečních fázích procesu a jejich následnou degradaci, tj. hydroxykaempferol, hydroxybenzoylkatechin, methylkvercetin, malvidin-3-glukosid, chalkon malvidinu a redukovaný katechin. Změny v profilu flavonoidů (přeměna flavonoidů na jejich redukované formy a jejich rozklad) v nestabilizovaném digestátu mohou ovlivňovat životní prostředí, pokud budou použity například jako hnojivo. Některé redukované formy flavonoidů (např. taxifolin) vykazují totiž vyšší toxicitu (LD_{50} hodnoty) než běžné flavonoidy vyskytující se ve vinařském odpadu (např. kvercetin, malvidin atd.). Detailní kontrola chemického složení digestátu by tedy do budoucna měla být nedílnou součástí procesu jeho dalšího zpracování.

Obsah

1. Úvod	7
2. Přehled aktuálního stavu problematiky.....	8
3. Cíle disertační práce	11
4. Experimentální část.....	12
4.1. Studium rozkladu anthokyaninů.....	12
4.1.1. Syntéza standardu anthrachrysenu	12
4.2. Studium kondenzace flavonoidů	12
4.2.1. Příprava reakční směsi, frakcionace reakčních produktů a příprava extraktu z výlisků z červených hroznů	12
4.2.2. Příprava kapilárních kolon.....	12
4.3. Anaerobní fermentace vinařského odpadu	13
4.3.1. Příprava vzorku.....	13
5. Výsledky a diskuze	15
5.1. Studium rozkladu anthokyaninů.....	15
5.1.1. Modelové roztoky anthokyaninů a floroglucinaldehydu.....	15
5.1.2. Identifikace neznámých látek vznikajících rozkladem floroglucinaldehydu	16
5.2. Studium kondenzace flavonoidů	18
5.2.1. Nano-kapalinová chromatografie.....	18
5.2.2. Porovnání konvenční vysoko-účinné kapalinové chromatografie s nano-kapalinovou chromatografií	21
5.3. Anaerobní fermentace vinařského odpadu	23
5.3.1. Optimalizace anaerobní fermentace.....	23
5.3.2. Analýza digestátu pomocí LC/MS	25
6. Závěr	35
Literatura	37
Curriculum vitae	40

1. Úvod

V současné době je anaerobní fermentace široce používaná metoda pro úpravu odpadu (zmenšení jeho množství) a využití energie, která je v něm ukryta, zejména pro výrobu levné tepelné a elektrické energie. Po ukončení zplyňování tzv. mokrou cestou (která je nejběžnějším postupem) zůstává v reaktoru nerozložený digestát (směs pevných a kapalných částí), který je bohatý na základní agrochemické prvky (dusík, uhlík, vápník, draslík, fosfor atd.). Proto je digestát hojně využíván jako hnojivo. Nicméně v digestátu se mohou nacházet také škodlivé látky, které nejsou rutinně sledovány (jejich analýza je doposud spíše součástí výzkumu). Jde především o pesticidy, polychlorované bifenyly a další agrochemikálie a organické polutanty. Digestát ovšem obsahuje i významné množství nerozložených metabolitů vznikajících při růstu a zrání surovin rostlinného původu a při jeho zpracování v potravinářském průmyslu. Zajímavým materiálem je v této souvislosti odpad vznikající při výrobě vína.

Tato práce je zaměřena na některé změny probíhající při skladování vinařského odpadu a jeho zpracování anaerobní fermentací. Jedna část práce se zabývá sledováním procesů přeměn anthokyaninových barviv přítomných v odpadu vznikajícím při výrobě červeného vína (jejich rozklad na jednodušší molekuly i vznik složitějších kondenzátů). V druhé části práce je studován proces anaerobní fermentace výlisků z červených hroznů v mikroreaktoru za kontrolované produkce bioplynu se zaměřením na osud flavonoidních látek. Tyto látky mají antibakteriální vlastnosti a představují tedy problém pro práci anaerobních mikroorganismů. Vzhledem k tomu, že studované materiály jsou složitými směsmi s řadou neidentifikovaných složek přítomných v řádově rozdílných koncentracích, je hlavní náplní práce vývoj vhodných analytických metod (založených zejména na chromatografické separaci a detekci hmotnostní spektrometrií), jejich aplikace i pokročilé postupy zpracování získaných dat. Práce si klade za cíl přispět k pochopení procesu přeměn flavonoidů ve složitém rostlinném materiálu po jejich prvním využití (např. ve vinařském průmyslu) a po jeho anaerobní fermentaci při produkci bioplynu (druhé využití), které ve svém důsledku může napomoci optimalizovat využití vznikajícího odpadu i s ohledem na životní prostředí.

2. Přehled aktuálního stavu problematiky

Počátky využití cílené anaerobní fermentace pro výrobu hořlavého plynu můžeme datovat na přelom 19. a 20. století, i když zmínky o možnosti vyrábět bioplyn se objevily již dříve. Tyto „bioplynové stanice“ byly situovány v čistírnách odpadních vod, kde se vzniklý bioplyn využíval na svícení a vytápění. První anaerobní bioplynová stanice byla postavena v Bombaji (Indie) už v roce 1859 v kolonii lidí nakažených leprou [1]. Postupným výzkumem bylo objeveno mnoho druhů anaerobních methanogenních bakterií díky nimž dochází k vývoji methanu [2]. Anaerobní fermentaci můžeme rozdělit na dva hlavní přístupy: A) při „mokrém“ anaerobní fermentaci je vstupní surovina smíchána s kapalnou složkou (nejčastěji vodou) a vložena do reaktoru, v němž je tato směs míchána a zahřívána, po ukončení fermentace se zbytek z tohoto procesu nazývá digestát. B) při „suchém“ anaerobní fermentaci je vstupní surovina vložena do kovového koše ve vrchní části reaktoru a v určitých časových cyklech je pomocí čerpadel seshora sprchována vodou. Voda materiálem protéká a zachycuje se ve spodní části reaktoru. Tento kapalný zbytek je nazýván perkolát [3]. V této práci je studována pouze "mokrý" anaerobní fermentace.

Bioplyn je převážně směs dvou plynů CO_2 a CH_4 . K jejich tvorbě nedochází ihned po vložení suroviny do reaktoru, ale vede k němu složitější cesta tvořená několika stádii. V první fázi fermentace dochází k rozkladu makromolekulárních látek na látky jednodušší. V tuto dobu je v reaktoru ještě přítomen zbytkový kyslík a proto tato fáze ještě není uskutečňována methanogenními bakteriemi, nýbrž aerobními bakteriemi [4, 5]. Prvotní fázi lze tedy popsat jako rozklad (převážně hydrolyzu) biopolymerů - z lipidů vznikají glyceriny a vyšší mastné kyseliny, z proteinů peptidy a poté aminokyseliny, a z polysacharidů jednoduché cukry. Hydrolyza postupně přechází v druhou fázi anaerobní fermentace - acidogenezi. Přechod mezi oběma fázemi není ostrý a tyto dva procesy běží v po určitou dobu současně, kdy dochází k útlumu hydrolyzy a nárůstu acidogeneze. V této fázi jsou vyšší mastné kyseliny rozkládány na nižší mastné kyseliny (kapronová, valerová, máselná, propionová a octová) a další látky na CO_2 a H_2 . Ve fázi acidogeneze jsou mastné kyseliny převáděny bakteriemi *Syntrophomonas Wolfei* a *Syntrophobacter Wolinii* na kyselinu propionovou, octovou, CO_2 a H_2 [6]. Tento proces, jež běží na konci acidogeneze, se podle kyseliny octové nazývá acetogeneze. Po fázi acidogeneze nastává závěrečná fáze celé anaerobní fermentace a to methanogeneze uskutečňována pomocí acetotrofních (*Methanotrix Soehngeni*) a hydrogenotrofních (*Methanobacterium Bryantii*) methanogenů [7]. První zmíněný kmen bakterií je zodpovědný za přeměnu acetátu na methan a oxid uhličitý. Druhý kmen využívá ke svému růstu CO_2 a H_2 a produkuje methan [8-10]. Je tedy zřejmé, že pro kvalitní průběh anaerobní digesce je nutná přítomnost obou kmenů v reakční směsi [11].

Důležitou otázkou je, co se děje s jednotlivými organickými látkami v průběhu anaerobní fermentace. Mezi tyto látky patří také látky flavonoidní povahy. Flavonoidy jsou látky náležející do

skupiny bioaktivních polyfenolů [12]. Studie popisující vliv flavonoidů na živé organismy poukazuje na jejich pozitivní vliv vůči široké škále nemocí. Mezi nejčastěji uváděné pozitivní účinky patří protizánětlivé, antibakteriální, antialergenní a antivirální [12-15]. Antibakteriální vlastnosti flavonoidů, jakkoli pozitivní pro člověka, představují velký problém pro činnost anaerobních bakterií a tím snižují efektivitu zplyňovacího procesu. Materiály bohaté na flavonoidy jsou tedy obtížněji zplynitelné. Jedním ze snadno dostupných zdrojů rostlinných zbytků pro bioplynové stanice je vinařský průmysl – matoliny, třapiny, sedlina po fermentaci [16]. Hlavní analytickou metodou používanou pro sledování procesu výroby bioplynu je plynová chromatografie [17-21]. Melamane a kol. sledovali účinnost anaerobní gasifikace materiálu bohatého na polyfenoly. Po 130 dnech anaerobní fermentace došlo k rozkladu pouze 63 % z celkového obsahu polyfenolů. Takto nízká účinnost rozkladu těchto látek je přisuzována výše uvedeným antibakteriálním vlastnostem [21]. Na druhou stranu, některé novější studie popisují, že přidavek polyfenolů do kapalného zbytku po fermentaci urychluje růst bakterií, které jsou schopny rozkládat polycyklické bifenyly [22]. Vedle velkého množství studií poukazujících na pozitivní vlastnosti flavonoidů lze v literatuře nalézt i zmínky o mutagenních a/nebo genotoxických vlastnostech na bakterie a buňky savců [23-25]. Skibola a kol. poukázali na fakt, že vysoké koncentrace těchto látek v přírodě mohou ovlivnit aktivitu některých environmentálních genotoxikantů (tj. sloučenin s mutagenními a karcinogenními účinky) a jejich metabolismus v živých organismy [26].

V současné době existují pouze dvě publikace popisující osud flavonoidů v průběhu anaerobní gasifikace. Tyto práce sledují a popisují přeměny této skupiny na skupině standardů vybraných flavonoidů (tj. Hesperidin, Rutin, Katechin, Naringenin, Chrysin, Luteolin, Kvercetin, Kaempferol, Kyanidin a Petunidin) za současného sledování průběhu anaerobní fermentace s využitím plynové chromatografie (poměr CO₂ a CH₄). Kapalný zbytek byl analyzován pomocí kapalinové chromatografie (C18 kolona) v kombinaci se spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem [27, 28].

Rozklad flavonoidů je ovlivněn řadou faktorů jako je pH jejich roztoků, teplota, přítomnost reaktivních forem kyslíku, enzymů, činnost bakterií, koncentrace flavonoidů, světlo, rozpouštědlo a přítomnost kovových iontů [29]. V reálných systémech jde samozřejmě o kombinaci více faktorů. Patrně nejprobádanější skupinou flavonoidů jsou anthokyaniny. Konečnými produkty rozkladu anthokyaninů je fenolická kyselina a 2,4,6-trihydroxyfenylacetaldehyd. Vzniklý aldehyd není konečným rozkladným produktem a dále dochází ke zkrácení postranního řetězce o jeden uhlík a vzniku konečného produktu 2,4,6-trihydroxybenzaldehydu neboli floroglucinaldehydu [30, 31]. Každý anthokyanin poskytuje rozkladem jinou fenolickou kyselinu podle substituce na B-kruhu a druhým rozkladným produktem běžných anthokyaninů je již zmíněný floroglucinaldehyd. Tato látka je poměrně reaktivní a může v roztoku interagovat s řadou dalších sloučenin. Reaktivitu floroglucinaldehydu lze vysvětlit izomerními a mezomerními efekty - v polohách ortho a para vzniká parciální kladný náboj, zatímco na kyslíku v aldehydycké skupině je parciální záporný náboj [32].

Autoři Serra a kol. studovali in-vitro rozklad flavonoidů (kvercetin, kvercetin–rhamnosid, kvercetin–rutinosid kaempferol-rutinosid, naringenin, luteolin a myricetin) pomocí bakterií z kysí střevní mikroflóry. Ve studovaných směsích detekovali jako hlavní metabolity 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionovou, 3,4-dihydroxyfenyloctovou, 3-hydroxyfenyloctovou a fenyloctovou kyselinu. Na základě vzniku těchto látek bylo možno navrhnout pravděpodobnou degradační cestu flavonoidů v anaerobních podmínkách. Dále byl studován rozklad flavonoidů bakteriemi z lidského zažívacího traktu. Mezi produkty rozkladu nebyly nalezeny výše uvedené metabolity (autoři ve vzorku našli vyšší obsah kyseliny protokatechové a malý obsah kyseliny p-hydroxybenzoové) což poukazuje na rychlý rozklad kvercetinu a 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny [33]. Procesy rozkladu flavonoidů jsou tedy poměrně komplikované a velmi se odvíjí od bakteriálního složení (různé kmeny bakterií) kapalně části v bioplynovém reaktoru.

3. Cíle disertační práce

Cíle disertační práce jsou spojeny se studiem vybraných reakcí flavonoidů probíhajících při skladování vinařského odpadu a při jeho anaerobní fermentaci.

Cíle práce lze shrnout do následujících bodů:

- vysvětlení procesů probíhajících při rozkladu anthokyaninů kyanidinu a malvidin-3-glukosidu v modelových podmínkách vlivem zvýšené teploty v neutrálním prostředí (pH 7) analýzou rozkladných produktů spojením kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.
- vývoj nano-kapalinově chromatografické metody (nano-LC) pro analýzu můstkových barviv vznikajících kondenzací katechinu s malvidin-3-glukosidem v přítomnosti acetaldehydu
- optimalizace anaerobní fermentace vinařského odpadu v mikroměřítku (v mikroreaktoru) za průběžné kontroly zplyňování plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.
- analýza složení digestátu odebraného z mikroreaktoru v různých fázích anaerobní fermentace pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí a s využitím analýzy hlavních komponent (PCA) a ortogonální projekce do latentních struktur (OPLS-DA).

Nejvýznamnější výsledky uvedené v této disertační práci byly uveřejněny ve třech impaktovaných [34, 35, 42] a jedné recenzované publikaci [11].

4. Experimentální část

4.1. Studium rozkladu anthokyaninů

4.1.1. Syntéza standardu anthrachrysenu

Anthrachrysen (1,3,5,7 – tetrahydroxyanthrachinon) byl připraven pomocí modifikované metody autorů Briggse a Nichollse z roku 1951 [37]. 1 g kyseliny m-hydroxybenzoové a 1,1 g kyseliny 3,5-dihydroxybenzoové byl zahříván společně s 3,9 mL koncentrované kyseliny sírové po dobu 1 hodiny na 100°C. Druhý den byl roztok zahřát na 10 minut a poté vlit do 65 mL vařící vody. Vzniklá zelená sraženina byla odfiltrována a rozpuštěna ve vodném roztoku NaOH. Po zahřátí roztoku NaOH byl tento roztok smíchán s horkým roztokem ledové kyseliny octové za vzniku sraženiny. Sraženina byla rozpuštěna v acetonu a separována pomocí sloupcové chromatografie pro izolaci oranžového pásu. Jako stacionární fáze byl použit silikagel.

4.2. Studium kondenzace flavonoidů

4.2.1. Příprava reakční směsi, frakcionace reakčních produktů a příprava extraktu z výlisků z červených hroznů

Reakční směs byla připravena smícháním (+)-katechinu a malvidin-3-glukosidu (oba 1 mmol) ve 4 ml vody. Poté bylo přidáno 0,86 μ l kyseliny mravenčí, 2,24 μ l acetaldehydu a 1 ml methanolu a vzniklá směs byla důkladně promíchána. Reakční proces a vzniklé produkty byly kontrolovány pomocí HPLC/DAD/ESI-MS. Nejvyšší koncentrace reakčních produktů byla nalezena po 8 dnech reakce. Purifikace reakčních produktů byla prováděna pomocí HPLC systému Smartline (Knauer, Germany) vybaveného semi-preparativní core-shell kolonou Ascentis C18 (250 x 10 mm; 5 μ m; tloušťka porézní vrstvy 0.5 μ m, Supelco, USA). Nástřikový objem reakční směsi byl 1 ml.

Výlisky červených hroznů (RGM) byly poskytnuty doc. Josefem Balíkem, Ph.D. z Ústavu posklizňové technologie zahradnických produktů, Zahradnické fakulty, Mendelovy univerzity v Brně. Surový materiál byl lyofilizován a uskladněn v mrazicím boxu. 250 mg lyofilizovaného materiálu bylo extrahováno 1 mL 0,1% kyseliny mravenčí v methanolu po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni za laboratorní teploty. Extrakt byl následně centrifugován při 1400 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. 0,5 mL organické fáze bylo 8x zředěno mobilní fází (0.1 % TFA ve směsi 80:20 voda:acetonitril, v/v/v). Pro identifikaci byla k tomuto vzorku přidána modelová směs studovaných látek (finální koncentrace reakčních produktů ve směsi byla přibližně 10 mg.L⁻¹).

4.2.2. Příprava kapilárních kolon

Křemenné kapilární kolony 100 μ m i.d., 375 o.d. (Composite Metal Services, Hallow, UK) byly plněny pomocí LC pumpy (Perkin-Elmer series 10 LC pump, Paolo Alto, CA, USA) 3 μ m částicemi

stacionární fáze Chromosphere C18 (Varian, Palo Alto, CA, USA) a 2,6 μm povrchově porézními částicemi stacionární fáze Kinetex® C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Detailní postup přípravy kapilárních kolon je popsán v publikaci [34]. Na konec plněné kapiláry byla připojena mechanická fritka a druhý konec byl napojen na HPLC předkolonu, která sloužila jako reservoár stacionární fáze (SF), jež je následně pumpována do kapiláry. Po konci plnění byla kapilára promyta destilovanou vodou pro odstranění plnicí kapaliny (methanol). Poté byla vytvořena počáteční a konečná permanentní fritka sintrováním stacionární fáze po dobu 6s při 700°C pomocí žhavicího vlákna. Detekční okénko o délce 0,5 cm bylo připraveno seškrábáním polyimidové vrstvy žiletkou.

Příprava kapilární kolony plněné povrchově porézními částicemi Kinetex probíhala odlišně. Kapilární kolona byla opět napojena na mechanickou fritku a konec kapiláry byl naplněn (cca 10 cm) 5 μm částicemi LiChrospher 100 RP-C18 (suspenze v acetonu). Kolona byla poté promyta destilovanou vodou a byla vytvořena první permanentní fritka. Po odstranění mechanické fritky byl vymyt zbytek stacionární fáze acetonem a kapilára byla naplněna povrchově porézními částicemi Kinetex C18 (25 cm) a poté dalšími 5 cm SF LiChrospher 100 RP-C18 5 μm . Druhá koncová permanentní fritka byla připravena stejným způsobem, jak je uvedeno výše. Nadbytečná SF byla vymyta z kapiláry. Částice stacionární fáze LiChrospher tvoří v kapiláře stacionární zóny dlouhé pouze pár milimetrů - dvě fritky (cca 2-3 mm). Důvodem použití částic LiChrosphere je z důvodu špatného sintrování povrchově porézních částic a tudíž nemožnosti vytvořit fritky. Všechny kolony byly plněny na délku 25 cm. Efektivní délka kolon byla 27 cm pro plně porézní SF a 32 cm pro povrchově porézní SF.

4.3. Anaerobní fermentace vinařského odpadu

4.3.1. Příprava vzorku

Vzorek vepřové kejdy (PS) byl poskytnut Květoslavem Mückem ze společnosti Cervus s.r.o. (Olomouc). PS byla přímo vzorkována ze zemědělské bioplynové stanice v Bílově-Pustějově a ihned zmrazena. Ve zmrazeném stavu byla skladována až do doby anaerobních experimentů. Předběžné experimenty byly provedeny na roztocích připravených smícháním PS, RGM, vody, 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ roztok methanogenních bakterií APD BIO GAS (MetBac; BAKTOMA s.r.o., Velká Bystřice) a 29,8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ roztok thio glykolátového media (TGM; NEOGEN, Lansing, MI, USA) ve 4 mL skleněných vialkách opatřených kvasnou zátkou a headspace víčkem se septem tvořeným polytetrafluorethylenovou a gumovou vrstvou v různém poměru.

Vzorkování vnitřní atmosféry bylo prováděno pomocí 2,5 mL stříkačky Hamilton Gastight no. 1002 s ostrou jehlou (vzorkovací objem 1.5 mL; Hamilton, Reno, NV, USA). Další optimalizační experimenty anaerobní fermentace byly prováděny v roztocích o různých poměrech PS a RGM (tj. 750:50 mg, 500:50 mg, 250:50 mg, 100:50 mg a 50:50 mg) ve 2 ml deionizované vody ve 4 mL

headspace vialkách. Do všech vzorků byl přidán hydroxid amonný pro dosažení finální koncentrace 0,254, 0,191, 0,127 a 0,064 mol L⁻¹.

Po nalezení optimálních podmínek pro anaerobní fermentaci (optimalizace složení směsi a jeho pH) byly připraveny tři samostatné vzorky smícháním 14 g PS, 1 g RGM a 40 ml deionizované vody v 60 ml vialkách (anaerobní mikro-reaktor, AMF, 139 x 27 mm). Vzorkování vnitřní atmosféry AMF bylo prováděno stejným postupem, jak je uvedeno výše. Kapalná část reaktoru byla vzorkována pomocí 5 mL plastové stříkačky s dlouhou ostrou jehlou pro dosažení kapalné části ve fermentoru (15 cm, pokaždé bylo vzorkováno 2 mL). Referenční vzorek byl tvořen 14 g PS a 40 ml deionizované vody. pH referenčního vzorku bylo stejné jako pH směsi PS-RGM (liší se pouze 0,127 μmol L⁻¹ NH₄OH; pH se liší méně než o 10%). Všechny vzorky byly probublávány po dobu 10 minut dusíkem pro odstranění kyslíku a nastolení anaerobních podmínek. Vzorky byly termostatovány na 35 ± 1 °C.

1,5 mL kapalné části z každého vzorku (PS-RGM nebo PS) bylo smícháno s 0,75 mL 5% vodného roztoku kyseliny mravenčí (v/v). Směs byla centrifugována po dobu 5 minut při 14 000 otáčkách za minutu (surový vzorek). Poté byly 2 ml supernatantu surového vzorku nanесeny SPE kolonku Strata SDB-L (Styren-Divinyl Benzen kopolymer; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Kolonka byla před nadávkováním vzorku kondicionována 2 mL methanolu a poté promyta 2 mL vodou a 2 mL 5% vodným roztokem kyseliny mravenčí (v/v). Po nanесení vzorku byly vysoce polární látky a anorganické soli vymyty 2 mL 5% vodného roztoku kyseliny mravenčí (v/v). Poté byl vzorek eluován 3 mL methanolu a vysušen do sucha proudem dusíku. Vysušený vzorek byl uskladněn v hlubokomrazicím boxu (-80 °C). Před analýzou LC/MS byly vzorky ponechány při laboratorní teplotě po dobu 10 minut a poté rozpuštěny v 1 mL 0,1% (v/v) kyseliny mravenčí.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Studium rozkladu anthokyaninů

5.1.1. Modelové roztoky anthokyaninů a floroglucinaldehydu

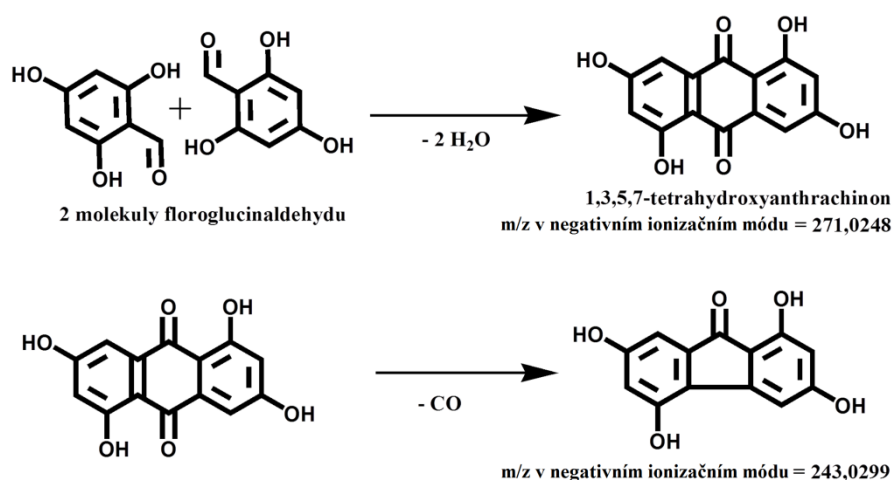
Odpad pocházející z výroby červených vín obsahuje velké množství flavonoidů včetně anthokyaninů. Chování těchto látek je velmi závislé na pH, což bylo blíže popsáno v teoretické části. V této kapitole jsou diskutovány experimenty rozkladu anthokyaninů (kyanidinu a malvidin-3-galaktosidu) a floroglucinaldehydu (PGA) při pH 7 (optimální hodnota pH pro anaerobní fermentaci) za zvýšené teploty (95°C) pro urychlení procesu transformace. Vliv pH na fermentaci bude diskutován v kapitole Anaerobní fermentace vinařského odpadu.

V roztocích anthokyaninů docházelo k jejich rychlému rozkladu a po jedné hodině nebyl ani v jednom případě detekován signál výchozí látky (tj. m/z 285,04 pro kyanidin (Cy) a m/z 491,16 pro malvidin-3-galaktosid (Mv3gl), při negativní ionizaci). Rychlý rozklad byl také pozorován u vznikajících fenolických kyselin (pro Cy kyselina protokatechová a pro Mv3gl kyselina syringová) a floroglucinaldehydu. V obou případech obsah fenolických kyselin dosáhl svého maxima po 1 hodině zahřívání a následně jejich obsah prudce klesal. U kyseliny protokatechové došlo k celkovému rozkladu po 4 hodinách a u kyseliny syringové po 24h. Floroglucinaldehyd nebyl detekován v žádném roztoku. Možným vysvětlením je následná reakce floroglucinaldehydu a tvorba nových sloučenin, které se ovšem v průběhu experimentů (např. vlivem změny složení roztoku) rozpadají opět za vzniku floroglucinaldehydu. Proto byla provedena série experimentů sledující chování samotného floroglucinaldehydu v roztoku o pH 7 a teplotě 95°C.

Nejvýraznější změna byla pozorována po 1 hodině zahřívání, kdy signál floroglucinaldehydu poklesl z výchozí hodnoty o 93,56%. Po 4 hodinách zahřívání byla v odpovídajícím rekonstruovaném chromatogramu patrná pouze stopa floroglucinaldehydu (0,15% z původní koncentrace). Důležitým momentem bylo nalezení tří látek s m/z 243,0324, 271,0255 a 271,0276. Na Obr. 11. je zobrazen rekonstruovaný chromatogram těchto tří látek získaný analýzou roztoku floroglucinaldehydu po jedné hodině zahřívání v roztoku o pH 7. Nutno zmínit, že tyto látky se vyskytují také v čase 0h a po jedné hodině se jejich obsah zvýšil o zhruba 85% (obsah látky m/z 243,0324 se zvýšil o 85,0%, látky m/z 271,0255 o 93,7% a látky s m/z 271,0276 o 79,2% oproti původní koncentraci v roztoku). To poukazuje na fakt, že uvedené procesy přeměn anthokyaninů a floroglucinaldehydu běží poměrně rychle už od počátku experimentu. Dalším zahříváním již docházelo ke snížení obsahu těchto látek. Po 4 hodinách již v roztoku nebyl nalezen pík látky s m/z 271,0255 eluující v čase 8,26 min. a obsahy dalších látek se snížily na 5 % (pro m/z 243,0324) a 8,3% (pro m/z 271,0276) jejich maximálního obsahu.

5.1.2. Identifikace neznámých látek vznikajících rozkladem floroglucinaldehydu

Při identifikaci jsme se zaměřili na tři látky s m/z 243,0324, 271,0255 a 271,0276. Všechny tři látky absorbují ve viditelné oblasti spektra a jsou tedy barevné (absorbanční maxima pro tyto látky jsou v rozmezí vlnových délek 444-487 nm; měřeno na UV detektoru s rozsahem 200-500 nm). Jedním z možných vysvětlení vzniku barevných produktů reakcí floroglucinaldehydu je jeho kondenzace za vzniku derivátů anthrachinonu. O anthrachinonech je známo, že jsou barevné a nemají negativní vliv na lidský organismus [38]. Pouze při vyšších častých dávkách může dojít melanóze (zbarvení) tlustého střeva [39]. Na možnost vzniku tetrahydroxyanthrachinonu poukazuje také reaktivnost molekuly floroglucinaldehydu uvedené v teoretické části v kapitole 2.6.1. Na Obr. 1. je znázorněno schéma reakce dvou molekul floroglucinaldehydu za vytvoření 1,3,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu.

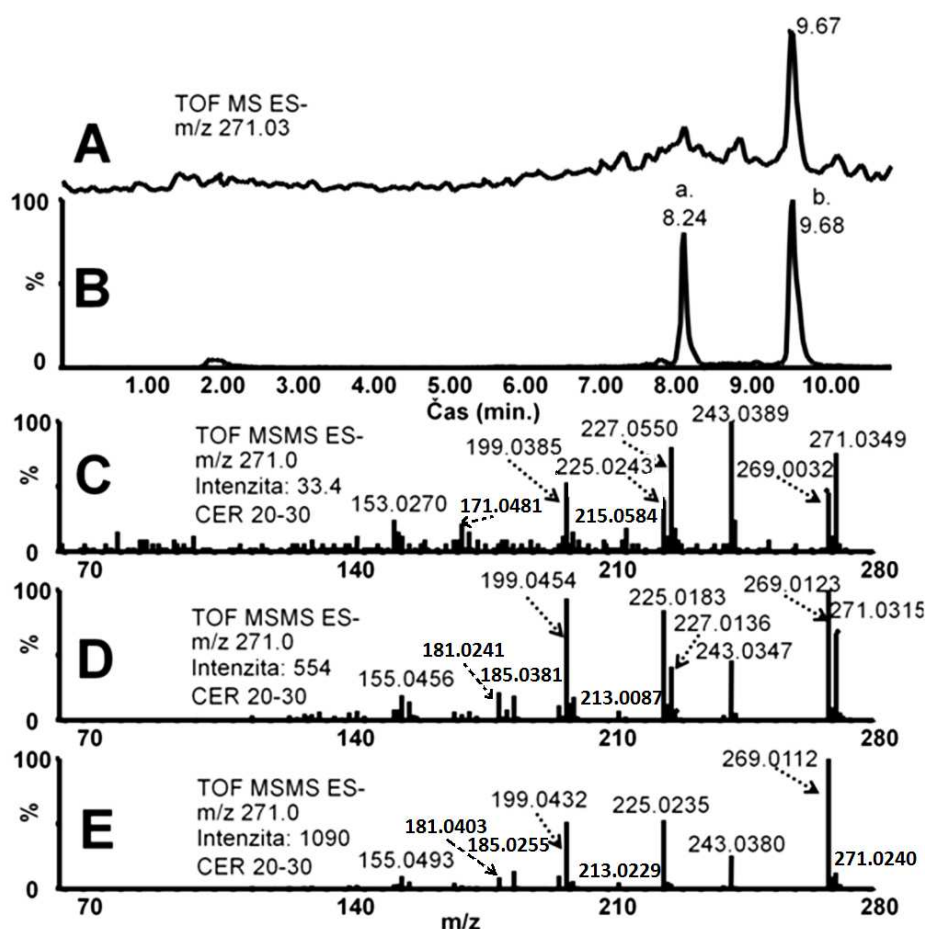


Obr. 1. Schéma reakce 1,3,5,7-tetrahydroxy-anthrachinonu a následně látky s m/z 243,03

Odchytky měřených hodnot m/z od teoreticky vypočítaných jsou pro tetrahydroxyanthrachinon malé (dtm 0,7 a 2,8 mDa). Rodičovský ion látky s hodnotou m/z 243,0324 je o 27,9933 Da nižší (oproti m/z hodnotě prvně eluujícího derivátu anthrachinonu). Tato diference odpovídá ztrátě jedné molekuly CO, může tedy jít o dekarboxylaci některého z izomerů s hodnotou m/z 217. Odchytky měřené hodnoty m/z navrženého dekarboxylačního produktu látky je 2,5 mDa. Na Obr. 2A-B je porovnání retenčního profilu laboratorně připraveného anthrachysenu s neznámými látkami s m/z 271,03. Z obrázku je patrné, že standard má stejný eluční profil jako látka, která eluuje v čase 9,67. Při porovnání fragmentačních spekter syntetizovaného standardu anthrachysenu a neznámých látek (Obr. 2C-E) byla pozorována shoda v přítomnosti určitých fragmentů, tj. 243,0389, 225,0243 a 199,0385. Tyto fragmenty odpovídají postupným ztrátám dvou molekul CO, molekuly vody a atomu kyslíku. Ztráta atomu kyslíku je v negativním ionizačním módu poměrně neobvyklá. Nicméně stejné fragmenty pozorovali také autoři Stodůlová a kol. při fragmentaci 1,3,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu (struktura identifikována pomocí NMR [40]) s využitím iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací [41]. Díky shodě profilů spekter STD

s neznámými látky a literaturou můžeme předpokládat, že kondenzací floriglucinaldehydu v námi studovaných podmínkách vzniká 1,3,5,7-tetrahydroxyanthrachinon případně jeho izomery.

Vycházíme-li z předpokladu, že měřené vzorky mají stejnou molekulovou hmotu jako standard, tak podle vodíkového (NMR) spektra by se mohlo jednat o 1,3,5,7-tetrahydroxyanthrachinon a/nebo 2,3,6,7-tetrahydroxyanthrachinon. Ačkoli se vznikající anthrachinonová barviv ve studovaných směsích vzhledem k jejich malé koncentraci nepodařilo zcela potvrdit NMR měřením, je identifikace pomocí LC/MS poměrně přesvědčivá (shodný retenční čas a velmi podobné UV spektrum pořízené DAD detektorem, shodující se hodnoty m/z rodičovských iontů i přítomnost stejných fragmentů v MS/MS spektru, shoda s již publikovanými výsledky).

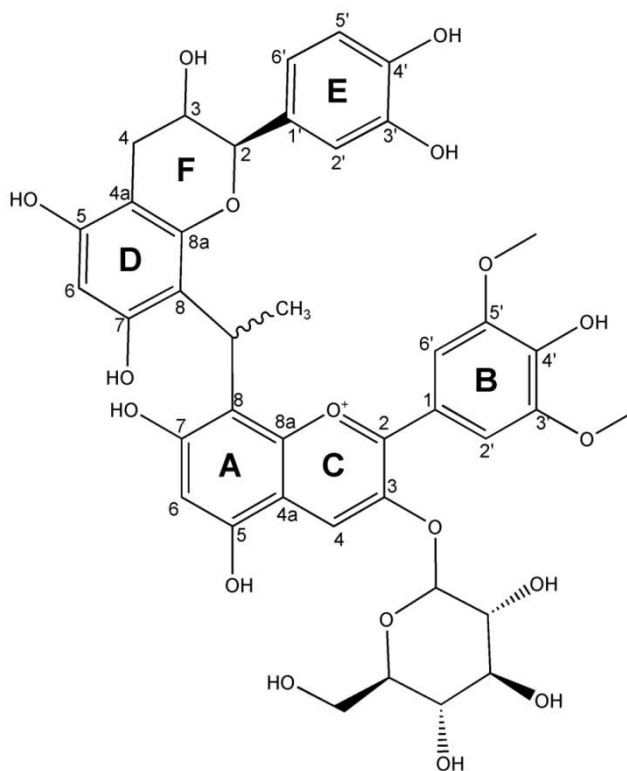


Obr. 2. Rekonstruované chromatogramy pro látku s m/z 271,03 (A – STD; B – neznámé látky m/z 271,0255 (a.); 271,0276 (b.)) a fragmentační spektra standardu (C) a neznámých látek (D, m/z 271,0255, RT 8,24 a E, 271,0276, RT 9,68)

Výsledky studia přeměn anthokyaninů, floriglucinaldehydu a analýza nově vznikajících anthrachinonových barviv byly publikovány v Chemických Listech [42] a prezentovány na konferencích formou posterů [43, 44].

5.2. Studium kondenzace flavonoidů

Při zpracování červených hroznů révy vinné dochází k chemickým přeměnám anthokyaninových barviv a dalších flavonoidních látek a vzniku nových strukturně složitějších molekul. Jde o dlouhodobě velmi zevrubně studovanou a pozorně sledovanou problematiku [45, 46] zejména ze dvou důvodů: 1.) vznikající kondenzovaná barviva výrazným způsobem mění senzorické vlastnosti vína, případně dalších vyráběných produktů a 2.) vlastnosti těchto látek a jejich účinek na lidský organismus a životní prostředí jsou velmi málo prostudovány. Zajímavou skupinou kondenzovaných barviv jsou sloučeniny, ve kterých je molekula anthokyaninu spojena s molekulou jiného flavonoidu (např. katechinu) ethylidenovým můstkem. Odpovídající produkty reakce mezi malvidin-3-glukosidem (nejběžnějším anthokyaninem vyskytujícím se v červených hroznech) a katechinem v prostředí acetaldehydu byly podrobně popsány Pissarrou a kol v roce 2005 (diastereomery (+)-katechin-ethyl-malvidin-3-glukosidu, CeM3G) [36]. Tato kapitola se zabývá vývojem nanoLC metody pro separaci těchto diastereomerních látek s ohledem na její možné nasazení při kontrole kondenzovaných barviv ve vinařských produktech a vznikajícím odpadu. Metoda byla z hlediska chromatografických parametrů porovnána s metodou paralelně vyvinutou pro běžnou kapalinovou chromatografii. Jejich struktury ukazuje Obr. 3.



Obr. 3. Struktura diastereomerů C a D

5.2.1. Nano-kapalinová chromatografie

Jedním z hlavních trendů v moderní analytické chromatografii je miniaturizace. Toto samozřejmě také platí pro kapalinovou chromatografii (kapilární/nanoLC systémy). Výhody těchto systémů tkví převážně ve zmenšení chromatografického zředění v koloně s čímž souvisí zlepšení detekčních parametrů, a v řadě případů ve vyšší separační účinnosti a rozlišení. Další výhodou je

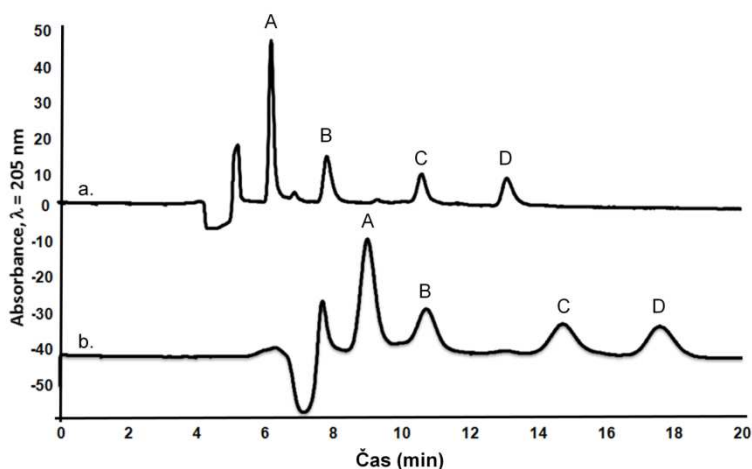
menší spotřeba vzorku a mobilní fáze a zlepšení kvality hmotnostních spekter (zvýšení citlivosti) při spojení s nanoelektrosprejem. Díky těmto vlastnostem je nanokapalinová chromatografie šetrná k životnímu prostředí a provozně levnější separační technika [34]. Prvním úkolem při vývoji nanoLC metody byla příprava kapilárních chromatografických kolon. Mezi nejčastěji používané sorbenty ve vysokoučinné kapalinové chromatografii a miniaturizovaných technikách patří plně porézní sorbenty. První separace byly provedeny s 250 mm dlouhou kapilární kolonou laboratorně na plněnou stacionární fází Chromosphere C18 s velikostí částic 3 μm . Na této koloně byla sledována separace obou diastereomerů CeM3G a jejich prekurzorů (malvidin-3-glukosid a katechin). Byl prostudován vliv složení mobilní fáze na retenci a selektivitu sledovaných analytů při izokratické separaci. S ohledem na potenciální propojení nanoLC techniky s hmotnostním spektrometrem byly pro separace používány těkavé mobilní fáze. Mobilní fáze byly připraveny smícháním vody, acetonitrilu (ACN) a trifluoroctové kyseliny (TFA).

V souladu s nepolárním charakterem stacionární fáze docházelo se zvyšujícím se podílem vody v mobilní fázi k výraznému zlepšení rozlišení analytů. Při použití mobilní fáze (MF) skládající se ze směsi voda:ACN (80:20) okyselené 0,1% TFA (v/v/v) došlo k oddělení všech sledovaných analytů (reaktanty - A,B; reakční produkty - C,D).

Vliv množství TFA v mobilní fázi byl také sledován. Nejrychlejší separace byla získána při okyselení mobilní fáze 0,4% TFA (méně než 13 min.) z důvodu posunutí rovnováhy (flavyliový kation/karbinol pseudobáze) směrem k flavyliovému kationtu (vyšší polarita). Nicméně takto vysoká koncentrace TFA může poškodit chromatografickou kolonu (hydrolyza navázaných oktadecylových řetězců). Z tohoto důvodu byla pro další experimenty použita 0,1% TFA jako kompromis mezi dostatečným rozlišením všech látek v reakční směsi (včetně minoritních nečistot eluujících mezi katechinem a malvidin-3-glukosidem a mezi malvidin-3-glukosidem a prvním z eluujících diastereomerních můstkových barviv) a stabilitou analytů a stacionární fáze.

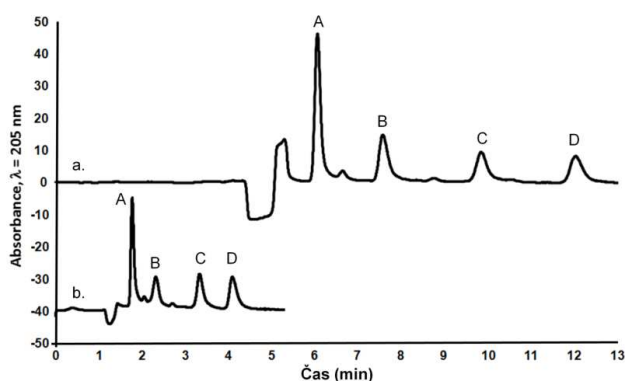
V současné době jsou velmi populární povrchově porézní stacionární fáze, které dovolují realizovat velmi účinné separace za tlaků únosných pro koncentrickou kapalinovou chromatografii (do 400 bar) [48]. Z tohoto důvodu byla porovnávána plně porézní stacionární fáze Chromosphere C18 s povrchově porézní SF Kinetex C18. Pro analýzu reakční směsi byla dále použita MF se složením voda:ACN/79:21 s 0,1% TFA (v/v/v). Při použití povrchově porézní SF byla pozorována menší účinnost v porovnání s plně porézní SF (Obr. 4). Kolona naplněná SF Chromosphere C18 dosáhla u látek ve studované směsi nejlepší účinnosti 9 667 teoretických pater, zatímco kolona s SF Kinetex C18 pouhých 2 342 pater (tj. 9667 (Cat), 5117 (Mv-3-Glu), 8060 (CeM3G diasteromer, C) a 7849 (CeM3G diasteromer, D) pro Chromosphere C18 a 2342 (Cat), 1848 (Mv-3-Glu), 1893 (CeM3G diasteromer, C) a 2224 (CeM3G diasteromer, D) pro Kinetex C18) při použití kolon o stejných rozměrech. Důvodem horší separace na koloně Kinetex C18 může být částečné překročení kapacity kolony. To naznačují i rozdíly v retenčních faktorech: 0.17 (Cat), 0.40 (Mv-3-Glu), 0.91 (CeM3G diasteromer, C) a 1.28 (CeM3G diasteromer, D) pro povrchově porézní částice

v porovnání s 0.19 (Cat), 0.50 (Mv-3-Glu), 1.02 (CeM3G diastereomer, C) a 1.49 (CeM3G diastereomer, D) pro plně porézní částice. Nižší účinnost separace může být také v určité míře ovlivněna komplikovanější přípravou povrchově porézních kolon.



Obr. 4. Nano-LC chromatografická separace reakční směsi na dvou kolonách s různou SF. a. plně porézní Chromosphere C18; b. core-shell Kinetex C18; MF 79:21 voda:ACN okyselená 0,1 TFA (v/v/v). A. (+)-katechin; B. malvidin-3-glukosid; C. a D. CeM3G diastereomery.

Pro další experimenty byla použita SF Chromosphere C18 z důvodu lepších chromatografických parametrů. Pro další zlepšení účinnosti a zkrácení doby analýzy byla připravena kratší kolona. Na Obr. 5 je zobrazena separace reakční směsi pomocí kratší kolony (150 mm x 100 μm). Bylo dosaženo dostatečného rozlišení všech složek za méně než 6 minut (průtok 360 nL min^{-1}). Separační účinnost přesáhla 9500 teoretických pater pro CeM3G diastereomer C. HETP jednotlivých složek u 25 cm dlouhé kolony Chromosphere C18, tj. 26 μm (Cat), 49 μm (Mv-3-Glu), 31 μm (CeM3G diastereomer, C) a 32 μm (CeM3G diastereomer, D) poklesl u 15 cm kolony na 7 μm (Cat), 15 μm (Mv-3-Glu), 7 μm (CeM3G diastereomer, C) a 7 μm (CeM3G diastereomer, D). Výrazné zlepšení účinnosti je dosaženo i proto, že kratší kolony je možno naplnit homogenněji [49].



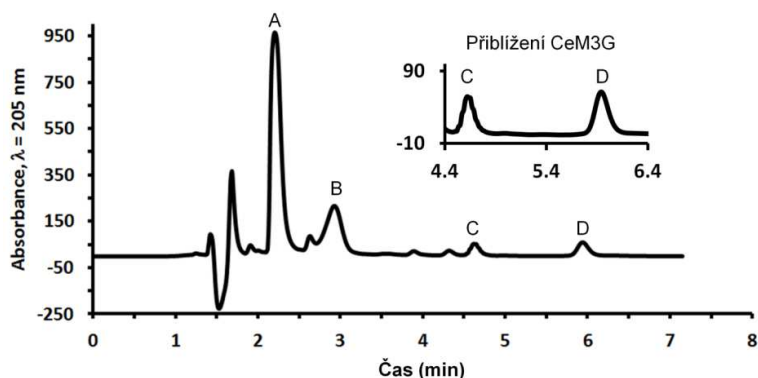
Obr. 5. Porovnání dvou různě dlouhých kolon pro separaci reakční směsi. a. 25 cm dlouhá kolona; b. 15 cm dlouhá kolona. 80:20 voda:ACN okys. 0,1% TFA (v/v/v). A. (+)-katechin; B. malvidin-3-glukosid; C. a D. CeM3G diastereomery.

Vedle náplňových kolon byla retenční studie studována také na monolitické koloně Chromolith CapRod (Merck Millipore, Darmstadt, Německo). Tento typ kolon má jedinečné vlastnosti, umožňující rychlejší a účinnější separace zejména pomalu difundujících molekul za nízkého zpětného tlaku. U monolitické kolony byl HETP 34 μm (Cat), 34 μm (Mv-3-Glu), 22 μm (CeM3G

diastereomer, C) a 13 μm (CeM3G diastereomer, D), což je výrazně horší než při použití 15 cm náplňové kolony Chromosphere C18 (HETP se pohybovalo v rozmezí 7-15). Selektivita pro separaci obou CeM3G diastereomerů je srovnatelná. Monolitická kolona ale za uvedených podmínek nedovoluje dostatečnou separaci páru katechin-malvidin v reakční směsi. Jednotlivé chromatografické parametry jsou uvedeny v Tab.1.

5.2.2. Porovnání konvenční vysoko-účinné kapalinové chromatografie s nano-kapalinovou chromatografií

Na Obr. 6 je zobrazena separace reakční směsi pomocí konvenční HPLC s kolonou Chromosphere 3 C18 (100 mm x 4.6 mm, $d_p = 3 \mu\text{m}$). Průtok $0,762 \text{ mL min}^{-1}$ byl nastaven tak aby odpovídal stejné lineární průtokové rychlosti MF, jaká byla použita u nanoLC metody. Pro optimalizovanou HPLC metodu byl použit nástřik 5 μL . Kromě koeluze malvidin-3-glukosidu s neznámou minoritní nečistotou ($R = 1,01$) poskytla optimalizovaná HPLC metoda separaci všech složek reakční směsi s vyhovujícím rozlišením. Analýzy byla uskutečněna za méně než 7 min.



Obr. 6. HPLC separace reakční směsi pomocí kolony Chromosphere C18. rozměry kolony (100 x 4,6 mm, velikost částic $3 \mu\text{m}$), mobilní fáze 80:20 voda:ACN oks. 0,1% TFA(v/v/v); A. (+)-katechin; B. malvidin-3-glukosid; C. a D. CeM3G diastereomery.

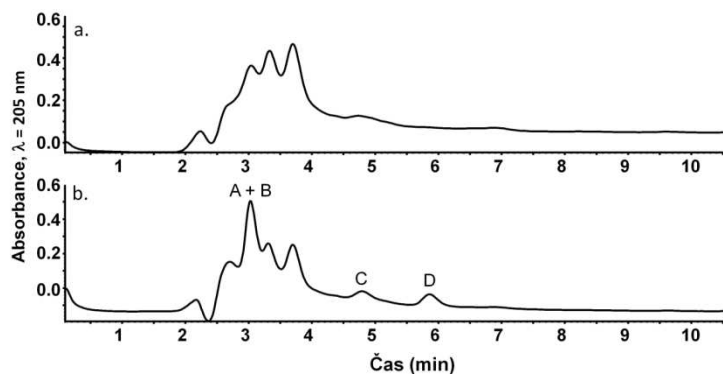
V Tab.1. jsou uvedeny základní chromatografické parametry získané z měření pomocí nano-LC a HPLC. Nano-kolona Chromosphere poskytla vyšší retenci a separační účinnost (nižší HETP, přibližně 10krát pro (+)-katechin a malvidin-3-glukosid a 3krát pro CeM3G diastereomery) v porovnání s konvenční HPLC. Na druhou stranu lepší selektivita pro CeM3G diastereomery (rozdíl v selektivním faktoru 1,4-14,1%) a vyšší rozlišení všech látek byly získány pomocí konvenční HPLC (rozdíl 35,6-91,6%) oproti nano-LC koloně. Výše uvedené výsledky pro konvenční HPLC byly získány za optimálních podmínek separace. Nástřikový objem při optimalizovaných HPLC experimentech odpovídal 5,3% nástřikového objemu použitého pro nano-LC. Pro srovnání chování nano a konvenční kolony byl v dalším experimentu nastřikovaný objem u HPLC systému zvýšen tak, aby odpovídal stejné části objemu kolony (5.3% celkového objemu kolony), který byl použit u nano-LC systému. Při tomto "škálovaném" experimentu byly plochy píků zhruba 10x větší v porovnání s optimalizovaným HPLC experimentem. U píků (+)-katechinu a malvidin-3-glukosidu bylo pozorováno zvětšení šířek píků. CeM3G diastereomerů byly šířky píků měřené

u „škálovaného“ experimentu srovnatelné s optimalizovaným experimentem. Nicméně u škálovaného experimentu bylo pozorováno zhoršení rozlišení u všech sledovaných látek. Na druhou stranu, za optimalizovaných podmínek poskytuje konvenční HPLC metoda lepší rozlišení a menší asymetrii píků oproti nano-LC.

	t_R (min)	$W_{50\%}$ (min)	HETP (μm)	k	α	SD	A_s	R	SD
nanoLC: Chromosphere C18, 150 mm x 100 μm , 3 μm , průtok 360 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$, nástřik 100 nL									
(+)-katechin	0,73	0,08	7	0,61	-	-	2,33	-	-
malvidin-3-glukosid	1,60	0,17	15	1,34	1,94	$\pm 0,049$	1,11	1,73	$\pm 0,021$
CeM3G diastereomer C	3,37	0,19	7	2,83	1,84	$\pm 0,019$	1,78	2,73	$\pm 0,218$
CeM3G diastereomer D	4,70	0,25	7	3,94	1,39	$\pm 0,003$	2,13	2,01	$\pm 0,244$
nanoLC: Chromolith CapRod, 150 mm x 100 μm , 3 μm , průtok 360 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$, nástřik 30 nL									
(+)-katechin	0,59	0,34	34	0,19	-	-	1,05	-	-
malvidin-3-glukosid	0,59	0,34	34	0,19	1,00	$\pm 0,000$	1,05	0	$\pm 0,000$
CeM3G diastereomer C	1,26	0,32	22	0,41	2,16	$\pm 0,099$	1,13	1,21	$\pm 0,043$
CeM3G diastereomer D	1,69	0,28	13	0,55	1,33	$\pm 0,017$	1,31	0,84	$\pm 0,058$
HPLCopt: ChromSphere C18, 100 mm x 4,6 mm, 3 μm , průtok 0,761 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, nástřik 5 μL									
(+)-katechin	0,77	0,15	84	0,54	-	-	2,00	-	-
malvidin-3-glukosid	1,50	0,20	84	1,05	1,92	$\pm 0,028$	0,91	2,48	$\pm 0,132$
CeM3G diastereomer C	3,18	0,15	19	2,22	2,12	$\pm 0,005$	1,57	6,34	$\pm 0,502$
CeM3G diastereomer D	4,50	0,17	15	3,14	1,41	$\pm 0,004$	1,50	5,41	$\pm 0,475$
HPLCscaled: ChromSphere C18, 100 mm x 4,6 mm, 3 μm , průtok 0,761 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, nástřik 88 μL									
(+)-katechin	0,93	0,30	273	0,67	-	-	3,17	-	-
malvidin-3-glukosid	1,60	0,47	246	1,14	1,69	$\pm 0,021$	0,75	1,01	$\pm 0,025$
CeM3G diastereomer C	3,42	0,17	13	2,44	2,14	$\pm 0,013$	1,45	3,65	$\pm 0,200$
CeM3G diastereomer D	4,73	0,18	12	3,38	1,39	$\pm 0,007$	1,57	4,63	$\pm 0,199$

Tab.1. Hlavní parametry separace reakční směsi pomocí nanoLC a HPLC systému. t_R = redukovaný retenční čas; $W_{50\%}$ = šířka píku v polovině výšky; HETP = výškový ekvivalent teoretického patra; k = retenční faktor; α = selektivita; A_s = asymetrie píku; R = rozlišení (počítáno vždy pro sousední píky (+)-katechinu, malvidin-3-glucosidu a oba CeM3G diastereomery)

Pro zjištění použitelnosti nano-LC metody pro analýzu reálného vzorku byl na kapilární kolonu nastříknut extrakt vinařského opadu (matoliny červených hroznů). Obr. 7. ukazuje analýzu vzorku matolin (a) a vzorku s přidavkem malvidin-3-glukosidu, katechinu a CeM3G diastereomerů (b). Ve vzorku s přidavkem těchto složek jsou patrné píky obou diastereomerů, které jsou dobře separovány od majoritních složek přítomných matolinách a jsou i vzájemně velmi dobře rozlišené (matrice tedy nemá významný vliv na vzájemnou separaci těchto diastereomerních můstkových barviv) (Obr. 7b.). Vyvinutá metoda separace těchto barviv na nano-koloně může být základem rychlého analytického postupu pro kontrolu kondenzovaných barviv v odpadech z vinařského průmyslu.



Obr. 7. Analýza extraktu matolin z červených hroznů (a) a extraktu s přidavkem (+)-katechinu (A); malvidin-3-glukosidu (B) a CeM3G diastereomerů (C, D) (b); kolona: Chromosphere C18 (150 mm x 100 μm i.d.), MF 80:20 $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ okys. 0.1 % TFA (v/v/v).

Výsledky uvedené v této kapitole byly publikovány v Journal of Chromatography A [34].

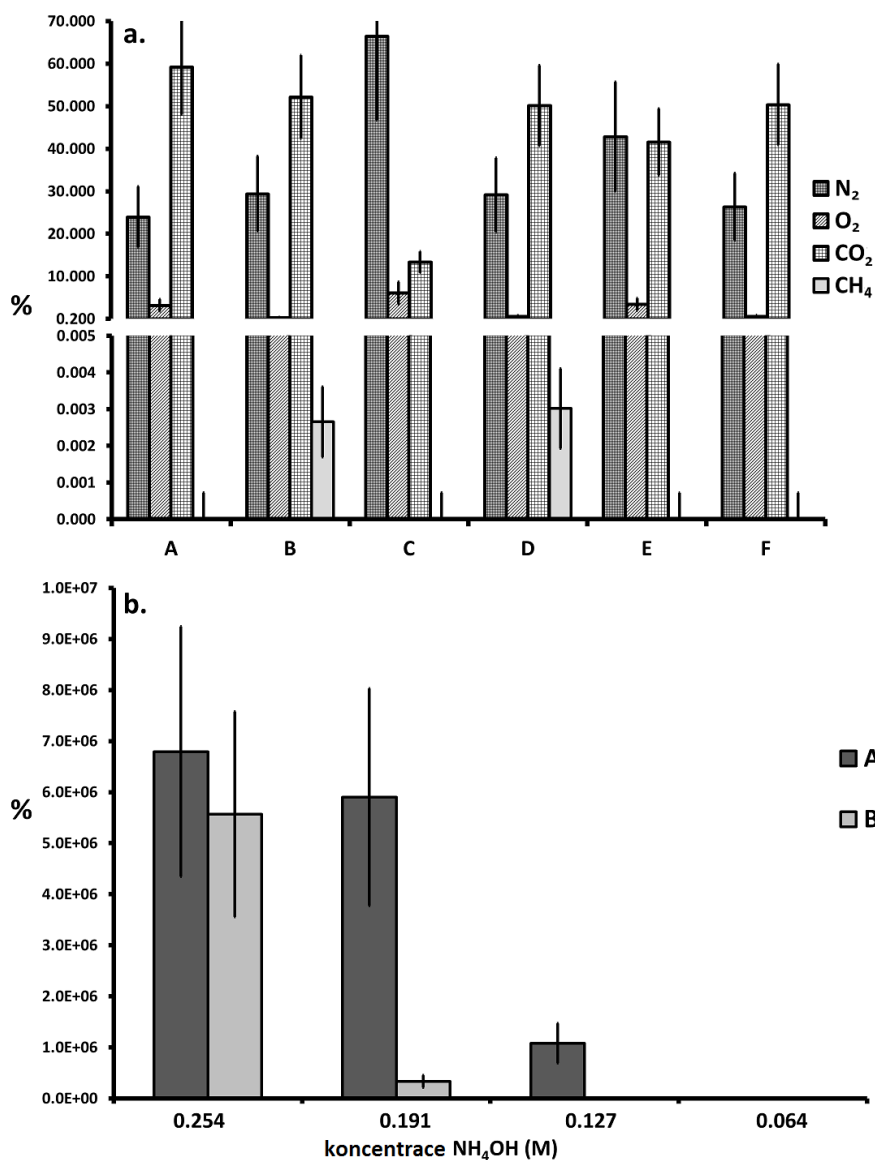
5.3. Anaerobní fermentace vinařského odpadu

5.3.1. Optimalizace anaerobní fermentace

Anaerobní fermentace je efektivní ekologická metoda pro zpracování biologicky rozložitelného odpadu za současné výroby levné elektrické a tepelné energie. Odpady můžeme v tomto ohledu rozdělit na dvě velké skupiny: 1) lehce zplynitelné, kam patří například kukuřičné siláž a řepné řízky a 2) těžce zplynitelné kam patří například odpad z vinařské výroby. Mezi hlavní důvody inhibující metanogenezi vinařského odpadu patří nízké pH a vysoký obsah flavonoidů (antibakteriální účinky). Z tohoto důvodu je nutné objasnit procesy přeměny flavonoidů za anaerobních podmínek a současného vývoje bioplynu (CO_2 a CH_4). Pro dosažení stabilní metanogeneze je nutné celý systém optimalizovat. Optimalizace anaerobní fermentace v mikroměřítku byla rozdělena do dvou částí. První část optimalizace zahrnovala hodnocení vlivu různých aditiv ve vzorku. Vzorky byly připraveny smícháním prasečí kejdy (PS), výlisky červených hroznů (RGM), vody, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ roztoku methanogenních bakterií (MetBac) a thioglykolátového média (TGM) v různých poměrech (MetBac a TGM byly přidány pro urychlení množení methanogenních bakterií a vyšší produkci methanu). Přípravek MetBac APD BIO GAS je hojně využíván v čistírnách odpadních vod pro urychlení a zvýšení účinnosti rozkladu organického.

Obr. 8a. zobrazuje porovnání obsahu čtyř plynů (N_2 , O_2 , CO_2 , CH_4) ve fermentačních směsích různého složení inkubovaných v objemu 2 mL po 23 denní anaerobní fermentaci (složení fermentačních směsí je uvedeno v legendě k tomuto obrázku). Nejvyšší obsah methanu byl nalezen v roztocích B a D (přibližně 0,003%). V roztocích A, C, E a F nebyl detekován žádný methan v průběhu anaerobní fermentace. Přítomnost prasečí kejdy ve fermentační směsi je tedy pro efektivní zplyňování nezbytná. pH v roztoku A pokleslo z hodnoty 4,0 na 3,4; v roztoku B z 7,8 na 4,0; v roztoku C z 4,0 na 3,4; v roztoku D z 7,8 na 4,4; v roztoku E z 7,8 na 4,2 a v roztoku F z 7,2 na 4,4. Tyto předběžné experimenty dále ukazují, že přídavek MetBac (D) nijak nezlepší produkci methanu (porovnání se vzorkem B). Z tohoto důvodu byla v dalších experimentech použita směs prasečí kejdy a výlisků červených hroznů (PS-RGM) bez přídavku MetBac a TGM.

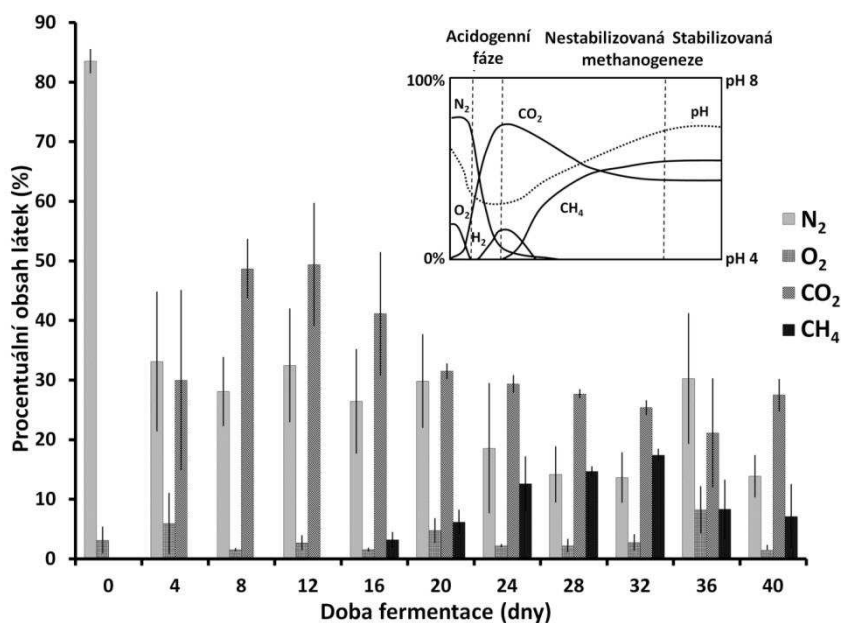
V druhé části optimalizačních experimentů byl sledován vliv přídavku hydroxidu amonného (vliv na pH směsi) na proces gasifikace fermentačních směsí o různém poměru vstupních složek (tj. PS a RGM). Obr. 8b. poukazuje na fakt, že udržování pH reakční směsi v alkalicko-neutrální oblasti je klíčová podmínka pro vznik a udržení metanogeneze, přinejmenším při anaerobní fermentaci za diskontinuálních podmínek. Větší množství PS a hydroxidu amonného zajišťují stabilní podmínky anaerobní fermentace (pH reakční směsi pokleslo v průběhu experimentu z 9,8 na 7,4). Pro další studii byla zvolena koncentrace NH_4OH $0,127 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (koncentrace v roztoku) jako kompromis zajišťující stabilní anaerobní fermentaci a udržení přímého působení amoniaku na studované polyfenolické látky v malém rozsahu oproti jejich přeměnám vlivem fermentačních procesů (pH tohoto roztoku pokleslo z 9,54 na 6,57 po 21 dnech).



Obr. 8. Procentní obsah N_2 , O_2 , CO_2 , CH_4 po 23 dnech anaerobní fermentace (a.) a efekt přidavku NH_4OH na produkci methanu v různých poměrech vepřové kejdy a matolin z červených hroznů (b); a. - A) 200 mg RGM + 2 mL vody; B) 100 mg RGM + 450 mg PS + 2 mL vody; C) 200 mg RGM + 2 mL vody + 1 μ L MetBac; D) 100 mg RGM + 450 mg PS + 2 mL vody + 1 μ L MetBac; E) 200 mg RGM + 2 mL TGM + 1 μ L MetBac; F) 100 mg RGM + 450 mg PS + 2 mL TGM + 1 μ L MetBac; b. - A) 750:50 = PS-RGM (m/m); B) 500:50 = PS-RGM (m/m).

Proces anaerobní fermentace za optimálních podmínek (poměr PS:RGM 750:50, m/m; konečná koncentrace NH_4OH 0,127 mol L^{-1} ; 35°C) byl kontrolován pomocí GC/MS (analýza 4 hlavních plynů). Obr. 9. zobrazuje proces anaerobní fermentace v reakční směsi probíhající v našem experimentu v mikroreaktoru a porovnává jej se změnami v obsazích hlavních plynů popsanych v literatuře [50]. V první části fermentace (při hydrolyze) dochází k rychlému poklesu kyslíku a dusíku, které jsou hlavními složkami vzduchu. Obsah oxidu uhličitého se zvyšuje za současného poklesu pH. Tento trend může je rovněž pozorován v další fázi fermentace - při acidogenezi. Ve finální fázi (methanogenezi) dochází k prudkému nárůstu methanu se současným poklesem CO_2 a H_2 [50]. Diskontinuální fermentace PS-RGM vykazuje stejný profil hlavních plynů jaký je uveden ve vloženém obrázku (Obr. 9.). Změny v profilu plyných složek v našem diskontinuálním mikro-reaktoru jsou kvalitativně ve velmi dobré shodě s optimálním (teoretickým) průběhem fermentace popsáním v literatuře. Tento fakt ukazuje, že řada procesů souvisejících

s anaerobní fermentací může být dobře studována v mikroreaktoru (v laboratorních podmínkách) za výrazného snížení nákladů na experimenty. Výsledky z našeho experimentu anaerobní fermentace vinařského odpadu poukazují na to, že relativně snadnou modifikací vstupního materiálu (úprava pH) je možné docílit zplynění tohoto materiálu a také kvalitativně potvrzují studii Frabbriho a kol [18] popisující analýzu plyných složek v reakční směsi složené z PS a vinařského odpadu. Současně s odebíráním plyných složek z vnitřní atmosféry mikro-reaktoru byly odebírány vzorky digestátu pro analýzu pomocí LC/MS, která je popsána v následující kapitole.



Obr. 9. Změny v zastoupení hlavních plynů během diskontinuální anaerobní fermentaci směsi PS a RGM (vložený obrázek ukazuje optimální podmínky anaerobní fermentace - publikováno s povolením autorů [50]).

5.3.2. Analýza digestátu pomocí LC/MS

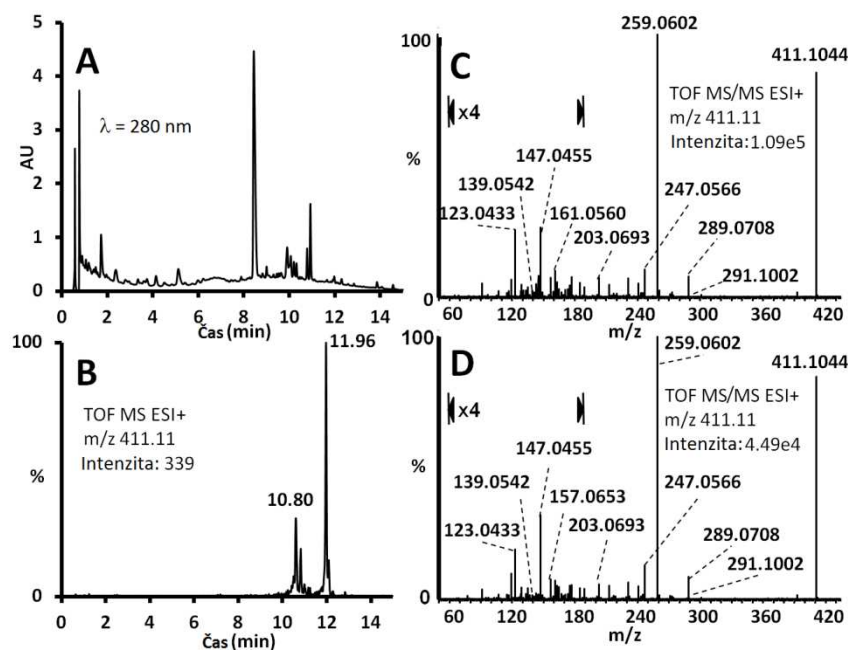
Vzorky digestátu byly odebírány z reaktoru injekční stříkačkou přes šroubovací víčko a septum uzavírající headspace vialku (použitou jako mikroreaktor) a analyzovány pomocí LC/MS. Surová LC-MS data získaná analýzou PS-RGM a PS (jako blank) směsí v počáteční fázi anaerobní fermentace (startovací podmínky, 1. fáze) byly zpracovány pomocí softwaru MarkerLynx. Pomocí tohoto softwaru byla provedena extrakce retenčních časů, m/z hodnot a intenzit, normalizace a zarovnání (alignment) dat a získána odpovídající datová matice (popisující relativní rozdíly v intenzitách mezi jednotlivými páry RT_m/z hodnot). Dále byla data upravena pomocí logaritmické transformace pro potlačení kvantitativní a zvýšení kvalitativní funkce dat. Vzniklý soubor dat byl zpracován pomocí statistického softwaru EZinfo a studován pomocí analýzy hlavních komponent (PCA). Pro nalezení látek odpovědných za segregaci dat byla použita ortogonální projekce do latentních struktur (OPLS-DA). Markery s největší variabilitou (vyjádřenou x-souřadnicí) a zároveň věrohodností (vyjádřenou y-souřadnicí) byly extrahovány z příslušného S-plotu z oblasti nejnižšího rizika. V našem případě je tato oblast (v literatuře popisovaná, jako „oblast malého rizika“ – „low risk region“) definována jako obdélník se souřadnicemi:

p[1] = 30-100% z nejvyšší hodnoty na ose x a p[2] = 75–100% z nejvyšší hodnoty na ose y. Nejvýznamnější markery byly detailně studovány pomocí cílených LC/MS/MS experimentů.

Ve MS/MS spektrech chromatograficky oddělených markerů 1 a 8 ($R = 2,34$) s hodnotami m/z 303.0530 a 303.0540 byly nalezeny charakteristické fragmenty kvercetinu [51], tj. m/z 229,0463 a 229,0529 (odchylka od teoretické hmoty, dtm, je 3,8 a -2,8 mDa); 153,0167 (dtm 2,1 mDa) a 137,0236 (dtm 0,3 mDa) - poslední dva fragmenty mají stejnou hodnotu m/z u obou markerů. Tyto fragmenty lze vysvětlit postupnými ztrátami dvou molekul oxidu uhelnatého a vody z rodičovského iontu a retro-Diels Alderovým (RDA) štěpením (produkce $^{1,3}A^+$ fragmentu). Ve fragmentačních spektrech byly dále nalezeny minoritní fragmenty vznikající dalšími ztrátami molekuly vody, CO a RDA štěpením, které potvrzují strukturu kvercetinu. Pro potvrzení identity těchto markerů byl do reakční směsi přidán standard kvercetinu. Retenční čas standardu se výrazně lišil od nalezených markerů. Detailním studiem MS spekter obou markerů byly nalezeny ionty m/z 465,1067 a 465,1068, které mají stejný RT jako signál iontů s m/z 303.0530 a 303.0540. Zjištěné markery jsou tedy v glykosylované formě (dtm pro glykosylované formy je 3,4 a 3,5 mDa). Dominantním fragmentem v cíleně měřených MS/MS spektrech iontů těchto glykosidů je látka s m/z 303,0522 a 303,0534, což jednoznačně potvrzuje, že markery nalezené pomocí OPLS-DA vznikají z iontů s m/z 465. Detailní studium RDA fragmentů ve fragmentačních spektrech markerů umožňuje lokalizovat umístění hydroxy skupin ve flavonoidním skeletu markeru 1 (detailní popis RDA fragmentací a nomenklatura je popsána v práci Cuyckense and Clayes [200]). Proces určování počtu hydroxy skupin na kruhu A a B je založen na RDA fragmentech, které jsou přítomny v MS/MS spektrech sledovaného markeru a standardu kvercetinu, tj. fragmenty s m/z 183.0456 ($^{0,2}A^+$, marker 1, dtm -16,3), 121.0280 ($^{0,2}B^+$, marker 1, dtm 1,0), 165.0183 ($^{0,2}A^+$, standard kvercetinu, dtm 0,5) a 137.0236 ($^{0,2}B^+$, standard kvercetinu, 0.3 mDa). Poměr signálů $^{0,2}A^+$ fragmentů ($Q=I_{183}/I_{165}$) ve spektru markeru 1 je $Q = 0,21$ a ve spektru kvercetinu $Q = 0,7$. Pokud provedeme stejné výpočty pro $^{0,2}B^+$ RDA fragmenty ($Q=I_{121}/I_{137}$), tak ve spektru markeru 1 získáme hodnotu $Q = 1,80$ a pro standard kvercetinu $Q = 0,25$. Tyto hodnoty podporují přítomnost jedné hydroxy skupiny na kruhu B a třech OH skupin na kruhu A (tj. struktury markeru 1 odpovídají 6- nebo 8-hydroxykaemferolu). Z důvodu nízké intenzity signálů RDA fragmentů v MS/MS spektru markeru 8 není možné určit rozmístění hydroxy skupin na molekule.

Na Obr. 10. je zobrazen chromatogram PS-RGM směsi při 280 nm (A – DAD detektor). Lze vidět, že PS-RGM je bohatá směs složek s různou strukturou a mezi nimi je i řada fenolických látek. Mezi eluovanými polyfenoly se vyskytují i tři dobře separované látky s m/z 411.11, jak ukazuje chromatogram rekonstruovaný pro tuto hmotu (B). Dvě z těchto látek patří mezi nalezené markery, RT_ m/z pár 10.59_411.1080 (marker 2) 11.95_411.1100 (marker 7). V kolizních spektrech obou látek byl nalezen fragment m/z 289.0708 ($C_{15}H_{13}O_6^+$, dtm, 0.4 mDa), který vzniká ztrátou hydroxybenzaldehydu ($\Delta m/z=122.0368$, dtm, -3.2 mDa). Tento fragment může být přiřazen protonizované molekule di-dehydrokatechinu. Dominantním fragmentem ve spektru je ion při

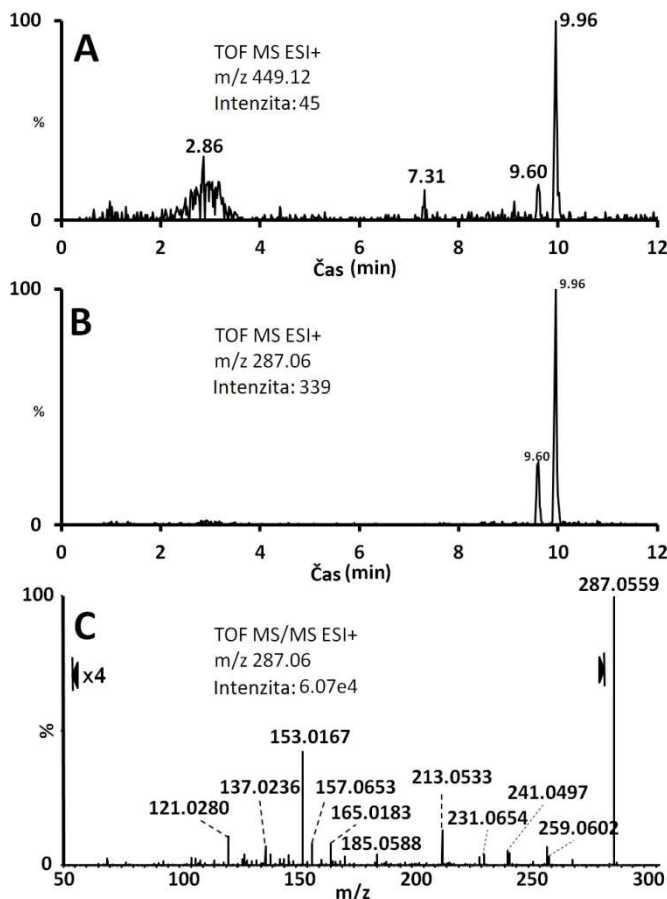
m/z 259.0602 ($C_{14}H_{11}O_5^+$, dtm, 0.4 mDa) odpovídající ztrátě methyl-esteru kyseliny hydroxybenzoové ($\Delta m/z=152.0442$, dtm, -3.1 mDa). Protonizovaná molekula hydroxybenzaldehydu byla rovněž nalezena ve spektru (m/z 123.0433, dtm -1.3). Na základě fragmentačních experimentů, mohou být markery 2 a 7 identifikovány jako izomery hydroxybenzoylkatechinu. Nutno zmínit, že fragmenty odpovídající protonizované molekule katechinu a kyselině hydroxybenzoové byly také nalezeny ve fragmentačním spektru hydroxybenzoylkatechinu, avšak s větší odchylkou od teoretické hodnoty m/z, což může být způsobeno nízkou intenzitou jejich signálů (tj, m/z 291.1002, dtm 13.3 a 139.0542; dtm 14.7 mDa). Pozice acylace na skeletu katechinu nebyla zjištěna, nicméně podle Smithe a kol., kteří se zabývali acylací prokyanidinů v různých rostlinných materiálech dochází nejčastěji k acylaci v pozici 3 [53]. Je nutné poznamenat, že signály těchto látek nebyly nalezeny v čistém extraktu vinařského odpadu a ani ve vepřové kejďě. Toto může být vysvětleno rychlou reakcí katechinu v PS-RGM směsi.



Obr. 10. Chromatogram PS-RGM směsi při 280 nm (A), rekonstruovaný chromatogram pro m/z 411.11 (B), MS/MS spektra markerů 2 a 7 (C,D; kolizní energie 10-40 eV).

Na Obr. 11 je zobrazen chromatogram pro rekonstruované hmoty m/z 449.12 a 287.06 (A, B). Dominantní pík s m/z 287.06 a RT 9.96 min. odpovídá markeru 3. Tento marker byl identifikován jako kaempferol. Postupné ztráty vody a oxidu uhelnatého poukazují na flavonoidní strukturu (tj. Obr. 11C.; fragmenty m/z 269.0457, 259.0602, 241.0497, 231.0654 atd.). Relativně silný signál RDA fragmentu m/z 121.0280 ($^{2,0}B^+$, dtm 1.0 mDa) poukazuje na přítomnost jedné hydroxy skupiny na B kruhu ($Q=I_{121}/I_{137}=1.5$). Ve spektru byly nalezeny také další RDA fragmenty, tj. 137.0236 ($^{0,3}A^+$, dtm 0.3), 153.0167 ($^{1,3}A^+$, dtm 2,1), 165.0183 ($^{0,2}A^+$, dtm 0,5). Na základě stejného elučního profilu látky s hodnotou m/z 449.12 lze usoudit, že kaempferol je v reakční směsi v glykosylované formě (mono hexosid). Intenzita signálu kaempferol-hexosidu byla nižší, než prahová hodnota

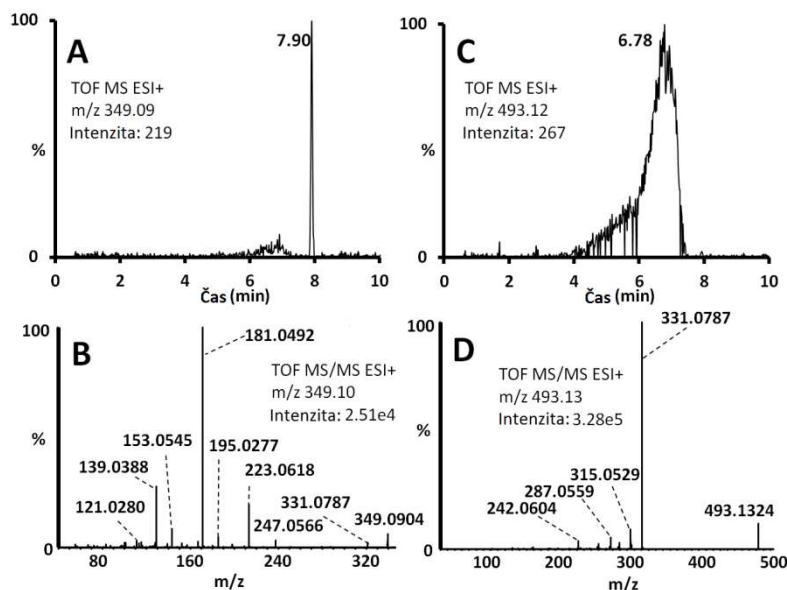
intenzity nastavená pro filtrování markerů od šumu při zpracování dat v programu MarkerLynx (100; marker intensity threshold). Při analýze čisté kejdy (referenční vzorek) nebyl v chromatogramu nalezen pík kaemferol-hexosidu. Tato látka je tedy rovněž důležitým markerem směsi PS-RGM, i přesto, že je v odpovídajícím spektru přítomna s nižší intenzitou. V chromatogramu na obrázku Obr. 11A. je patrný také široký pík kyanidin-3-glukosidu (RT 2,8 min.) a další dvě menší neidentifikované látky. Signály těchto látek byly rovněž pod nastavenou prahovou hodnotou intenzity.



Obr. 11. Rekonstruovaný chromatogram pro m/z 449.12 (A) a 287.06 (B) a MS/MS spektrum markeru 3 (C; CER 10-50 eV).

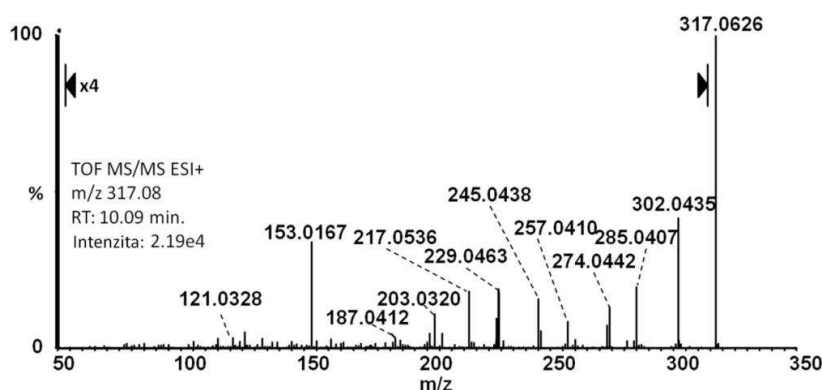
Marker 7,92_349,0970 (RT_m/z pár) byl identifikován jako malvidin chalkon. Na Obr. 12A. je zobrazen rekonstruovaný chromatogram pro tuto hmotu. Ostrý pík indikuje, že v roztoku převládá (otevřená) forma chalkonu (vzájemná konverze jednotlivých acidobazických forem hydratovaného malvidinu neovlivňuje retenci). V kolizním spektru (Obr. 12B.) můžeme pozorovat ztrátu molekuly vody (fragment s m/z 331,0787, dtm 3,1 mDa) následovanou ztrátou methylového radikálu (m/z 316,0453, dtm 13 mDa). Signál náležící ztrátě dvou molekul methanu byl také detekován v MS/MS spektru, avšak s vysokou odchylkou od teoretické hodnoty m/z z důvodu nedostatečného rozlišení pozadí (m/z 299.0547, dtm 35.5 mDa). Tyto procesy indikují přítomnost dvou methylových skupin v molekule. Dominantní fragment m/z 181,0492 odpovídá odštěpení acyliového kationtu kyseliny syringové z rodičovské molekuly chalkonu ($C_9H_9O_4^+$, dtm 0.9 mDa). Diagnostický fragment odpovídající kruhu A substituovaný třemi hydroxy skupinami (tj. (2-(2,4,6-trihydroxyfenyl)ethylidyn)oxonium, m/z 167.0316, $C_8H_7O_4^+$, dtm 2.8 mDa) byl rovněž pozorován ve spektru. Popsané fragmentační procesy této látky zcela potvrzují navrženou strukturu. Vyšší obsah chalkonu v reakční směsi lze očekávat z důvodu vysokého obsahu derivátů malvidinu ve vyliscích z červených hroznů. Glykosylovaná forma této látky (malvidin-3-glukosid) je dalším z markerů nalezených pomocí statistického zpracování dat. Obr. 12C. zobrazuje rekonstruovaný chromatogram pro jeho hmotu. Identifikace tohoto anthokyaninu byla založena na měření přesné

hodnoty m/z (m/z 493.1340, dtm 0.6), fragmentačních experimentech (Obr. 12D.) a porovnání RT, profilu píku (typický rozšířený pík anthokyaninů při pH MF pod 2 [47]) a MS dat s autentickým standardem.



Obr. 12. Rekonstruovaný chromatogram pro markery s m/z 349,09 (A) a 493,12 (C) a jejich MS/MS spektra (B a D, CER 10-50 eV).

Látka definovaná RT_ m/z párem 10.09_317.0780 je také uvedena mezi markery. V kolizním spektru této látky můžeme pozorovat ztrátu methylového radikálu (fragment s m/z 302.0435, dtm -0.8 mDa), kaskádové ztráty hydroxylového radikálu, oxidu uhelnatého a vody (tj. fragmenty m/z 285.0407, 257.0410, 229.0529, 239.0279 a další) a rovněž menší fragmenty vznikající RDA štěpením (Obr. 13.). Tento marker na základě svých analytických vlastností odpovídá methylkvercetinů nebo jeho izomeru (tj. hydroxymethyl-kaempferolu nebo hydroxymethyl-luteolinu). Detailnější identifikace je komplikována složitostí fragmentačních pochodů (nedostatečně charakteristickým profilem spektra, včetně RDA štěpení) a chybějícími autentickými standardy.

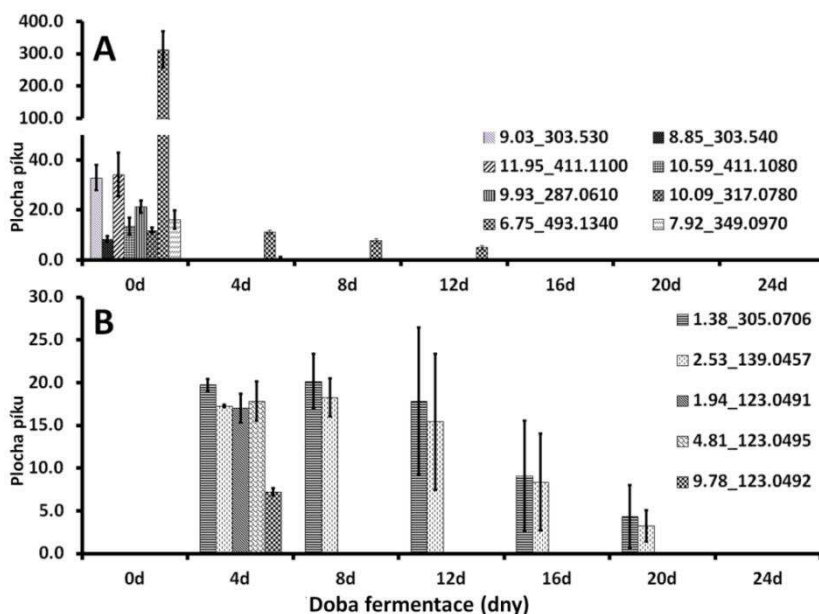


Obr. 13. MS/MS spektrum markeru s m/z 317,0780 (CER 10-50 eV).

Mezi markery se nachází také další tři neidentifikované látky a fragment hydroxybenzoyl-katechinu.

Výše uvedené výsledky ukazují, že kombinace LC/HRTMS s PCA a OPLS-DA je velmi užitečný nástroj pro hledání důležitých změn ve složení směsí při anaerobní fermentaci a také, že deriváty a izomery kaempferolu, katechinu, malvidinu a kvercetinů jsou složky vinařského odpadu významně se projevující v připravených fermentačních směsích. Tyto látky

mohou ovlivnit průběh zplyňovacího procesu. Změny obsahů sledovaných látek během anaerobní fermentace (vyjádřené plochami píků v rekonstruovaných chromatogramech) jsou patrné z Obr. 14A. Z obrázku je vidět, že obsahy analyzovaných flavonoidů (obsažených ve víně) rychle klesají v průběhu zplyňování za optimálních podmínek. Po čtyřech dnech (tj. v acidogenní fázi při anaerobní digesci) jsou patrné pouze stopy těchto látek.



Obr. 14. Změny v obsazích markerů z první (A) a druhé (B) fáze zplyňovacího procesu. A: 9.03_303.0530 hydroxylovaný kaempferol; 11.95_411.1100 hydroxybenzoylkatechin; 9.93_287.610 kaempferol; 6.75_493.1340 malvidin-3-glukosid; 8.85_303.0540 izomer kvercetin; 10.59_411.1080 hydroxybenzoylkatechin; 10.09_317.0780 methylkvercetin nebo jeho izomer; 7.92_349.0970 malvidin-chalkone. B: 1.38_305.0706 - redukovaný (dihydro analog) kvercetin, hydroxykaempferol nebo příslušný chalkon; 2.53_139.0457 – pravděpodobně fragment redukovaného kaempferolu; 1.94_123.0491 – hydroxybenzaldehyd (pravděpodobně fragment

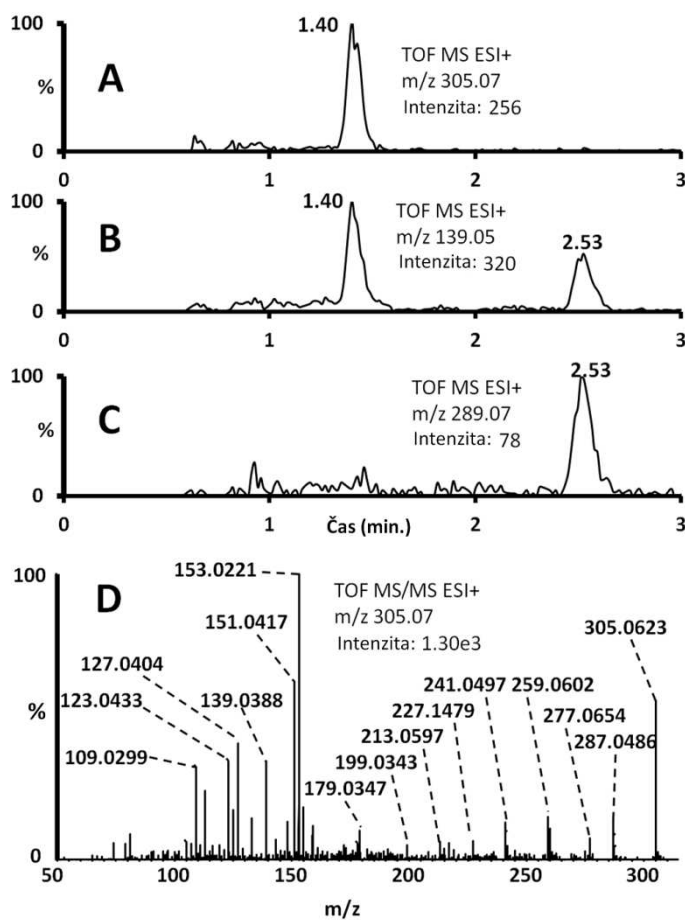
dimethoxychromanonu); 4.81_123.0495 – hydroxybenzaldehyd (pravděpodobně fragment redukovaného katechinu); 9.78_123.0492 – hydroxybenzaldehyd (fragment neznámé látky).

Stejně zpracování dat jaké bylo popsáno výše (PCA pro sledování segregace zplyňovaných vzorků PS-RGM a PS podle jejich složení a OPLS_DA pro popis významu jednotlivých markerů) bylo aplikováno na vzorky po 4 dnech (2. fáze) zplyňovacího experimentu. Šest nejvýznamnějších markerů, tj. RT_m/z páry 1.38_305.0706, 1.39_139.0451, 1.94_123.0491, 2.53_139.0457, 4.81_123.0495, 9.78_123.0492, je detailně popisováno v následujícím textu.

Na Obr. 15 je zobrazen rekonstruovaný chromatogram pro m/z 305.07 a 139.05 (A a B). Všechny tři píky přítomné v obou chromatogramech patří mezi významné markery PS-RGM ve 2. fázi experimentu. V kolizním spektru látky m/z 305.0706 byly pozorovány opakující se ztráty vody a oxidu uhelnatého, jež indikují polyfenolickou strukturu (Obr. 15D.). Dominantní fragmenty při m/z 153.0221 a 151.0417 vznikají rozštěpením chalkonu kvercetin a/nebo redukované (dihydro-) formy kvercetin a/nebo redukované (dihydro-) formy hydroxylovaného kaempferolu. Fragment při m/z 139.0388 může být vysvětlen jako $^{0,3}A^+$ RDA fragment z dihydrokvercetin. Tento fragment je také významným markerem 2. fáze zplyňovacího experimentu (RT_m/z pair 1.39_139.0451). Fragmenty s m/z 127.0404 a 123.0482 odpovídají protonizované molekule floroglucinaldehydu ($^{1,4}A^+$ fragment dihydrokvercetin) a protonizované molekule hydroxybenzaldehydu ($^{0,2}B^+$ RDA fragment redukovaného hydroxykaempferolu). Původ RDA fragmentů byl také potvrzen MRM

experimenty. Na základě získaných dat je možno látku s m/z 305.07 přiřadit dihydrokvercetin, dihydrohydroxykaemferolu nebo odpovídajícímu chalkonu (případně jejich nerozlišené směsi).

Marker s vyšší retencí v rekonstruovaném chromatogramu pro m/z 139.05 (Obr. 15B.; tj. pár s $RT_{m/z}$ 2.56_139.0457) odpovídá protonizované molekule dihydroxybenzaldehydu. Identitu tohoto markeru potvrzuje MS/MS experiment. V kolizním spektru jsou patrné dvě ztráty CO a jedna ztráta vody (tj. fragmenty m/z 111.0443, 93.0384 a 65.0376). Tento marker má identický retenční profil s iontem s m/z 289.0774 (Obr. 15C.), který není přímo uveden mezi markery z důvodu jeho nízké intenzity v MS spektru. S ohledem na přítomnost kaemferolu v 1. fázi experimentu, lze navrhnout, že ion 289.0774 vzniká redukcí (hydrogenací) kaemferolu. Redukce flavonoidů z vinařského odpadu je tak patrně jedním důležitých procesů doprovázejícím anaerobní fermentaci s produkcí bioplynu, při nejmenším na začátku anaerobní digesce, tj. v acidogenní fázi. Kvalitativně jsou tyto výsledky ve shodě s modelovou in-vitro studií katabolismu kvercetinu pomocí bakterií z lidských exkrementů [54].

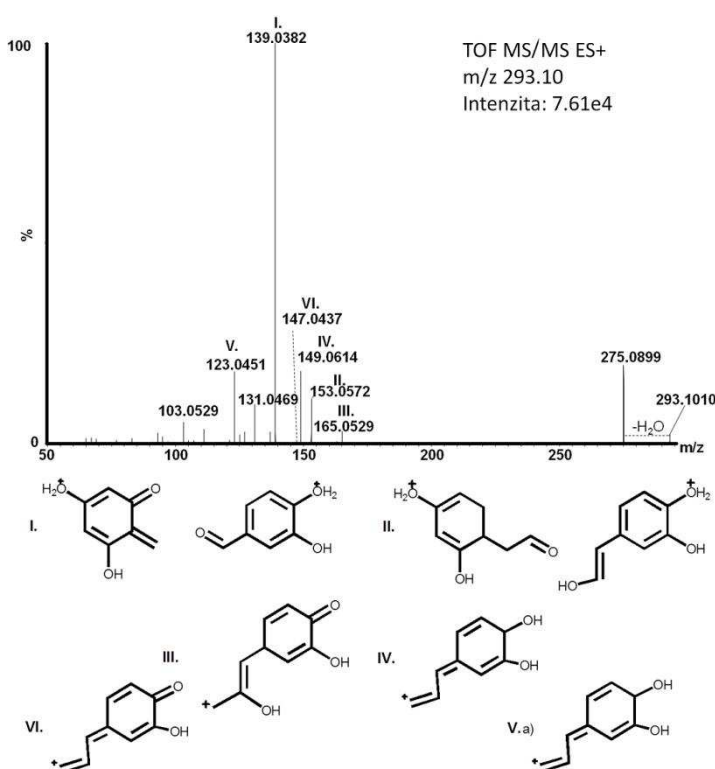


Obr. 15. Rekonstruovaný chromatogram pro m/z 305.07 (A), 139.05 (B), 289.07 (C) a MS/MS spektrum markeru s m/z 305,0706 (D, CER 10-40 eV).

Poslední tři markery označené jako $RT_{m/z}$ páry 1.94_123.0491, 4.81_123.0495 a 9.78_123.0492 odpovídají hydroxybenzaldehydům ($C_7H_7O_2^+$, dtm, -4.5, -4.9 a -4.6 mDa). Jejich kolizní spektra jsou poměrně jednoduchá a vzájemně podobná. Můžeme pozorovat dominantní fragmenty odpovídající postupně ztrátě vody (m/z 105.0339, dtm 0.1 mDa) a oxidu uhelnatého (m/z 77.0413, dtm -2.2 mDa). Ve spektru jsou také pozorovatelné další minoritní ztráty. První je ztráta molekuly s 15.9959 Da z rodičovského iontu za tvorby fragmentu m/z 107.0474. Tato ztráta může odpovídat odštěpení kyslíku z hydroxy skupiny ($\Delta m/z$ 15.9949) nebo odštěpení methanu ($\Delta m/z$ 16.0313). S ohledem na naměřenou a vypočítanou neutrální ztrátou je zřejmé, že tato ztráta odpovídá první možnosti a indikuje absenci methylové skupiny v struktuře. Druhá ztráta odpovídá odštěpení formaldehydu - tj. ztráta ($\Delta m/z$ 30.0049, dtm 5.7 mDa) a $COH\cdot$ radikálu ($\Delta m/z$ 29.0045,

dtm 1.8 mDa) potvrzuje vedle ztráty CO přítomnost aldehydické skupiny v molekule. Další možností je přítomnost karboxy skupiny v molekule markeru (tj. kyselina benzoová). Tato možnost byla testována porovnáním analytických vlastností s autentickým standardem (přídavek k. benzoové k PS-RGM vzorku). Z důvodu odlišného retenčního času standardu a nalezených markerů a zejména absence CO₂ v kolizním spektru markeru (v kolizní spektru k. benzoové je tato ztráta velmi dobře patrná) byla tato možnost zavrhnuta. Nalezené markery s m/z 123.05 byly také porovnávány se standardem p-hydroxybenzaldehydu. I v tomto případě se RT standardu lišil od diskutovaných markerů. Z tohoto důvodu bylo možno uvažovat, že tyto markery jsou fragmenty větších molekul - látky s m/z 209,0870 a 293,1053, které mají stejný retenční čas jako markery s m/z 123 eluující v RT 1,94 a 4,81.

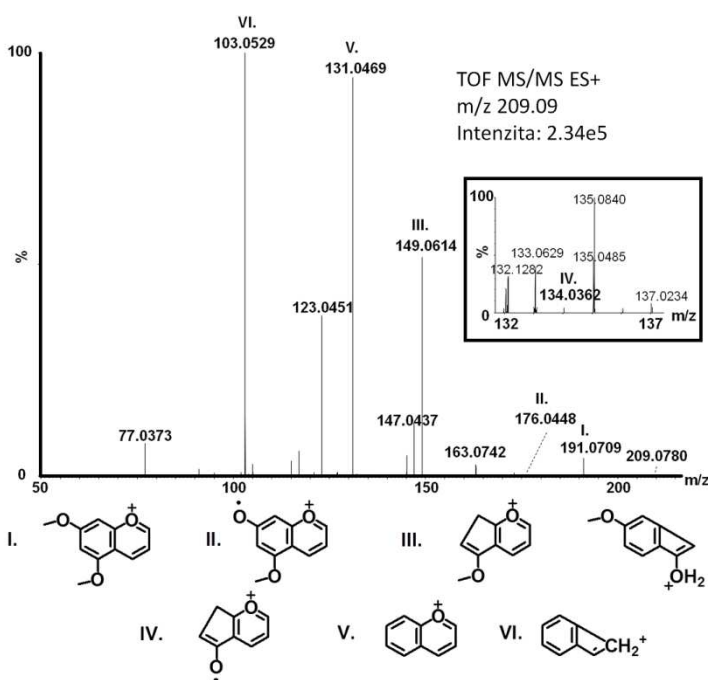
V MS/MS spektru látky s m/z 293,1053 byl nalezen fragment s m/z 275,0899 odpovídající ztrátě molekuly vody. Ve fragmentačním spektru byly také nalezeny typické RDA fragmenty flavan-3-olů, tj. m/z 165.0529 (C₉H₉O₃⁺, dtm -2.3 mDa), 153.0572 (C₈H₉O₃⁺, 2.0 mDa) and 139.0382 (C₇H₇O₃⁺, -1,3 mDa). Tyto fragmenty pozorovali a také důkladně popsali autoři Li a Deinzer [203]. Rodičovská molekula obsahuje o dva atomy vodíku více v porovnání s katechinem - můžeme tedy uvažovat jeho redukci. Tato interpretace je dále potvrzena přítomností fragmentu m/z 149.0614 odpovídající ^{1,4}B⁺ RDA fragmentu katechinu obsahující navíc dva atomy vodíku. Fragment m/z 123,0451 (odpovídající markeru 4.81_123.0495, dtm -4.4 mDa) vzniká katechin-benzofuranovým štěpením (catechin benzofuran forming fission) [55]. Detailní zobrazení fragmentačního procesu redukovaného katechinu je zobrazen na Obr. 16. Pozice redukce na katechinovém skeletu nebyla odhalena ze získaného fragmentačního spektra (pravděpodobně se však jedná o chromatograficky nerozdělenou směs izomerů)



Obr. 16. MS/MS spektrum látky s m/z 293,1010 (CER 10-30 eV) a navržené struktury fragmentů; a) ^{1,4}B⁺ RDA fragment redukovaného katechinu.

Rodičovská molekula markeru 1,94_123,0491 (tj. m/z 209,0870) může vznikat vlivem methanogenních bakterií v redukční atmosféře podobně jako látky popsané výše. Přítomnost běžných flavonů a flavanolů a v některých případech jejich redukované či methylované formy ve vinařském

odpadu byly popsány v textu výše. Flavonoidy [56] a jejich chalkony [57] můžou být transformovány na dihydroxychromony nebo deriváty kumarinu ztrátou B-kruhu. Tento proces je také pozorován v PS-RGM směsi. Molekula poskytující rodičovský ion s m/z 209,0870 byla identifikována jako dimethoxychromanon (dihydroxychromony vznikají enzymatickým rozkladem flavonoidů [56]) a tyto látky mohou být následně redukovány a methylovány methanogenními bakteriemi [54]. Dominantní fragmenty získané MS/MS experimentem jsou ionty s m/z 149,0614, 131,0469 a 103,0529. Tyto signály mohou být vysvětleny jako postupné ztráty molekuly vody (pravděpodobně díky aromatizaci heterocyklického kruhu) potvrzující přítomnost hydroxy skupiny), ketenu (přítomnost methoxy skupiny) a oxidu uhelnatého (vyštěpnutého z heterocyklického kruhu). Přítomnost druhé methoxy skupiny potvrzuje slabý, ale stále patrný signál fragmentu s m/z 134,0362 vznikajícího ztrátou methylového radikálu z 149,0614 (Obr. 17.). Původ markeru 9,78_123,0492 nebyl objasněn a je předmětem dalšího výzkumu.



Obr. 17. MS/MS spektrum látky s m/z 209,0780 (CER 10-40 eV) a navržené struktury vznikajících fragmentů.

Změny v obsahu markerů z druhé fáze fermentačního procesu jsou zobrazeny na Obr. 14B. Z obrázku je patrné, že všechny tyto markery nejsou přítomny v reakční směsi v počáteční fázi fermentace. Jejich obsah v kapalné fázi dosahuje maxima zhruba po 4-8 dnech a poté jejich obsah klesá. Statisticky významný pokles identifikovaných

redukováných flavonoidů (markery m/z 305,0706 a 139,0457) byl pozorován po 16 dnech gasifikačního procesu. Markery s fragmentem m/z 123,05 se rozkládaly výrazně rychleji a statisticky významný pokles byl patrný po 8 dnech.

Studovaný proces gasifikace zahrnuje velké množství chemických a enzymatických procesů. Z tohoto důvodu je komplexní popis degradace polyfenolů obsažených ve víně velice komplikovaný. Nicméně naše experimenty indikují jeden obecnější významný proces, a to je vznik redukováných forem flavonoidů v průběhu fermentace [35]. Některé z redukováných forem flavonoidních látek těchto látek mají vyšší toxicitu než běžné flavonoidy. Například izomer dihydrokvercetin, taxifolin, má akutní intraperitoneální toxicitu měřenou na myších LD50 (AITM-LD50) 985 mg.kg⁻¹. U kvercetin byla naměřena hodnota 3000 mg.kg⁻¹. Malvidin (aglykon nejvýznamnějšího anthokyaninu přítomného ve vínech a detekovaného v počáteční fázi

fermentace PS-RGM) má hodnotu AITM-LD50 4110 mg.kg⁻¹ (měřený jako malvidin chlorid) [58]. Ačkoli jde o velmi předběžné srovnání a vyslovení jednoznačného závěru o rozdílech v toxicitách běžných polyfenolů a jejich redukovaných forem vyžaduje daleko zevrubnější výzkum, uvedená data akcentují potřebu vhodné analytické kontroly (nestabilizovaného) digestátu i výzkumu jeho vlivu na životní prostředí v širších souvislostech.

Výsledky získané touto studií byly publikovány v časopise Chemosphere [35]

6. Závěr

Výroba bioplynu je rychle se rozvíjející se odvětví dovolující účinný a ekologický způsob zpracování odpadu a zároveň produkce relativně levné energie. V současné bioplynárenské praxi je analytická chemie používána hlavně pro kontrolu složení plynů a základních agrochemických parametrů v digestátu. Aby bylo možno rozšířit spektrum materiálů, které je možno zplyňovat, je třeba detailně znát složení vstupních surovin (včetně jejich změn probíhajících při skladování surovin před zplyňováním) i chemické změny probíhající v průběhu samotné anaerobní fermentace v bioplynovém reaktoru. Tato práce se zabývá vývojem vhodných analytických metod pro sledování složení těchto materiálů a následně jejich využitím pro studium změn v profilu vybraných látek s flavonoidní povahou za uvedených podmínek.

V prvním kroku byly provedeny experimenty studující degradaci i kondenzační reakce na chemicky čistých standardech dvou anthokyaninových barviv. Při degradaci kyanidinu a malvidin-3-galaktosidu při pH 7 a zvýšené teploty (95°C) po dobu 24 hodin docházelo ke vzniku kyseliny protokatechové (z kyanidinu) a kyseliny syringové (z malvidin-3-galaktosidu). Ani v jednom případě nebyl ve vzorku detekován společný rozkladný produkt obou anthokyaninů floroglucinaldehyd. Z toho důvodu byly provedeny rozkladné experimenty se standardem floroglucinaldehydu. Při rozkladných experimentech čistého standardu byly v roztoku nalezeny neznámé látky s m/z 243,0324, 271,0255 a 271,0276. Na základě porovnání analytických dat s laboratorně nezávisle připraveným standardem anthrachysenu (1,3,5,7 – tetrahydroxyanthrachinon) a porovnání s již publikovanými výsledky v odborných časopisech byly látky s m/z 271,02 identifikovány jako tetrahydroxyanthrachinony (1,3,5,7 tetrahydroxyanthrachinon, 1,4,5,8-tetrahydroxyanthrachinon a/nebo 2,3,6,7-tetrahydroxyanthrachinon). Tyto látky by tedy potenciálně mohly vznikat i při zpracování potravin bohatých na sledované anthokyaniny a ovlivňovat tak jejich organoleptické vlastnosti i působení na lidský organismus.

Další studie byla zaměřena na vývoj nano-LC metody pro analýzu můstkových barviv vznikajících reakcí (+)-katechinu a malvidin-3-glukosidu v prostředí acetaldehydu. Byla provedena syntéza dvou diasteromerů (+)-katechin-ethyl-malvidin-3-glukosidu a prostudováno jejich retenční chování na laboratorně připravených kapilárních kolonách s různými stacionárními fázemi (plně porézní Chromosphere C18, povrchově porézní Kinetex C18 a monolitická stacionární fáze Chromolith C18). Nejlepší výsledky poskytuje fáze Chromosphere C18, která byla rovněž testována z hlediska možného použití pro kontrolu obsahu kondenzovaných barviv ve vinařském odpadu. Nano-LC technika byla porovnána s metodou optimalizovanou pro konvenční kapalinovou chromatografii.

Pro studium anaerobní fermentace vinařského odpadu byl navržen a použit jednoduchý diskontinuální mikroreaktor. Proces průběhu anaerobní fermentace byl kontrolován pomocí

headspace analýzy vnitřní atmosféry reaktoru (methan, oxid uhličitý, dusík a kyslík) plynovým chromatografem s hmotnostní detekcí. Analýzy pomohly definovat jednotlivé fáze zplyňovacího procesu (acidogenní fáze a nestabilizovaná methanogeneze) v diskontinuálním režimu. Kapalný podíl fermentační směsi (digestát) byl analyzován spojením vysokoúčinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišující tandemovou hmotnostní spektrometrií. Získaná data byla dále zpracována analýzou hlavních komponent a ortogonální projekcí do latentních struktur. Tyto postupy hodnocení dat dovolily nalézt látky (markery) výrazně odlišující směs s přidavkem vinařského odpadu od běžně používané směsi (prasečí kejda). Osm nejvýznamnějších markerů lze na základě získaných analytických dat zařadit do skupiny polyfenolů. LC/MS analýzy vzorků z acidogenní fáze a z nestabilizované methanogeneze indikují vznik redukovaných forem některých flavonoidů v počátečních fázích bioplynového procesu a jejich rozklad ve fázích následujících. Jde o látky hydroxykaempferol, hydroxybenzoylkatechin, methylkvercetin, malvidin-3-glukosid, chalkon malvidinu a redukovaný katechin. Vyšší toxicita některých dihydroflavonoidů (např. taxifolin) může (vzhledem k rozdílům v hodnotách LD50) představovat vyšší zátěž pro životní prostředí než běžné flavonoidy vyskytující se ve víně (malvidin, kvercetin, atd.), pokud je jako hnojivo použit nestabilizovaný digestát. Tato velmi předběžná hypotéza však vyžaduje podrobnější výzkum. Výsledky ale poukazují na potřebu zevrubné analytické kontroly složení digestátu před jeho dalším použitím.

Výsledky získané v souvislosti s touto disertační prací byly publikovány ve třech impaktovaných a jednom recenzovaném časopise a byly prezentovány na řadě mezinárodních a domácích sympozií.

Literatura

1. Meynell, P.J., *Methane: Planning a Digester*. 1976, New York: Schocken Books.
2. Bryant, M.P., *Methane-Producing Bacteria (part 13) Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. 8 ed. 1974, BA, USA: The Williams and Wilkins Co.
3. Pospíšil, L. Výzkum „suché“ anaerobní fermentace různých druhů biomasy za účelem výroby bioplynu. 2014 04.10.2014 [cited 2014 4.10.]; Available from: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/vyzkum-suche-anaerobni-fermentace-ruznych-druhu-biomasy-za-ucelem-vyroby-bioplynu>.
4. Archer, D.B. a Peck, M.W., *The Microbiology of Methane Production in Landfills*. Microbiology of Extreme Environments and Its Potential for Biotechnology, 1989. 49: p. 187-204.
5. Archer, D.B., Robertson, J.A., a Peck, M.W., *The Microbiology and Biochemistry of Biogas Production from Solid Wastes*, in *Landfill Gas and Anaerobic Digestion of Solid Waste*. 1988, Harwell Lab.: Oxfordshire.
6. Li, Y.B., Park, S.Y. a Zhu, J.Y., *Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste*. Renew. Sust. Energ. Rev., 2011. **15**(1): p. 821-826.
7. Archer, D.B. a Kirsop, B.H., *The Microbiology and control of anaerobic digestion*, in *A Waste Treatment Technology*. 1990, Crit. Rept. Appl. Chem: London. p. 43-92.
8. Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R. a Wolfe, R.S., *Methanogens - Re-Evaluation of a Unique Biological Group*. Microbiol. Rev., 1979. **43**(2): p. 260-296.
9. Heinedobbernack, E., Schoberth, S.M. a Sahn, H., *Relationship of Intracellular Coenzyme F420 Content to Growth and Metabolic-Activity of Methanobacterium-Bryantii and Methanosarcina-Barkeri*. Appl. Environ. Microbiol., 1988. **54**(2): p. 454-459.
10. Touzel, J.P., Prensier, G., Roustan, J.L., Thomas, I., Dubourguier, H.C. a Albagnac, G., *Description of a New Strain of Methanoxix-Soehngeni and Rejection of Methanoxix-Concillii as a Synonym of Methanoxix-Soehngeni*. Int. J. Syst. Bacteriol., 1988. **38**(1): p. 30-36.
11. Kučera, L. a Bednář, P., *Biogas system and possibilities of control and use of digestate in Czech Republic: A Review*. Waste Forum, 2014. **2014**: p. 123-136.
12. Cushnie, T.P.T. a Lamb, A.J., *Antimicrobial activity of flavonoids*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005. **26**(5): p. 343-356.
13. Murray, M., *Quercetin: Nature's antihistamine*. Better Nutrition, 1998. **60**(10).
14. Cook, N.C. a Samman, S., *Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources*. J. Nutr. Biochem., 1996. **7**(2): p. 66-76.
15. Chakraborty, T., Verotta, L. a Poddar, G., *Evaluation of Azadirachta-Indica Leaf Extract for Hypoglycemic Activity in Rats*. Phytother. Res., 1989. **3**(1): p. 30-32.
16. Bustamante, M.A., Moral, R., Paredes, C., Perez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J. a Perez-Murcia, M.D., *Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry*. Waste Manag., 2008. **28**(2): p. 372-380.
17. Da Ros, C., Cavinato, C., Pavan, P. a Bolzonella, D., *Winery waste recycling through anaerobic co-digestion with waste activated sludge*. Waste Manag., 2014. **34**(11): p. 2028-2035.
18. Fabbri, A., Bonifazi, G. a Serranti, S., *Micro-scale energy valorization of grape marcs in winery production plants*. Waste Manag., 2015. **36**: p. 156-165.
19. Leiva, M.B., Koupaie, E.H. a Eskicioglu, C., *Anaerobic co-digestion of wine/fruit-juice production waste with landfill leachate diluted municipal sludge cake under semi-continuous flow operation*. Waste Manag., 2014. **34**(10): p. 1860-1870.
20. Li, J., Kong, C., Duan, Q., Luo, T., Mei, Z. a Lei, Y., *Mass flow and energy balance plus economic analysis of a full-scale biogas plant in the rice-wine-pig system*. Bioresour. Technol., 2015. **193**: p. 62-67.
21. Melamane, X.L., Tandlich, R. a Burgess, J.E., *Treatment of wine distillery wastewater by high rate anaerobic digestion*. Water Sci. Technol., 2007. **56**(2): p. 9-16.
22. Macek, T., Mackova, M. a Kas, J., *Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation*. Biotechnol. Adv., 2000. **18**(1): p. 23-34.
23. Jurado, J., Alejandreduran, E., Alonsomoraga, A. a Pueyo, C., *Study on the Mutagenic Activity of 13 Bioflavonoids with the Salmonella Ara Test*. Mutagenesis, 1991. **6**(4): p. 289-295.
24. Popp, R. a Schimmer, O., *Induction of Sister-Chromatid Exchanges (Sce), Polyploidy, and Micronuclei by Plant Flavonoids in Human Lymphocyte-Cultures - a Comparative-Study of 19 Flavonoids*. Mutation Res., 1991. **246**(1): p. 205-213.
25. Suzuki, S., Takada, T., Sugawara, Y., Muto, T. a Kominami, R., *Quercetin Induces Recombinational Mutations in Cultured-Cells as Detected by DNA Fingerprinting*. Japanese J. Cancer Res., 1991. **82**(10): p. 1061-1064.

26. Skibola, C.F. a Smith, M.T., *Potential health impacts of excessive flavonoid intake*. Free Radical Bio. Med., 2000. **29**(3-4): p. 375-383.
27. Herrmann, A.P. a Janke, H.D., *Cofeimentation of rutin and hesperidin during two-stage anaerobic pre-treatment of high-loaded brewery wastewater*. Water Res., 2001. **35**(11): p. 2583-2588.
28. Herrmann, A.P., Willems, M. a Janke, H.D., *Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge*. Water Res., 2001. **35**(11): p. 2575-2582.
29. Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M.D., Paez-Hernandez, M.E., Rodriguez, J.A. a Galan-Vidal, C.A., *Chemical studies of anthocyanins: A review*. Food Chem., 2009. **113**(4): p. 859-871.
30. Sadilova, E., Stintzing, F.C. a Carle, R., *Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins*. J. Food Sci., 2006. **71**(8): p. C504-C512.
31. Avila, M., Hidalgo, M., Sanchez-Moreno, C., Pelaez, C., Requena, T. a de Pascual-Teresa, S., *Bioconversion of anthocyanin glycosides by Bifidobacteria and Lactobacillus*. Food Res. Inter., 2009. **42**(10): p. 1453-1461.
32. McMurry, J., *Organická chemie*. 2007: Vysoké učení technické v Brně, Nakladatelství VUTIUM.
33. Serra, A., Macia, A., Romero, M.P., Reguant, J., Ortega, N. a Motilva, M.J., *Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids*. Food Chem., 2012. **130**(2): p. 383-393.
34. Kucera, L., Fanali, S., Aturki, Z., Pospisil, T. a Bednar, P., *Comparison of nano and conventional liquid chromatographic methods for the separation of (+)-catechin-ethyl-malvidin-3-glucoside diastereoisomers*. J. Chromatogr. A, 2016. **1428**: p. 126-133.
35. Kučera, L., Kurka, O., Barták, P. a Bednar, P., *Liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry - tool for the study of polyphenol profile changes during micro-scale biogas digestion of grape marcs*. Chemosphere, 2017, **166**: p. 463-472 .
36. Pissarra, J., Lourenco, S., Gonzalez-Paramas, A.M., Mateus, N., Buelga, C.S., Silva, A.M.S. a De Freitas, V., *Isolation and structural characterization of new anthocyanin-alkyl-catechin pigments*. Food Chem., 2005. **90**(1-2): p. 81-87.
37. Briggs, L. a Nicholls, G., *Some hydroxyanthraquinones and derivatives*. 1951, Royal Soc Chem. Thomas Graham House. p. 1138-1139.
38. Singh, N.P., Gupta, A.P., Sinha, A.K. a Ahuja, P.S., *High-performance thin layer chromatography method for quantitative determination of four major anthraquinone derivatives in Rheum emodi*. J. Chromatogr. A, 2005. **1077**(2): p. 202-206.
39. *Bezpečnostní list - Antrachinon*.
40. Stodůlková, E., Kolařík, M., Křesinová, Z., Kuzma, M., Šulc, M., Man, P., Novák, P., Maršík, P., Landa, P., Olšovská, J., Chudíčková, M., Pažoutová, S., Černý, J., Bella, J. a Flieger, M., *Hydroxylated anthraquinones produced by Geosmithia species*. Folia Microbiologica, 2009. **54**(3): p. 179-187.
41. Stodůlková, E., Man, P., Kolařík, M. a Flieger, M., *High-performance liquid chromatography-off line mass spectrometry analysis of anthraquinones produced by Geosmithia lavendula*. J. Chromatogr. A, 2010. **1217**(40): p. 6296-6302.
42. Kučera, L., Kurka, O. a Bednář, P., *LC/MS method development for the determination of degradation products of anthocyanin dyes*. Chem. Listy, 2012. **106**: p. 298.
43. Kučera, L., Kurka, O. a Bednář, P., *Study of degradation of anthocyanins dyes using liquid chromatography with mass detection*, in *29th International Symposium on Chromatography (9. 9. - 15. 9.)*. 2012: Toruň, Polsko.
44. Kučera, L., Kurka, O. a Bednář, P., *Analysis of degradation products of anthocyanin dyes using LC/MS*, in *Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiral 2012*. 2012: Olomouc, Česká republika.
45. Francia-Aricha, E.M., Guerra, M.T., Rivas-Gonzalo, J.C. a Santos-Buelga, C., *New Anthocyanin Pigments Formed after Condensation with Flavanols*. J. Agricul. Food Chem., 1997. **45**(6): p. 2262-2266.
46. Jackman, R.L., Yada, R.Y., Tung, M.A. a Speers, R., *Anthocyanins as food colorants—a review*. J. Food Biochem., 1987. **11**(3): p. 201-247.
47. Papouskova, B., Bednar, P., Hron, K., Stavek, J., Balik, J., Myjavcova, R., Bartak, P., Tomankova, E. a Lemr, K., *Advanced liquid chromatography/mass spectrometry profiling of anthocyanins in relation to set of red wine varieties certified in Czech Republic*. J. Chromatogr. A, 2011. **1218**(42): p. 7581-7591.
48. Fanali, C., Rocco, A., Aturki, Z., Mondello, L. a Fanali, S., *Analysis of polyphenols and methylxantines in tea samples by means of nano-liquid chromatography utilizing capillary columns packed with core-shell particles*. J. Chromatogr. A, 2012. **1234**: p. 38-44.
49. Guiochon, G., *The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography*. J. Chromatogr. A, 2006. **1126**(1-2): p. 6-49.

50. Straka, F., Dohányos, M., Zábranská, J., Jeníček, P., Dědek, J., Malijevský, A., Novák, J., Oldřich, J. a Kunčarová, M., *Biogas - a handbook for teaching, design and operation of biogas system*. 2 ed. 2006, Praha /in Czech/: GAS s.r.o.
51. Wittig, J., Herderich, M., Graefe, E.U. a Veit, M., *Identification of quercetin glucuronides in human plasma by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *J. Chromatogr. B*, 2001. **753**(2): p. 237-243.
52. Cuyckens, F. a Claeys, M., *Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids*. *J. Mass Spectrom.*, 2004. **39**(1): p. 1-15.
53. Smith, A.H., Kandil, F.E., Seigler, D.S. a Mackie, R.I., *5-Deoxyflavan-3-ol-based proanthocyanidins with antinutritional and antimicrobial properties from the forage legume *Acaciella angustissima**. *J. Appl. Bot. Food Quality*, 2011. **84**(2): p. 142-150.
54. Peng, X.C., Zhang, Z.C., Zhang, N., Liu, L., Li, S.T. a Wei, H., *In vitro catabolism of quercetin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites*. *Food Nutr. Res.*, 2014. **58**.
55. Li, H.-J. a Deinzer, M.L., *Tandem Mass Spectrometry for Sequencing Proanthocyanidins*. *Anal. Chem.*, 2007. **79**(4): p. 1739-1748.
56. Barz, W. a Hoesel, W., *Metabolism and Degradation of Phenolic Compounds in Plants*, in *Biochemistry of Plant Phenolics*, Swain, T., Harbone, J.B., and Van Sumere, C.F., Editors. 1979, Springer US: Boston, MA. p. 339-369.
57. Adams, J.B., *Thermal-Degradation of Anthocyanins with Particular Reference to 3-Glycosides of Cyanidin .1. Acidified Aqueous-Solution at 100 Degrees C*. *J. Sci. Food Agricul.*, 1973. **24**(7): p. 747-762.
58. <http://datasheets.scbt.com>.

Curriculum vitae

RNDr. Lukáš Kučera
narozen 29. října 1986 ve Vítkově, ČR
bydliště: Nábřeží 7, 77900 Olomouc

Vzdělání

2011-doposud postgraduální studium na PŘF UP v Olomouci, obor „analytická chemie“
2015 udělen titul RNDr. – PŘF UP v Olomouci, obor „analytická chemie“
2009-2011 studium na PŘF UP v Olomouci, obor Chemie životního prostředí (Mgr.)
2006-2009 studium na PŘF UP v Olomouci, obor Chemie - Geologie a ochrana životního prostředí (Bc.)

Zaměstnání:

2013-doposud výzkumný pracovník, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc
2006-2012 manažer výroby, skladový a logistický referent, Cervus s.r.o., Olomouc (firma se zabývá výrobou krmiv a směsí pro bioplynové stanice)

Studijní pobyty:

2013, Italian Academy of Science (CNR), Řím, Itálie, celkem 3 měsíce (prof. S. Fanali)

Odborné vědecké zaměření:

Analytická chemie, separační metody, hmotnostní spektrometrie, analýza biologicky aktivních látek, studium vlastností polyfenolů, analýza složitých matric, analýza archeologických artefaktů a organických reziduí v nich.

Pedagogická činnost:

vedoucí laboratorních cvičení, konzultant diplomové práce

Publikační činnost:

- **Kučera L.**, Fanali S., Aturki Z., Pospisil T., Bednar P.: Comparison of nano and conventional liquid chromatographic methods for the separation of (+)-catechin-ethylmalvidin-3-glucoside diastereoisomers. *J. Chromatogr. A* 1428 (2015) 126-133.
- **Kučera L.**, Kurka O., Bartak P., Bednar P.: Liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry – Tool for the study of polyphenol profile changes during micro-scale biogas digestion of grape marcs. *Chemosphere* 166 (2017) 463-472.
- **Kučera L.**, Kurka O., Bednar P.: LC/MS method development for the determination of degradation products of anthocyanin dyes. *Chem. Listy* 106 (2012) 298.
- **Kučera L.**, Bednar P.: Biogas system and possibilities of control and use of digestate in Czech Republic: A Review. *Waste Forum* 3 (2014) 123-136.

Impaktované časopisy (mimo disertační práci)

- **Kučera L.**, Papoušek R., Kurka O., Barták P., Bednář P.: Study of composition of espresso coffee prepared from various roast degrees of *Coffea arabica* L. coffee beans, *Food Chem* 199 (2016), 727-735.

- Kučerová P., Skopalová J., **Kučera L.**, Táborský J., Švecová H., Lemr K., Cankař P., Barták P.: Electrochemical oxidation of 5-hydroxymethyl tolterodine and identification of its oxidation products using liquid chromatography and mass spectrometry, *Electrochimica Acta* 215 (2016) 131-139.
- Kurka O., **Kučera L.**, Bednář P.: Analytical and semipreparative chiral separation of *cis*-itraconazole on cellulose stationary phases by high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 36 (2016) 2736-2745.
- Kučerová P., Skopalová J., **Kučera L.**, Hrbáč J., Lemr K.: Electrochemical oxidation of fesoterodine and identification of its oxidation products using liquid chromatography and mass spectrometry, *Electrochimica Acta* 159 (2015) 131-139.
- Škríba, A., Janková, Š., Váňa, J., Barták, P., Bednář, P., Fryčák, P., **Kučera, L.**, Kurka, O., Lemr, K., Macíková, P., Marková, E., Nováková, P., Papoušková, B., Skopalová, J., Švecová, H., and Roithová, J. (2013) Protonation sites and fragmentations of para-aminophenol, *Int J Mass Spectrom* 337, 18-23.

Recenzované časopisy (mimo disertační práci)

- Richtera, L.; Zmrzlý, M.; Videman, J.; Grossmannová, D.; **Kučera, L.** (2011) Moravské denáry fenikového typu Přemysla Otakara II. z nálezů Třebíč-Borovina (II) a jejich analýza. *Folia Numismatica* 25(1), 3-17.
- **Kučera, L.** (2011) Dvě dobová falza pražských grošů Karla IV. nalezená na území bývalého Litevského velkoknížectví. *Num.Listy* 66 (1), 119-122
- **Kučera, L.**, Cycoňová, L. (2013) Hromadný nález 63 pražských grošů se dvěma neobvyklými kusy. *Folia Numismatica* 27(1), 171-177.
- **Kučera, L.** (2013) Nález 23 pražských grošů v okr. Hodonín, *Folia Numismatica* 27(2), 233-236.

Prezentace na konferencích formou posterů:

- **Kučera L.**, Kurka O., Bednář P. *Analysis of degradation products of anthocyanin dyes using LC/MS*; Acta UPOL, Chemica 50S (2012), s. 118. International Symposium Advances in Chromatography and Electrophoresis Chiranal 2012.
- **Kučera L.**, Kurka O., Bednář P., *Study of degradation of anthocyanin dyes using liquid chromatography with mass detection*, Book of Abstracts S5-P27, str. 555, 29th International Symposium on Chromatography, Toruň, 9.-13.9. 2012
- **Kučera, L.**, Bednář, P., *UPLC/MS² study of composition of espresso coffee prepared from various roasting stages of coffee beans Coffea arabica L.*, 30th International Symposium on Chromatography, Salzburg, 14.-18.9. 2014.
- **Kučera, L.**, Bednář, P., *Analysis of espresso coffee prepared from various roasting stages of coffee beans Coffea arabica L.*, 42nd International Symposium of High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques – HPLC 2015, Ženeva, 21.-25.6. 2015.
- **Kučera, L.**, Kurka, O., Barták, P., Bednář, P., *Study of changes of polyphenols in red grape marcs during anaerobic digestion by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry*, Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2016, 6.-9. červen, Olomouc 2016.
- **Kučera L.**, Cechová M., Fanali S., Aturki Z., Bednář P.: *Nano-liquid chromatography for analysis of plant extract*. 31st International Symposium on Chromatography 2016, 28. 8. - 1. 9., Cork 2016.