

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Veronika Zušáková

ANALÝZA POLYFENOLOVÝCH LÁTEK VE VYBRANÝCH PIVOVARSKÝCH
SUROVINÁCH METODOU HPLC-HRMS

Analysis of polyphenolic compounds in selected brewery matrices by HPLC-HRMS
method

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Konzultanti: RNDr. Jana Olšovská, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 13. 5. 2015

Abstrakt a klíčová slova

Abstrakt:

Tato práce byla zaměřena na separaci proanthokyanidinů (PAs) v pivu, v pivovarských surovinách (chmel, slad) a v pivovarských meziproduktech (sladina, mladina, mladé pivo) za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením. K separaci proanthokyanidinů byla použita chromatografická kolona XSELECT HSS T3. Mobilní fáze byla tvořena směsí 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě (A) a 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu (B) a separace probíhala v gradientovém módu. Kalibrační rozsah pro katechin, prokyanidin B1 a B2 byl lineární v rozsahu od 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ do 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ u epikatechinu od 5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ do 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Mez stanovitelnosti (LOQ) byla stanovena pro katechin, prokyanidin B1 a B2 na 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a pro epikatechin 5 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Výtěžnost metody byla okolo 100 %. Metoda měla taktéž vyhovující opakovatelnost, kdy relativní směrodatná odchylka (RSD) byla u všech PAs menší než 20 %. Tato metoda byla využita pro sledování změn profilu zastoupení PAs během pivovarského procesu u katechinu, epikatechinu, prokyanidinu B1, B2 a B3. Bylo potvrzeno, že katechin, epikatechin, prokyanidin B1 a B2 přecházejí převážně z chmele a prokyanidin B3 je obsažen pouze v ječmenu. Dále byla metoda využita k ověření předpokladu, že profil proanthokyanidinů lze dát do souvislosti s odrůdou chmele. Zpracováním profilů metodou klastrové analýzy se odrůdy chmele rozdělily do dvou hlavních skupin, a to na Žatecký poloraný červeňák (ŽPČ) a na další odrůdy chmele (Sládek, Premiant, Agnus a Kazbek). Z výsledku vyplývá, že profil proanthokyanidinů je specifický pro tyto zkoumané odrůdy českého chmele.

Klíčová slova:

Proanthokyanidiny, chmel, sladina, mladina, mladé pivo, pivo, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením.

Abstract:

The thesis has focused on the separation of proanthocyanidins (Pas) in beer, raw beer material and beer intermediates (wort, hopped wort, green beer) by using high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometric detection. A chromatographic column XSELECT HSS T3 was used for separation of individual proanthocyanidins. Mobile phase was formed by a mixture of 0,1% formic acid in water (A) and 0,1% formic acid in acetonitril (B), separation was conducted in gradient mode. Calibration range for catechin and procyanidin B1 a B2 was linear in the range from $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ to $200 \mu\text{g.l}^{-1}$ and for epicatechin from $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ to $200 \mu\text{g.l}^{-1}$. Limit of quantitation (LOQ) was set to the lowest point of calibration curve, hence for catechin, procyanidin B1 and B2 was $\text{LOQ} = 10 \mu\text{g.l}^{-1}$ and for epicatechin was $\text{LOQ} = \mu\text{g.l}^{-1}$. Yield of method of the observed Pas was very good, where yield oscillated around 100%. The method also had excellent repeatability, where the relative standard deviation (RSD) was lower then 20%. After optimization of this method it was used for observation of profile changes during brewery process in catechin, epicatechin, procyanidin B1, B2 and B3. It was discovered, that catechin, epicatechin, procyanidin B1 and B2 originate mainly from hops and procyaniding B3 is presented only in barley. Afterwards, the method was used to verify assumption, that profile of proanthocyanidin may be directly related to hops species. We could separate hops species into two main groups by processing profiles by cluster analysis method, into Saaz and into other hops species (Sládek, Premiant, Agnus and Kazbek) The result implies, that profile of proanthocyanidins is specific for individual species of czech hops.

Key words:

Proanthocyanidins, hops, wort, hopped wort, green beer, beer, high performance liquid chromatography, mass spectrometric with high resolution detection.

Poděkování

Ráda bych touto formou poděkovala RNDr. Janě Olšovské, Ph.D., a Ing. Martinu Duškovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a za pomoc při zpracování této práce. Také bych ráda poděkovala RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. za všestrannou pomoc.

Mé poděkování také patří Výzkumnému ústavu pivovarskému a sladařskému, a.s., v Praze za umožnění spolupráce, ochotu a velmi vstřícný přístup.

Taktéž bych ráda poděkovala své rodině za veškerou podporu a pomoc, která se mi od nich dostávala po dobu celého mého studia.

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1 ÚVOD..... | 9 |
| 2 TEORETICKÁ ČÁST..... | 10 |
| 2.1 Polyfenolické látky..... | 10 |
| 2.1.1 Proanthokyanidiny..... | 10 |
| 2.1.1.1 Struktura proanthokyanidinů..... | 12 |
| 2.1.1.2 Proanthokyanidiny v pivovarských surovinách a pivu..... | 15 |
| 2.2 Analytické metody používané pro stanovení PAs..... | 17 |
| 2.2.1 Příprava vzorků..... | 17 |
| 2.2.2 Analýza PAs..... | 19 |
| 2.3 Příprava vzorků metodou QuEChERS..... | 23 |
| 2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí..... | 25 |
| 2.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie..... | 25 |
| 2.4.2 Hmotnostní spektrometrie..... | 27 |
| 2.4.2.1 Iontové zdroje..... | 28 |
| 2.4.2.2 Analyzátory..... | 29 |
| 2.4.2.3 Detektory..... | 31 |
| 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 32 |
| 3.1 Použité chemikálie..... | 32 |
| 3.2 Přístrojové vybavení..... | 32 |
| 3.3 Příprava kalibračních standardů proanthokyanidinů..... | 33 |
| 3.4 Příprava vzorků..... | 34 |
| 3.5 Experimentální uspořádání a postup měření..... | 36 |
| 3.6 Zpracování dat..... | 39 |
| 4 VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 40 |
| 4.1 Optimalizace podmínek separace PAs..... | 40 |

| | |
|--|----|
| 4.2 Interní validace metody | 44 |
| 4.2.1 Kalibrace metody, limit kvantifikace (LOQ) | 44 |
| 4.2.2 Opakovatelnost metody | 47 |
| 4.2.3 Standardní přídavek, výtěžnost metody..... | 47 |
| 4.3 Aplikace metody..... | 48 |
| 4.3.1 Koncentrační profil PAs během varního procesu..... | 48 |
| 4.3.2 Odrůdová specifita chmele pomocí profilů PAs..... | 52 |
| 5 Závěr..... | 54 |
| Literatura | 54 |
| PŘÍLOHA..... | 60 |

Seznam zkratek a symbolů

| | |
|----------|---|
| ACN | acetonitril |
| APCI | chemická ionizace za atmosférického tlaku (<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>) |
| APPI | fotoionizace za atmosférického tlaku (<i>atmospheric pressure photoionization</i>) |
| B1 | prokyanidin B1 |
| B2 | prokyanidin B2 |
| B3 | prokyanidin B3 |
| EK | epikatechin |
| ESI | ionizace elektrosprejem (<i>electrospray ionization</i>) |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>) |
| K | katechin |
| LOQ | mez stanovitelnosti (<i>limit of quantification</i>) |
| MF | mobilní fáze |
| m/z | poměr hmotnosti a náboje atomu |
| NCE | normalizovaná kolizní energie (<i>normalized collision energy</i>) |
| NP-HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi |
| PAs | proanthokyanidiny |
| QuEChERS | akronym pro rychle, jednoduše, levně, efektivně, robustně, bezpečně (<i>quick, easy, cheap, effective, rugged, safe</i>) |
| RT | retenční čas |
| SF | stacionární fáze |
| ŽPČ | Žatecký poloraný červeňák |

1 ÚVOD

Proanthokyanidiny (PAs) jsou látky patřící mezi polyfenolické sloučeniny tvořené z flavan-3-ol jednotek. Tato skupina látek tvoří jednu ze dvou hlavních kategorií rostlinných taninů, které jsou široce rozšířené v přírodě. Jsou přítomny ve vysokých koncentracích v ovoci zejména bobulovitém, jako jsou zejména brusinky, angrešt, černý rybíz, dále pak v ořeších, ve víně, v pivu či v čaji.

PAs jsou účinné antioxidanty a poskytují ochranu proti kardiovaskulárním onemocněním, imunitním poruchám a neurodegenerativním onemocněním. Tyto příznivé účinky na zdraví člověka jsou jim přičítány hlavně díky jejich silným antioxidačním vlastnostem a schopnosti vychytávat volné radikály.

Tato práce měla dva hlavní cíle. Prvním cílem bylo vyvinout a zoptimalizovat metodu stanovení proanthokyanidinů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (Thermo Q-Exactive).

Druhým cílem bylo tuto metodu použít pro stanovení proanthokyanidinů v pivovarských surovinách. V první části tohoto úkolu byla tato nově vyvinutá metoda použita pro sledování změn v profilu zastoupení proanthokyanidinů během pivovarského procesu, tj. ve sladnič, mladině, mladém pivu a pivu. V druhé části toho úkolu byla tato metoda použita pro ověření předpokladu, že profil proanthokyanidinů je možné dát do přímé souvislosti s odrůdami chmele. Pro tento účel byl profil proanthokyanidinů stanoven v 50 vzorcích chmele pěti základních chmelových odrůd s významem pro autenticitu českého piva.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyfenolické látky

Polyfenoly jsou velkou a různorodou skupinou sloučenin¹. Tyto látky jsou velmi rozšířené, a to zejména v rostlinách, jako sekundární metabolity. Dnes je známo přes 8000 těchto polyfenolických sloučenin.

Tyto látky mají společné obecné vlastnosti. Některé monomerní jednotky polyfenolů jsou ve vodě rozpustné, ale jelikož přírodní polyfenoly tvoří polymery, a tak díky vazbám mezi nimi jsou nerozpustné ve vodě. Jejich relativní molekulová hmotnost je od 500 do 4000. Polyfenoly od relativní molekulové hmotnosti 1000 většinou mají 12-16 polyfenolických skupin a 5 až 7 aromatických kruhů.

2.1.1 Proanthokyanidiny

Proanthokyanidiny [PAs] (známé také jako kondenzované taniny neboli třísloviny) patří do třídy polyfenolických sloučenin, které jsou tvořeny oligomerními jednotkami z flavan-3-ol monomerů a jsou druhou nejrozšířenější skupinou fenolů v přírodě po ligninu².

PAs se vyskytují v mnoha druzích rostlin, a tudíž jsou přítomny v řadě potravin a nápojů³. Běžně se vyskytují v bobulovitém ovoci (angrešt, černý a červený rybíz, jeřabiny, černý bez), ve víně, v čaji a v ořechích. Prokyanidiny jsou převládající forma PAs v potravinách (viz tabulka 2.1)⁴.

Tyto látky jsou zajímavé především díky své biologické aktivitě⁵. Jsou známé svými antioxidačními vlastnostmi, poskytují ochranu proti kardiovaskulárním onemocněním, imunitním poruchám a neurodegenerativním onemocněním. Tyto příznivé účinky na lidské zdraví se připisují především silné schopnosti vychytávat volné radikály ($O_2\cdot^-$, $OH\cdot$, $NO\cdot$ a alkyl peroxyl radikály), a tudíž silným antioxidačním účinkům. Jejich biologická aktivita závisí na chemické struktuře, koncentraci a na jejich stupni polymerace^{5,6}.

Tab 2.1 Stručný přehled potravin a jejich celková suma PAs^{7,8}.

| Potravina | Celková suma PAs [mg na 100 g] |
|------------------|---------------------------------------|
| Ovoce | |
| Černý rybíz | 147,8 ± 33,0 |
| Angrešt | 134,0 ± 45,6 |
| Černý jeřáb | 663,7 ± 15,1 |
| Bez | 23,3 ± 11,2 |
| Červený rybíz | 60,8 ± 2,3 |
| Broskve | 67,3 ± 20,9 |
| Nektarinky | 22,8 ± 14,6 |
| Kiwi | 3,7 ± 1,6 |
| Brusinky | 418,8 ± 75,3 |
| Borůvky | 27,0 ± 17,5 |
| Ostružiny | 8,9 ± 0,1 |
| Maliny | 30,2 ± 23,4 |
| Jahody | 145,0 ± 24,9 |
| Zelené hrozno | 81,5 ± 15,0 |
| Červené hrozno | 61,0 ± 12,3 |
| Banány | 4,0 ± 0,6 |
| Ořechy | |
| Pekanové | 494,1 ± 86,2 |
| Lískové | 500,7 ± 152,0 |
| Pistácie | 237,3 ± 52,0 |
| Madle | 184,0 ± 48,2 |
| Vlašské | 67,3 ± 14,7 |
| Nápoje | |
| červené víno | 313 ± 5 |
| pivo | 23 ± 2 |
| grepový džus | 231 ± 2,0 |
| jablkový džus | 9 ± 0 |

2.1.1.1 Struktura proanthokyanidinů

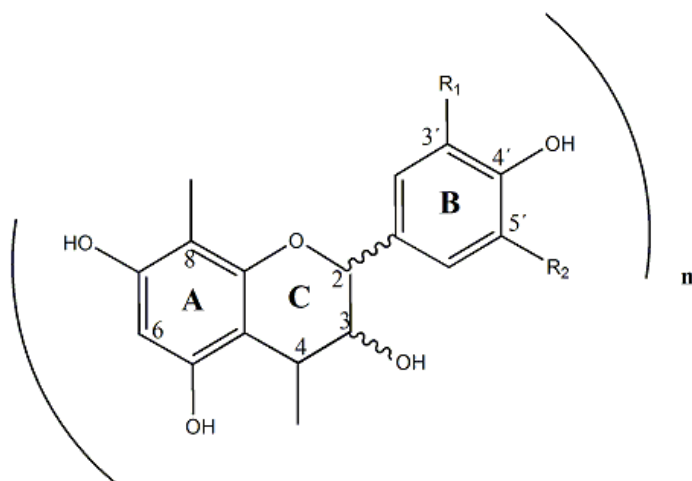
PAs jsou polymerní flavan-3-oly, jejichž základní jednotky jsou spojené C-C a C-O-C vazbami. Flavan-3-ol jednotky mají typickou C6-C3-C6 flavanoidní strukturu⁹. Je tvořena třemi kruhy, které lze rozlišit písmeny A, B a C, jak uvedeno na obrázku 2.1. Struktura PAs monomerů se liší počtem hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích a stereochemií asymetrického uhlíku C3 na heterocyklu.

Základními stavební kameny PAs jsou jednoduché monomery (flavan-3-ol) a jsou to afzelechin, epiafzelechin, katechin, epikatechin, gallokatechin a epigallokatechin viz obrázek č. 2.2⁹. PAs, které jsou tvořeny dvěma až sedmi monomerními jednotkami, se nazývají „oligomery“, jakmile PAs mají více jak sedm monomerních jednotek, používá se pro ně již výraz „polymery“.

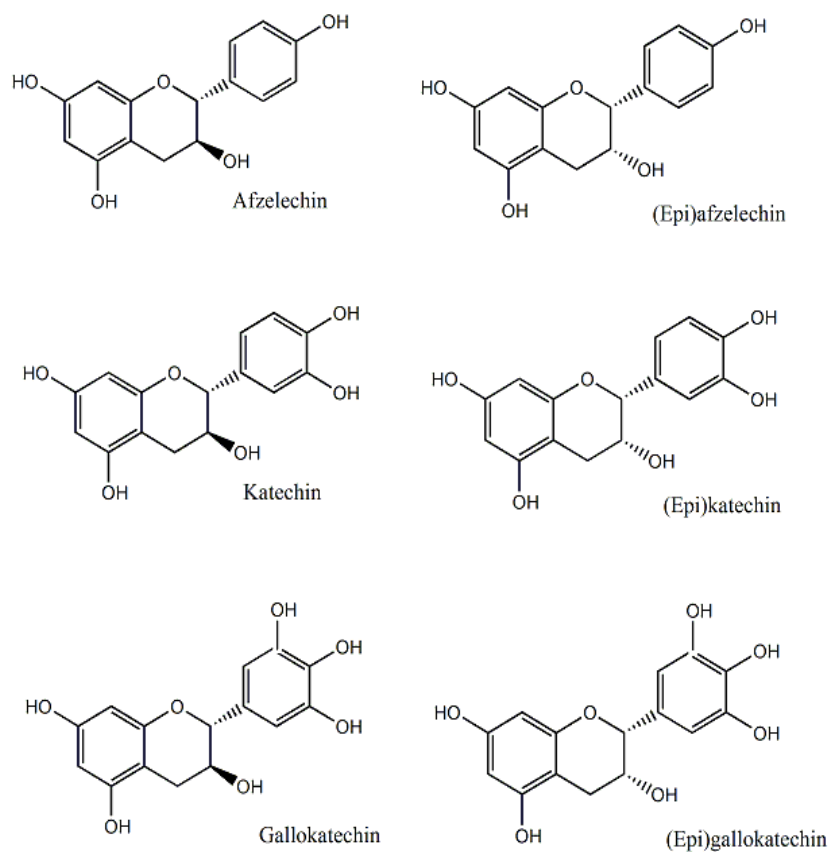
PAs jsou známy ve třech možných uskupeních, a to A – typ , B – typ a C –typ¹⁰. Nejběžněji se vyskytují B – typ (dimery) a C – typ (trimery), kde jsou interflavanoidní vazby C–C tvořené mezi uhlíkem C4 z jedné flavanoidní jednotky (vyšší jednotka) a C8 nebo C6 z další flavanoidní jednotky (nižší jednotka). U A – typu PAs, které se tak často nevyskytují v přírodě ve srovnání s B – typem, je další éterová vazba tvořená mezi C2 – O – C7^{9, 2}. Struktury různých možných dimerů A – typu a B – typu jsou zobrazeny na obrázku 2.3.

PAs tvořené výlučně z monomerní jednotky (epi)katechinu jsou označovány jako prokyanidiny (PCs)⁹. Tyto látky mají substituci hydroxylovou skupinou v pozici 3' a 4' na B – kruhu. Propelargonidiny a prodelfinidiny obsahují (epi)afzelechinové nebo (epi)gallokatechinové podjednotky. Propelargonidiny jsou substituované hydroxylovými skupinami v poloze 3',4' a 5' na B kruhu a prodelfinidiny jsou substituované hydroxylovou skupinou v poloze 4' na B kruhu.

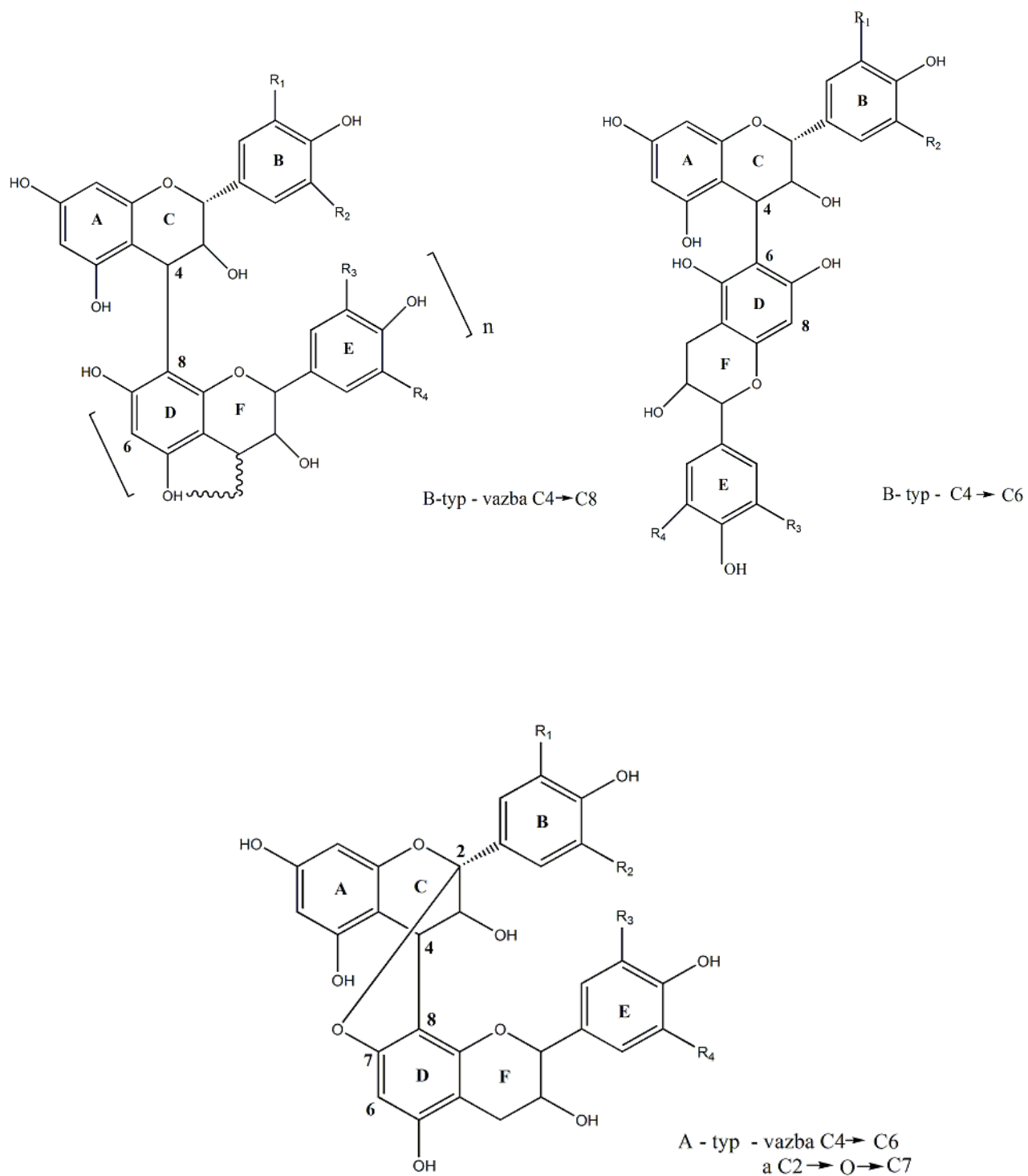
Tři uhlíky C2, C3 a C4 z flavanol heterocyklu jsou asymetrické a mohou se vyskytovat v různých konfiguracích¹⁰. Velmi vzácná konfigurace je, když na uhlíku C2 jsou jiné substituenty. Flavan-3-ol jednotky s 2S konfigurací jsou rozlišovány předponou epi-. Stereochemie C2 – C3 vazby může být trans (2*R*, 3*S*) nebo cis (2*R*, 3*R*) - (např. (+) – katechin s 2,3-trans- stereochemií a (-) – (epi)katechin s 2,3- cis-stereochemií).



Obr. 2.1 Základní struktura proanthokyanidinů: $R_1, R_2 = H$, propelargonidiny; $R_1 = H, R_2 = OH$, prokyanidiny; $R_1, R_2 = OH$, prodelfinidiny¹⁰.



Obr. 2.2 Monomerní jednotky proanthokyanidinů⁹.



Obr. 2. 3 Struktura dimerů PAs (dimer B-typů s vazbou C4→C8 nebo s vazbou C4→C6, dimer A-typů s vazbou C4→C6 a C2-O-C7)⁹.

2.1.1.2 Proanthokyanidiny v pivovarských surovinách a pivu

Jednou z hlavních pivovarským surovin je *chmel*¹¹. Je nezastupitelnou složkou, která dodává pivu typickou hořkost a aroma. Nejrozšířenější odrůdou v České republice je Žatecký poloraný červeňák, který se pěstoval do 90. let 20. století jako jediná odrůda¹². Od roku 1994 se začaly pěstovat hybridní odrůdy (např. Sládek, Premiant). V roce 2001 přibýly odrůdy Agnus, a poté Harmonie a Rubín. O sedm let později byly registrovány odrůdy Kazbek a Vital.

Další důležitou surovinou pro výrobu piva je obilný slad, který se připravuje nejčastěji ze sladovnického ječmene¹³. Dále se pak může využívat pšenice, kukuřice či rýže. Rozemletý slad se během výroby piva smíchá s vodou (vystírání) a začne se zahřívát (rmutování) na technologicky důležité teploty. Tak vznikne *sladina*, do které se během chmelovaru přidává chmel a vzniká tím *mladina*. Uvařená mladina se ochladí na zákvasnou teplotu a zakvasí se pivovarskými kvasinkami (hlavní kvašení). Po tomto procesu se získá takzvané *mladé pivo*, které se nechává dokvasit a zrát a po určité době ležení (přibližně 3 týdny) se získá samotné pivo.

Během technologického procesu se PAs obsažené v chmelu a sladu (ječmenu) snadno extrahují do piva díky své vysoké rozpustnosti⁹. Celkový obsah PAs v pivu (monomery, dimery a trimery) je okolo 20 mg.l⁻¹. Odhadované množství PAs v sušině chmelu je v rozsahu 0,5 – 5 %¹⁴. Obsah těchto látek v chmelu závisí na odrůdě, geografickém růstu rostliny, na čerstvosti a na procesu sklizně. Odhaduje se, že okolo 70 – 80 % PAs v pivu pochází z ječmene, zatímco pouze 20-30 % pochází z chmele⁵. PAs z chmele jsou strukturně velmi podobné PAs v ječmenu, hlavní rozdíl bývá ve vyšším podílu gallokatechinových oligomerních jednotek v ječmenu. PAs obsažené v piva jsou uvedeny v tabulce 2.2.

Tab. 2.2 PAs obsažené v pivu ¹⁴.

| Složení monomerních jednotek | Zkratka |
|--|------------------|
| katechin | - |
| epikatechin | - |
| gallokatechin | - |
| epikatechin-(4 β →8)katechin | prokyanidin B1 |
| epikatechin-(4 β →8)-epikatechin | prokyanidin B2 |
| katechin-(4 α →8)-katechin | prokyanidin B3 |
| katechin-(4 α →8)-epikatechin | prokyanidin B4 |
| gallokatechin-(4 α →8)-katechin | prodelfinidin B3 |
| gallokatechin-(4 α →6)-katechin | - |
| katechin-(4 α →6)-gallokatechin | - |
| afzelechin-(4 α →8)-katechin | - |
| katechin-(4 α →8)-katechin-(4 α →8)-katechin | prokyanidin C2 |
| epikatechin-(4 α →8)-katechin-(4 α →8)-katechin | prokyanidin C |
| epikatechin-(4 α →8)-epikatechin-(4 α →8)-katechin | prokyanidin C |
| katechin-(4 α →8)-gallokatechin-(4 α →8)-katechin | prodelfinidiny C |
| gallokatechin-(4 α →8)-gallokatechin-(4 α →8)-katechin | prodelfinidin C2 |

Obsah polyfenolů je obecně důležitý technologický parametr. Pokud pivo obsahuje proteiny bohaté na prolin, tvoří s PAs nerozpustné komplexy, které pak tvoří nežádoucí viditelný zákal¹². Velmi malý zákal je produkován monomery (-)-(epi)katechinu a (+)-katechinu, zatímco prokyanidin B3, a zejména prodelfinidin B3 je úzce spojen s tou tvorbou zákalu. Problém s tímto nebiologickým zákalem piva se řeší tak, že během výroby se sníží obsah polyfenolů za pomoci absorbentu PVPP [poly(vinylpyrrolidon)]¹⁵. Tento proces se nazývá stabilizace piva.

Na druhou stranu obsah PAs má také pozitivní příspěvek k sensorickým vlastnostem piva tím, že stabilizují organoleptické vlastnosti a barvu piva a přispívají k jeho trpkosti a hořkosti⁹. Proto jejich nadměrné odstranění může mít vliv na celý charakter výsledného piva¹⁵.

2.2 Analytické metody používané pro stanovení PAs

2.2.1 Příprava vzorků

Potraviny a jejich suroviny jsou velice komplexní směsí, a proto je potřeba před stanovením PAs v těchto matricích analyt extrahovat a přečistit. Tím se stanovovaný vzorek částečně zbaví matrice a současně je možné ho zakonzentrovat.

Vodný roztok acetonu se ukázal být nejúčinnějším extrakčním rozpouštědlem pro extrakci celkových PAs¹⁶. Aceton silně oslabuje vodíkové vazby a jeho použití je běžnější než „alkoholové“ rozpouštědla. Nicméně se ukázalo, že methanol má lepší extrakční účinnost pro katechin a malé pro anthokyanidinové oligomery^{17,18}. Proto některé studie doporučují pro extrakci flavan-3-olů použití vodného roztoku methanolu místo acetonu. Podle dalších studií se doporučuje okyselení extrakčního rozpouštědla, často zejména pro fenolické sloučeniny zahrnující flavan-3-oly¹⁹. Tento krok však může vést k částečné hydrolyze PAs kvůli nestabilní povaze interflavanoidové vazby vůči kyselině.

V práci Hellströma a Mattila autoři uvádějí, že vodný roztok acetonu je nejvhodnější extrakční rozpouštědlo, avšak přídavek kyseliny octové neměl žádný vliv na extrakční účinnost. V experimentu byly srovnány tři extrakční směsi pro extrakci PAs z různých druhů rostlinné matrice⁶. První extrakce byla provedena za využití 80% vodného roztoku acetonu, druhá extrakce byla 70% vodným roztokem acetonu s přídavkem 0,5% kyseliny octové a třetí extrakce byla prováděna za pomoci aceton/methanol/voda (2:2:1). Vzorky (jablka, brusinky, grepy, kůra borovice) byly před extrakcí lyofilizovány, poté rozemlety a homogenizovány s extrakčním rozpouštědlem, následovala extrakce za pomoci ultrazvuku. Po 10 minutách sonikace byl vzorek odstředěn a supernatant byl odstraněn. Tento extrakční proces se opakoval ještě dvakrát. Všechny tři extrakty byly sloučeny. Posléze bylo organické rozpouštědlo odstraněno na vakuové odparce (35 °C) a zbývající podíl byl přečištěn za pomoci extrakce na pevné fázi (Supelco Discovery DPA-6S 1 g), která byla předem aktivována methanolem. Cukry a většina rušivých polyfenolů byly vymyty 20% methanolem. Pro uvolnění PAs z kolony byl použit 85% N,N-dimethylformamid (5 ml).

V práci Gu et al. bylo použito pro extrakci PAs z potravin směsné rozpouštědlo (aceton/voda/kyselina octová, 70:29:0,5 v/v/v) v 15ml uzavíratelné kyvetě²⁰. V případě

ořechů byly ze vzorku před extrakcí PAs ještě odstraněny lipidy extrakcí hexanem. Po přidání směsného rozpouštědla byly vzorky míchány, a poté byly vloženy na 10 minut do ultrazvukové lázně při 37 °C. V polovině času sonikace byly vzorky promíchány. Poté se kyvety se vzorky nechaly 50 minut při pokojové teplotě. Následně byly vzorky třepány po dobu 25 minut. Na konci extrakce byly kyvety se vzorky odstředěny. Část supernatantu byla odpipetována a byl odpařen aceton. Poté byl zbytek vzorku rozpuštěn přibližně ve 30% vodném roztoku methanolu a nanesen na kolonu Sephadex LH-20 pro jeho přečištění. U vzorků nápojů nebyla provedena extrakce, ale vzorky byly rovnou nanesen na kolonu Sephadex LH-20 (6 x 1,5 cm). Kolona byla stabilizována před použitím 30% vodného roztoku methanolu po dobu 4 hodin. Po nanesení vzorků byla kolona promyta 30% vodným roztokem methanolu pro odstranění cukrů a ostatních fenolů. PAs byly vymyty z kolony 70% vodným roztokem acetonu. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno do sucha na vakuové odparce. Suchý zbytek byl rozpuštěn ve směsném rozpouštědle a přenesen do odměrné baňky.

V experimentu Lie et al. a Steventse et al. použili pro extrakci PAs ze chmelu následující postup^{14,5}. Na vzduchu usušené chmelové hlávky se krátce ponořily do dichlormethanu (CH₂Cl₂), nechaly se jednu hodinu míchat, a poté byl extrakt scezen. Následně byly chmelové hlávky třikrát promyty CH₂Cl₂ pro extrakci pryskyřic, pigmentů a lipidů. Poté byly hlávky sušeny pod proudem vzduchu a po usušení byly z hlávek vytvořeny granule, které byly extrahovány jedním litrem roztoku aceton/voda (7:3, v/v). Roztok byl přefiltrován a zakoncentrován na vakuové odparce, kde došlo k odstranění acetonu. Výsledný extrakt byl promyt dvakrát hexanem pro lepší odstranění pigmentů a nepolárního materiálu. Rozpouštědlo bylo následně odpařeno na vakuové odparce a zbytek byl nanesen na kolonu Sephadex LH-20, která byla předtím stabilizována vodou. Kolona byla promývána postupně vodou, směsí methanol/voda v poměru 1:3 (v/v), 1:1 (v/v), a 3:1 (v/v), methanol, a nakonec aceton/voda (7:3, v/v). Průtok byl vždy 100 ml.h⁻¹. Každá jednotlivá frakce byla analyzována pomocí HPLC-UV a dvourozměrnou TLC. Frakce, které obsahovaly zejména oligomery PAs a monomery flava-3-olů byly sloučeny a zakoncentrovány na vakuové odparce (po lyofilizaci se přibližně získalo 4,2 g PAs) a znovu přečištěny na Sephadex koloně.

Postup extrakce z piva byl popsán v práci Callemien a Collin²¹. Autoři také použili kolonu Sephadex LH-20, která byla před použitím kondicionována 4 hodiny roztokem

methanol/voda (3:7, v/v). Poté bylo odplyněné pivo nanášeno na kolonu a byla promývána roztokem methanol/voda (3:7, v/v). PAs byly uvolněny elučním roztokem aceton/voda (7:3, v/v). Poté roztok byl zakonzentrován vysušením na vakuové odparce. Před analýzou byl vzorek rozpuštěn v methanolu.

Všechny tyto práce uvádějí směs acetonu s vodou, jako vhodné extrakční rozpouštědlo, proto bylo i v této práci použito pro extrakci PAs z chmele.

2.2.2 Analýza PAs

Mezi dvě nejčastěji využívané metody pro identifikaci a kvantifikaci PAs patří kolorimetrické a chromatografické metody ve spojení s různými detektory⁴.

Kolorimetrické metody jsou založeny na spektrofotometrickém měření barevných produktů skupin fenolických sloučenin s činidlem²². Mezi nepoužívanější kolorimetrické metody patří Folin-Ciocalteu metoda a Vanilin-HCl test. Tyto metody jsou používány pro kvantitativní odhad celkového množství polyfenolů. Odhad celkového množství PAs se často vyjadřuje, jako koncentrace katechinu, což vede k složitější interpretaci dat. Další komplikací u této metody je porovnání vzorků z různých matic.

Spektrofotometrické metody se pro rutinní analýzu stále používají, ale s vývojem moderní instrumentace se začala využívat především vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), a to pro kvantifikaci jednotlivých prokyanidinů v různých potravinářských výrobcích²³. Stanovení proanthokyanidinů pomocí HPLC ztěžuje matriční efekt, proto je nutno vzorek předem upravit⁶.

Chromatografie s reverzními fázemi je vhodnou metodou pro separaci PAs monomerů až trimerů²⁴. Látky s vyšším stupněm polymerace nejsou zadržovány a všechny PAs s polymeračním stupněm vyšším než 4 jsou eluovány společně na konci chromatogramu jako široký směsný pík.

Gelová permeační chromatografie umožňuje frakcionaci monomerů až oligomerů v pořadí s rostoucí molekulovou hmotností PAs²⁵. Tato metoda je však v tomto případě spíše metodou adsorpční než vylučovací, proto je velmi nepraktické separovat PAs s větším stupněm polymerace než tetramer. Metoda je spíše používána pro frakcionaci PAs než pro kvantifikaci.

HPLC s normálními fázemi (NP-HPLC) je vhodná pro separaci až oligomerů do stupně 9 a byla vyvinuta pro stanovení PAs ve vzorcích kakaa a čokolády za použití fluorescenčního detektoru. Tato metoda byla porovnána s dobrou shodou výsledků ve čtyřech nezávislých laboratořích, což ukazuje na dobrou reprodukovatelnost²³.

K identifikaci struktury PAs je nutno použít nukleární magnetickou rezonanci či hmotností spektrometrii ve spojení s HPLC, které jsou rychlé a citlivé. Také pro analýzu PAs v chmelu, ječmenu a v pivu již byly vyvinuty HPLC-MS metody.

Taylor et al. separovali PAs extrahované ze chmelu za pomoci chromatografické kolony Sephadex LH-20 a za použití gradientové eluce methanolu, vody a acetonu²⁶. Výsledné frakce byly analyzovány dvoudimenzionální tenkou vrstvou, gelovou permeační chromatografií a MALDI-TOF.

Magalhães et al. publikoval práci, ve které se mu podařilo separovat katechin a epikatechin a objasnil strukturu u více než 30 polyfenolických látek. Tyto látky extrahoval z chmelu, směs absorboval na PVPP, a následně je desorboval směsí aceton/voda (7:3, v/v)²⁷. Poté tyto látky analyzoval pomocí HPLC ve spojení s detektorem diodového pole a HPLC-ESI- MS/MS.

Li et al. použili k identifikaci nově izolovaných PAs ze 13 odrůd chmelu dvě metody HPLC-APCI-MS a HPLC-ESI-MS¹⁴. Práce byla zaměřena na vývoj izolačního postupu a objasnění struktury látek.

Práce Whittle et al. shrnuje poznatky o profilu PAs v ječmenu¹⁵. V této práci identifikovali více než 50 proanthokyanidinových struktur pomocí HPLC-ESI-MS. Jejich množství a druh koreloval s odrůdou ječmene a typem piva. Pro rutinní stanovení PAs, však tato metoda není vhodná, neboť je časově velmi náročná (150 minut).

Dvořáková et al. použili pro identifikaci monomerních a oligomerních flavan-3-olů v deseti odrůdách ječmene a k nim příslušných sladech metodu HPLC-ESI-MS²⁸. Stručný přehled stanovení PAs v pivovarských surovinách je shrnut v tabulce 2.2.

Tab. 2.3 Stručný přehled stanovení PAs v pivovarských surovinách pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie.

| PAs | Extrakce | metoda | Odkaz |
|-------------------------------------|----------------------------|--|----------------------------|
| A-typ v chmelu | Aceton/ voda (7:3, v/v) | HPLC-ESI-MS <i>ESI</i> : Pozitivní mód <i>Kolona</i> : Econosil C18 <i>MF</i> : lineární gradientový mód od 5% MeOH (B) do 40 % B v A (1% vodný roztok kyseliny mravenčí) <i>Doba separace</i> : 40 minut <i>MS</i> : iontová past | Li a Deinzer ²⁹ |
| Monomery PAs v chmelu | Aceton/ voda (7:3, v/v) | HPLC-APCI-MS/MS <i>APCI</i> : Pozitivní mód <i>Kolona</i> : Hydro-RP-80A <i>MF</i> : lineární gradientový mód od 5% MeOH (B) do 50 % B v A (1% vodný roztok kyseliny mravenčí) <i>Doba separace</i> : 40 minut <i>MS</i> : trojitý kvadrupól | Li a Deinzer ¹⁴ |
| Dimery a trimery PAs v chmelu | Aceton/ voda (7:3, v/v) | HPLC-ESI-MS/MS <i>ESI</i> : Pozitivní mód <i>Kolona</i> : Toyopearl TSK -40S <i>MF</i> : lineární gradientový mód od 5% MeOH (B) do 40 % B v A (1% vodný roztok kyseliny mravenčí) <i>Doba separace</i> : 50 minut <i>MS</i> : trojitý kvadrupól | Li a Deinzer ¹⁴ |

Tabulka 2.2 pokračuje na další straně

Pokračování tabulka 2.2 z předchozí strany

| PAs | Extrakce | Metoda | Odkaz |
|--|-------------------------|---|--------------------------------|
| Monomery až polymery v českém chmelu | Aceton/ voda (7:3, v/v) | UHPLC-MS <i>ESI</i> : negativní mód <i>Kolona</i> : Acquity UPLC BEH Shield RP18 <i>MF</i> : 0,1 % kyselina mravenčí ve vodě (A) a 0,1% kyselina mravenčí v ACN (B) <i>Doba separace</i> : 9 minut <i>MS</i> : průletový analyzátor (TOF) | Olšovská et al. ³⁰ |
| Katechin, epikatechin v chmelu | Aceton/voda (7:3, v/v) | HPLC-UV <i>Kolona</i> : LiChroCar RP-18 <i>MF</i> : 100% MeOH (A) a 0,1% kyselina mravenčí (B) <i>Doba separace</i> : 160 minut UV: detektor diodového pole | Magalhães et al. ²⁷ |
| Katechin, epikatechin v chmelu | Aceton/voda (7:3, v/v) | HPLC-ESI-MS <i>ESI</i> : negativní mód <i>Kolona</i> : LiChroCar RP-18 <i>MF</i> : 100% MeOH (A) a 0,1% kyselina mravenčí (B) <i>Doba separace</i> : 160 minut <i>MS</i> : iontová past | Magalhães et al. ²⁷ |
| Identifikace padesáti struktur PAs z ječmene | Aceton/voda (7/3, v/v) | HPLC-ESI-MS <i>ESI</i> : negativní mód <i>Kolona</i> : Zorbax SB-C18 <i>MF</i> : 0,1% kyselina octová ve vodě (A) a 0,1% kyselina octová v ACN (B) <i>Doba separace</i> : 150 minut | Whittle et al. ¹⁵ |

2.3 Příprava vzorků metodou QuEChERS

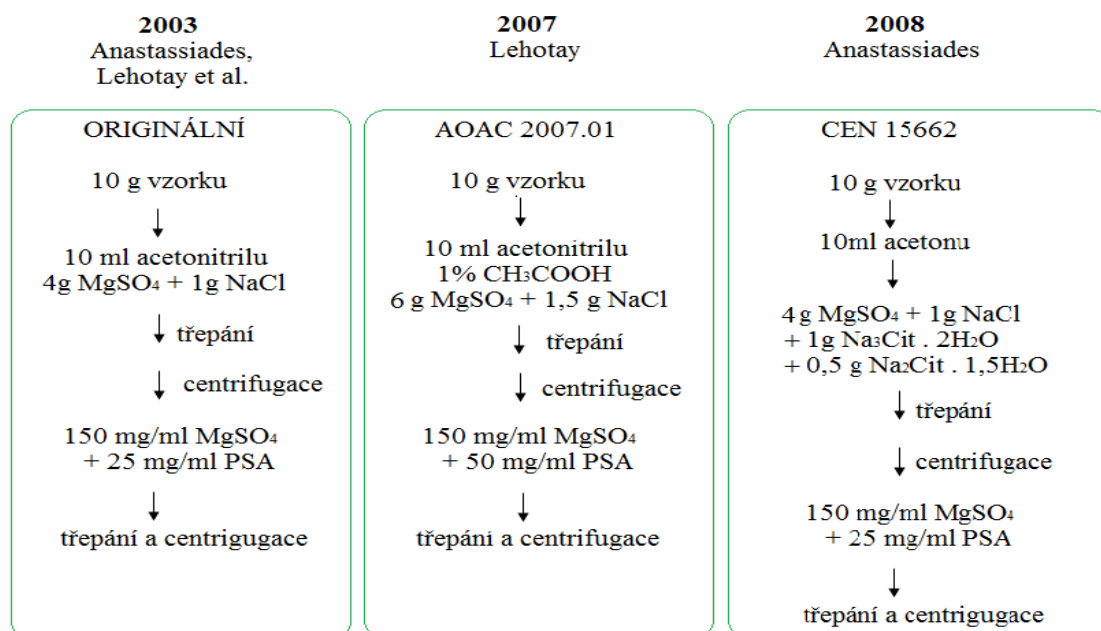
V roce 2000 Lehotay a Anastassiades vyvinuli novou techniku extrakce analytu ze vzorku. Tuto metodu nazvali QuEChERS. Název je zkratkou šesti slov, která vyjadřují vlastnosti této techniky: *Quick* – rychlá, *Easy* – jednoduchá, *Cheap* – levná, *Effective* – efektivní, *Rugged* – robustní, *Safe* – bezpečná. Metoda byla prvotně vyvinuta pro analýzu veterinárních léčiv v živočišných tkáních, a poté byla úspěšně použita pro stanovení reziduí pesticidů v rostlinách³¹. V roce 2003 byla navržena a publikována modifikovaná QuEChERS metoda přípravy vzorků pro analýzu reziduí pesticidů v potravinách. Technika je tedy velice variabilní a může se po optimalizaci používat i pro jiné pevné matrice environmentálních vzorků. Pro stanovení reziduí pesticidů v potravinách existují tři standardní postupy (viz obrázek 2.4). Jsou to originální metoda Lehotaye, Anastassiadese et al. z roku 2003, dále pak oficiální metoda asociace analytické společnosti (AOAC International) 2007.01 a standardní metoda (CEN) EN.

Velkou výhodou techniky QuEChERS ve srovnání s ostatními metodami je nízká spotřeba rozpouštědla, o 95 % menší množství vzorku a 90% úspora času při přípravě vzorků.

Technika QuEChERS je založena na extrakci rozpouštědlem (např. acetonitril, ethylacetát, aceton) z vodného roztoku, do kterého je přidána anorganická sůl (bezvodý síran hořečnatý v kombinaci s chloridem sodným nebo octanem sodným)³¹. Při rozdělení fází na bezvodou a vodnou fázi dochází k tzv. efektu vysolování, neboli čištění surového extraktu disperzní extrakcí na pevné fázi.

Výhodou QuEChERS oproti čištění klasickou extrakcí na pevné fázi je, že se sorbent sype přímo do čištěného extraktu a metodu lze přizpůsobit podle konkrétních požadavků na čištění. Pro odstranění pigmentů, sterolů, nepolárních sloučenin a jiných polárních sloučenin se používá grafitický uhlík. Na odstranění lipidů a mastných kyselin s dlouhými řetězci se přidává C18 sorbent. Sorbenty na bázi primárních a sekundárních aminů (PSA) se používají pro odstranění sacharidů, mastných a organických kyselin, lipidů a některých pigmentů. Tato technika je tedy velmi univerzální, neboť je možné základní postup - při dodržení vlastního principu metody - snadno přizpůsobit pro široké spektrum matric.

Je důležité zmínit, že po přidání bezvodého síranu hořečnatého ke vzorku v rozpouštědle dojde k exotermické reakci, při které se uvolní určité množství tepla³². Je to způsobeno tím, že bezvodý síran amonný je silné sušidlo a při jeho hydrataci se uvolní teplo, které zvýší teplotu vzorku až na 40 °C, což ale zlepšuje účinnost extrakce.



Obr. 2. 4 Jednotlivé kroky ve třech základních postupech metody QuEChERS, originální verzi a oficiálních verzích QuEChERS úpravy vzorků pesticidů v analýze potravin³¹.

2.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

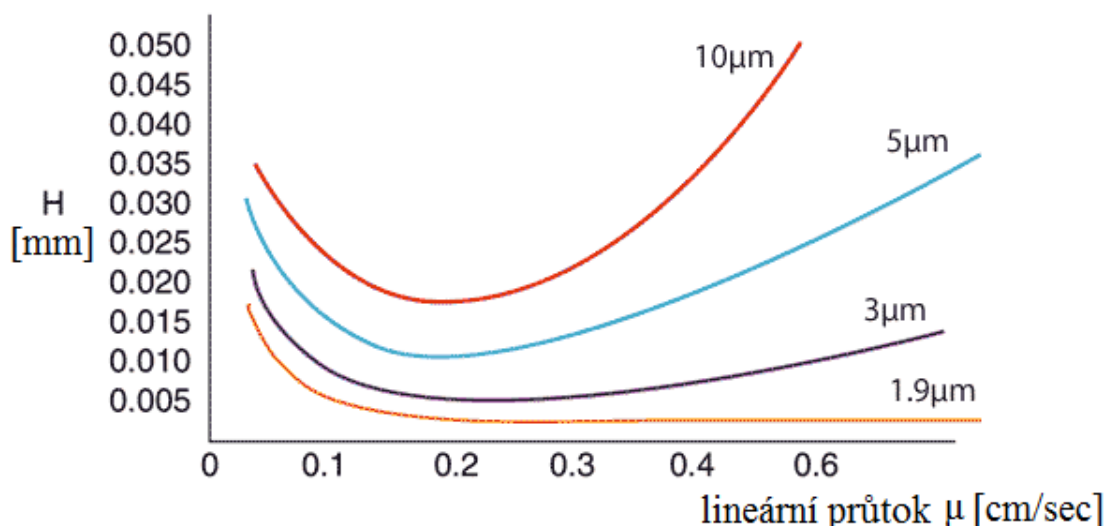
Velký pokrok v přímém spojení separačních a spektrálních technik byl zaznamenán v 90. letech 20. století³³. Během posledních pěti let se spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem stalo zásadní pro analýzu takových vzorků, jako jsou například environmentální či biologické matrice³⁴.

Mezi hlavní výhody spojení těchto dvou technik je vysoce selektivní detekce analytů díky MS detekci a také možnosti analýzy složitých směsí díky vysoce efektivní separaci na kolonách o malém zrnění částic (méně než 5 μm).

2.4.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří do skupiny separačních metod, které jsou založeny na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze, a to mezi mobilní (MF) a stacionární (SF). Mobilní fáze v kapalinové chromatografii, jak již z názvu vyplývá, je kapalina, která unáší vzorek prostorem, stacionární (nepohyblivá) fáze je buď tuhá látka, nebo kapalina ukotvená na tuhém nosiči³⁴. Stacionární fáze je umístěná v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Podstatou separačního procesu je opakované ustavování rozdělovací rovnováhy vzorku mezi těmito dvěma fázemi.

V HPLC se dosahuje vysoké účinnosti separačního procesu použitím kolon naplněných stacionární fází o malé (méně než 5 μm) a dobře definované velikosti částic, jelikož účinnost separace roste se snižující se velikostí částic náplně. Tento fakt popisuje Van Deemterova křivka (viz obrázek 2.5). Minimum křivky udává oblast průtokových rychlostí, při které kolona vykazuje největší účinnost. Minimum je pro malé částice ploché, což znamená, že lze pracovat v širším rozsahu průtoku bez ztráty účinnosti.



Obr 2.5 Van Deemterova křivka - závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti mobilní fáze³⁵.

V HPLC se využívá více separačních módů. Vývojově nejstarší je systém s normálními fázemi (NP-HPLC). V tomto módu je používána polární SF, kterou tvoří nejčastěji čistý silikagel nebo polární chemicky vázané fáze na silikagelovém nosiči) a MF s nižší polaritou než SF. Pomocí této techniky se separují polární látky. Čím více jsou látky polární, tím má vyšší afinitu k SF a tím má větší retenci. Tento systém se v dnešní době dostává do ústraní, jelikož převažují nevýhody oproti separacím v jiných systémech (práce s nevodnými, těkavými organickými rozpouštědly).

Iontově výměnná chromatografie (ion exchange chromatography - IEC) je založena na principu silných elektrostatických interakcí mezi ionizovanými funkčními skupinami měniče SF a opačně nabitými ionty obsaženými v roztoku. Síla interakcí je určena počtem a velikostí náboje analytu a funkčních skupin. IEC se používá například pro separaci aminokyselin, nukleových kyselin, peptidů a kationtů a aniontů ve vodách.

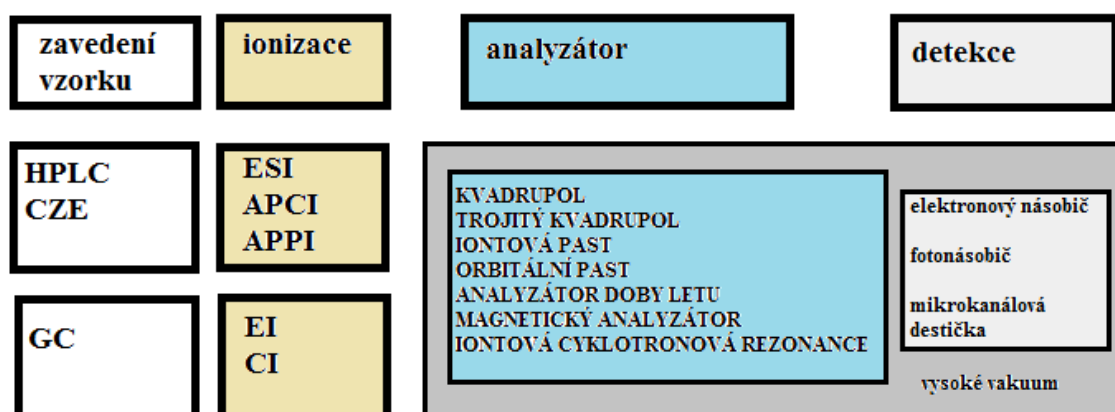
Další variantou je molekulová vylučovací chromatografie (size exclusion chromatography - SEC) neboli gelová chromatografie, která je založena na rozdělování molekul podle jejich velikosti v koloně s pórovitým polymerním gelem. Zde nedochází k žádným interakcím, ale látky jsou separovány podle molekulových hmotností. Dále pak

se tento systém používá pro frakcionaci, kdy směs látek je rozdělena na základě distribučních konstant analytů.

Nejrozšířenější a nejpoužívanější je chromatografie s reverzními fázemi (RP-HPLC). V tomto systému se využívá polární MF a nepolární SF. MF je obvykle směs vodné složky s polárními organickými rozpouštědly (např. alkohol, acetonitril), které jsou dobře mísitelné s vodou. SF obsahuje nejčastěji dlouhé uhlíkaté řetězce navázané na povrch nosiče (např. silikagel, hybridní sorbent nebo jiné kovové oxidy). Tato metoda je velmi univerzální a využívá se jak k separaci malých molekul, tak i pro separaci směsí, které jsou velmi komplikované (např. biologické vzorky, rostlinné extrakty).

2.4.2 Hmotností spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je používána pro určování hmotnosti atomů, molekul a jejich částí poté, co se převedou na kladné či záporné ionty³⁶. Hmotnostní spektrometr (MS) je iontově optické zařízení, které vzniklé ionty separuje podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Schématické znázornění procesu detekce MS, nejpoužívanější ionizační techniky a přehled analyzátorů jsou zobrazeny na obrázku 2.6³⁴.



Obr. 2.6 Schématické znázornění procesu detekce hmotností spektrometrií³⁴.

MS se skládá s iontového zdroje, který slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice. Dále zde je hmotnostní analyzátor, který rozděljuje ionty za vysokého vakua podle poměru jejich m/z . Poslední částí MS je detektor, který detekuje ionty a určuje jejich relativní intenzity.

2.4.2.1 Iontové zdroje

Ionizačních technik je široké spektrum, protože žádná z nich není naprosto univerzální. Volba ionizační techniky závisí na těkavosti látky, tepelné stabilitě látky, molekulové hmotnosti látky a polaritě látky³⁴. Pro spojení HPLC s MS jsou techniky ionizace používány za atmosférického tlaku, kam patří ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Ionizace desorpcí laserem za účasti matrice (MALDI) se používá zejména pro biologické matrice a to v off-line spojení s MS.

Všechny tyto techniky patří mezi tzv. měkké ionizační techniky, kdy při ionizaci vznikají protonované molekuly $[M+H]^+$ nebo deprotonované molekuly $[M-H]^-$ a při těchto technikách nedochází k tak rozsáhlým fragmentacím jako u tvrdých ionizačních technik, kde molekula získá nadbytek vnitřní energie, což se projeví fragmentací iontů na menší části. Do tvrdých ionizačních technik patří elektronová ionizace, používaná ve spojení s GC.

ESI je nejběžněji používaná ionizační technika pro HPLC-MS³⁷. Slouží k ionizaci středně polárních a iontových látek a umožňuje analyzovat velmi velké molekuly (např. proteiny). Principem této ionizace je, že rozpuštěný analyt prochází kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí. Vznikající kapičky po rozprášení na výstupu z kapiláry za pomoci zamlžujícího plynu nesou na svém povrchu velké množství nábojů. Při odpaření rozpouštědla dojde ke zvýšení hustoty povrchového náboje, až při dosažení kritické hodnoty dochází k rozpadu na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů. Opakování tohoto procesu vede až k uvolnění iontů.

Druhou používanou ionizační metodou je APCI, kde eluát je rozprašován do vyhřívané komůrky³⁷. Ve zdroji je pak na výbojové elektrodě vysoké napětí, čímž vzniká koronový výboj, při kterém se nejprve ionizují molekuly mobilní fáze, dále se přenáší náboj na molekuly analytu. Metoda má široké uplatnění a je vhodná i pro méně

polární analyty. Její nevýhodou je, že jí obvykle nelze používat pro aplikaci s nízkým průtokem MF ($>0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), zde ale záleží na vlastní konstrukci iontového zdroje.

Ionizační metoda APPI má stejné uspořádání jako APCI, jen se pro ionizaci molekul používá UV záření místo elektrody. Výhodou zde je, že lze ionizovat sloučeniny s nízkou až střední polaritou.

2.4.2.2 Analyzátoři

Analyzátor má dvě důležité funkce, a to rozdělení iontů podle poměru m/z a následně jejich urychlení a fokusaci³⁴. Výběr hmotnostního analyzátoru záleží na různých parametrech, například hmotnostním rozsahu (maximální měřitelná hodnota m/z), účinnosti, správnost hmoty, lineárním dynamické rozsahu, rychlosti a citlivosti.

Kvadrupólový analyzátor bývá součástí hmotnostních spektrometrů s nízkým rozlišením³⁷. Je tvořen čtyřmi paralelními tyčemi hyperbolického průřezu, na něž je vkládáno stejnosměrné střídavé napětí. Vstupující ionty zde začnou oscilovat. Nami vybrané ionty s určitým poměrem m/z projdou tímto kvadrupólem. Ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích. Trojitý kvadrupól je složen ze tří kvadrupólů jdoucích za sebou, kde prostřední kvadrupól slouží jako kolizní cela. Používá se pro kvantitativní analýzu či pro MS/MS experimenty.

Iontová past je v podstatě kvadrupól, na jehož koncích jsou umístěny elektrody s vloženým potenciálem, které umožňují zadržení iontů. Ionty, které přijdou do vnitřního prostoru iontové pasti, jsou nuceny se pohybovat po uzavřených kruhových dráhách. Se zvyšující se amplitudou vkládaného napětí se postupně ionty s rostoucím poměrem m/z dostávají na nestabilní trajektorie a opouštějí vnitřní prostor iontové pasti do detektoru.

Analyzátor doby letu neboli průletový analyzátor (TOF), který již umožňuje stanovení přesné hmoty s přesností na jednotky ppm*, je založen na měření doby, za kterou ionty překonají určitou dráhu³⁷. Ionty jsou urychleny vysokonapěťovým pulsem

* přesnost hmoty (mass error) se vyjadřuje v jednotkách ppm a vypočítá se dle vzorce:

$$\Delta \text{ ppm} = \frac{\text{přesná hmota} - \text{změřená hmota}}{\text{přesná hmota}} \times 10^6$$

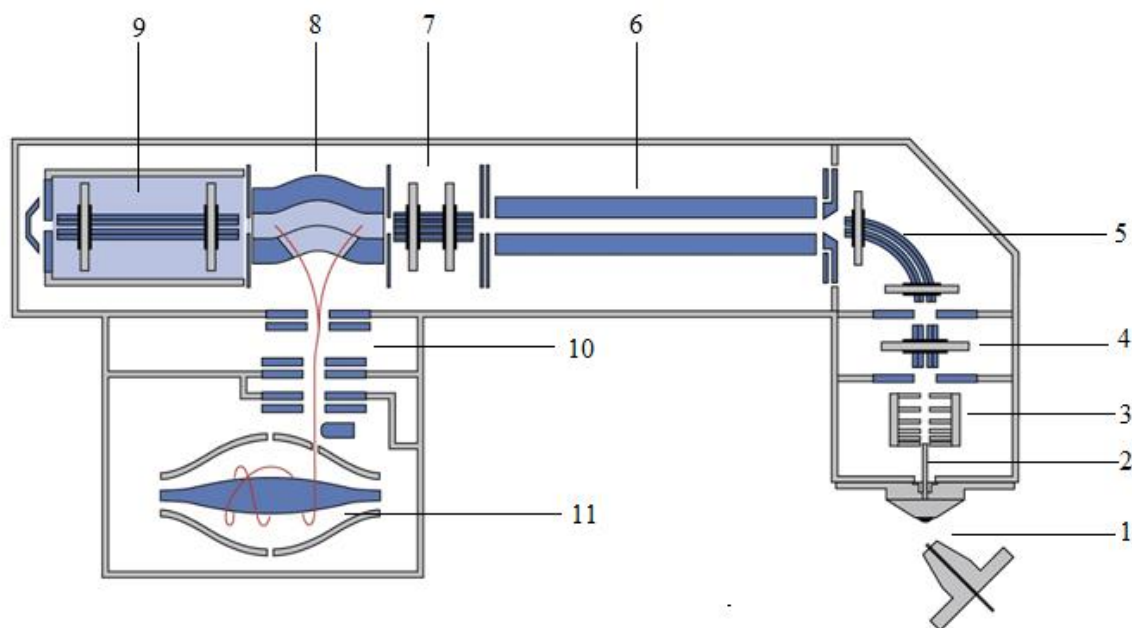
a vstupují do oblasti bez elektrického pole. Ionty s různým poměrem m/z získají stejnou energii a však různou rychlost. Poté doba, potřebná k překonání letové dráhy, je rozdílná (těžší ionty potřebují delší dobu než lehčí ionty).

Iontová cyklotronová rezonance, taktéž využívaná pro stanovení přesné hmoty, je cela, která je umístěna ve vakuu uprostřed velmi silného magnetického pole. Ionty jsou zachyceny v pasti kombinací magnetického pole a elektrického potenciálu vkládaného na záchytné desky. Ionty se začnou pohybovat po kruhové trajektorii a frekvence jejich rotace je úměrná poměru m/z . Pomocí Fourierovy transformace jsou tyto rotace převedeny na hmotností spektrum.

Magnetický hmotností analyzátor je založen na tom, že při průchodu iontu magnetickým polem dojde k zakřivení dráhy letu iontů. Větší zakřivení vzniká pro ionty s nižším poměrem m/z .

Novým druhem analyzátoru je orbitální past (viz obrázek 2.7), která byla popsána ruským fyzikem Makarovem v roce 2005. Tento analyzátor se skládá z vnější a středové vřetenové elektrody, na kterou je vloženo vysoké napětí. Úzký svazek iontů s určitým poměrem m/z vstupuje do elektrického pole a pohybuje se okolo a podél středové elektrody. Se stabilizací napětí se následně stabilizují i trajektorie jednotlivých iontů, čímž se vytvoří prstenece iontů. Ionty indukovaný proud je měřen na vnějších elektrodách³⁴. Hmotností spektrum se následně získá po Fourierově transformaci tohoto signálu.

Kombinace orbitální pasti s externím akumulacním zařízením (lineární past) umožňuje vícenásobnou úroveň fragmentace, což napomáhá k lepšímu objasnění struktury analytu. Společným rysem všech přístrojů, které používají orbitální past, je zařízení takzvané C-trap, neboli zakřivená lineární iontová past³⁸. Toto zařízení umožňuje uchovávání iontů, a poté jejich nástřik do orbitální pasti v krátkých pulzech.



Obr. 2.7 Schéma uspořádání Orbitrap hmotnostního spektrometru (1 – vyhřívaný elektrospej, 2 – kapilára na přenos iontů, 3 – S-čočka, 4 – flatapole, 5 – zakřivený flatapole, 6 – kvadrupól, 7 – octopole, 8 – C-Tap, 9 – HCD kolizní cela, 10 – orbitální past)³⁸.

2.4.2.3 Detektory

Detektory pro hmotnostní spektrometrii lze rozdělit do dvou skupin, a to na detektory pro přímá měření, které detekují elektrický proud vznikající přímým dopadem iontů na detektor a na detektory, které využívají efekt násobení elektronů vzniklých po dopadů iontů (poskytují měřitelný signál i pro jednotlivé ionty)³⁴.

Mezi detektory, které násobí elektrony, patří elektronový násobič, který obsahuje sérii dynod se vzrůstajícím potenciálem. Při nárazu iontů na první dynodu dojde k sekundární emisi elektronů a kaskádovitým efektem vznikne velké množství elektronů, které jsou poté detekovány.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- deionizovaná voda získaná pomocí přístroje Mill-Q Integral 3 (Merck Milipore, USA)
- aceton, 99,9% p.a. (C_3H_6O ; $M_r = 58,08$, Lach:ner, Česká republika)
- dusík, 99,996% (Messer, Německo)
- acetonitril, $\geq 99,9\%$ (C_2H_3N ; $M_r = 41,05$; Sigma-Aldrich, USA)
- metanol pro HPLC, $\geq 99,9\%$ (CH_3OH ; $M_r = 32,04$; Sigma-Aldrich, USA)
- síran hořečnatý ($MgSO_4$; $M_r = 120,36$; Lach:ner, Česká republika)
- chlorid sodný ($NaCl$; $M_r = 58,44$; Lach:ner, Česká republika)
- kyselina mravenčí ($HCOOH$; $M_r = 46,03$; Sigma-Aldrich, USA).

3. 2 Přístrojové vybavení

- hybridní hmotností detektor Quadrupol-Orbitrap – Q Exactive (Thermo Scientific, USA)
- kapalinový chromatograf Dionex Ulti Mate 300 UHPLC (Thermo Scientific, USA)
- kolonový termostat (Thermo scientific, USA)
- automatický dávkovač (Thermo scientific, USA)
- chromatografická kolona XSELECT HSS T3 201 μm x 10 mm, 2,4 μm (Waters, USA)
- analytické váhy AB204-S s přesností na 0,0001 g (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- předvážky s přesností 0,01 g (Denver Instrument, USA)
- odstředivka (PragoLab, Česká republika)
- rotační odparka Hei-Vap Precision (Heidolph, Německo)
- třepačka (Fisher Scientific, USA)
- třepačka MS3 Basic (IKA[®], Německo)

- ultrazvuková lázeň PSO2000A (Notus-Powersonic, Slovenská republika)
- automatické pipety, rozsahy 2-20 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL , 0,5- 5 mL (Thermo Scientific, USA)
- filtrační papír typ 1288 (Munkte, Švédsko).

3.3 Příprava kalibračních standardů proanthokyanidinů

Zásobní roztoky standardů PAs byly připraveny navážením 1 mg standardu a rozpuštěním v 1 ml MeOH. Pro přípravu těchto zásobních roztoků byly použity:

- katechin ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$; $M_r=290,28$; Sigma-Aldrich, USA)
- epikatechin ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$; $M_r=290,28$; Sigma-Aldrich, USA)
- procyanidin A2 ($\text{C}_{10}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$; $M_r=576,52$; Phytochem, Německo)
- procyanidin B1 ($\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$; $M_r = 578,53$; Phytochem, Německo)
- procyanidin B2 ($\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$; $M_r = 578,53$; Phytochem, Německo).

Pracovní roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků na finální koncentraci 1 mg.l^{-1} a to tak, že bylo odpipetováno pomocí automatické pipety 25 μl do 25ml odměrné baňky a objem doplněn methanolem. Z pracovního roztoku se připravilo deset kalibrační roztoků (pro jednotlivé PAs) a to tak, že do deseti skleněných vialek se odpipetovalo 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200 a 800 μl pracovního roztoku ($c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$), 100 μl vnitřního standardu (probenecid, $c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$) a vše bylo doplněno na celkový objem 1 ml pomocí roztoku methanol/voda (50:50, v/v). Pracovní roztoky byly vždy připravovány čerstvé.

3.4 Příprava vzorků

3.4.1 Příprava vzorků sladiny, mladiny, mladého piva, piva metodou QuEChERS

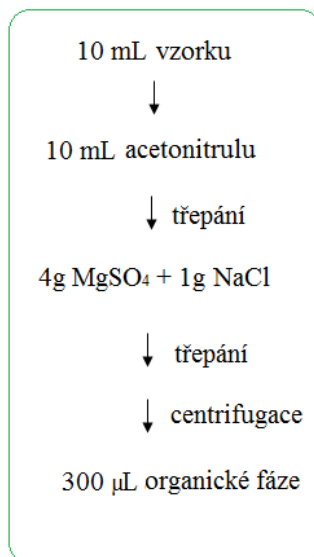
Vzorky byly odebrány při varném procesu piva ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském, a.s. v Praze. Technologie všech srovnávacích várek probíhala reprodukovatelně, pouze se měnily odrůdy chmele.

10 ml vzorku sladiny, mladiny, mladého piva a piva (tabulka č. 3.1) bylo odpipetováno do plastové 50 ml kyvety (Pozn.: vzorek piva musel být před analýzou 10 minut vložen do ultrazvukové lázně pro odstranění oxidu uhličitého). Ke vzorku bylo poté přidáno 10 ml acetonitrilu. Plastová kyveta se důkladně zavřela, a posléze se vzorek nechal třepat 1 minutu na třepačce. Pak se přidala směs solí 4 g $MgSO_4$ a 1 g NaCl a vzorek byl 1 minutu ručně protřepáván. Vzorek byl posléze odstředěn 7 minut při 5000 ot.min⁻¹. Schéma postupu přípravy vzorků je na obrázku 3.1.

Po odstředění bylo odpipetováno 300 μ l organické fáze, přidáno 50 μ l vnitřního standardu probenecid ($c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$), 50 μ l 2% kyseliny mravenčí, která napomáhá ke stabilitě PAs, a 600 μ l destilované vody.

Tab. 3.1 Popis vzorků testovaných chmelových odrůd a příslušných produktů (sladina, mladina, sladina, pivo).

| Odrůda chmele | Vzorek/zkratka | Odrůda chmele | Vzorek/zkratka |
|---------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| Žatecký poloraný červeňák | Sladina [CHS1] | Kazbek | Sladina [CHS2] |
| | Mladina [CHM1] | | Mladina [CHM2] |
| | Mladé pivo [CHML1] | | Mladé pivo [CHML2] |
| | Pivo [CHP1] | | Pivo [CHP2] |
| 4979 Modifikace ŽPČ | Sladina [CHS3] | 4980 Modifikace ŽPČ | Sladina [CHS4] |
| | Mladina [CHM3] | | Mladina [CHM4] |
| | Mladé pivo [CHML3] | | Mladé pivo [CHML4] |
| | Pivo [CHP3] | | Pivo [CHP4] |



Obr. č. 3. 1 Příprava vzorků mladiny, sladiny, mladého piva a piva metodou QuEChERS (1. odpipetování 10 mL vzorku a 10 mL ACN do plastové 50ml kyvety; 2. třepání na třepačce 1 minutu; 3. přidání směsi solí MgSO₄ a NaCl; 4. třepání v ruce pohybem „nahoru a dolů“ po dobu 1 minuty; 5. odstředění 7 minut/ 5000 rpm; 6. odpipetování organické fáze).

3.4.2 Příprava vzorku chmele

Pro experiment profilování PAs chmele za účelem vývoje metody pro odrůdovou specifitu byly použity chmely ze sklizně 2014. Chmely pocházely z různých lokalit České republiky. Jednalo se o odrůdy Žatecký poloraný červeňák (ŽPČ), Sládek, Kazbek, Argus a Premiant (viz příloha – Sklizeň chmele 2014).

Nejprve se rozemlely sušené chmelové hlávky. Potom se navázilo přibližně 1 g chmele do Ehlenmayerovy baňky (výsledná koncentrace 4 g/l, přepočítáno přes sušinu). PAs byly extrahovány 70% acetonem (250 ml) v inertní atmosféře (hrdlo baňky byl naplněn dusíkem). Poté se vzorek nechal 40 minut třepat. Po uplynutí doby se vzorek přefiltroval přes skládaný filtr. Poté se odebralo 5 ml vzorku a aceton se nechal odpařit na vakuové odparce při 37 °C podobu 30 minut. Poté se vzorek rozpustil v 1 ml methanolu.

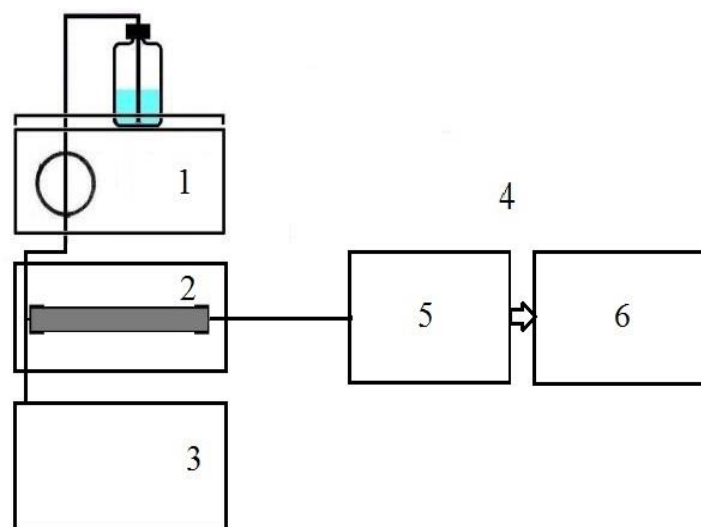
Pro přípravu roztoků k analýze se odpipetovalo 200 µl chmelového extraktu, 20 µl vnitřního standardu ($c = 1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a 780 µl destilované vody do skleněných vialek.

Opakovatelnost metody byla stanovena pomocí vzorku chmelu (Sládek- Čáslav), který se připravil stejným postupem, jako ostatní vzorky chmelu. Opakování bylo provedeno šestkrát.

Vzorky pro získání výtěžnosti byly připraveny opět z chmelu Sládek (Čáslav). Vzorek chmele byl připraven stejným postupem, jako ostatní vzorky chmele (viz předchozí odstavce). Poté se do 25ml odměrné baňky připravil směsný standard katechin, epikatechinu, prokyanidinu B1 a B2, do kterého bylo odpipetováno 310 μl katechinu (pracovní roztok o $c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$), 77,5 μl epikatechinu (pracovní roztok o $c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$), 65 μl prokyanidinu B1 (pracovní roztok o $c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$) a 15 μl prokyanidinu B2 (pracovní roztok o $c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$) a výsledný objem byl doplněn methanolem. Vzorky chmele s 50% a 100% přídávkem byly připraveny tak, že do dvou skleněných vialek bylo odpipetováno 200 μl chmelového extraktu, 20 μl vnitřního standardu; do jedné vialky s 50% přídávkem se odpipetovalo 50 μl směsného standardu a do druhé se 100% přídávkem 100 μl směsného standardu, a poté byla přidána destilovaná voda na celkový objem 1 ml. Poté byly připraveny dva vzorky pouze se směsným standardem. Do jedné vialky se odpipetovalo 50 μl směsného standardu, 20 μl vnitřního standardu a 930 μl destilované vody, do druhé vialky 100 μl směsného standardu, 20 μl vnitřního standardu a 880 μl destilované vody.

3.5 Experimentální uspořádání a postup měření

Schéma experimentálního uspořádání je zobrazeno na obrázku 3.2. K separaci proanthokyanidinů byla použita kolona XSELECT HSS T3, se stacionární fází C18. Jako mobilní fáze byly použity roztoky 0,1% mravenčí kyseliny ve vodě (A) a 0,1% mravenčí kyseliny v acetonitrilu (B). Podmínky měření HPLC a MS použité při analýze jsou zaznamenány v tabulce 3.2. Eluce probíhala v gradientovém módu viz tabulka 3.3. MS/MS data byla získána použitím módu „Data independent acquisition“ (DIA), kdy vybrané hmoty prekurzorů byly fragmentovány v HCD kolizní cele a sledované analyty byly detekovány a kvantifikovány na základě specifických produktových iontů (viz tabulka 3.3) v MS/MS fragmentačních spektrech.



Obr. 3.2 Schéma HPLC-HRMS (1 – duální vysokotlaké pístové čerpadlo, 2 – termostatovaný prostor s kolonou, 3 – automatický dávkovač, 4 – vysoko rozlišovací hmotností spektrometr, 5 – iontový zdroj – ESI, 6 – hmotnostní analyzátor – orbitální past).

Tab. 3. 2 Podmínky měření použité při analýze.

| Parametry ionizačního zdroje (ESI) | |
|---|--|
| Průtok sušícího plynu (N ₂) | 32 |
| Průtok pomocného plynu (N ₂) | 7 |
| Teplota sušícího plynu | 295°C |
| Napětí na sprejovací jehle | -3000 |
| Teplota kapiláry | 295°C |
| MS – MS/MS experiment v negativním ionizačním módu | |
| Rozlišení | 35 000 |
| Max. IT čas | 120 ms |
| Izolační okno | 2 <i>m/z</i> |
| HPLC | |
| Použitá kolona | XSELECT HSS T3 (2,1x100 mm, 2,5 μm) |
| Mobilní fáze | A – 0,1% mravenčí kyselina ve vodě, B – 0,1% mravenčí kyselina v acetonitrilu |
| Dávkovaný objem | 2 μl |
| Průtoková rychlost mobilní fáze | 0,400 ml.min ⁻¹ |
| Teplota separace | 40 °C |

Tab. 3.3 Gradientový mód mobilní fáze v závislosti na čase.

| min | A [%] | B [%] |
|------------|--------------|--------------|
| 0 | 95 | 5 |
| 1 | 95 | 5 |
| 13 | 70 | 30 |
| 18-21 | 0 | 100 |
| 22-25 | 95 | 5 |

Pozn.: A - 0,1% mravenčí kyselina v destilované vodě, B - 0,1% mravenčí v acetonitrilu kyselina

Tab 3.4 MS parametry pro sledované analyty a skupiny analytů, sumární vzorec, retenční čas (*Rt*), *m/z* mateřského iontu [M-H]⁻, *m/z* kvantifikačního iontu z fragmentačního MS/MS spektra (NCE: 30).

| Proanthokyanidiny | <i>Rt</i> [min] | Sumární vzorec | mateřský ion <i>m/z</i> [M-H] ⁻ | Kvantifikační iont <i>m/z</i> |
|---------------------------------|--------------------|---|---|----------------------------------|
| K | 4,8 | | | |
| EK | 6,2 | C ₁₅ H ₁₄ O ₇ | 289,1 | 125,0242 |
| (E)G | | C ₁₅ H ₁₄ O ₇ | 305,1 | 125,0242 |
| (E)K-(E)A | | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁ | 531,1 | 289,0720 |
| (E)K-(E)K <i>Prokyanidin B1</i> | 5,2 | | | |
| (E)K-(E)K <i>Prokyanidin B3</i> | 4,5 | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ | 577,1 | 407,0775 |
| (E)K-(E)K <i>Prokyanidin B</i> | 5,8 | | | |
| (E)K=(E)K <i>Prokyanidin A2</i> | 8,8 | C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂ | 575,1 | 289,0720 |
| (E)K-(E)G | | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃ | 593,1 | 407,0775 |
| (E)G-(E)G | | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄ | 609,1 | 125,0242 |
| (E)K-(E)K-(E)K | | C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈ | 865,1 | 407,0775 |

Pozn.: K – katechin, EK- epikatechin, (E)A-(epi)afzelechin, (E)G-(epi)gallokatechin

3.6 Zpracování dat

Naměřené signály byly zaznamenávané a integrované pomocí software Thermo Xcalibur 2.2. Dále pak byla data exportována do programu OriginPro 8.5 (OriginLab, USA), kde byla dále zpracována.

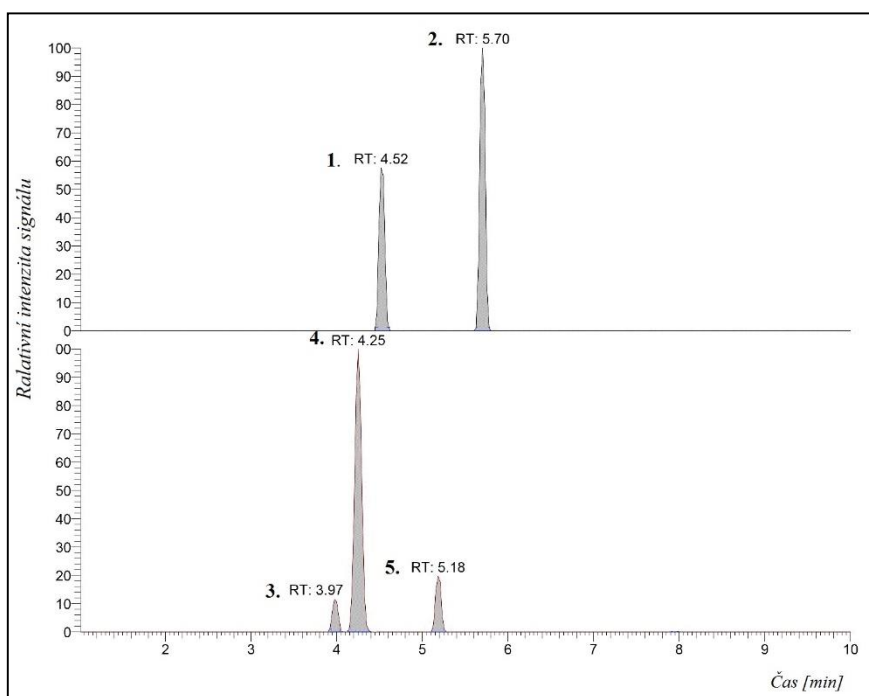
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace podmínek separace PAs

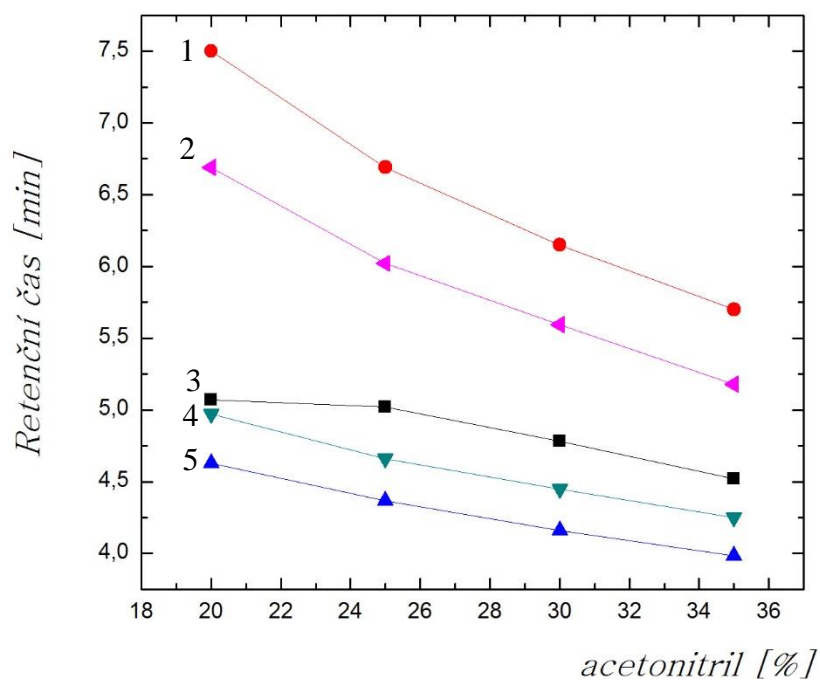
4.1.1 Optimalizace gradientu

Při optimalizaci gradientu byla testována jeho strmota. Gradient vždy začínal na 5 % organické fáze, jejíž koncentrace lineárně stoupala po dobu 13 minut na hodnoty 20 %, 25 %, 30 % nebo 35%. Chromatogram na obrázku 4.1 zobrazuje chromatogram při použití 30 % organickou fáze v 13. minutě.

Při růstu gradientu na finální 20 % ACN v MF nedocházelo k dostatečné separaci katechinu a prokyanidinu B3. U 25 % ACN na konci gradientu byla separace zbytečně dlouhá a při 35 % ACN docházelo ke koeluci látek. Srovnání jednotlivých gradientů je možno vidět na obrázku 4.2.

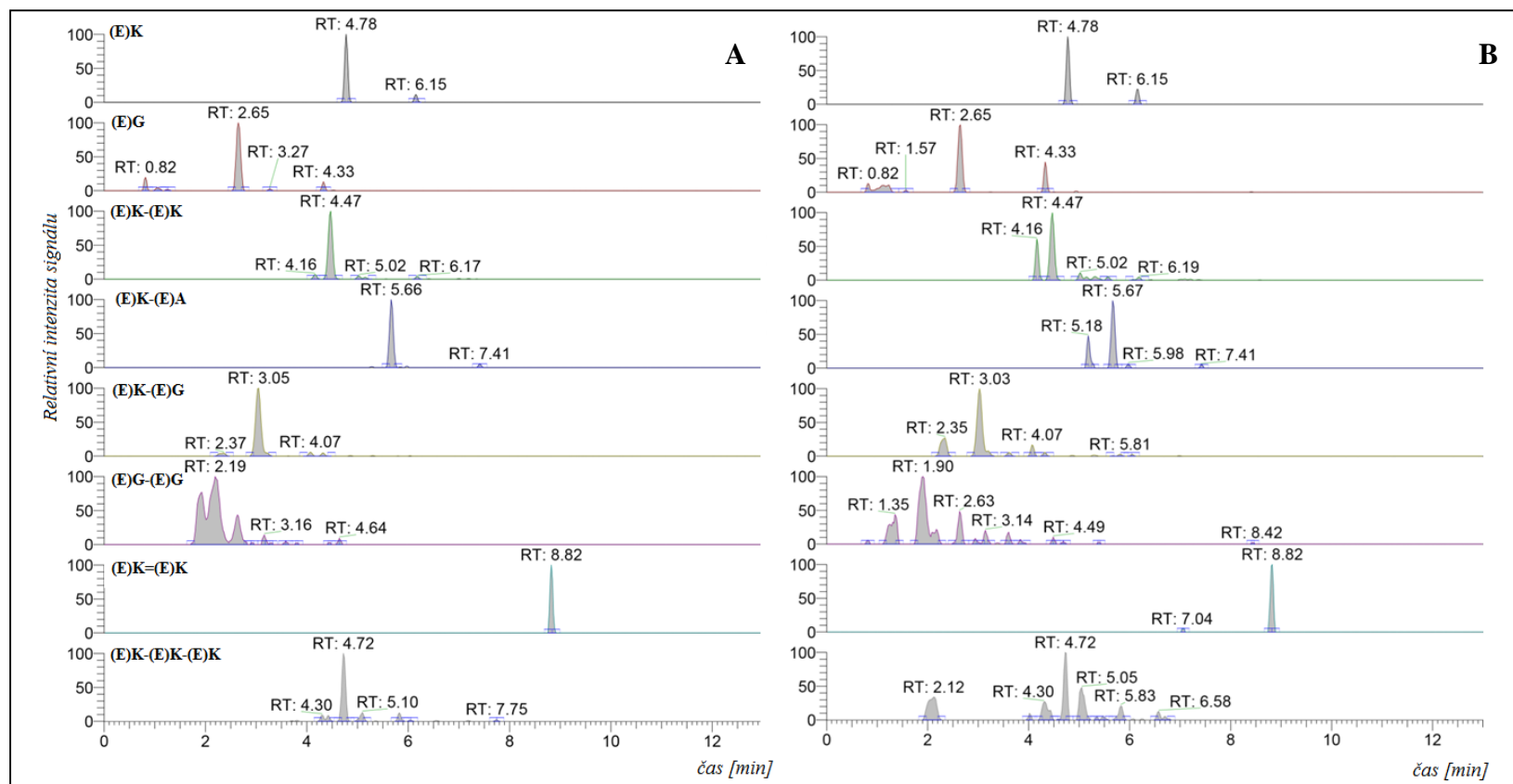


Obr 4.1 Chromatogram standardů PAs při složení konečného 30% podílu ACN v MF (1. – katechin, 2. – epikatechin, 3. – prokyanidin B1, 4. – prokyanidin B3, 5. – prokyanidin B2).



Obr. 4.2 Srovnání retenčních časů PAs při různém složení ACN v MF (1 – epikatechin, 2 – prokyanidin B2, 3 – katechin, 4 – prokyanidin B3, 5 – prokyanidin B2).

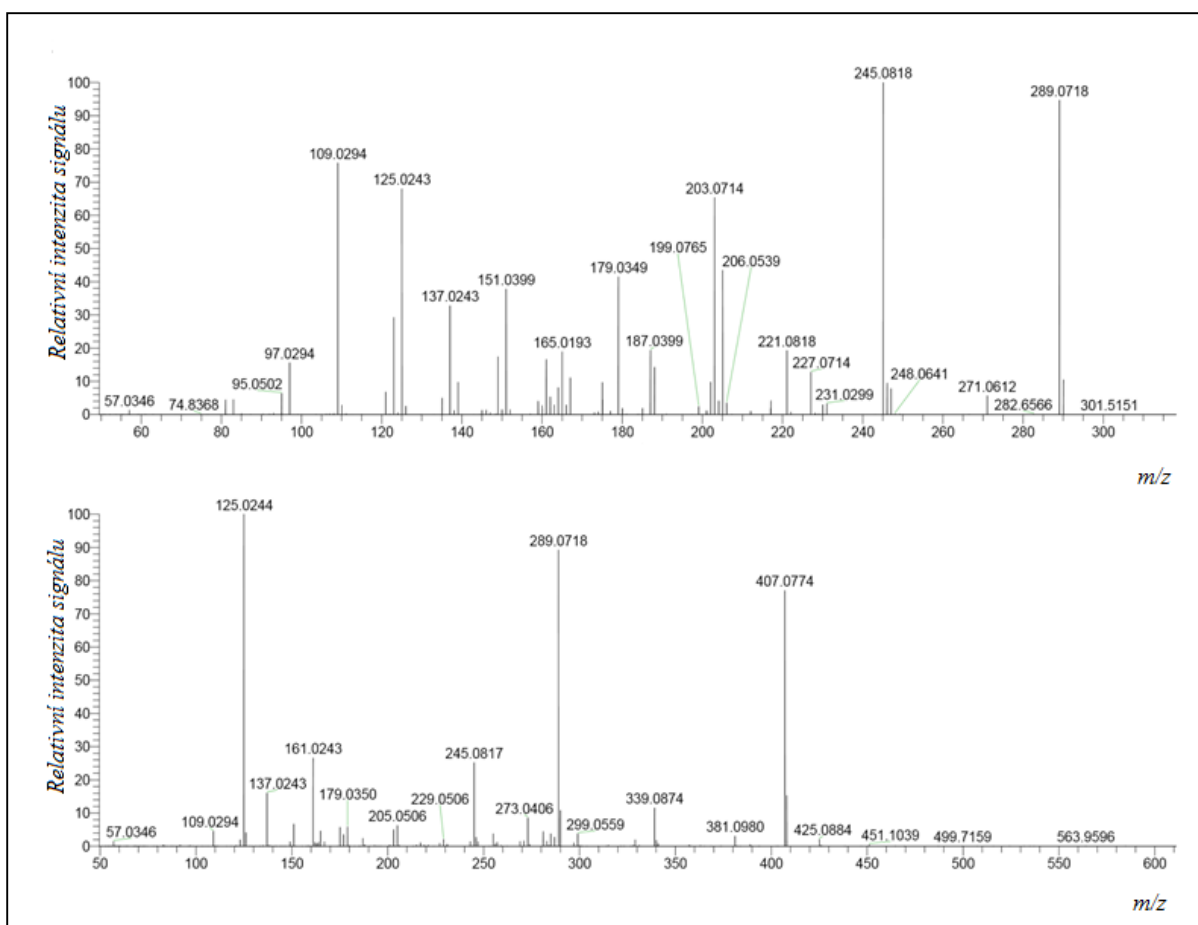
Aplikace optimalizovaných podmínek je demonstrována na reálném vzorku sladiny a mladiny kdy dochází k dobré separaci píků PAs (obrázek 4.3).



Obř. 4.3 HPLC-ESI-HRMS – chromatografické záznamy reálných vzorků (sladina-A, mladina-B). Podmínky separace: Kolona XSELECT HSS T3; mobilní fáze: 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě (A) a 0,1% kyseliny mravenčí v acetonitrilu; průtoková rychlost: 0,4 ml.min⁻¹ v gradientovém módu (viz tabulka 3.3); teplota separace 40 °C. Pozn.: K-katechin, G-gallokatechin, A-afzelechin.

4.1.2 Optimalizace normalizované kolizní energie

Normalizovaná kolizní energie byla optimalizovaná s ohledem na získaná MS/MS spektra, která bude mít reprodukovatelnou a dobře vypovídající fragmentaci, proto byly srovnány hodnoty normalizované kolizní energie (NCE) 20, 30 a 40. Za optimální normalizovanou NCE byla zvolena hodnota 30, při které byla získána reprodukovatelná MS/MS spektra s bohatou fragmentací (viz obrázek 4.4). Při použití NCE 20, nedocházelo k dostatečné fragmentaci iontů. Naopak při použití vyšší NCE než 30 docházelo až k příliš rozsáhlé fragmentaci iontů, která byla pro vyhodnocení nepřehledná.



Obr. 4.4 Fragmentační spektrum katechinu (A) a prokyanidinu (B) při použití NCE 30.

Výsledné experimentální podmínky jsou uvedeny v tabulce 3.2.

4.2 Interní validace metody

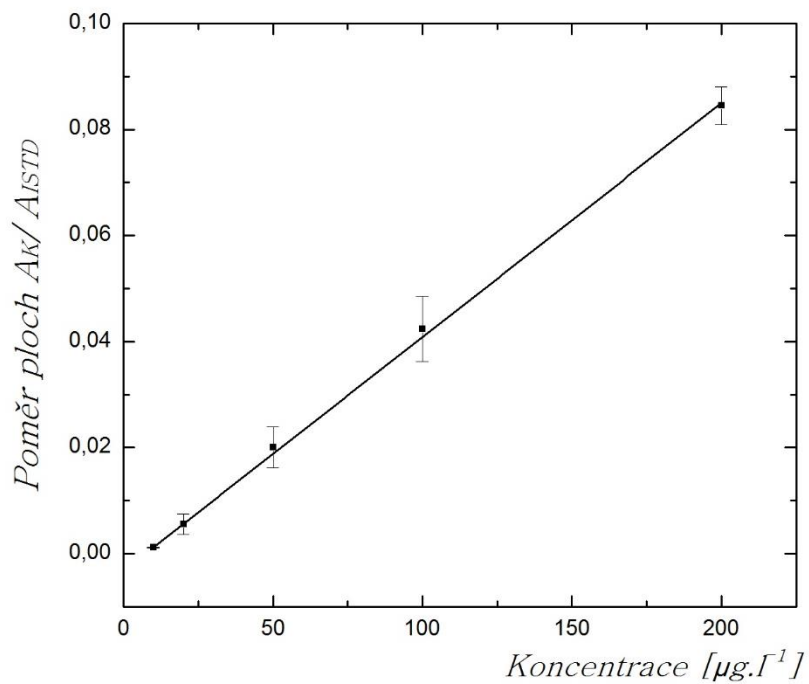
4.2.1 Kalibrace metody, limit kvantifikace (LOQ)

Kalibrační roztoky byly připraveny podle návodu (kapitola 3.3) a změřeny jejich plochy šestkrát. Z naměřených hodnot se udělal průměr, a poté se vypočítaly odchylky měření. Ze získaných hodnot ploch (normalizovaných na plochu ISTD) byly sestrojeny kalibrační křivky (viz obrázek 4.5, 4.6, 4.7,4.8) katechinu, epikatechinu, B1 a B2 v koncentračním rozmezí od 5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ do 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a vypočteny rovnice regrese a hodnoty determinačního koeficientu R^2 .

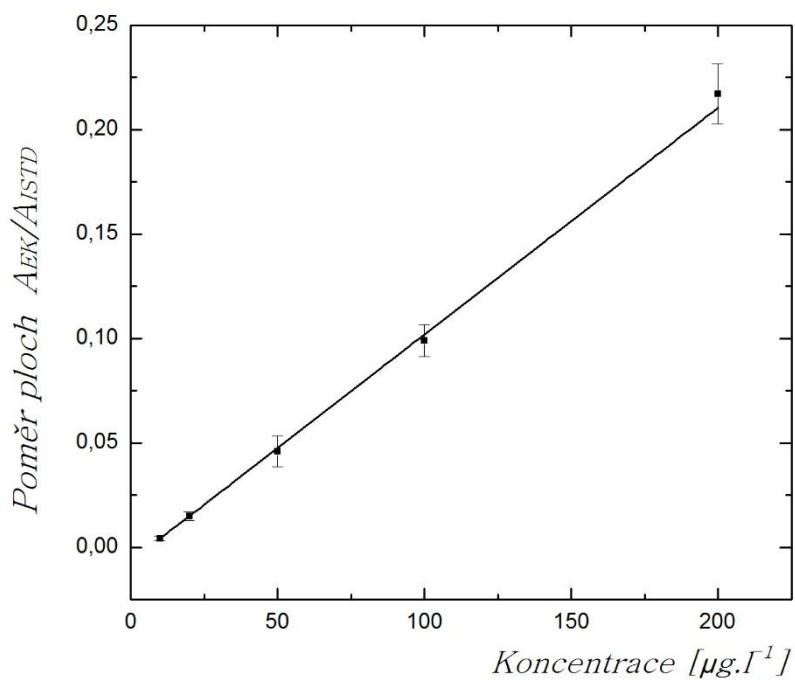
Poté byla učena mez stanovitelnosti (LOQ – z anglického zkratky – limit of quantification), jako nejnižší bod kalibrační křivky. Ta byla ověřena pomocí opakovaného měření (6x) a vyjádření relativní směrodatné odchylky (viz tabulka č. 4.1). Pro všechny standardy byla relativní směrodatná odchylka menší než 20 %, z čehož vyplývá, že nejnižší bod kalibrační křivky u jednotlivých PAs lze považovat za mez stanovitelnosti.

Tab. 4.1 Mez stanovitelnosti pro jednotlivé PAs standardy.

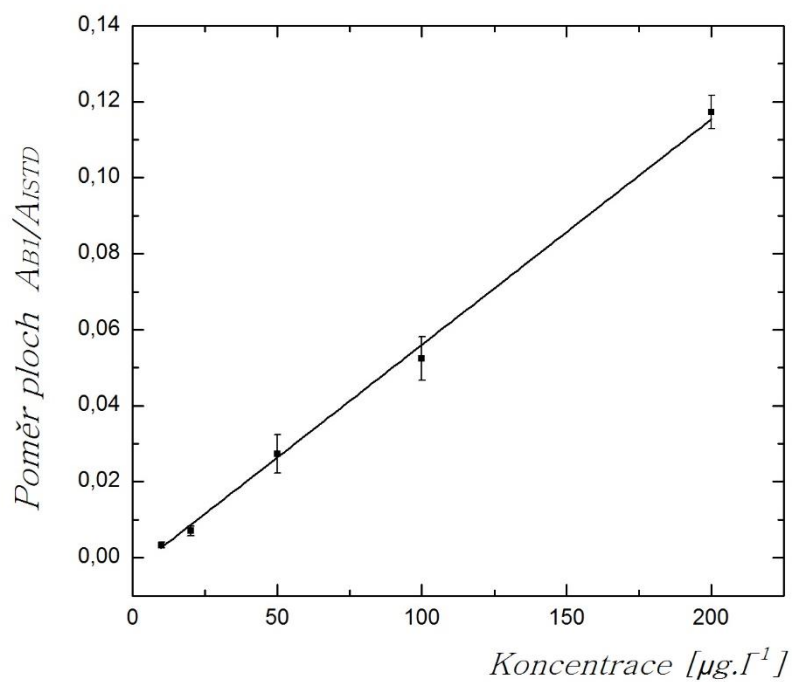
| | LOQ [$\mu\text{g.l}^{-1}$] | Relativní směrodatná odchylka [%] |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| Katechin | 10 | 2,4 |
| Epikatechin | 5 | 12,6 |
| Prokyanidin B1 | 10 | 9,7 |
| Prokyanidin B2 | 10 | 5,2 |



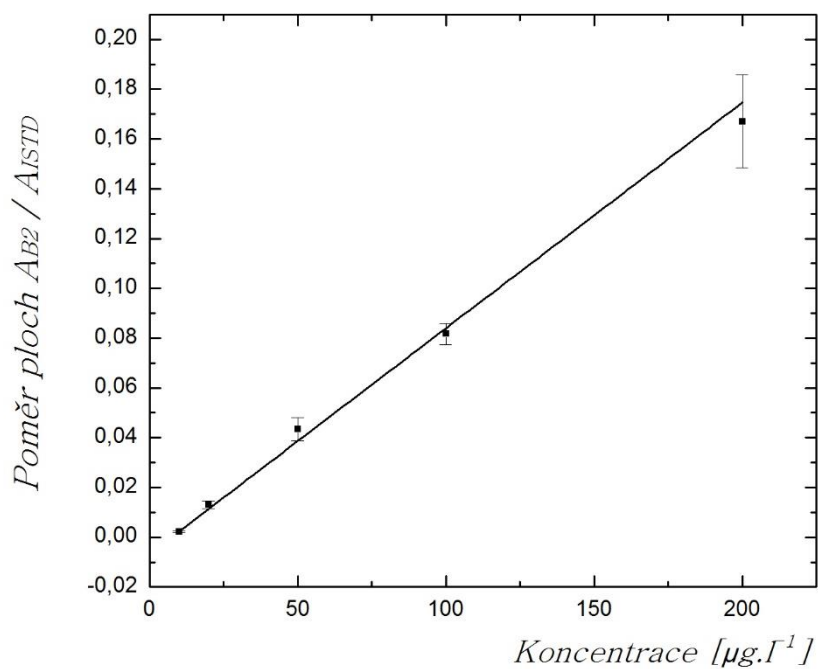
Obr 4.5 Kalibrační závislost katechinu. Rovnice regrese $y = 0,00044 c - 0,00323$, $R^2 = 0,9996$.



Obr 4.6 Kalibrační závislost epikatechinu. Rovnice regrese: $y = 0,00109 c - 0,00662$, $R^2 = 0,9986$.



Obr 4.7 Kalibrační závislost prokyanidinu B1 – rovnice regrese:
 $y = 0,00060c - 0,00323$, $R^2 = 0,9951$.



Obr 4.8 Kalibrační závislost prokyanidinu B2 – rovnice regrese:
 $y = 0,000091c - 0,00669$, $R^2 = 0,9935$.

4.2.2 Opakovatelnost metody

Vzorek chmelu (Sládek – Čáslav) byl připraven šestkrát stejným postupem. Poté byly vzorky změřeny a následně byla vypočítána koncentrace ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) námi vybranými PAs. Ze získaných hodnot se vypočítal průměr a posléze se vypočítala relativní směrodatná odchylka těchto koncentrací (viz tabulka 4.2). Pro jednotlivé PAs standardy byla relativní směrodatná odchylka menší než 20 %, což svědčí o dobré opakovatelnosti metody.

Tab. 4.2 Opakovatelnost metody.

| | Koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] | | | | | | Průměr | RSD [%] |
|----|--|-----|-----|----|----|-----|--------|-------------|
| | Měření | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | |
| K | 122 | 127 | 104 | 83 | 98 | 101 | 106 | 16,5 |
| EK | 15 | 16 | 14 | 12 | 14 | 13 | 14 | 13,6 |
| B1 | 50 | 45 | 33 | 31 | 37 | 34 | 38 | 19,7 |
| B2 | 6 | 5 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 14,0 |

Pozn.: K – katechin, EK – epikatechin, B1 – prokyanidin B1, B2 – prokyanidin B2

4.2.3 Standardní přídavek, výtěžnost metody

Vzorek chmelu, vzorky chmelu s 50% a 100% přídávkem PAs (katechin, epikatechinu, prokyanidinu B1 a B2) a vzorky se směsným standardem připravené z pracovních roztoků byly připraveny a změřeny třikrát. Výsledné hodnoty z měření byly vždy zprůměrované. Ze získaných dat byla vypočítána výtěžnost metody viz tabulka 4.3.

Tab. 4.3 Výtěžnost metody.

| PA _s | Průměrná výtěžnost metody u 50% přídatku PA _s [%] | Průměrná výtěžnost metody u 100% přídatku PA _s [%] |
|-----------------|---|--|
| K | 113 | 100 |
| EK | 100 | 98 |
| B1 | 111 | 118 |
| B2 | 103 | 114 |

Pozn.: K – katechin, EK – epikatechin, B1 – prokyanidin B1, B2 – prokyanidin B2

Výtěžnost na obou koncentračních hladinách (50% a 100% přídatku PA_s) se pohybuje v oblasti 98 - 118 %, tudíž lze říci, že metoda má výbornou výtěžnost. V souladu s již dříve popsány výsledky je 70% aceton pro extrakci PA_s z chmele optimální. Z dobré výtěžnosti metody lze také usuzovat na optimální separační podmínky a podmínky MS detekce.

4.3 Aplikace metody

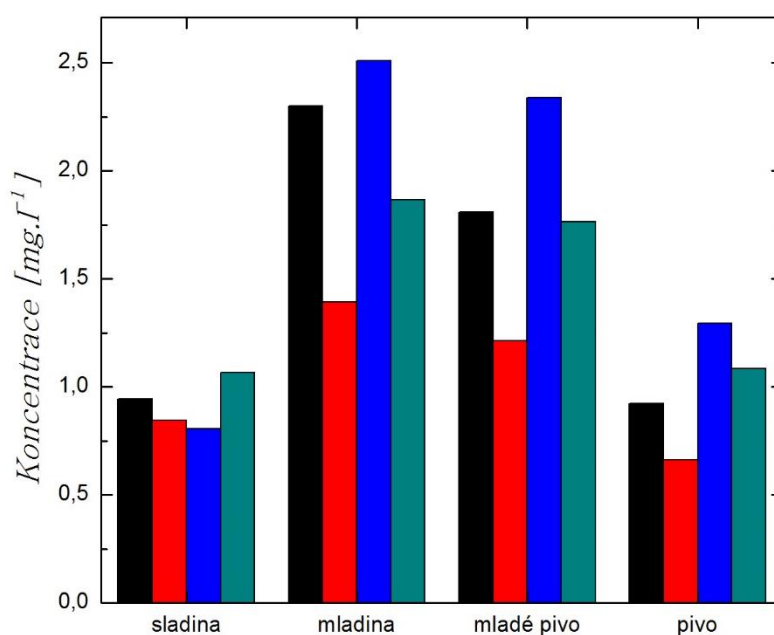
4.3.1 Koncentrační profil PA_s během varního procesu

Jak lze vidět na obrázcích 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 a 4.13, během varního procesu se jednotlivé koncentrace PA_s mění.

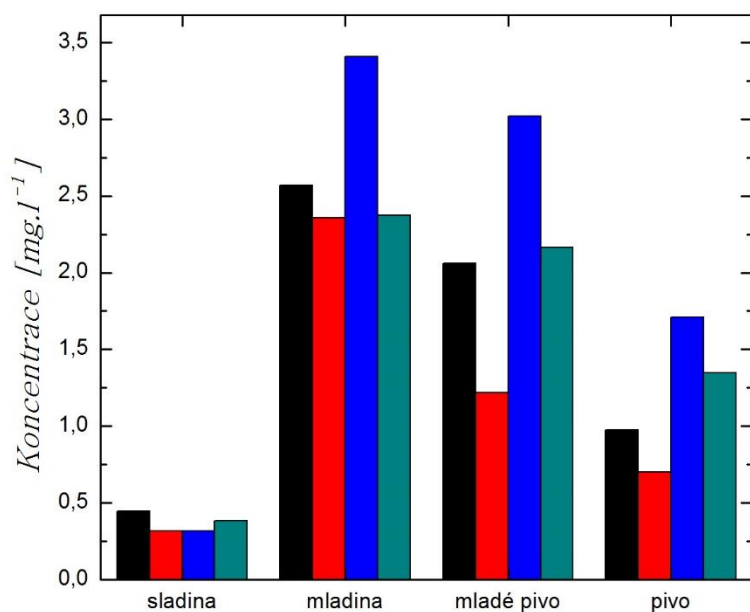
Koncentrační profily katechinu, epikatechinu, prokyanidinu B1 a B2 mají stejný průběh. Ve sladině, kdy jednotlivé PA_s pocházejí pouze z ječmene, je koncentrace těchto látek zprvu nízká. Po chmelovaru, kdy se ke sladině přidá chmel a vzniká mladina, jejich koncentrace výrazně stoupá - lze tedy říci, že tyto PA_s pocházejí z chmele. Následně se jejich koncentrace snižuje z technologických důvodů (precipitace s bílkovinami a odstraňování kalů pro stabilizaci piva).

Rozdílný průběh má prokyanidin B3, jehož koncentrace je nejvyšší ve sladině, a poté lineárně klesá. Důvodem je, že tento prokyanidin je hojně obsažen v ječmeni, ve chmelu přítomen není.

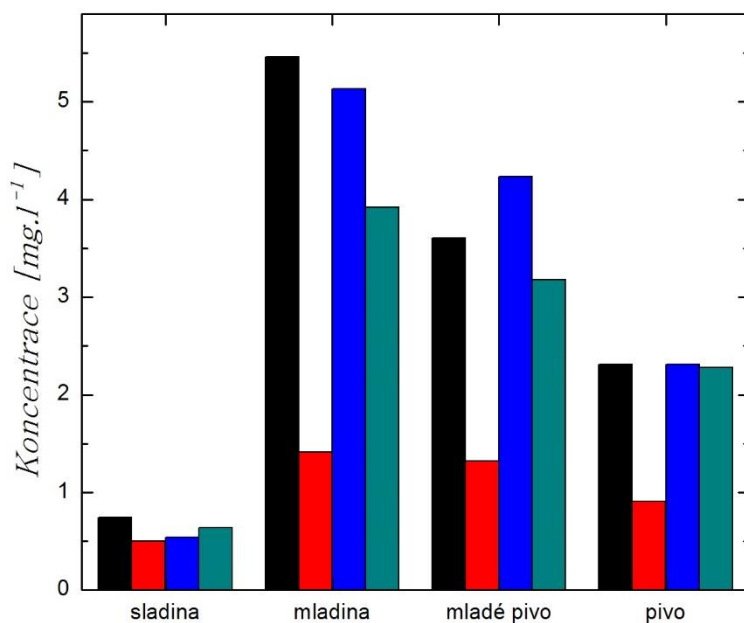
Dále je z grafů patrné, že koncentrace katechinu v mladině (obr. 4.9) je v jednotlivých odrůdách chmelu rozdílná. Koncentrace epikatechinu v mladině (obr. 4.10) se shoduje u odrůdy Kazbek s chmelem 4980 (modifikace ŽPČ). Koncentraci prokyanidinu B1 v mladině má shodnou chmel 4979 (modifikace ŽPČ) a ŽPČ. Prokyanidin B2 v mladině má různé koncentrace, odrůda ŽPČ má asi pětinasobně vyšší koncentraci tohoto PAs oproti odrůdě Kazbek. Malý rozptyl B3 v mladině (obrázek 4.13) je dán nejistotou měření a technologií přípravy vzorku.



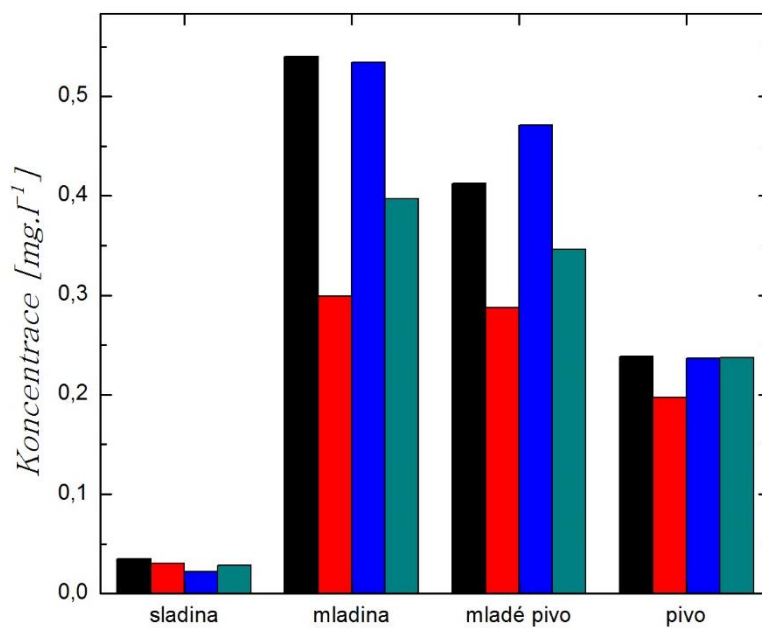
Obr. 4.9 Koncentrační profil katechinu během varního procesu (■ – Žatecký poloraný červeňák, ■ – Kazbek, ■ – modifikace ŽPČ 4979, ■ – modifikace ŽPČ 4980).



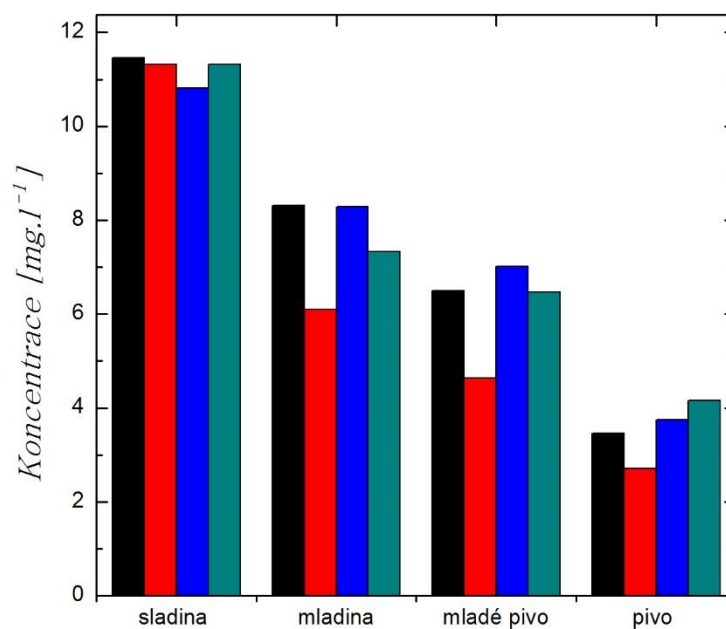
Obr. 4.10 Koncentrační profil epikatechinu během varního procesu (■ – Žatecký poloraný červeňák, ■ – Kazbek, ■ – modifikace ŽPC 4979, ■ – modifikace ŽPC 4980).



Obr. 4.11 Koncentrační profil prokyanidinu B1 během varního procesu (■ – Žatecký poloraný červeňák, ■ – Kazbek, ■ – modifikace ŽPC 4979, ■ – modifikace ŽPC 4980).



Obr. 4.12 Koncentrační profil prokyanidinu B2 během varního procesu (■ – Žatecký poloraný červeňák, ■ – Kazbek, ■ – modifikace ŽPC 4979, ■ – modifikace ŽPC 4980).



Obr. 4.13 Průběh koncentrace prokyanidinu B3 během varního procesu (■ – Žatecký poloraný červeňák, ■ – Kazbek, ■ – modifikace ŽPC 4979, ■ – modifikace ŽPC 4980).

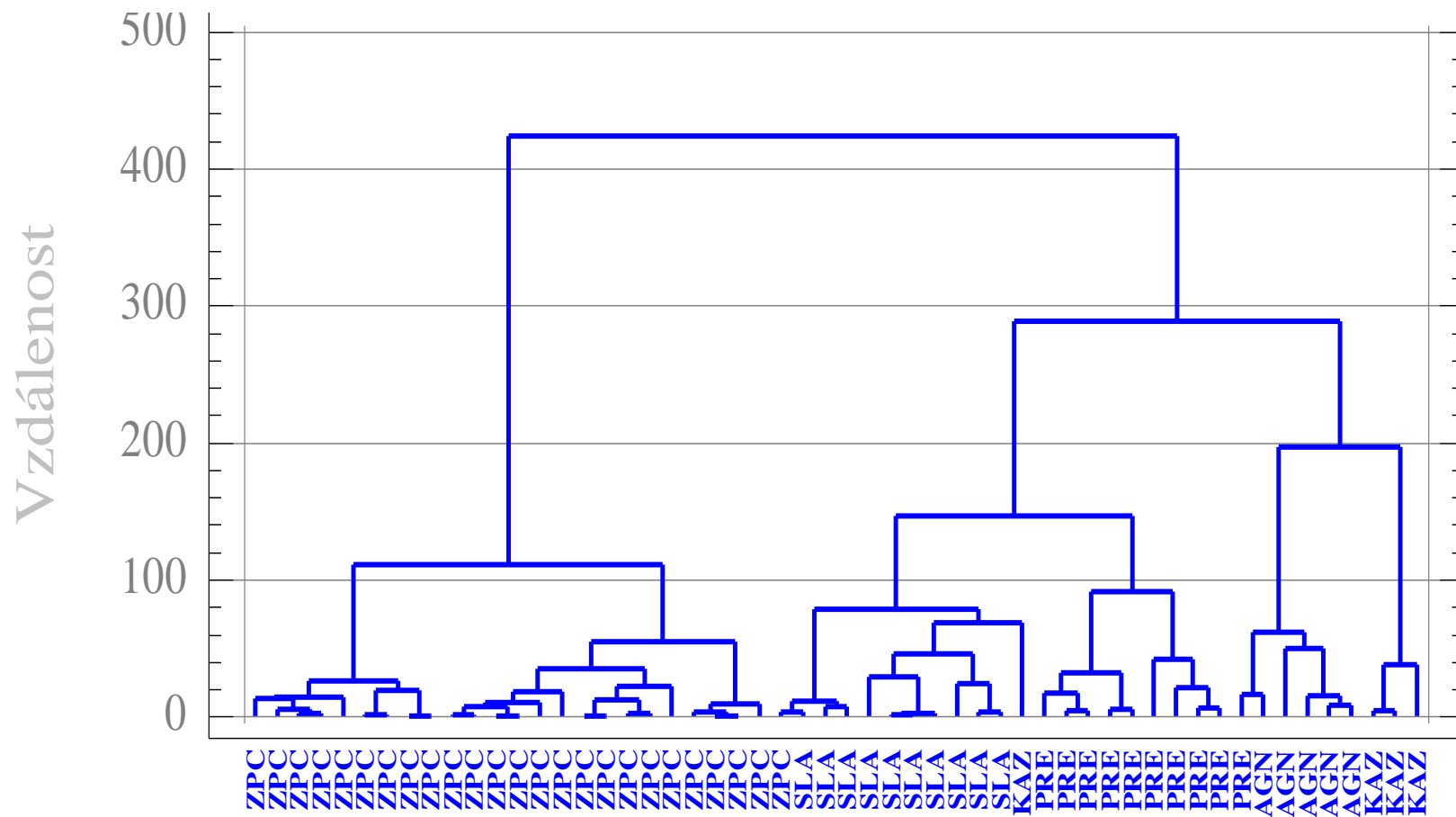
4.3.2 Odrůdová specifita chmele pomocí profilů PAs

Získané profily testovaných padesáti vzorků chmele byly statisticky zpracovány pomocí klastrové analýzy. Ze získaného dendrogramu (viz obrázek 4.14) je patrné, že odrůdy chmele se rozdělily do dvou hlavních skupin, a to na Žatecký poloraný červeňák a na odrůdy další (Sládek, Premiant, Agnus a Kazbek).

Nejbližší shody s ŽPČ má odrůda chmele Sládek z druhé skupiny. Tato odrůda byla získána výběrem hybridního potomstva šlechtitelského materiálu, kde v původu jsou odrůdy ŽPČ a Northern brewer. Protože je zřejmé, že genetický původ chmele se shoduje s chemotaxonomickým profilem PAs, jsou chemicky tyto dvě odrůdy skutečně nejvíce podobné, což potvrdila i publikace Olšovská et al.³⁰.

Odrůda Premiant se zařadila za odrůdu chmele Sládek. Tato odrůda byla získána také výběrem z hybridního potomstva křížením ŽPČ, a navíc z dalšího šlechtitelského materiálu. Odrůda Agnus, která se zařadila za Premiant, byla získána výběrem z hybridního potomstva, které má v původu odrůdy ŽPČ, Sládek, Bor, Fuggle, Northeim brewer a další šlechtitelský materiál. Odrůda chmele Kazbek, která je na opačném konci dendrogramu než ŽPČ, není geneticky příbuzná s ŽPČ, byla získána šlechtěním ruského planého chmele.

Z dendrogramu je patrné, že se jeden vzorek odrůdy Kazbek zařadil do klastru s odrůdou Sládek. Vzhledem k tomu, že všechny ostatní vzorky se zařadily do příslušných klastrů, lze tento vzorek považovat za nestandardní (chyba mohla nastat například záměnou vzorku při odběru, při chemické analýze nebo při přípravě vzorku).



Obr. 4.14 Klastrová analýza. Odrůdová specifita chmele (ZPC – Žatecký poloraný červeňák, SLA- Sládek, PRE –Premiant, AGN – Agnus, KAZ – Kazbek).

5 Závěr

Cílem této práce bylo optimalizovat podmínky separace PAs ve vybraných pivovarských surovinách pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením a aplikovat tuto metodu na sledování profilu vybraných PAs (katechin, epikatechin, prokyanidin B1, B2 a B3) během pivovarského procesu. Bylo zjištěno, že jednotlivé koncentrace se během procesu mění. Koncentrace katechinu, epikatechinu, prokyanidinu B1 a B2 v mladině prudce stoupla oproti koncentraci ve sladině, z čehož vyplývá, že tyto PAs jsou při varném procesu extrahovány z použitého chmele. Naopak prokyanidin B3 pochází pouze z ječmene, neboť jeho koncentrace během varního procesu lineárně klesá. Výsledný lineární pokles všech sledovaných PAs je způsobený technologickým procesem při výrobě piva (precipitace s bílkovinami, odstraňování kalů). Dále bylo potvrzeno, že profil proanthokyanidinů je specifický pro danou odrůdu českého chmele.

Literatura

1. Haslam E.; Cai Y.; Plant Polyfenols (Vegetable Tannins): Gallic Acid Metabolism. *Natural product report*, 41-66 (1994).
2. Lazarus S.A.; Adamson G. E.; Hammerstone J. F.; Schmitz H. H.; High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spektrometry Analysis of Proanthocyanidins in Foods and Beverages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **47**, 3693-3701 (1999).
3. Es-Safi N-E.; Guyot S.; Ducrot P-H.; NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS Analysis of Pear Juice Polymeric Proanthoxyanidins with Potent Free Radical Scavenging Activity. *Journal of Argicultural and Food Chemistry* **54**, 6969-6977 (2006).
4. Prior L.R.; Gu L.; Occurrence and biological signifkance of proanthocyanidins in the America diet. *Elsevier* **66**, 2264-2280 (2005).
5. Stevens J. F.; Miranda C. L.; Wolthers K. R.; Schimerlik M.; Deinzer M. L.; Bulher D. R.; Identification and in Vitro Biological Activities of Hop Proanthocyanidins: Inhibition of nNOS Activity and Scavenging of Reactive Nitrogen Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 3435-3443 (2002).
6. Hellstrom J.K.; Mattila R.H.; HPLC Determination of Extractable and Unextractable Proanthocyanidins in Plant Materials. *Journal of Agricultrural and Food Chemistry* **56**, 7617–7624 (2008).
7. Wu X.; Gu L.; Prrior R.L.; McKay S.; Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in some cultivars of ribes, aronia, and sambucus and their antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry* **52**, 7846-7856 (2004).
8. Gu L.; Kelm M.A.; Hammerstone J.F.; Beecher G.; Holden J.; Haytowitz D.; Gebhardt S.; Prior L.; Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Destimations of Normal Consumption. *The journal of nutrition*, 613 – 617 (2003).

9. Predy V.R.; Beer and Health and Disease Prevention, Elsevier, USA, (2009).
10. Santos-Buelga C.; Scalbert A.; Review Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1094-1117 (2000).
11. Basařová G.; Šavel J.; Basař P.; Lejsek T.; *Pivovarství teorie a praxe výroby piva*. Vydavatelství VŠCHT, Praha, 863 (2010).
12. Kadlec P.; Melzoch K.; Voldřich M; *Technologie potravin. Co byste měli vědět o výrobě potravin*. KEY Publishing s.r.o., Ostrava, 536 (2009).
13. Basařová G.; Hlaváček I. Basař P.; Hlaváček J.; *České pivo (třetí, doplněné vydání)*. Havlíčkův Brain Team, Příbram, 309 (2011).
14. Li H. J.; Deinzer M. L.; Structural Identification and Distribution of Proanthocyanidins in 13 Different Hops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4048-4056 (2006).
15. Whittle N.; Eldridge H.; Bartley J.; Identification of the Polyphenols in Barley and Beer by HPLC/MS and HPLC/Electrochemical Detection. *Journal of The Institute of Brewing* **105**, 89-99 (1999).
16. Rohr G.E.; Meier B.; Sticher O.; Analysis of procyanidins. *Studies Natural Products Chemistry* **21**, 497-537 (2000).
17. Arts J.C.W.; Hollman P.C.H.; Optimization of a quantitative method for the determination of catechins in fruits and legumes. *Journal of agricultural and food chemistry* **46**, 5156-5162 (1998).
18. Alonso-Selces R.M.; Barranco A.; Corta E.; Berrueta L.A.; Gallo B.; Vicente F.; A validation solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues comparison with pressurised liquid extraction. *Talanta* **65**, 654-662 (2005).

19. Gu L.; Kelm J.F.; Hammerstone J.F.; Beecher G.; Cunningham D.; Vannozzi S.; Prior R.L.; Fractionation of Polymeric Procyanidins from Lowbush Blueberry and Quantification of Procyanidins in Selected Food with an Optimized Normal-Phase HPLC-MS Fluorescent detection method. *Journal of agricultural and food chemistry* **50**, 4852-4860 (2002).
20. Gu L.; Kelm M.A.; Hammerstone J.F.; Beecher G.; Holden J.; Haytowitz D.; G.; Prior R.L.; Screening of Food containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 7513-7521 (2003).
21. Callemien D.; Bennani M.; Counet C.; Colin S.; Whiw polyphenols are involved in aged beer astrigency? Assessmetn by HPLC and time-intensity method. *European brewery convention* **90**, 1-6 (2005).
22. EBC Analysis Committee: Analytica-EBC, Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag,Nürnberg, 2009, EBC 9.11.
23. Adamson G.E.; Lazarus S.A.; Michell E.A.; Prior R.L.; Cao G.; Jacobs P.H.; Kremers B.G.; Hammerstone J.F.; Rucker R.B.; Ritter K.A.; Schmitz H.H.; HPLC method for the quantification of proxyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry* **47**, 4184-4188 (1999).
24. Guyot S.; Marnet N.; Drilleau J.; Thiolysis-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. *Journal of agricultural and food chemistry* **49**, 14-20 (2001).
25. Yanagida A.; Kanda T.; Shoji T.; Ohnishi-Kameyama M.; Nagata T.; Fractionation of apple proxyanidins by size-exclusion chromatography. *Journal of chromatography A* **855**, 181-190 (1999).

26. Taylor A.W.; Barofsky E.; Kennedy J.A.; Deinzer M.L.; Hop (Humulus lupulus L.) Proanthocyanidins Characterized by Mass Spectrometry, Acid Catalysis, and Gel Permeation Chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 4101-4110 (2003).
27. Magalhaes P.J.; Viera J.S.; Goncalves L.M.; Pacheco J.G.; Guido L.F.; Barros A.A.; Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpolypyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1217**, 3258-3268 (2010)
28. Dvořáková M.; Moireira M.M.; Dostalek P.; Skulilová Z.; Guido L.F.; Barros A.A.; Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barely and malt by liquid chromatography–ultraviolet detection–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1189**, 398-405 (2008).
29. Li H.-J.; Deinzer M.L.; The mass spectral analysis of isolated hops A-type proanthocyanidins by eletrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry* **43**, 1353-1363 (2008).
30. Olšovská J.; Kameník Z.; Čejka P.; Juková M.; Mikyška A.; Ultra-high-perfomance liquid chromatography profiling method for chemical screening of proanthocyanidins in Czech hops. *Talanta* **116**, 919-926 (2013).
31. Lehatay J.S.; Anastassiades M.; Majers E.R.; The QuEChERS revolution, *LC-GC Europe* **23**, 418-429 (2010).
32. Díez, C., Traag, W. A., Zommer, P., Marinero, P., Atienza, J., Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and „dispersive solid-phase extraction“ method with classical multiresidue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. *Journal of Chromatography A* **1131**, 11–23 (2006).
33. Holčapek M.; Jandera P.; Spojení kapalinové chromatografie a hmotností spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy* **92**, 278-286 (1998).

34. Nováková L.; Douša M.; *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Europrint a.s. 2013. liquid chromatography–ultraviolet detection–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1189**, 398-405 (2008).
35. Van Deemterova křivka. Dostupné na WWW:<http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A016> [cit. 5.5.2015].
36. Klapková E.; Uřinová R.; Průša R.; Vliv matricových efektů při vývoji a validace metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, *Klinická biochemie a metabolismus* **19**, 5-8 (2011).
37. Henderson W.; Melndoe J.S.; *Mass Spectrometry of Inorganic Coordination and Organometallic Compounds: Tools-Techniques-Tip*. John Wiley & Sons, England, 271 (2005).
38. Makarov A.; Scigelova M.; Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **1217**, 3938-3945 (2010).
39. Michalski A.; Domac E.; Hauschild J.-P.; Lange O.; Wieghaus A.; Makarov A.; Nagaraj N.; Cox J.; Mann M.; Horning S.; Mass Spektrometry- based Proteomics Using Q-Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spektrometer. *Molecular and Cellular Proteomics* **10**, 1-11 (2011).

PŘÍLOHA

Tab. 5.1 – Sklizeň chmele 2014

| Žatecký poloraný červeňák | | | |
|---|---------------------|-------------------|------------------------------|
| Obec | Číslo vzorku | Sušina [%] | Navážka do 250 mL [g] |
| Břínkov | 1 | 89,93 | 1,11 |
| Břínkov | 2 | 90,85 | 1,10 |
| Stekník | 1 | 90,87 | 1,10 |
| Stekník | 2 | 88,92 | 1,12 |
| Soběchleby u Podbořan | 1 | 90,25 | 1,11 |
| Soběchleby u Podbořan | 2 | 89,68 | 1,12 |
| Sírem | 1 | 90,05 | 1,11 |
| Sírem | 2 | 90,85 | 1,10 |
| Mšec | 1 | 89,80 | 1,11 |
| Kněžice u Podbořan | 1 | 89,47 | 1,12 |
| Kněžice u Podbořan | 2 | 89,85 | 1,11 |
| Kounov u Rakovníka | 1 | 89,56 | 1,12 |
| Smilovice | 1 | 89,25 | 1,12 |
| Hradiště nad Ohří | 1 | 90,79 | 1,10 |
| Želeč u Žatce | 1 | 91,42 | 1,09 |
| Nesuchyně | 1 | 90,67 | 1,11 |
| Žatecký poloraný červeňák – Tršice | | | |
| Senice na Hané | 1 | 90,93 | 1,10 |
| Čechy | 1 | 89,03 | 1,12 |
| Doloplazy u Olomouce | 1 | 90,20 | 1,11 |
| Lipňany | 1 | 90,56 | 1,10 |
| Žatecký poloraný červeňák – Ústěk | | | |
| Radovesice u Libochovic | 1 | 89,88 | 1,11 |
| Brozany nad Ohří | 1 | 90,39 | 1,11 |
| Sířejovice | 1 | 89,72 | 1,11 |
| Okna u Polep | 1 | 89,04 | 1,12 |

tab 5.1 pokračuje na další straně

pokračování tab. 5.1 s předchozí strany

| Obec | Číslo vzorku | Sušina [%] | Navážka do 250 mL [g] |
|---------------------|--------------|------------|-----------------------|
| Sířejovice | 1 | 89,72 | 1,11 |
| Premiant | | | |
| Stekník | 1 | 90,72 | 1,10 |
| Tuchořice | 1 | 91,28 | 1,10 |
| Žatec | 1 | 91,41 | 1,10 |
| Sedčice | 1 | 91,46 | 1,09 |
| Hředle | 1 | 90,34 | 1,11 |
| Libochovice | 1 | 90,29 | 1,11 |
| Počedělice | 1 | 91,85 | 1,09 |
| Brozany na Ohří | 1 | 91,85 | 1,09 |
| Hněvotín | 1 | 89,89 | 1,11 |
| Prosenice | 1 | 90,38 | 1,11 |
| Agnus | | | |
| Staňkovice u Žatce | 1 | 92,55 | 1,08 |
| Trnovany u Žatce | 1 | 89,40 | 1,12 |
| Trnovany u Žatce | 2 | 91,76 | 1,09 |
| Trnovany u Žatce | 3 | 91,35 | 1,09 |
| Trnovany u Žatce | 4 | 92,32 | 1,08 |
| Stekník | 1 | 92,05 | 1,09 |
| Sládek | | | |
| Sedčice | 1 | 91,51 | 1,09 |
| Čáslav | 1 | 90,34 | 1,11 |
| Lipník nad Bečvou | 1 | 90,07 | 1,11 |
| Lipník nad Bečvou | 2 | 90,28 | 1,11 |
| Prosenice | 1 | 90,72 | 1,12 |
| Radvanice u Lipníka | 1 | 90,93 | 1,10 |
| Radvanice u Lipníka | 2 | 89,72 | 1,11 |
| Radvanice u Lipníka | 3 | 92,55 | 1,08 |
| Hradiště | 1 | 90,27 | 1,11 |
| Neprobylice | 1 | 90,07 | 1,11 |

tab. 5.1 pokračuje na další straně

pokračování tab. 5.1 z předchozí strany

| Obec | Číslo vzorku | Sušina [%] | Navážka do 250 mL [g] |
|--------------------|---------------------|-------------------|------------------------------|
| Kněžice u Podbořan | 1 | 90,74 | 1,10 |
| Kazbek | | | |
| Vrbičany | 1 | 90,51 | 1,10 |
| Vrbičany | 2 | 90,13 | 1,11 |
| Vrbičany | 3 | 90,50 | 1,10 |
| Zálužice | 1 | 89,42 | 1,12 |
| Zálužice | 2 | 90,02 | 1,11 |