

Analýza barviv ve vybraných potravinářských matricích pomocí TLC-ESI-MS analýzy

Adriana Ščurková

Bakalářská práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Adriana Ščurková**
Osobní číslo: **T12256**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Analýza barviv ve vybraných potravinářských
matricích pomocí TLC-ESI-MS analýzy**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Přírodní barviva.
2. Syntetická barviva.
3. Možnosti extrakce barviv.
4. Analytické stanovení barviv.

II. Praktická část

1. Provést extrakci barviv z vybraných potravinářských výrobků.
2. Pomocí metody TLC-ESI-MS analyzovat získané extrakty.
3. Získané výsledky vyhodnotit a interpretovat.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 1. 2. vyd. OSSIS: Tábor, 2002. 344 s. ISBN 80-86659-00-3.

[2] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 2. 2. vyd. OSSIS: Tábor, 2002. 320 s. ISBN 80-86659-01-1.

[3] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 3. 2. vyd. OSSIS: Tábor, 2002. 368 s. ISBN 80-86659-02-X.

[4] VORLOVÁ, L. Chemie potravin návody k praktickým cvičením. ES VFU Brno: Brno, 2001. 84 s. ISBN 80-7305-411-6.

[5] ŠLAMPOVÁ, A., SMĚLÁ, D., VONDRÁČKOVÁ, A., JANČAŘOVÁ, I., KUBÁŇ, V., Stanovení syntetických barviv v potravinách separačními metodami. Chemické listy. 2001, roč 95, č. 3, s. 163-168.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Michal Rouchal, Ph.D.**

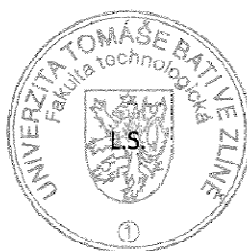
Ústav chemie

Datum zadání bakalářské práce: **2. února 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. května 2015**

Ve Zlíně dne 2. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ŠOURKOVÁ ADRIANA

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 30.4.2015

A. Šourková

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Opírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se v teoretické části zabývá obecnou charakteristikou přírodních a syntetických barviv, jejich extrakcí z přírodních materiálů a výčtem vybraných analytických metod vhodných ke stanovení barviv. Praktická část je věnována extrakci barviv z čerstvého a mraženého špenátu, jejich separaci technikou tenkovrstvé chromatografie a analýze pomocí hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací.

Klíčová slova: barvivo, extrakce, macerace, chromatografie na tenké vrstvě, hmotnostní spektrometrie, špenát

ABSTRACT

In the theoretical part of this bachelor thesis, general characterization of both natural and synthetic dyes, methods of their extraction from the natural sources and description of analytical methods commonly used for their determination, is described. The practical part of this work describes the extraction of dyes from fresh and frozen spinach, separation of extracted dyes using thin-layer chromatography and the electrospray mass spectrometry analysis of both separated dyes and obtained extracts.

Keywords: dye, extraction, maceration, thin-layer chromatography, mass spectrometry, spinach

Poděkování

Touto cestou bych velmi ráda poděkovala mému vedoucímu Ing. Michalovi Rouchalovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a ochotu v průběhu celé práce. Nejvíce bych mu však chtěla poděkovat za strávený čas při pomáhání s dokončení této práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	10
TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 BARVIVA.....	12
1.1 PŘÍRODNÍ BARVIVA.....	12
1.1.1 KAROTENOIDY	14
1.1.2 CHLOROFYLY	16
1.1.3 OSTATNÍ PŘÍRODNÍ BARVIVA.....	18
1.2 SYNTETICKÁ BARVIVA.....	19
1.2.1 AZOBARVIVA	20
1.2.2 TRIFENYLMETHANOVÁ BARVIVA	21
1.2.3 XANTHENOVA BARVIVA	21
1.2.4 INDIGOIDNÍ BARVIVA	22
2 MOŽNOSTI EXTRAKCE BARVIV	23
2.1 MACERACE.....	23
2.2 SOXHLETOVA EXTRAKCE.....	24
2.3 VYSOKOTLAKÁ EXTRAKCE	25
2.4 EXTRAKCE S VYUŽITÍM ULTRAZVUKU	25
2.5 MIKROVLNNÁ EXTRAKCE	26
2.6 EXTRAKCE NA PEVNÉ FÁZI.....	26
3 ANALYTICKÉ STANOVENÍ BARVIV	27
3.1 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	27
3.1.1 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR.....	27
3.2 CHROMATOGRRAFIE.....	28
3.2.1 CHROMATOGRRAFIE NA TENKÉ VRSTVĚ	29
3.2.2 CHROMATOGRRAFIE NA PAPIŘE.....	30
3.2.3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	31
3.3 INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE	32
3.3.1 INFRAČERVENÝ SPEKTROMETR	32
PRAKTICKÁ ČÁST	33
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
4.1 MATERIÁL	34
4.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A POUŽITÉCHEMIKÁLIE	34
4.3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	35
4.4 METODY EXTRAKCE BARVIV ZE ŠPENÁTU	35
4.4.1 EXTRAKCE NA SOXHLETOVĚ EXTRAKTORU.....	35
4.4.2 JEDNOSTUPŇOVÁ MACERACE	36
4.5 TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRRAFIE	36
4.6 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	37

4.6.1	SPECIFIKACE HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU	37
4.6.2	PARAMETRY MŠ ANALÝZ.....	37
4.6.3	PŘÍPRAVA VZORKŮ	38
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
5.1	EXTRAKCE BARVIV ZE ŠPENÁTU	39
5.2	TENKOVrstvá CHROMATOGRafIE	41
5.3	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	45
	ZÁVĚR	49
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	55
	SEZNAM OBRÁZKŮ	56
	SEZNAM TABULEK.....	57
	SEZNAM PŘÍLOH.....	58

ÚVOD

Barviva jsou rozšířenou skupinou organických, sensoricky aktivních látek, které dodávají charakteristickou barevnost potravinám či rostlinným materiálům. Podle původu se rozlišují barviva přírodní a syntetická. Přírodní barviva představují širokou skupinu látek, které se mohou členit na základě jejich chemické struktury, rozpustnosti, výskytu anebo dle biologické funkce v přírodním materiálu. Největší důraz v této práci je kladen na karotenoidní a chlorofylová barviva. Nejvýznamnějšími zástupci karotenoidních barviv jsou lykopen, β -karoten, lutein, violaxanthin, neoxanthin, mutatoxanthin; z chlorofylových barviv jsou nejvýznamnější dva typy - chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. Pro potravinářské účely se využívají taková syntetická barviva, která jsou rozpustná ve vodě, a to proto, aby nedocházelo k jejich hromadění v těle a mohly být metabolizovány v játrech s následným vyloučením močí.

Tato bakalářská práce je rozdělena na dvě části – teoretickou a praktickou. Teoretická část práce je věnována charakteristice přírodních barviv vyskytujících se v přirozených materiálech a syntetických barviv, která se nejvíce uplatňují při technologické výrobě potravin. Pro analytické stanovení barviv je nejprve nezbytné je vyextrahovat z daného materiálu. K tomu se využívá extrakčních a maceračních technik. Takto vyextrahovaná barviva mohou být izolována a charakterizována pomocí chromatografie nebo za použití metody hmotnostní či infračervené spektrometrie, o kterých taktéž pojednává tato práce.

V praktické části byly podrobeny kvalitativní analýze listy špenátu setého, které jsou bohaté na karotenoidní a chlorofylová barviva. V rámci této práce byly studovány dva typy vzorků, kdy prvním byly listy čerstvého špenátu, a druhým vzorkem byl mražený špenátový protlak. Cílem práce bylo extrahovat barviva jak na Soxhletově extraktoru, tak i jednostupňovou macerací za použití vhodného rozpouštědla. Po získání jednotlivých extraktů následovala izolace barviv pomocí tenkovrstvé chromatografie, a na základě rychlosti interakcí mezi kapalným vzorkem a mobilní fází byly zjištěny retardační faktory pro jednotlivé barevné skvrny. S využitím hmotnostního spektrometru s elektrosprejovou ionizací byla provedena analýza barviv špenátových extraktů, kdy výstupem měření byl graf závislosti intenzity proudu iontů na hodnotách m/z , nazývaný hmotnostní spektrum. V diskuzi jsou podrobně popsány výsledky jednotlivých měření s důrazem na popis odlišností pozorovaných u čerstvého špenátu a mraženého špenátového protlaku.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BARVIVA

Barviva jsou organické sloučeniny, jež mají takovou molekulární strukturu, která umožňuje absorpci světla ve viditelné části spektra a zároveň umožňuje fyzikální nebo chemickou vazbu s vybarvovaným substrátem. Barviva jsou významnou skupinou sensoricky aktivních látek potravin, které určují jejich charakteristickou barvu. [1,2]

Barevnost je dána rozsáhlým konjugovaným systémem dvojných vazeb v molekule barviva. Nositelem barevnosti jsou skupiny obsahující dvojně vazby, tzv. chromofory (skupina azo-, nitro-, nitroso- či karbonylová). Sloučenina nesoucí chromofory se nazývá chromogen. Auxochromy (skupina hydroxy-, amino-, alkylamino-), jsou látky, které udávají intenzitu zbarvení a afinitu k substrátu. [2]

Podle původu jsou barviva dělena na 3 skupiny:

- přírodní (přírozená) barviva
- syntetická barviva identická s přírodními
- syntetická barviva. [1]

Přírozená barviva se klasifikují podle chemické povahy, výskytu v biologických materiálech nebo rozpustnosti. Syntetická barviva jsou členěna taktéž podle chemické povahy, rozpustnosti, ale i z hlediska fyzikálně-chemických vlastností. [1,3]

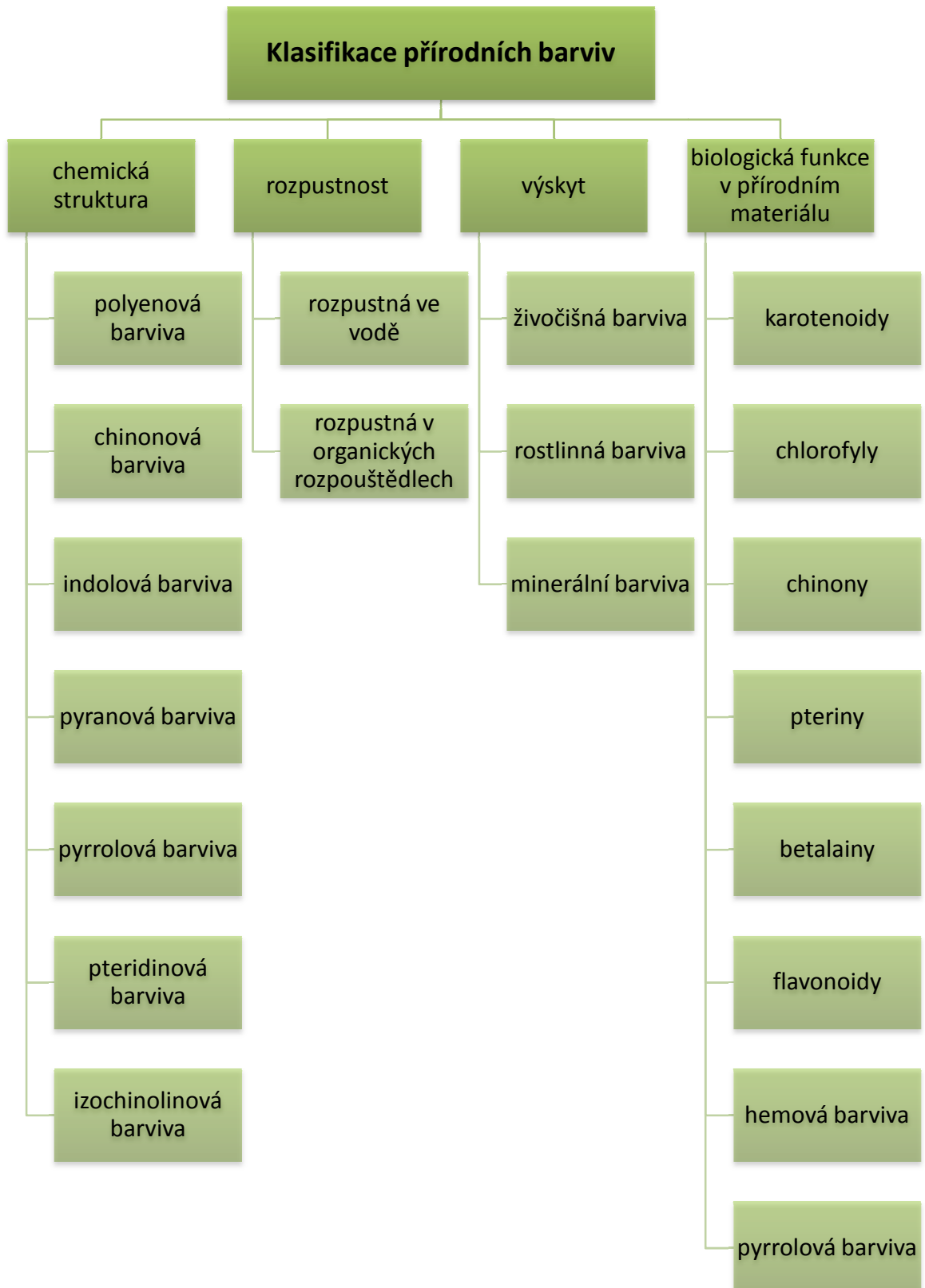
Syntetická barviva identická s přírodními jsou sice získávána chemickými reakcemi, ale jejich struktura je totožná se strukturou barviv přírodních. Typickým příkladem mohou být syntetický β -karoten a riboflamin, které zároveň plní funkci vitaminů. [1]

1.1 Přírodní barviva

Přírodní barviva jsou barevné látky, které jsou přirozenou součástí jednak potravin živočišného nebo rostlinného původu, jednak jiných než potravinářských materiálů přírodního původu, ze kterých se získávají v původním stavu nebo strukturně pozměněném.

Do přírodních barviv se taktéž řadí nejen barevné produkty získávané z přírodních surovin různými technologickými procesy, ale i měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofyllinů, které se v přírodě příliš nevyskytují, či anorganické pigmenty, jež mohou být využívány i v potravinářství. [1]

Klasifikace přírodních barviv je schematicky znázorněna na Obrázku 1.



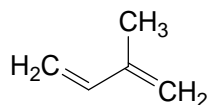
Obrázek 1. Schéma rozdělení přírodních barviv. [2,4,5]

Následující část této kapitoly bude zaměřena na barviva, která se vyskytují v listovém špenátu (β -karoten, lutein, violaxanthin, neoxanthin, mutatoxanthin, chlorofyl *a*, chlorofyl *b*), poté budou stručně popsána ostatní přírodní barviva.

1.1.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou přírodní barviva, která jsou syntetizována jak rostlinami, tak mikroorganismy. Karotenoidní barviva tvoří soubor žlutých, oranžových, červených a fialových pigmentů. Jsou to zejména β -karoten, který bývá často doprovázen α -karotenem, luteinem, violaxanthinem a neoxanthinem. Karotenoidy jsou vázány s chlorofyly v chloroplastech. Mají funkci provitaminu A, tudíž jsou fyziologicky významné. [3,4,6]

Karotenoidy jsou látky nerozpustné ve vodě, avšak v organických nepolárních rozpouštědlech jsou relativně snadno rozpustné. Dle chemické struktury jsou řazeny mezi nenasycená polyenová barviva, která jsou složena z různého množství isoprenových jednotek. [4] Strukturní vzorec isoprenu, jehož systematický název je 2-methyl-buta-1,3-dien je znázorněn na Obrázku 2.



Obrázek 2. Strukturní vzorec isoprenu.

Struktura každého karotenoidu určuje jak jeho barvu, tak fotochemické vlastnosti jeho molekuly. Polyenová struktura karotenoidů jim dodává barevnost. V přirozených systémech se tato barviva nejčastěji vyskytují v takzvané *all-trans*-konfiguraci, což znamená, že všechny dvojné vazby mají konfiguraci *trans*. [4,6]

Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny:

- karoteny
- xanthofyly

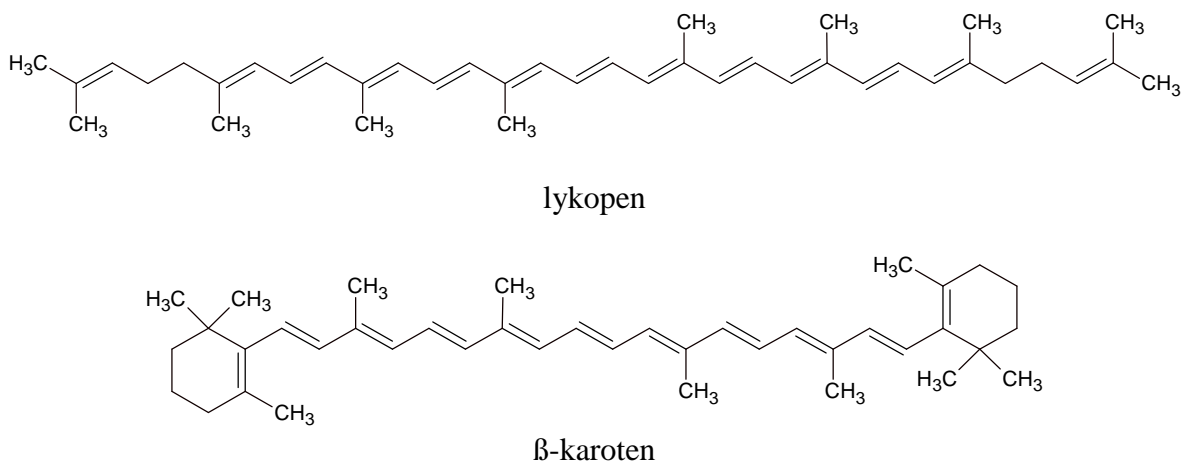
Podle uhlovodíkové struktury molekuly lze také karotenoidy rozdělit na:

- karotenoidy s acyklickou strukturou (např. lykopen)
- karotenoidy s monocyklickou strukturou (např. γ -karoten, δ -karoten)
- karotenoidy s bicyklickou strukturou (např. α -karoten, β -karoten, lutein)

Mezi nejvýznamnější karoteny patří lykopen (Obrázek 3), který dodává rostlinným plodům červenou barvu. Vyskytuje se například v rajčatech, červeném rybízu, vodním melounu nebo v růžovém grapefruitu. Jeho izomerací a cyklizací pomocí enzymatické katalýzy vznikají γ -, α -, β -karoten. [4]

β -Karoten (Obrázek 3) je významný svými antioxidačními účinky. Díky systému dvojných vazeb ve svém řetězci dokáže výborně pohlcovat volné radikály. Prokázán byl rovněž inhibiční vliv β -karotenu na peroxidaci lipidů. [7,8] Jeho další unikátní schopností je to, že chrání lidskou kůži před vysokou intenzitou slunečního záření a UV zářením, které může vést k poškození kůže, ba dokonce může být příčinou vzniku rakoviny kůže. [6]

β -karoteny mají největší zastoupení v meruňkách, mangu, mrkvi, špenátu či paprice. Taktéž patří k významným potravinářským barvivům. [1,6]



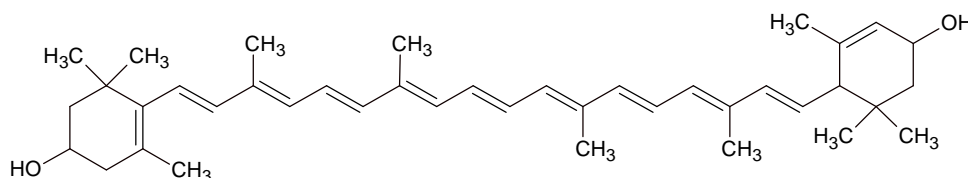
Obrázek 3. Strukturní vzorec lykopenu a β -karotenu.

Xanthofyly jsou kyslíkaté deriváty odvozené od karotenů. Primárně vznikají jako produkty chemické oxidace karotenů. Vyskytují se jako volné látky, glykosidy nebo také jako estery mastných kyselin. Hlavní mastnou kyselinou ve žlutých xantofylech je kyselina linolová, miristová a palmitová. V červených xantofylech je vázaná především laurová, miristová a palmitová kyselina. [1,6]

Lutein, jehož strukturní vzorec je znázorněn na Obrázku 4, je žluté rostlinné barvivo. Vyskytuje se ve vaječném žloutku, v ovoci a zelenině, zejména v té listové, ale také v očních tkáních. Toto barvivo se v těle člověka nemění na vitamin A, ale je velmi účinným antioxidantem. Důležitou roli hraje v ochraně očí, protože dokáže neutralizovat volné radikály, které vznikají působením UV paprsků na oční sítnici. Dále má vliv na správnou funkčnost imunitního systému, chrání proti nemocem srdce a rakovině.

V rostlinných materiálech se lutein vyskytuje ve dvou formách:

- ve formě volného luteinu – nejvíce v listové zelenině, např. špenátu, kapustě, brokolici;
- ve formě esteru mastných kyselin – z ovoce je to např. mango, pomeranč či papája, ze zeleniny pak červená a zelená paprika nebo kukuřice. [6,9]



Obrázek 4. Strukturní vzorec luteinu.

Oxidací na obou koncích molekuly antheraxanthinu a taraxanthinu vzniká violaxanthin, který je dalším oranžovým barvivem obsaženým ve špenátu. Neoxanthin, neboli taktéž foliixanthin se nejvíce vyskytuje ve vyšších rostlinách. Je uložen v membráně chloroplastu. Mutatoxanthin vzniká izomerací antheraxanthinu a taraxanthinu. [10]

1.1.2 Chlorofyly

Chlorofyly jsou skupinou zelených pigmentů, které se vyskytují v pletivech zelených rostlin. Nachází se nejen téměř u všech vyšších rostlin, mechů, řas, ale také v některých bakteriích jako tzv. bakteriochlorofyly. V živých buňkách jsou chlorofyly umístěny v chloroplastech, jež mají významnou úlohu při fotosyntetické asimilaci oxidu uhličitého. [4,10]

Chlorofylové pigmenty existují ve dvou formách známých jako:

- chlorofyl *a*
- chlorofyl *b*

Rozdíl mezi nimi je v barevnosti a v chemické struktuře (Příloha PI). Chlorofyl *a* je modrozelené barvy a na druhém pyrrolovém kruhu obsahuje methylovou skupinu. Chlorofyl *b* je naopak žlutozelený a na pyrrolovém jádře má aldehydickou skupinu. [4]

Molekula chlorofylu obsahuje protoporfyrin s vázaným atomem hořčíku. Tato vazba není příliš pevná. Atom hořčíku lze snadno nahradit jinými kovy nebo atomem vodíku. Tento jev nastává při záhřevu v kyselém prostředí, kdy se velmi rychle uvolňuje hořčík a je nahrazován vodíkem. To potom způsobuje ztrátu sytě zelené barvy na olivově žlutou za vzniku feofytinu. [3,4]

Reakce, při které dochází ke vzniku feofytinu se nazývá feofytinace. Rychlost tvorby feofytinu závisí především na pH prostředí a teplotě. Značná stálost chlorofylu v rostlinných tkáních je dána vazbou chlorofylu na lipoproteiny, které mají schopnost chránit před feofytinací. Během technologických operací při působení vyšších teplot lipoprotein denaturuje, dojde k uvolnění volného chlorofylu, který se s přítomnými organickými kyselinami rychle mění na feofytin. Působením silných kyselin se hydrolyzuje fytol a z feofytinů vznikají feoforbidy. Enzym chlorofyláza štěpí fytolové řetězce za tvorby chlorofylidů. [4,10]

Chlorofyly se vyskytují v přírodě téměř v neomezeném množství a jsou prakticky jediným přírodním zeleným pigmentem. Široké uplatnění nachází zejména jako potravinářská barviva. Pro tyto účely se nejčasteji chlorofylová barviva získávají z rostlin rostoucích na souši (kopřivy, vojtěška, špenát a mnoha dalších). [2]

Chlorofyl je nedílnou součástí naší stravy. Buď je přijímán v podobě zeleninových salátů, nebo může být součástí potravinářských barviv. Významné jsou jeho účinky na zdravotní stav. Doporučuje se při anémii, snižuje hladinu cholesterolu v krvi, podporuje růst tkání a její hojení, příznivě ovlivňuje peristaltiku střev a zpomaluje oxidaci buněk. Denní doporučená dávka činí 10 mg/den. [11]

1.1.3 Ostatní přírodní barviva

Chinoidní barviva představují skupinu cca 200 žlutých, červených, hnědých až téměř černých barviv s různou chemickou strukturou. Z chinonů vyskytujících se v přírodě jsou nejrozšířenější barviva, která jsou odvozena od 1,4-benzochinonu, 1,4-naftochinonu a anthrachinonu (Obrázek 5).



Obrázek 5. Strukturální vzorce vybraných sloučenin s chinonovým skeletem.

Od 1,4-benzochinonu je odvozena spousta barviv přítomných v mikroorganizmech, v menší míře v rostlinných tkáních. Rovněž jsou od 1,4-benzochinonu odvozeny ubiquinony. Tato žlutá až oranžová barviva se podílejí na dýchacích procesech v mitochondriích. Chinoidní barviva se mohou nacházet v různých částech vyšších rostlin, lišejnících, řasách, houbách, bakteriích či v určitých druzích hmyzu. [1,4]

Pteriny jsou dalšími přírodními barvivy, které jsou odvozeny od pteridinu. V jejich molekule se vyskytuje aminová nebo hydroxylová skupina. Nejvýznamnějším zástupcem pterinových barviv je xanthopterin, který je přítomný v játrech a ledvinách a je vylučován močí. Jedná se o žlutý pigment, který se v potravinářství neuplatňuje. [4]

Betalainy jsou významným potravinářským barvivem, vyskytujícím se v červené řepě. Jedná se o dusíkaté látky, které jsou rozpustné ve vodě a jsou zodpovědné za červené, oranžové a žluté zbarvení. [12]

Flavonoidy jsou velice rozsáhlou skupinou barevných rostlinných látek, které ve své molekule obsahují dva benzenové kruhy. V přírodě se vyskytují jak ve volné formě, tak glykosidicky vázané. Nejvýznamnější skupinou flavonoidních látek jsou anthokyany. Anthokyany představují skupinu ve vodě rozpustných přírodních barviv, která jsou zodpovědná za červené, fialové až modré zbarvení květů, plodů a jiných částí rostlin či obilovin. Molekula anthokyanů se skládá z necukerné části (aglykonu) a jednoho nebo více cukerných zbytků. Cukernou složku těchto glykosidů tvoří především glukóza, galaktóza,

rhammóza, arabinóza a xylóza. V buňkách se anthokyany vyskytují ve vakuolách a každý rostlinný druh obsahuje charakteristická anthokyanová barviva. [4,13,14]

Pyrrolová barviva se vyskytují u mikroorganismů, rostlin a živočichů. Představují sice malou, avšak velice významnou a rozšířenou skupinu různobarevných barviv. Základem jejich chemické struktury je pyrrolové jádro a podle jeho počtu se dělí na dipyrroly, tripyrroly a tetrapyrroly. Z potravinářského hlediska jsou nejvýznamnější tetrapyrroly. [2,4]

Poslední skupinou přírodních barviv jsou takzvaná hemová barviva, mezi která patří hemoglobin a myoglobin. Hemoglobin je barvivo červených krvinek, myoglobin zase tmavě červené barvivo svalové tkáně. Molekula obou barviv je tvořena protoporfyrinovým komplexem s dvojmocným atomem železa, tzv. hem, který je vázaný na bílkovinu globin. Chemická struktura myoglobinu je tvořena jedním peptidovým řetězcem, na němž je navázána jedna hemová skupina. Oproti tomu chemická struktura hemoglobinu je složena ze čtyř peptidových řetězců, z nichž má každý svoji vlastní hemovou skupinu. V roce 1959 se podařilo britskému biologovi jménem Max Ferdinand Perutz rozluštit strukturu hemoglobinu pomocí metod rentgenové krystalografie. Spolu s Johnem Kendrewem získal v roce 1962 Nobelovu cenu za chemii za výzkum v oblasti stanovení struktury globulárních bílkovin. [4,15,16]

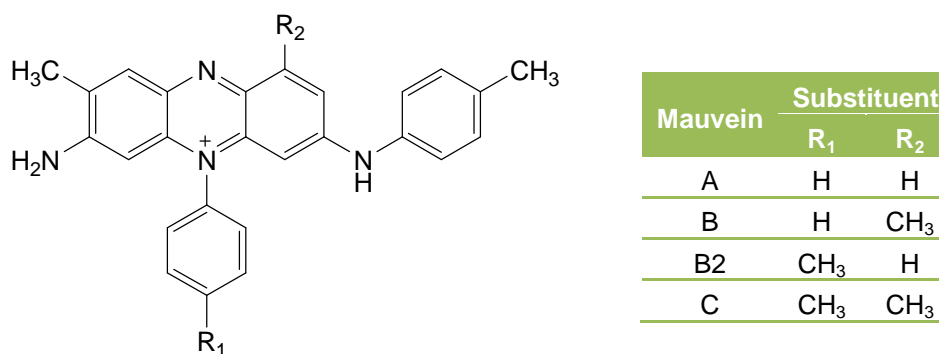
1.2 Syntetická barviva

Průmyslově vyráběné barevné sloučeniny, které se syntetizují z velkého množství prekurzorů, založených na produktech zpracování ropy a dehtu se nazývají syntetická barviva.

Dle chemické struktury jsou syntetická potravinářská barviva rozdělována do několika skupin. Jedná se o azobarviva mono- i poly- funkční, di- a trifenylnmethanová barviva, nitrobarviva, pyrazonová, xanthenová, antrachinonová, chinolinová a indigoidní barviva. Dalším způsobem klasifikace je členění dle rozpustnosti ve vodě a jejich acidobazické povahy.

Syntetická barviva kyselé povahy jsou většinou ve vodě rozpustná. Ve své molekule obsahují jednu nebo více sulfonových skupin a jsou využívána ve formě sodných solí, které jsou velmi dobře rozpustné ve vodě. Zásaditá barviva mají ve své molekule přítomnu jednu nebo více volných, či substituovaných aminoskupin. [1]

Roku 1856 se podařilo anglickému chemikovi W. H. Perkinsovi, kterému bylo v té době pouhých 18 let, připravit první syntetické barvivo. Toto barvivo nese název mauvein a má fialové zbarvení. Podle počtu a umístění methylových skupin se rozlišují čtyři typy mauveinu. Mauvein A, B, B2 a mauvein C, jejichž chemická struktura je znázorněna na Obrázku 6. [17]



Obrázek 6. Strukturní vzorec mauveinu.

1.2.1 Azobarviva

Azobarviva jsou látky, které se vyznačují přítomností jedné nebo několika azoskupin v molekule. Azoskupina se skládá ze dvou atomů dusíku spojených dvojnou vazbou a může na sebe vázat různé, hlavně aromatické radikály. Intenzivního zbarvení nabývají látky obsahující azoskupinu tehdy, když do jejich molekuly vstoupí i auxochromy (skupina hydroxy-, amino-, alkylamino-).

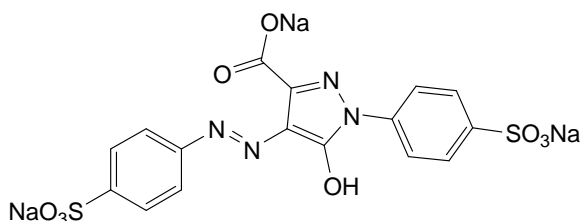
Základní metoda přípravy azobarviv je založena na diazotaci primárních aromatických aminů a následné reakci získaných diazosloučenin s aromatickými hydroxyderiváty nebo aminoderiváty.

V dnešní době azobarviva slouží k vybarvování všech druhů vláken i tkanin, k barvení kaučuku i plastických hmot, k přípravě laků, malířských a polygrafických barev, inkoustů, k barvení potravin a k mnoha jiným účelům. [18]

Významnou vlastností azobarviv je jejich široké spektrum využití. Používání těchto látek je nedílnou součástí většiny výrobních procesů, neboť jsou k dispozici téměř ve všech barvách. Jsou stálobarevné, tudíž mohou být strukturně upraveny tak, aby se mohly použít jak na přírodní, tak syntetická vlákna, nebo jako barvicí složka potravin. [17]

Významným potravinářským azobarvivem je tantrazin (Obrázek 7). Jedná se o žluté barvivo, které se uplatňuje zejména v ovocných šťávách, konzervovaném ovoci i zelenině,

cukrovinkách a zmrzlíně. Dále se používá při barvení krmiv pro zvířata nebo medicínských přípravků. V posledních letech je snaha omezit toto potravinářské barvivo, neboť má negativní vedlejší účinky na zdraví. Může způsobovat hyperaktivitu u dětí, astma, kopřivku či jiné alergické reakce. [19]



Obrázek 7. Strukturní vzorec tantrazínu.

Mezi další potravinářská azobarviva patří například žluť SY, azorubin, amarant, ponceau 4R, červěň 2G, červeň Allura AC, černě BN, hněď FK, hněď HT litolrubin BK. S těmito potravinářskými barvivy jsou často spojovány různé nežádoucí účinky – reakce připomínající alergie, astmatické záchvaty či hyperaktivita u dětí. [20,21]

1.2.2 Trifenylmethanová barviva

Trifenylmethan patří do skupiny triarylmethanových barviv, které mají zelené až zelenomodré zbarvení. Patří sem například patentní modř V, brilantní modř a zeleň S.

Patentní modř V, je modro-zelené barvivo využívané při výrobě cukrovinek, nealkoholických nápojů, mražených dezertů, krémů či krmiv pro zvířata.

Brilantní modř je zeleno-modré barvivo, které se může nacházet v cukrovinkách, mražených dezertech a krémech, v některých mléčných výrobcích a nápojích. Může být využito i v kosmetickém průmyslu při výrobě barev na vlasy, deodorantů či zubních past.

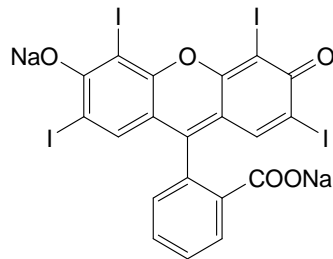
Zeleň S je zelené barvivo, které se přidává do cukrovinek, dezertů, zmrzlín, konzervovaného hrášku. U limonád a cukrovinek dodává subjektivní pocit sladší chuti. Může způsobovat hyperaktivitu u dětí, astma, kopřivku nebo nespavost. Toto syntetické barvivo je zakázáno v Kanadě, Finsku, Japonsku, Norsku, Švédsku a v USA. [22,23]

1.2.3 Xanthenová barviva

Známým potravinářským xanthenovým barvivem je erythrosin, jehož barvy se pohybují od zeleno-žluté přes červenou až po fialovou. Největší uplatnění nachází při výrobě konzervovaných třešní, džemů, zmrzlín, cukrovinek či při dobarvení pistáciových oříšků.

V ostatních průmyslových odvětvích se využívá do tiskových inkoustů, při barvení papírů, kůže, dřeva a kosmetiky.

Erythrosin je disodná sůl 2,4,5,7-tetraiodfluoresceinu (Obrázek 8) a jako vedlejší účinky se mu připisují astma, horečky, hyperaktivita u dětí či porucha soustředěnosti. Může postihovat játra, srdce, rozmnožovací orgány, štítnou žlázu a žaludek. [24]



Obrázek 8. Strukturní vzorec erythrosinu.

1.2.4 Indigoidní barviva

Indigotin je tmavě modré barvivo, které se původně izolovalo z asijské rostliny indigovníku a používalo se k barvení džínového oblečení. Nyní je získáváno synteticky a využívá se při výrobě nealkoholických nápojů, cukrovinek, mražených krémů a kosmetiky. Může způsobovat nevolnost, zvracení, vyšší krevní tlak či jiné alergické reakce. [25]

2 MOŽNOSTI EXTRAKCE BARVIV

Extrakce je dělicí metoda, při níž se využívá rozpustnost jednotlivých složek vzorku v různých rozpouštědlech. Jedná se tedy o proces, při kterém jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné fáze. Cílem této metody je selektivní až specifické oddělení látek od ostatních složek nebo oddělení rušící látky od analytu. [26]

Klasifikace extrakce:

- dle přítomných fází:
 - plyn – kapalina
 - kapalina – kapalina
 - tuhá fáze – kapalina
- dle způsobu provedení
 - jednostupňová
 - dvoustupňová
 - kontinuální
- dle charakteru extrahovaných látek
 - extrakce organických látek
 - extrakce kovových chelátů
 - extrakce iontových asociátů

Proces extrakce zpravidla zahrnuje tři po sobě jdoucí kroky, a to:

- úpravu vzorku – vytvoření extrahovatelné formy sledované látky
- vlastní extrakci – ustavení rozdělovací rovnováhy
- izolaci stanovované látky z organické fáze. [27]

2.1 Macerace

Macerace je nejjednodušší způsob extrakce metodou separace z tuhé fáze do kapaliny. Princip spočívá v tom, že daný vzorek se přelije specifickým rozpouštědlem tak, aby byl zcela ponořen, a ponechá se stanovenou dobu za občasného promíchání vyluhovat. Doba výluhu může trvat několik minut až dní. Pokud se objem rozpouštědla po celou dobu výluhu nemění, jedná se o jednostupňovou maceraci. Když však dochází k pravidelnému obměňování rozpouštědla, označuje se tato macerace jako vícestupňová.

Po uplynutí doby extrakce se vzniklý výluh dekantuje a filtruje. Tímto procesem se získávají vodné či ethanolicke výluhy. Výtěžnost macerace závisí na udržení koncentračního spádu mezi tuhous látkou a rozpouštědlem. Rychlost extrakce postupně klesá, pokud se koncentrace vyluhované látky v daném rozpouštědle zvyšuje. Tuto metodu lze praktikovat při laboratorní či za zvýšené teplotě. Zahřátím roztoku se sice zvýší rychlost extrakce, ale může také dojít k rozkladu termolabilních látek.

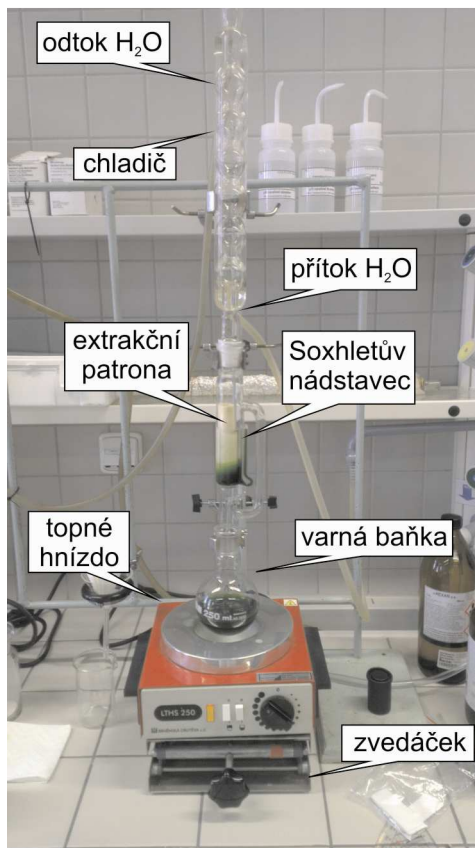
Pokud je cílem získat nálev, je třeba přelít vzorek vroucím rozpouštědlem a nechat vyluhovat danou dobu. Nebo je také možné vytvořit odvary, které jsou specifické tím, že se vzorek s rozpouštědlem nejprve povaří a následně se ještě nechá vyluhovat za postupného chladnutí. [28]

2.2 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce se řadí mezi extrakci tuhé látky kapalinou, která se nejčastěji používá k izolaci jedné nebo více složek z přírodního materiálu. Při extrakci se volí takové rozpouštědlo, aby se v něm co nejselektivněji rozpustila pouze složka, která má být izolována. Materiál, z něhož je složka extrahována se musí obvykle rozmělnit.

V roce 1879 sestrojil Prof. Dr. Franz Ritter von Soxhlet extrakční přístroj, který je dnes po něm pojmenován. Princip Soxhletovy extrakce spočívá v tom, že při extrakci v extraktoru dochází k izolaci analytu z tuhého vzorku.

Aparatura Soxhletova extraktoru (Obrázek 9) se skládá z varné baňky, extrakčního nástavce a chladiče. Extrahovaný vzorek je rozmělněn, vložen do patrony a uzavřen vatou. Extrakční patrona může být buď skleněná, nebo papírová. Rozdíl mezi nimi je v pořizovací ceně a možnosti opakované použitelnosti. Rozpouštědlo ve varné baňce se přivede k mírnému varu, jeho páry následně stoupají postranní trubicí do zpětného chladiče, kde kondenzují, a kondenzát kape na patronu ve střední části extraktoru. Po naplnění střední části extraktoru dojde pomocí přepadové trubice k vypuštění extraktu do varné baňky a celý proces se tak opakuje. Izolovaná látka musí být stabilní při teplotě varu rozpouštědla. Proto je výhodné, má-li použité rozpouštědlo nízký bod varu, aby jej bylo možno odstranit destilací od izolované složky, aniž by došlo k jejím ztrátám těkáním. Jako rozpouštědlo může být použit hexan, aceton, petrolether, nebo směs hexan-aceton. [29,30]



Obrázek 9. Aparatura pro Soxhletovu extrakci.

2.3 Vysokotlaká extrakce

Jedná se o techniku založenou na principu extrakce tuhé látky kapalinou. Jak už vyplývá z názvu, tato metoda se provádí za zvýšeného tlaku (10 – 15 MPa) a při teplotě 50 – 200 °C, což vede ke zkrácení doby extrakce a zvýšení extrakční účinnosti. Tlak je zvolen takový, aby bylo rozpouštědlo udržováno v kapalném stavu při vysoké teplotě, což způsobí nízkou viskozitu rozpouštědla a zvýší rozpouštěcí schopnost, tudíž dochází k lepšímu efektu extrakce.

Výhodou vysokotlaké extrakce je snížení množství používaných organických rozpouštědel a časová nenáročnost. [31]

2.4 Extrakce s využitím ultrazvuku

Tato extrakční metoda se provádí v ultrazvukové lázni, nebo pomocí ultrazvukové sondy. Pevný vzorek, který se musí rozmělnit se smíchá s vhodným rozpouštědlem a vytvoří se směs připravená k extrakci. Vlivem ultrazvuku následně dochází k rozpadu takto připravené směsi. Pomocí sondy lze nastavit dobu, teplotu extrakce a intenzitu

energie. Látky přechází do rozpouštědla a pro oddělení od extraktu se využívá filtrace. Získaný extrakt se poté zakoncentruje odpařením rozpouštědla.

Metoda je poměrně rychlá, jednoduchá a levná. Díky ultrazvukové sondě dochází ke snížení provozní teploty, tudíž lze extrahovat i některé termolabilní sloučeniny. [30]

2.5 Mikrovlnná extrakce

Při této extrakční technice se využívá mikrovlnného záření, které proniká do materiálu a spolu s polárními molekulami rozpouštědla dochází k tvorbě tepla a celý vzorek je stejnoměrně zahříván. U mikrovlnné extrakce se používají pouze polární rozpouštědla, neboť ty nepolární nejsou mikrovlnami ovlivňovány. Tato technika se využívá při zvýšení efektivity klasické extrakce u tuhých vzorků. Z důvodu vyvíjení vysoké teploty je třeba tuto metodu aplikovat u termostabilních sloučenin.

Výhodou této metody oproti klasické Soxhletově extrakci je nejen významně krátká doba extrakce (do 30 minut), ale i nižší spotřeba organického rozpouštědla. [30]

2.6 Extrakce na pevné fázi

Mechanismus této extrakční metody spočívá v zachycení molekul látky, které ulpívají na pevném sorbentu vlivem mezimolekulových interakcí. Při extrakci z kapaliny na tuhou fázi je velký objem kapalného vzorku proléván kolonkou, která je naplněna pevným absorbentem. Ten na svém povrchu zachycuje a zakoncentrovává příslušný analyt. Následně se kolonka promyje vhodným činidlem o malém objemu, který uvolní daný analyt z pevného absorbentu a dojde k jeho vymytí do čisté zkumavky o malém objemu onoho činidla. Nežádoucí příměsi mohou být z kolonky selektivně odstraněny promytím správně zvolenými rozpouštědly. Výstupem je tedy separovaný a purifikovaný analyt, který byl z velkého objemu kapalného vzorku redukován do malého objemu vymývacího činidla. Takto připravený vzorek je následně podroben analytickým metodám.

Sorbent může být tvořen polární stacionární fází, což je například nemodifikovaný silikagel nebo alumina, nebo nepolární stacionární fází modifikovaným silikagelem. Výhodou této metody je nejen krátká doba experimentu, ale i malá spotřeba použitých rozpouštědel. [32]

3 ANALYTICKÉ STANOVENÍ BARVIV

3.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická, fyzikálně-chemická metoda sloužící k určování hmotností atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné nebo záporné ionty. Dále tato metoda slouží k identifikaci neznámých sloučenin, kvantifikaci známých sloučenin, objasňování struktury iontů v plynné fázi a ke stanovení fyzikálních a chemických vlastností iontů a molekul. Pokud je vzorek ve složité matici a využije se hmotnostní spektrometrie se separačními metodami, může se tak zvýšit selektivita a přesnější identifikace vzorku. [33,34]

Principem hmotnostní spektrometrie je separace molekulových iontů a fragmentů analyzované látky, které vznikly ionizací molekul nevratným odštěpením valenčních elektronů v magnetickém poli. Pro tuto separaci je rozhodující veličinou efektivní hmotnost ionizované částice označována jako m/z , kde m je hmotnost iontu, z je velikost náboje. Analyzovaný vzorek se vystaví vlivu iontového zdroje, v němž vzniknou molekulové ionty. Proud iontů se vlivem silného elektrického pole urychlí a je dále veden jako tenký svazek letících částic do homogenního magnetického pole. V něm dochází k rozlišení jednotlivých částic podle svých efektivních hmotností a dochází k zakřivení jejich drah podle hodnot m/z . Částice stejných efektivních hmotností vychází z magnetického pole jako svazky zaostřené na stejné místo detektoru. Intenzita signálu je úměrná počtu dopadených částic. Výstupem je potom hmotnostní spektrum, což je graf závislosti intenzity proudu iontů na hodnotách m/z . [26]

3.1.1 Hmotnostní spektrometr

Historie spektrometrů se píše již od roku 1910, kdy se využíval parabolový spektrograf od J. J. Thompsona. Následovaly dokonalejší přístroje, které už umožnily přesněji stanovit měrný náboj, nebo zastoupení iontů s odlišným měrným nábojem.

Nyní se v analytické chemii využívají hmotnostní spektrometry, které umožňují přímou detekcí iontových proudů měřit či registrovat zastoupení jednotlivých rozlišených iontových druhů s velkou přesností nebo rychlostí, a to i při velmi malém relativním zastoupení jednotlivých druhů iontů. [35]

Základními stavebními prvky všech hmotnostních spektrometrů jsou:

- *vstupní systém* – umožňuje převedení vzorku analyzované látky z prostředí vnějšího do prostoru iontového zdroje
- *iontový zdroj* – slouží k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu, kdy v prostoru iontového zdroje může docházet i k reakcím vedoucích k destrukci chemických vazeb vzniklého iontu
- *hmotnostní analyzátor* – má funkci jako disperzní prvek a umožňuje rozdělit v prostoru nebo čase směs iontů o různých poměrech hmotnosti ku náboji (m/z), produkovanou v iontovém zdroji
- *detektor* – na něj je směřován proud iontů po průchodu hmotnostním analyzátozem, poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů
- *počítač* – signál z detektoru je po digitalizaci převeden do počítače a vhodným programovým vybavením je zpracován do formy hmotnostních spekter. [34]

3.2 Chromatografie

Chromatografie je vysoce účinná analytická separační metoda, sloužící k dělení směsi, identifikaci a stanovení velkého počtu organických i anorganických látek. Pod chromatografické metody se zahrnují všechny operace, které jsou založeny na různých fyzikálně-chemických principech, při kterých dochází k postupnému, mnohonásobně opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma fázemi. Za objevitele chromatografie je považován ruský botanik Michail Semjonovič Cvět. [26]

Chromatografické dělení směsi lze uskutečnit jak v plynné, tak v kapalně fázi. Princip metody je založen na vnesení vhodného množství dělené směsi látek do chromatografické kolony, kterou tvoří sloupec účinné látky velkého povrchu. Tato látka tvoří tzv. nepohyblivou (stacionární) fázi, jež má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti dělené směsi. Do kolony se pak přivádí určitou rychlostí další kapalná nebo plynná fáze, tzv. pohyblivá (mobilní) fáze, která vymývá (eluuje) jednotlivé součásti směsi z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku. Po projití dostatečného množství rozpouštědla dojde k oddělení jednotlivých látek. Takto izolované složky se pak identifikují.

Chromatografické metody lze klasifikovat podle skupenství fází, tedy na plyn-kapalina, plyn-pevná látka, kapalina-kapalina a kapalina-pevná látka. Další rozdělení je podle

povahy separačních sil, které se dále dělí na čtyři hlavní typy chromatografie – adsorpční, rozdělovací, výměnná a chromatografie na molekulových sítích. [35,36]

V Tabulce 1 jsou znázorněny chromatografické metody.

Tabulka 1. Přehled chromatografických metod. [26]

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Separační mechanismus a funkce	Chromatografická technika
plyn	kapalina	rozdělování, rozdělovací rovnováha	plynová rozdělovací chromatografie (GLC)
	pevná látka	adsorpce, adsorbční izoterma	plynová adsorpční chromatografie (GSC)
		sítový efekt	plynová chromatografie na molekulových sítích
kapalina	kapalina	rozdělování, rozdělovací rovnováha	kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)
		sítový efekt	gelová permeační chromatografie (GPC)
	pevná látka	adsorpce, adsorpční izoterma	kapalinová adsorpční (LSC) chromatografie
			tenkovrstvá chromatografie (TLC)
		iontová výměna, výměnná rovnováha	iontově výměnná chromatografie (IEC)
		biospecifická chemická reakce	afinitní chromatografie

3.2.1 Chromatografie na tenké vrstvě

Chromatografie na tenké vrstvě je metoda, která umožňuje použití většího množství stacionárních fází, než je tomu například u chromatografie na papíře. Nepohyblivou fází tvoří vrstva adsorbentu uložená na rovné podložce. Touto pórovitou vrstvičkou je nasáváno rozpouštědlo mobilní fáze, které eluuje látky nanesené na start ve formě skvrny. Mají-li dělené látky dostatečně rozdílné adsorpční izotermy pro daný systém fází, dojde po projití rozpouštědla do určité vzdálenosti od startu k jejich úplnému rozdělení. Dělení látek probíhá na základě různých mechanismů, podle toho, jaký materiál je zvolen pro tenkou vrstvu. Pro adsorpční chromatografii je vhodný silikagel, oxid hlinitý, kyselina křemičitá,

polyamid a jiné. Pro rozdělovací chromatografii je to především celulóza, silikagel a další. [3,35,37]

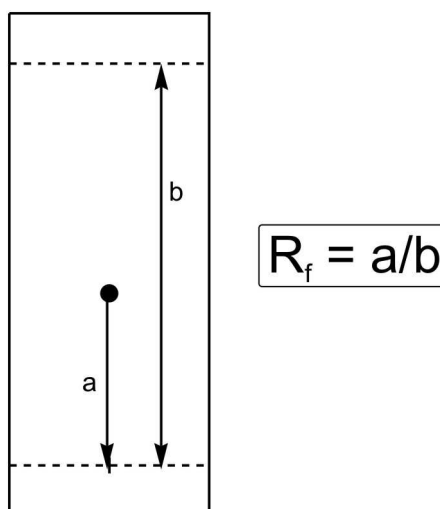
Adsorbenty jsou tuhé látky schopné reverzibilně vázat na svém povrchu jiné chemické sloučeniny v kapalně nebo plynné fázi, a to buď působením fyzikálních sil (např. Van der Waalsových), nebo chemických sil (vodíkové můstky a chemisorpce). Tenká rovnoměrná vrstva adsorbentu se nanáší na hladkou desku (skleněnou, hliníkovou nebo z plastické hmoty) několika způsoby, např. roztíráním, nastříkáním, litím suspenze adsorbentu, popř. ponořením desky do této suspenze.

Každá sloučenina má v daných podmínkách charakteristickou rychlost migrace, určující její polohu na chromatogramu. K vyjádření rychlosti migrace se používají tzv. hodnoty retardačního faktoru – R_f . Jedná se o poměr vzdálenosti středu (těžiště) skvrny od startu a vzdálenosti čela rozpouštědla od startu. To znamená, že se hodnoty retardačního faktoru pohybují v rozmezí od nuly do jedné. Pro látky u „startu“ blíží se nule, pro látky u „čela“ blíží se jedné. Někdy tvar skvrny nedovoluje odhadnout správně střed skvrny a je nutné měřit od jejího předního či zadního okraje, což je třeba vždy uvést. Vyjádření retardačního faktoru je ukázáno na Obrázku 10. [38]

3.2.2 Chromatografie na papíře

Chromatografie na papíře je rozdělovací chromatografie, při níž je stacionární fáze fixována na inertním celulózovém nosiči. Výhody této metody, ve srovnání s metodou chromatografie na tenké vrstvě, spočívají především v jednoduchosti manipulace a přípravě stacionární fáze, dobré reprodukovatelnosti výsledků, a také ve snadné uchovatelnosti chromatogramů. Naopak nevýhodou může být větší časová náročnost, malá kapacita, obtížnější izolace látek po rozdělení a nemožnost použití drastičtějších detekčních činidel. [3]

Na speciální chromatografický papír se vyznačí, ve vhodné vzdálenosti od horního nebo dolního okraje, tzv. start s body pro nanášení vzorku. Na označené body se nanesou roztoky příslušných vzorků. Po vysušení startu se chromatogram umístí do chromatografické komory nasycené zakotvenou mobilní fází a provede se vyvíjení. Poté rozpouštědlo vzlíná kapilární silou vzhůru. Jakmile čelo rozpouštědla dosáhne dostatečné vzdálenosti od startu, chromatogram je vyjmut z komory a nechá se vyschnout. Následně je možná detekce vzniklých skvrn. Poloha skvrny na chromatogramu, která je pro každou sloučeninu za daných podmínek charakteristická, je vyjádřena pomocí hodnoty R_f . [38]



Obrázek 10. Vyjádření retardačního faktoru.

3.2.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je další analytickou separační metodou, která je využívána k separaci široké škály analytů. Ve srovnání s plynovou chromatografií má tu výhodu, že umožňuje určení tepelně nestálých, netěkavých nebo velmi polárních sloučenin. Základním cílem této metody je dosažení co nejlepšího rozdělení látek v co nejkratším čase.

Separace látek probíhá na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Mobilní fáze je kapalná. Stacionární fáze je pevně zakotvena v chromatografické koloně. Během procesu dochází k více typům interakcí. Může to být interakce látek s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární fází, anebo sorpce látek na stacionární fází. Princip analýzy spočívá v tom, že aparaturou protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek, který je unášen do kolony. V té dochází k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a taktéž k separaci látek dle fyzikálně-chemických vlastností. Po průchodu separační kolonou jsou látky v mobilní fází detekovány v detektoru. Měřenou veličinou je fluorescence, absorbance, index lomu, elektrický proud, ionizační proud, elektrická vodivost a relativní permitivita. Signál z detektoru se zaznamenává pomocí počítače. Výstupem je chromatogram tvořený soustavou píků, které mají různou plochu, výšku a retenční čas. Pokud je analyzovaná směs dobře rozdělena, pak každé složce směsi odpovídá jeden pík. [26,39,40]

3.3 Infračervená spektrometrie

Infračervená spektrometrie je významná analytická kvalitativní metoda, která spadá pod elektromagnetickou spektroskopii. Tato analýza je podstatou vibračně rotačních spekter molekul. Molekuly a atomy mají za vhodných podmínek schopnost pohlcovat nebo vyzařovat elektromagnetické vlnění pouze určitých vlnových délek. Je to dáno tím, že molekuly nebo atomy mohou existovat pouze v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie. K pohlcení elektromagnetického vlnění dochází při přechodu ze stavu s nižší energií do stavu s vyšší energií, naopak k vyzáření vlnění dochází při opačném přechodu. [41]

Jsou rozeznávány tři druhy energetických přechodů – elektronový, vibrační a rotační. Všechny tyto tři druhy pohybů spolu souvisí. Při změně stavu elektronového obalu se mění vibrační a rotační stavy. Při změně vibračního stavu se mění i stav rotační. Vibrace a rotace molekul se řídí zákony kvantové mechaniky. [35]

Šířka infračervené oblasti odpovídá elektromagnetickému záření o velikosti vlnových délek 0,78 – 1000 μm a vlnočtu 13000 – 10 cm^{-1} . Tuto oblast lze dále rozdělit do tří intervalů:

- blízká infračervená oblast: 13000 – 5000 cm^{-1}
- střední infračervená oblast: 5000 – 200 cm^{-1}
- daleká infračervená oblast: 200 – 10 cm^{-1} [42, 43]

3.3.1 Infračervený spektrometr

Všechny infračervené spektrometry se skládají ze zdroje záření, monochromátoru, detektoru infračerveného záření a registračního záření. Jednotlivé spektrometry se mohou lišit uspořádáním těchto částí a také tím, zda spektrometr pracuje jako jednopaprskový či dvoupaprskový.

Zdrojem infračerveného záření jsou využívány rozžhavené pevné látky, které vydávají v infračervené oblasti spojité spektrum. Teplota, na kterou se zdroj zahřívá je zvolena tak, aby bylo dosaženo v infračervené oblasti maxima energie. Monochromátor se skládá ze vstupní a výstupní štěrbin, zobrazovací optiky a dispergujícího systému, kterým je hranol nebo mřížka. Jako detektorů infračerveného záření se používá termoelektrických článků, bolometru, fotoelektrického detektoru nebo také detektoru pneumatického. [35]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

Pro analýzu byly použity tyto vzorky:

- čerstvý mladý špenát–Jung Spinat, Eisberg Hungary
- hluboce zmrazený špenátový protlak – Icefield, Vegetable Creations

Čerstvý mladý špenát byl zakoupen v obchodní síti BILLA spol. s.r.o a hluboce zmrazený špenátový protlak byl kupován v obchodní síti Lidl v.o.s. (Obrázek 11)



Obrázek 11. Materiál použitý pro analýzu.

4.2 Přístrojové vybavení a použité chemikálie

- laboratorní sklo
- nádstavec pro Soxhletovu extrakci
- extrakční papírová patrona
- zpětný chladič
- silufolová destička pro tenkovrstvou chromatografii
- papírový skládaný filtr
- tyčový mixér
- analytické váhy (Bas 31, Boeco, Německo)
- topné hnízdo (LTHS 250 cm³)

- třepačka (ReaxControl, Heidolph Instrument GmbH)
- rotační vakuová odparka (Laborota 4000, Heidolph)
- hmotnostní spektrometr s iontovou pastí (amaZon X, BrukerDaltonics, Německo)

4.3 Použité chemikálie

- demineralizovaná voda
- aceton p.a. (IPL, Uherský Brod)
- hexan p.a.(IPL, Uherský Brod)
- petrolether p.a.(IPL, Uherský Brod)
- izopropylalkohol p.a.(IPL, Uherský Brod)
- ethylacetát p.a.(IPL, Uherský Brod)
- methanol p.a.(IPL, Uherský Brod)
- cyklohexan p.a.(IPL, Uherský Brod)
- uhličitan vápenatý bezvodý p.a.(IPL, Uherský Brod)
- síran sodný bezvodý p.a.(IPL, Uherský Brod)
- methanol LC-MS CHROMASOLV[®] (Sigma-Aldrich)
- voda LC-MS CHROMASOLV[®] (Sigma-Aldrich)

4.4 Metody extrakce barviv ze špenátu

4.4.1 Extrakce na Soxhletově extraktoru

Pomocí tyčového mixéru bylo rozmělněno 10 g špenátu spolu s 1 g práškovitého uhličitanu vápenatého. Rozmixovaná hmota byla přenesena do papírové extrakční patrony a zakryta vatou. Patrona byla umístěna do Soxhletova extraktoru. Do 250 cm³ destilační baňky bylo přidáno 150 cm³ acetonu. Extrakce probíhala pod zpětným chladičem po dobu 2 hodin. Po této době byl získaný acetonový extrakt vytemperován na laboratorní teplotu a po dobu 24 hodin sušen na tmavém a suchém místě nad bezvodým síranem sodným. Po této době byl acetonový extrakt zfiltrován přes skládaný filtr, čímž došlo k jeho oddělení od sušidla. Následně byl filtrát zahuštěn na rotační vaukové odparce přibližně na třetinový objem a použit k následným analýzám.

4.4.2 Jednostupňová macerace

Na analytických vahách bylo odváženo 0,5 g špenátu, 0,5 g uhličitanu vápenatého a 1 g bezvodého síranu sodného. Všechny komponenty byly důkladně promíseny v hmoždíři, čímž byla získána směs pastovité konzistence. Tato směs byla kvantitativně převedena do zkumavky, do níž byly následně přidány 2 cm³ acetonu. Po dobu jedné minuty byla zkumavka intenzivně třepána tak, aby došlo k dokonalému promíchání pastovité směsi s rozpouštědlem. Zkumavka byla poté ponechána 10 minut stát za laboratorní teploty. Během této doby došlo k oddělení tuhé fáze od kapalné. Následně byla kapalná fáze odfiltrována přes skládaný filtr a použita k následným analýzám. Výše uvedený postup byl převzat z odborné literatury. [44]

4.5 Tenkovrstvá chromatografie

TLC analýzy byly prováděny na deskách ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄ od firmy Machrey-Nagel, kdy příslušný vzorek byl na TLC desku nanášen pomocí tenké skleněné kapiláry. V rámci provedených experimentů byly použity následující typy mobilních fází:

Tabulka 2. Seznam použitých mobilních fází.

Mobilní fáze	Směs rozpouštědel	Objemový zlomek
A	petrolether/isopropanol/voda	0,90/0,09/0,0023
B	petrolether/ethylacetát	0,89/0,12
C	petrolether/ethylacetát	0,50/0,50
D	petrolether/ethylacetát	0,20/0,80
E	ethylacetát/methanol	0,50/0,50
F	petrolether/aceton/cyklohexan/ethylacetát/methanol	0,40/0,07/0,10/0,07/0,30

Bezprostředně před samotnou TLC analýzou byla do vyvíjecí chromatografické komory připravena příslušná mobilní fáze (Tabulka 2). Vyvíjecí chromatografická komora byla poté uzavřena. Poté byl na TLC destičku nanesen příslušný vzorek a po oschnutí skvrn byla destička pomocí pinzety vložena do vyvíjecí chromatografické komory, přičemž bylo použito vzestupné vyvíjení. Po vyvinutí byla tenká vrstva opatrně vyjmuta z vyvíjecí chromatografické komory a vizuálně zkontrolována. Všechny pozorované skvrny byly označeny a byla pro ně spočítána hodnota retardačního faktoru (R_f). Pro případ, že by se ve vzorku nacházely sloučeniny, které není možné pozorovat v denním světle, byla každá vyvinutá vrstva rovněž prohlédnuta pod UV paprsky.

4.6 Hmotnostní spektrometrie

Analýzy všech studovaných vzorků byly prováděny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X (BrukerDaltonics) vybaveným elektrosprejovým ionizačním zdrojem (Příloha PII).

4.6.1 Specifikace hmotnostního spektrometru

Název:	amaZon X (BrukerDaltonics)
Ionizační zdroj:	elektrosprej
Hmotnostní analyzátor:	iontová past
Rozsah m/z :	50 – 3000
Sušící a rozprašovací plyn:	dusík
Způsob fragmetance iontů:	kolizí indukovaná disociace (CID)
Kolizní plyn:	helium
Software:	Trap Control, Data Analysis

4.6.2 Parametry MS analýz

Všechny analyzované vzorky byly do hmotnostního spektrometru přiváděny kovovou kapilárou a následně měřeny v pozitivním skenovacím módu. Dále jsou uvedeny nevýznamnější parametry měření:

Skenování mód:	Enhance dresolution (8 100 $m/z \cdot s^{-1}$)
Napětí na kapiláře:	- 2,0 až- 6,0 kV
Napětí na konci kapiláry:	140 V
Tlak rozprašovacího plynu:	55 158 Pa
Průtok sušícího plynu:	6 $dm^3 \cdot min^{-1}$
Teplota sušícího plynu:	220 °C
ICC (maximální počet iontů v pasti):	200 000
Maximální akumulací čas:	20 ms
Rozpětí m/z :	50 – 2000
Tandemová spektra:	MS/MS

4.6.3 Příprava vzorků

Příprava vzorků po TLC analýze získaných extraktů

Jednotlivé skvrny pozorované na TLC destičkách byly vyříznuty a kvantitativně převedeny do vialky o objemu $1,5 \text{ cm}^3$ (Eppendorf® microtube 3810X) a to bezprostředně po provedení TLC analýzy. Následně byl do vialky přidán 1 cm^3 methanolu a vialka byla ponechána po dobu 60 sekund na třepače. Následně bylo provedeno dvoustupňové ředění. Nejprve bylo ze zásobního roztoku odebráno $5 \mu\text{l}$ vzorku a převedeno do vialky obsahující 1 cm^3 methanolu (případně směs methanol/voda, 1/1, v/v). Z této vialky bylo odebráno $100 \mu\text{l}$ vzorku a převedeno do vialky obsahující $0,9 \text{ cm}^3$ methanolu (případně směs methanol/voda, 1/1, v/v). Takto připravený vzorek byl následně pomocí kovové kapiláry přiváděn do hmotnostního spektrometru. V případě nízké intenzity signálů pozorovaných ve spektrech prvního řádu, byl do hmotnostního spektrometru nastříknut vzorek o vyšší koncentraci.

Příprava vzorků po extrakci bez provedení TLC analýzy

Do vialky o objemu $1,5 \text{ cm}^3$ (Eppendorf® microtube 3810X) bylo napipetován 1 cm^3 methanolu do něhož bylo přidáno $10 \mu\text{l}$ získaného extraktu (extrakt byl zahuštěn na jednu třetinu původního objemu). Následně bylo provedeno dvoustupňové ředění. Nejprve bylo ze zásobního roztoku odebráno $10 \mu\text{l}$ vzorku a převedeno do vialky obsahující 1 cm^3 methanolu. Z této vialky bylo odebráno opět $10 \mu\text{l}$ vzorku a převedeno do vialky obsahující 1 cm^3 methanolu. Takto připravený vzorek byl následně pomocí kovové kapiláry přiváděn do hmotnostního spektrometru. V případě nízké intenzity signálů pozorovaných ve spektrech prvního řádu, byl do hmotnostního spektrometru nastříknut vzorek o vyšší koncentraci.

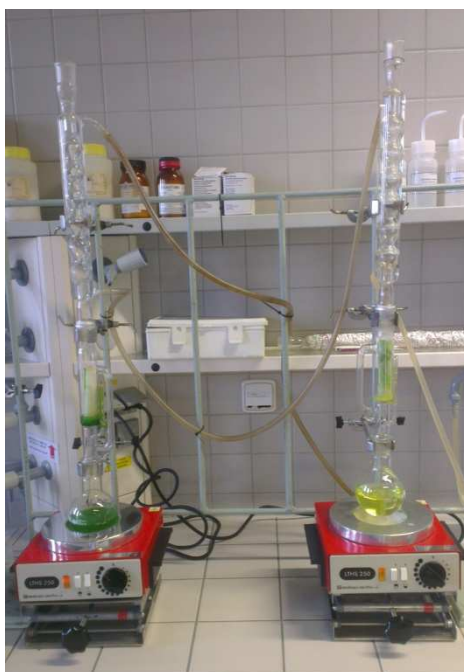
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této kapitole budou postupně uvedeny a komentovány nejvýznamnější výsledky, které byly v rámci této práce získány. Pro větší přehlednost rukopisu a snadnější orientaci případného čtenáře, bude tato část práce koncipována stejně, jako je tomu v kapitole nesoucí název Experimentální část (kapitola 4). To znamená, že nejprve bude podán komentář k extrakčním metodám, které byly použity pro izolaci barviv z čerstvého a mraženého špenátu, dále bude pojednáno o separaci jednotlivých barviv, k čemuž byla použita chromatografie na tenké vrstvě a v neposlední řadě budou zmíněny výsledky získané pomocí hmotnostní spektrometrie.

5.1 Extrakce barviv ze špenátu

Jak je již zmíněno v experimentální části, předmětem této studie byla extrakce a následná analýza barviv obsažených v čerstvém a mraženém špenátu, přičemž vzorky použité pro jednotlivé analýzy byly zakoupeny v tržní síti. Pro extrakci barviv z obou typů studovaných vzorků byly vybrány dvě metody, a sice Soxhletova extrakce a jednostupňová macerace. Tyto metody se vzájemně liší v několika ohledech. Pravděpodobně nejvýznamnější rozdíl lze spatřovat v teplotě, při níž je samotná extrakce prováděna. Zatímco macerace se provádí za laboratorní teploty, pak pro Soxhletovu extrakci je nezbytné použít teplotu, při níž bude zvolené rozpouštědlo přivedeno k varu. Rozdílná teplota při provádění extrakce může mít teoreticky vliv na výsledné složení získaného extraktu. Jinak řečeno, při použití Soxhletovy extrakce může dojít k nežádoucím reakcím termolabilních sloučenin, které pak nemusí být ze studované matrice vůbec vyizolovány, nebo se mohou přeměnit na jiné, neočekávané typy sloučenin. Další odlišnost lze spatřovat v délce trvání analýzy, kdy samotná macerace je časově nenáročná (cca 15 minut), zatímco Soxhletova extrakce trvá řádově několik hodin. To záleží na tom, jak je k samotné extrakci přistoupeno. Při extrakci barviv z rostlinných materiálů se může extrakce provádět buď tak dlouho, dokud není rozpouštědlo přicházející z přepadové trubice zpět do varné baňky čiré nebo po přesně stanovenou dobu zajišťující vyextrahování všech studovaných typů sloučenin, nebo alespoň jejich podstatné části. Další možností představuje konstantní počet uskutečněných cyklů, který je pro všechny prováděné experimenty shodný. Pro potřeby této bakalářské práce byla jako nejvhodnější se jevící zvolena metoda konstantního času provádění každé extrakce, a to po dobu 2 hodin.

Prvním úkolem při optimalizaci extrakce dle Soxhleta bylo vybrat vhodný typ organického rozpouštědla. Na základě odborné literatury [45] byl vybrán hexan (nepolární rozpouštědlo) a aceton (polární aprotické rozpouštědlo), přičemž každé rozpouštědlo bylo vždy použito samostatně. Nabízela se také varianta připravit různé směsi těchto dvou typů rozpouštědel, ale od ní bylo z časových důvodů upuštěno. Extrakce barviv z čerstvého špenátu dle Soxhleta za použití dvou výše zmíněných rozpouštědel probíhala bez jakýchkoliv problémů. Nicméně, po několika proběhlých cyklech bylo patrné, že barva každého z použitých rozpouštědel se rapidně liší. Zatímco v případě extrakce prováděné pomocí acetonu mělo rozpouštědlo sytě zelenou barvu (Obrázek 12, vlevo), v případě hexanu měl extrakt světlé (žluto-zelené) zabarvení (Obrázek 12, vpravo). Po ukončení reakce, vysušení rozpouštědla a jeho zahuštění na rotační vakuové odparce, byl extrakt získaný z obou reakcí analyzován pomocí tenkovrstvé chromatografie. Pomineme-li nepříliš dobré separační účinky prvotně zvolených typů mobilních fází, což bude dále diskutováno v kapitole 5.2, je na místě uvést, že prostým srovnáním intenzity pozorovaných skvrn bylo zcela zřejmé, že acetonový extrakt obsahuje jednotlivé složky ve vyšší koncentraci, nežli extrakt hexanový. Z tohoto důvodu byly všechny následné experimenty prováděny již jen pomocí acetonu jako rozpouštědla.



Obrázek 12. Srovnání acetonového a hexanového extraktu.

Druhou, v této práci aplikovanou, extrakční metodu představovala jednostupňová macerace. Jedná se o velice jednoduchou a časově nenáročnou extrakční metodu, která se provádí za laboratorní teploty. Klíčovým krokem při tomto typu extrakce je pravděpodobně důkladné promísení studovaného materiálu, rozpouštědla a dalších činidel. Značnou výhodou této metody je také nízká ekonomická náročnost, vyplývající nejen z malé spotřeby použitého rozpouštědla, ale také z minimálních nároků kladených na materiální vybavení. Za přednost macerace lze také považovat to, že je upuštěno od sušení extraktu, které je např. u Soxhletovy extrakce nezbytné a relativně časově náročné (cca 24 hodin – dle typu použitého sušidla). Z výše uvedeného plyne, že čas potřebný pro tento typ experimentu, přesněji doba od provedení samotné macerace až po získání výsledků z tenkovrstvé chromatografie, obvykle nepřesáhne 1 hodinu. To představuje, ve srovnání se Soxhletovou extrakcí, u níž lze výsledky z TLC očekávat nejdříve po 24 hodinách (z důvodu relativně dlouhého sušení získaného extraktu), nepopíratelnou výhodu. Po získání extraktů pomocí výše uvedených metod, bylo přistoupeno k jejich analýze pomocí tenkovrstvé chromatografie.

5.2 Tenkovrstvá chromatografie

Poté co byly získány požadované extrakty barviv obsažených ve studovaných vzorcích, bylo přistoupeno k jejich analýze pomocí chromatografie na tenké vrstvě. Stejně jako lze nalézt určité odlišnosti mezi použitými extrakčními metodami, tak také v případě tenkovrstvé chromatografie lze poukázat na skutečnosti, v nichž se TLC analýzy extraktů získaných pomocí dvou různých extrakčních metod lišily. Zatímco extrakty získané pomocí metody dle Soxhleta byly před samotnou chromatografickou analýzou zahušťovány na rotační vakuové odparce, tak extrakty získané jednostupňovou macerací žádnou další úpravu před samotnou TLC analýzou nevyžadovaly. Vzorky získané Soxhletovou extrakcí byly nejprve na TLC destičky nanášeny z extraktu, jež nebyl žádným způsobem upravován, dále pak z extraktu zahuštěného na $\frac{1}{2}$ původního objemu a nakonec z extraktu zahuštěného přibližně na $\frac{1}{3}$ původního objemu.

Primárním cílem však bylo nalézt optimální složení mobilní fáze pro tenkovrstvou chromatografii, zajišťující co možná nejlepší oddělení jednotlivých složek nacházejících se ve studovaných extraktech. Postupně tak bylo vyzkoušeno sedm typů mobilních fází vzájemně se lišících svým složením a/nebo poměrem jednotlivých složek mobilní fáze tvořících. Přehled sedmi typů mobilních fází, které byly v průběhu této studie vyzkoušeny,

se nachází v Tabulce 2 (kapitola 4.5, strana 36). Zatímco mobilní fáze A, B a E se ukázaly být jako nevyhovující, kdy nedocházelo k téměř žádnému nebo jen velmi špatně rozlišitelnému dělení jednotlivých barviv, pak mobilní fáze C, D a F poskytovaly relativně uspokojivé výsledky. Z tohoto důvodu bylo v dalších experimentech pracováno právě s těmito typy mobilních fází.

Chromatografií na tenké vrstvě tak byl postupně analyzován:

- a) extrakt z čerstvého špenátu získaný Soxhletovou extrakcí
- b) extrakt z čerstvého špenátu získaný jednostupňovou macerací
- c) extrakt z mraženého špenátu získaný Soxhletovou extrakcí
- d) extrakt z mraženého špenátu získaný jednostupňovou macerací.

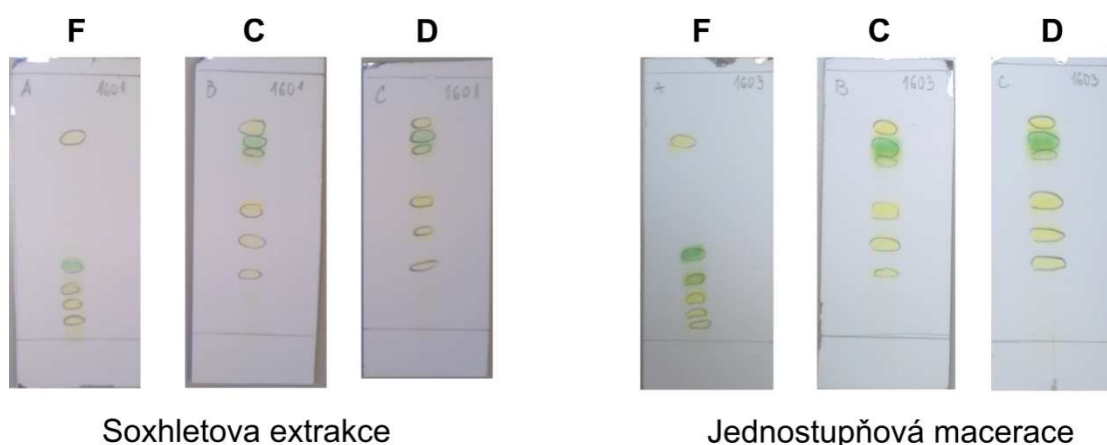
V obecné rovině lze říci, že ve zkoumaných vzorcích bylo pozorováno ve všech případech minimálně 5 a maximálně 8 vzájemně oddělených barevných skvrn. Na základě odborné literatury [44] byla k jednotlivým skvrnám přiřazena barviva přirozeně se vyskytující ve špenátu. S vysokou pravděpodobností lze určit β -karoten, feofytin *a*, feofytin *b*, chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. Složitější je rozklíčovat skupinu xantofylových barviv, z nichž se ve špenátu velmi pravděpodobně může vyskytovat lutein (nebo jeho izomer zeaxanthin), violaxanthin a neoxanthin. Ke každé z těchto látek byl u všech typů použitých mobilních fází spočítán retardační faktor, přičemž hodnoty uvedené dále v této práci představují aritmetický průměr získaný z pěti TLC analýz příslušného vzorku.

Výsledky TLC analýz extraktů z čerstvého špenátu získané oběma použitými typy extrakčních metod jsou uvedeny v Tabulce 3. Obecně lze říci, že při použití všech tří typů mobilních fází (C, D a F), byly obdrženy výsledky velmi podobné, alespoň ve smyslu počtu pozorovaných barviv (nikoliv však jejich retardačních faktorů). Ve většině případů bylo detekováno šest barviv, a sice β -karoten, chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a některá xantofylová barviva (pravděpodobně lutein/zeaxanthin, violaxanthin a neoxanthin). Pouze u extraktu získaného Soxhletovou extrakcí nebyl v mobilní fázi C a F pozorován neoxanthin. Pro ilustraci jsou reprezentativní výsledky TLC analýz extraktů z čerstvého špenátu znázorněny na Obrázku 13, přičemž písmenné označení nad každou TLC vrstvou značí typ použité mobilní fáze. Z obrázku je patrné, že výsledky chromatografie na tenké vrstvě byly u obou použitých extrakčních technik shodné.

Tabulka 3. Vyjádření retardačních faktorů barviv vyextrahovaných z čerstvého špenátu.

Sloučenina	Mobilní fáze C		Mobilní fáze D		Mobilní fáze F	
	Macerace	Extrakce	Macerace	Extrakce	Macerace	Extrakce
β -karoten	0,81	0,84	0,77	0,80	0,73	0,78
feofytin <i>a</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
feofytin <i>b</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
chlorofyl <i>a</i>	0,73	0,78	0,73	0,74	0,33	0,28
chlorofyl <i>b</i>	0,58	0,51	0,66	0,69	0,24	0,20
lutein/zeaxanthin	0,51	0,39	0,47	0,48	0,14	0,15
violaxanthin	0,38	0,25	0,36	0,37	0,11	0,07
neoxanthin	0,27	n.d.	0,23	0,22	0,06	n.d.

n.d.: nebyl detekován

**Obrázek 13.** Výsledky TLC analýz extraktů z čerstvého špenátu.

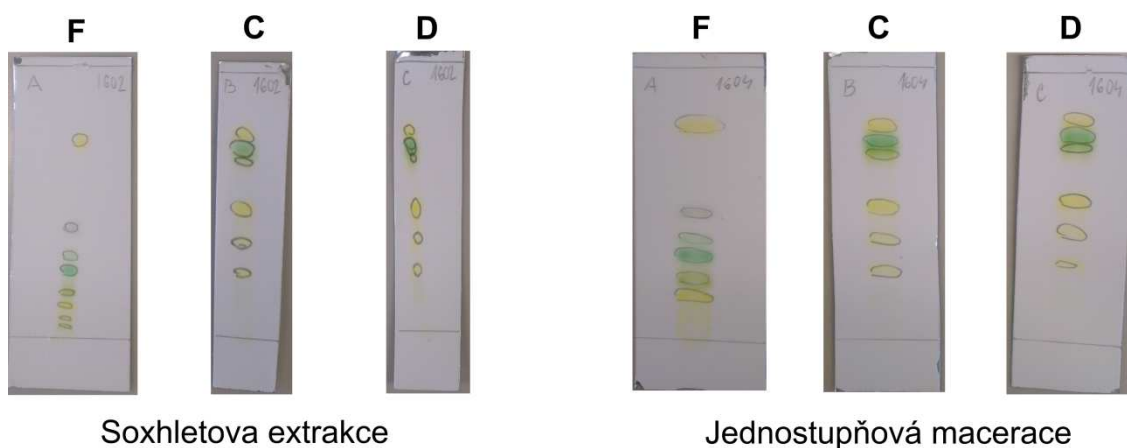
Výsledky TLC analýz extraktů z mraženého špenátu získaných Soxhletovou extrakcí a macerací jsou uvedeny v Tabulce 4. Tak jako u vzorku čerstvého špenátu, tak i u tohoto byly použity mobilní fáze typu C, D a F. U mobilních fází C a D bylo pozorováno celkem šest barevných skvrn značících přítomnost šesti různých barviv, a to β -karotenu, chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, luteinu/zeaxanthinu, violaxanthinu a neoxanthinu. Velice zajímavé výsledky poskytla TLC analýza provedená v mobilní fázi typu F, v níž byly detekovány dvě doposud nepozorované barevné skvrny. Ty byly na základě odborné literatury označeny jako feofytin *a* a *b* (možnosti původu těchto látek v extraktech z mraženého špenátu budou diskutovány níže). [45] U této mobilní fáze nebyly v maceračním extraktu detekovány xantofylová barviva violaxanthin a neoxanthin.

Tabulka 4. Vyjádření retardačních faktorů barviv vyextrahovaných z mraženého špenátu.

Sloučenina	Mobilní fáze C		Mobilní fáze D		Mobilní fáze F	
	Macerace	Extrakce	Macerace	Extrakce	Macerace	Extrakce
β -karoten	0,81	0,78	0,79	0,72	0,81	0,74
feofytin <i>a</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,47	0,43
feofytin <i>b</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,38	0,31
chlorofyl <i>a</i>	0,77	0,73	0,74	0,71	0,30	0,26
chlorofyl <i>b</i>	0,72	0,67	0,60	0,63	0,23	0,17
lutein/zeaxanthin	0,53	0,49	0,49	0,44	0,17	0,13
violaxanthin	0,42	0,35	0,38	0,33	n.d.	0,07
neoxanthin	0,19	0,25	0,25	0,22	n.d.	0,04

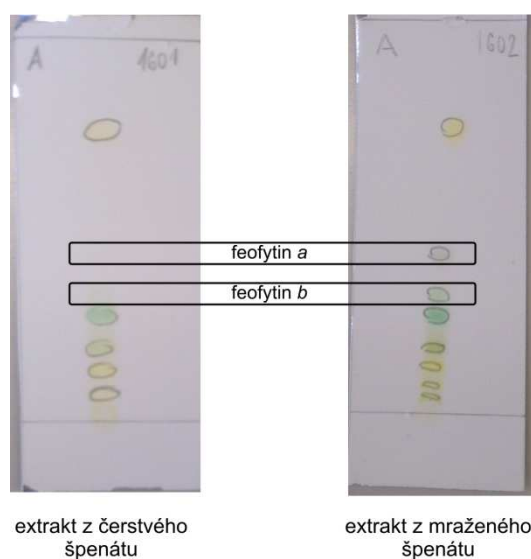
n.d.: nebyl detekován

Výsledky TLC analýz extraktů z mraženého špenátu jsou pro větší názornost uvedeny na Obrázku 14, přičemž písmenné označení nad každou TLC vrstvou značí typ použité mobilní fáze. V případě mobilních fází C a D nebyly mezi jednotlivými typy použitých extrakčních technik pozorovány žádné významné rozdíly. Jako velice zajímavé se ukázalo být použití mobilní fáze F, v níž byly pozorovány dvě zcela nové barevné skvrny (později určené jako feofytiny) umístěné mezi β -karotenem a chlorofylem *a*.

**Obrázek 14.** Výsledky TLC analýz extraktů z čerstvého špenátu.

Při srovnání TLC analýz extraktů z čerstvého a mraženého špenátu je patrné, že v případě použití mobilních fází C a D nebyly pozorovány žádné významné rozdíly. Jinak tomu však bylo v okamžiku, kdy byly TLC vrstvy vyvíjeny v mobilní fázi F. Zatímco v případě TLC analýz (mobilní fáze F) extraktů z čerstvého špenátu, bylo pozorováno 5 (Soxhletova extrakce), respektive 6 (jednostupňová macerace) látek, tak při použití stejné mobilní fáze pro extrakty získané z mraženého špenátu, bylo na TLC destičce pozorováno

8 (Soxhletova extrakce), respektive 6 (jednostupňová macerace) sloučenin. Tato skutečnost byla nejprve přisuzována experimentální chybě, nicméně na základě výsledků získaných TLC analýzami dalších provedených extrakcí bylo zřejmé, že se o experimentální chybu nejedná. Nově pozorované skvrny, situované mezi β -karotenem a chlorofylem *a*, byly na základě studie odborné literatury označeny jako feofytiny, a sice feofytin *a* a feofytin *b*. [45] Feofytiny jsou sloučeniny, které se svojí strukturou velmi podobají chlorofylům, s tím rozdílem, že centrální hořčnatý kationt je nahrazen dvěma atomy vodíku. K tomuto jevu může dojít v okamžiku, kdy je molekula chlorofylu vystavena nadměrnému záhřevu, případně kyselému prostředí. Vzhledem k tomu, že v průběhu výroby mraženého špenátového protlaku dochází ke krátkodobému zvýšení teploty za účelem inaktivace enzymů, lze usuzovat, že ke vzniku feofytinů může docházet v této fázi technologického postupu. Na Obrázku 15 je pro názornost znázorněn výsledek TLC analýz (mobilní fáze F) extraktů z čerstvého a mraženého špenátu získaných Soxhletovou extrakcí s vyznačením oblasti, v níž byla nebo naopak nebyla pozorována feofytinová barviva.



Obrázek 15. Srovnání TLC analýz extraktů z čerstvého a mraženého špenátu.

5.3 Hmotnostní spektrometrie

Posledním krokem praktické části této bakalářské práce byla analýza jednotlivých barviv oddělených tenkovrstvou chromatografií pomocí hmotnostní spektrometrie. K tomu účelu byl použit hmotnostní spektrometr s iontovou pastí vybavený elektrosprejovou ionizací. Pro samotnou analýzu byly jednotlivé skvrny z TLC destiček opatrně vyříznuty, oddělený silikagel obsahující příslušné barvivo byl kvantitativně převeden do vialky

a vyextrahován methanolem. Jednotlivé vzorky byly připravovány bezprostředně před samotnými analýzami.

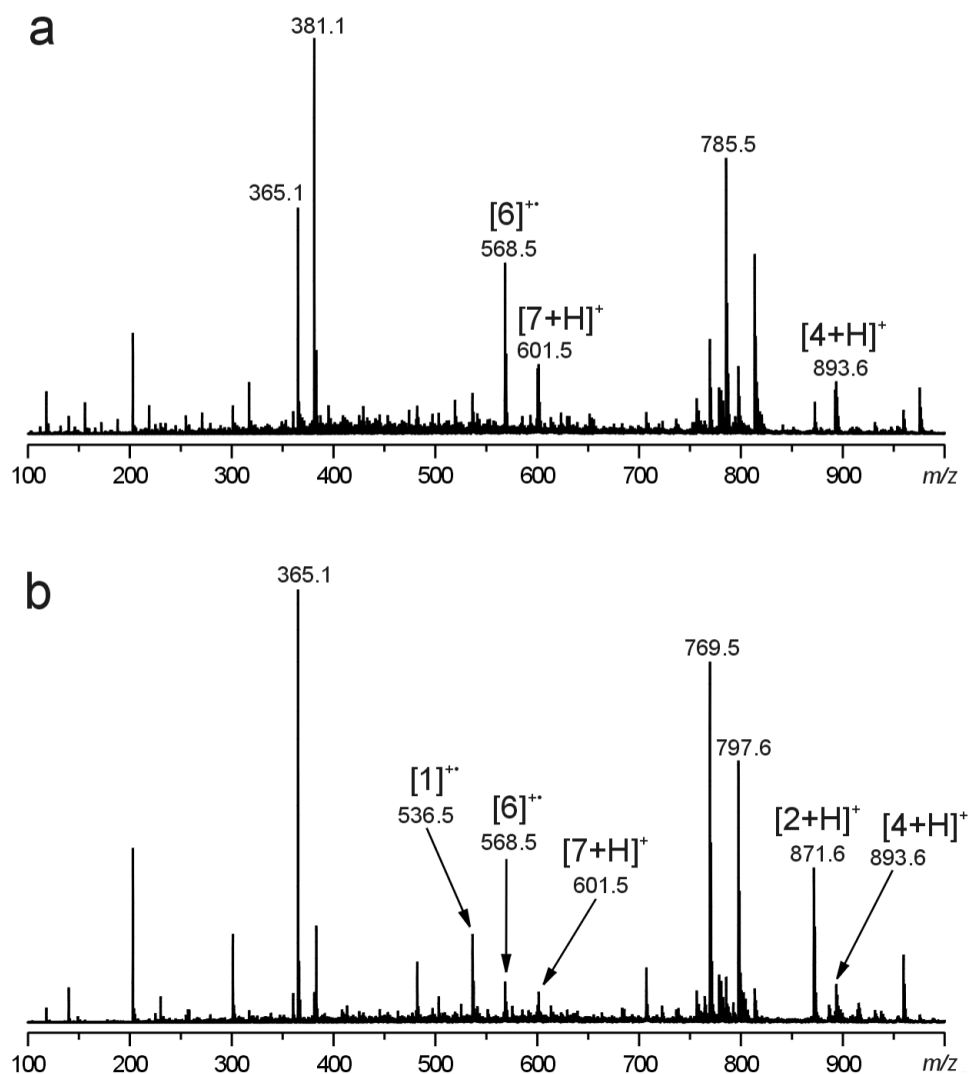
Aby bylo možné ze získaných spekter interpretovat výsledky, byly předem pro každou s očekávaných sloučenin vypočítány její exaktní hmotnosti. Zároveň bylo každé sloučenině přiděleno číselné označení, pod nímž budou tyto látky v další části této kapitoly uváděny. Číselné označení, název, sumární vzorec a exaktní hmotnost (vyjádřená jako atomová hmotnostní jednotka; u) pro všechny uvažované sloučeniny jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5. Exaktní hmotnosti pozorovaných barviv.

Číslo sloučeniny	Název sloučeniny	Sumární vzorec	Exaktní hmotnost [u]
1	β -karoten	$C_{40}H_{56}$	536,44
2	feofytin a	$C_{55}H_{74}N_4O_5$	870,57
3	feofytin b	$C_{55}H_{74}N_4O_5$	884,55
4	chlorofyl a	$C_{55}H_{74}MgN_4O_5$	892,54
5	chlorofyl b	$C_{55}H_{70}MgN_4O_6$	906,51
6	lutein/zeaxanthin	$C_{40}H_{56}O_2$	568,43
7	neoxanthin/violaxanthin	$C_{40}H_{56}O_4$	600,42

Při analýzách jednotlivých skvrn vyříznutých z TLC destičky byl vzorek nastříknut přímo do hmotnostního spektrometru pomocí tzv. přímé difuze. Ačkoliv byly v průběhu každé z provedených analýz měněny všechny parametry, které mohou určitým způsobem změnit profil spektra prvního řádu (napětí na kapiláře, napětí na konci kapiláry, teplota sušicího plynu, tlak rozprašovacího plynu, maximální akumulací čas apod.), nepodařilo se nám v žádném ze zkoumaných vzorků nalézt signál, jehož hodnota m/z by odpovídala jakékoliv z předpokládaných struktur. Ve všech spektrech prvního řádu se vyskytovaly jedenkrát nabitě signály o m/z 338,4, 360,4, 376,4 a 722,5. Z hodnot prvních tří uvedených signálů je patrné, že je mezi nimi vzájemný vztah. Vzhledem k tomu, že rozdíl mezi signálem 338 a 360 činí 22 m/z a rozdíl mezi signálem 360 a 376 je 16 m/z lze říci, že exaktní hmotnost této sloučeniny činí 337,4 u. Jednotlivé signály pak lze určit následovně: 338 $[337+H]^+$, 360 $[337+Na]^+$, 338 $[337+K]^+$. Strukturu předmětné sloučeniny se na základě těchto údajů bohužel určit nepodařilo. Obava, že tyto signály pocházejí z TLC destičky a jsou tedy pouhou nečistotou byla vyvrácena provedením slepého pokusu, kdy byla analyzována část TLC destičky neobsahující žádnou látku. V tomto případě nebyly výše zmíněné signály pozorovány.

Po výše uvedených nezdarech bylo přistoupeno k ESI-MS analýze samotného extraktu. Byly provedeny analýzy extraktů získaných jednostupňovou macerací a to jak z čerstvého tak z mraženého špenátu. Spektra prvního řádu změřená v pozitivním skenovacím módu jsou uvedena na Obrázku 16, kdy horní spektrum (a) náleží extraktu z čerstvého špenátu a spodní spektrum (b) odpovídá extraktu ze špenátu mraženého. Ve spektrech obou vzorků byly pozorovány signály o m/z 568,5, 601,5 a 893,6. Ion o m/z 568 odpovídá s největší pravděpodobností luteinu nebo zeaxanthinu, přičemž vzhledem k tomu, že obě uvedené sloučeniny mají shodnou exaktní hmotnost, nelze s jistotou říci, o kterou látku se jedná. Pokusy o izolaci a následnou fragmentaci tohoto iontu, která by mohla o dané sloučenině poskytnout více informací, nebyly ani v jednom případě úspěšné. Za zmínku stojí, že tato látka byla pozorována, pro ESI-MS netypicky, ve formě kation radikálu. Signál o m/z 893 byl identifikován jako protonová molekula chlorofylu *a*.



Obrázek 16. ESI-MS spektra extraktu čerstvého a mraženého špenátu.

Stejně jako v případě luteinu a zeaxanthinu, pak také v případě dalších dvou xantofylů, a sice neoxanthinu a violaxanthinu (600,42 u) není možné ze spektra prvního řádu určit, o kterou z těchto dvou látek se jedná. Ve spektrech obou studovaných vzorků byl sice pozorován signál o m/z 601, který pravděpodobně náleží jedné ze dvou posledně jmenovaných sloučenin, resp. se jedná o jejich protonovanou formu, ale vzhledem k výše uvedeným důvodům nelze s jistotou tento signál přiřadit ani jedné z nich.

Posledním pozorovaným byl signál o m/z 871,6, který se nacházel pouze ve spektru jednoho ze dvou studovaných vzorků, a sice extraktu z mraženého špenátu. Tento signál s největší pravděpodobností odpovídá protonované molekule feofytinu *a*. Přítomnost tohoto signálu ve spektru prvního řádu extraktu z mraženého špenátu potvrzuje výsledky získané TLC analýzami, kdy také pouze ve vzorcích mraženého špenátu byly pozorovány skvrny, které ve vzorcích extraktů ze špenátu čerstvého přítomny nebyly a jež byly, dle retardačních faktorů, za feofytiny považovány. Za zmínku rovněž stojí intenzita signálu o m/z 871 a její srovnání s relativní intenzitou iontu o m/z 893 (protonovaná molekula chlorofylu *a*).

ZÁVĚR

Cílem práce bylo analyzovat barviva vyskytující se v čerstvém a mraženém špenátu a výsledky následně porovnat mezi sebou. Pro samostatnou analýzu je důležitá extrakce barviv z rostlinného materiálu vhodným rozpouštědlem. Byly prováděny dva typy extrakce, přičemž u té první docházelo k extrakci barviv pod zpětným chladičem na Soxhletově extraktoru a druhým typem byla jednostupňová macerace. U obou extrakčních metod bylo použito acetonové rozpouštědlo. Získané extrakty se analyzovaly pomocí tenkovrstvé chromatografie, díky které došlo k izolaci barevných skvrn, na základě čehož bylo možné identifikovat jednotlivá barviva.

Ve vzorku z čerstvého špenátu, ať už v maceračním extraktu či extraktu získaného Soxhletovou extrakcí, byla přítomna tato barviva: oranžový β -karoten, modro-zelený chlorofyl *a*, žluto-zelený chlorofyl *b* a skupina žlutých xantofylů, do kterých patří barviva lutein, zeaxanthin, violaxanthin a neoxanthin.

Zajímavý výsledek přinesl vzorek mraženého špenátu, když při analýze tenkovrstvé chromatografie, kde byly krom barviv jako v čerstvém špenátu, vyizolovány dvě nové skvrny šedého zbarvení. Tyto skvrny se nacházely mezi β -karotenem a chlorofylem *a*. Na základě odborné literatury [45] byly skvrny identifikovány jako feofytiny, a to přesněji feofytin *a* a feofytin *b*. Tyto sloučeniny vznikají nahrazením centrálního hořečnatého kationtu z molekuly chlorofylu za dva atomy vodíku. Tento jev se nazývá feofytinace a vzniká tehdy, kdy je molekula vystavena vyšší teplotě a případně kyselému prostředí. To, že jsou přítomny v mraženém špenátu může být proto, že v průběhu jeho výroby dochází ke krátkodobému zvýšení teploty až k hodnotám bodu varu. Nicméně přítomnost feofytinů nemá žádný negativní vliv z hlediska výživy člověka. Podílí se na změně barvy finálního produktu, neboť může docházet ke ztrátě sytě zelené barvy na olivově-šedou.

Ačkoliv ESI-MS analýzy jednotlivých barviv, získaných jejich preparací z TLC destiček, nebyly úspěšné (pravděpodobně s ohledem na jejich nízkou koncentraci), následně provedené ESI-MS analýzy samotných extraktů čerstvého a mraženého špenátu získaných jednostupňovou macerací, přinesly relativně zajímavé výsledky. V obou vzorcích byla potvrzena přítomnost chlorofylu *a* a xantofylových barviv luteinu/zeaxanthinu a neoxanthinu/violaxanthinu. Ve vzorku čerstvého špenátu byl rovněž pozorován β -karoten. Pravděpodobně nejzajímavější výsledek představuje přítomnost

feofytinu *a* ve vzorku extraktu z mraženého špenátu, zatímco signál odpovídající této sloučenině ve vzorku čerstvého špenátu pozorován nebyl.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že mražený špenát obsahoval oproti tomu čerstvému dvě barviva navíc. Pravděpodobně se jednalo o výše diskutované feofytiny (byť byla pomocí ESI-MS analýzy potvrzena pouze přítomnost feofytinu *a*, které vznikly z chlorofylových molekul zřejmě během výroby špenátového protlaku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠLAMPOVÁ, A., SMĚLÁ, D., VONDRÁČKOVÁ, A., JANČÁROVÁ, I., KUBÁŇ, V., Stanovení syntetických barviv v potravinách separačními metodami. *Chemické listy*. 2001, roč 95, č. 3, s. 163-168.
- [2] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin* 3. 2. Vyd. OSSIS: Tábor, 2002. 368 s. ISBN 80-86659-02
- [3] DAVÍDEK, J. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2. Vyd. Praha: SNTL, 1981, 718 s.
- [4] DAVÍDEK, J. *Chemie potravin*. 2. Vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991, 142 s. ISBN 8070800976.
- [5] ČOPÍKOVÁ, J., UHER, M., LAPČÍK, O., MORAVCOVÁ, J., DRAŠAR, P., Přírodní barevné látky. *Chemické listy*. 2005, roč 99, č. 11, s. 802 – 816.
- [6] ŠIVEL, M., KLEJDUS, B., KRÁČMAR, S., KUBÁŇ, V., Lutein - významný karotenoid ve výživě člověka. *Chemické listy*. 2013, č. 6, s. 456 – 463.
- [7] PITERKOVÁ, J., TOMÁNKOVÁ, K., LUHOVÁ, L., PETŘIVALSKÝ, M., PEČ, P., Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy*. 2005, roč 99, č. 7, s. 455 – 466.
- [8] KARABÍN, M., DOSTÁLEK, P., HOFTA, P., Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství. *Chemické listy*. 2006, č. 3, s. 184 – 189.
- [9] LIGOR, M., BUSZEWSKI, B., Study of Xanthophyll Concentration in Spinach Leaves by Means of HPLC Coupled with UV – VIS and Corona CAD Detectors. Springer Science + Business Media. 2012, č. 5, s. 388 – 395.
- [10] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin* 2. 2. Vyd. OSSIS: Tábor, 1999, 304 s. ISBN 8090239145.
- [11] KOPEC, K., *Zelenina ve výživě člověka*. 1. Vyd. Grada: Praha, 2010, 168 s. ISBN 978-802-4728-452.
- [12] TESORIERE, L., BUTERA, D., ARPA, D., et al. Increased Resistance to Oxidation of Betalain – Enriched Human Low Density Lipoproteins. *Free Radical Research*. 2002, vol. 37, s. 689 – 696.
- [13] BARTL, P., TREMLOVÁ, B., OŠŤÁDALOVÁ, M., POKORNÁ, J., ŽDÁRSKÝ, M., Kvalitativní a kvantitativní stanovení anthokyanů v kultivarech pšenice s modrým a purpurovým zrnem. *Potravinářstvo*. 2013, vol. 7, s. 145 – 148.

- [14] CHABINOVÁ, J., ZÍTKA, O., HÚSKA, D., KLEJDUS, B., KIZEK, R., Optimization chromatographic isolation of anthocyanins. MendelNet. 2011, s. 1003 – 1010.
- [15] SALÁKOVÁ, A., BOŘILOVÁ, G., Technologie a hygiena potravin živočišného původu. 1. Vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2014, 51 s. ISBN 978-80-7305-731-2.
- [16] The Nobel Prize in Chemistry 1962". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014.[online]. [cit. 2015 – 03 - 01]. Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1962/.
- [17] BUMPUS, J., Biodegradation of Azo Dyes by Fungi. University of Northernlowa. 2004.
- [18] KOGAN, I., Chemie barviv. 1. Vyd. SNTL: Praha, 1960, 742 s.
- [19] VRBOVÁ, T., Víme co jíme? Aneb Průvodce „Éčky“ v potravinách. 2. Vyd. ECOHOUSE, 2001, 268 s., ISBN 80-238-7504-3.
- [20] Zdravá potravina. [online]. [cit. 2015-03-01]. Dostupné z:<http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E102>.
- [21] Food info. [online]. [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://www.food-info.net/uk/colour/azo.htm>
- [22] The UK Food Guide. [online]. [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://www.ukfoodguide.net/enumeric.htm>
- [23] Zdravá potravina. [online]. [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E142>.
- [24] Zdravá potravina. [online]. [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E127>.
- [25] Zdravá potravina. [online]. [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E132>.
- [26] HOLZBECHER, Z., CHURÁČEK, J., Analytická chemie. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1987, 663 s.
- [27] BORKOVCOVÁ, I., KOSTRHOUNOVÁ, R., Studijní materiál: Extrakční metody. [online]. [cit. 2015-04-12]. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/pub-files/realizovane-klicove-aktivity/zs-2013-2014/h3cp1/index/h3cp1---extrakcni-metody---studijni-material-zs-13-14.pdf>.
- [28] Laboratorní technika: Extrakce. [online]. [cit. 2015-04-12]. Dostupné z: <http://lat.zshk.cz/vyuka/extrakce.aspx>.

- [29] CHURÁČEK, J., Analytická separace látek. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 8003005698.
- [30] CASTRO, L., PRIEGO-CAPOTE, F., Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*. 2010, vol. 1217, s. 2383-2389.
- [31] SMITH, R., Before the injection – Modern Methods of Sample Preparation for Separation Techniques. *Journal of Chromatography A*. 2003, vol. 1000, s. 3-27.
- [32] FERENC, A., BIZIUK, M., Solid phase extraction technique – Trends, Opportunities and Applications. *Polish J. of Environ.* 2006, vol. 15, s. 677 – 690.
- [33] POLÁŠEK, M., Hmotnostní spektrometrie. [online]. [cit. 2015-04-12]. Dostupné z: <http://www.njh.cz/seminare/13569848/1270588>.
- [34] ŠTULÍK, K., Analytické separační metody. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [35] ZÝKA, J., Analytická příručka. 2., dopl. a upr. vyd. Praha: SNTL, 1972, 1037 s.
- [36] MIKEŠ, O., Příručka laboratorních chromatografických metod. Praha: SNTL, 1961, 399 s.
- [37] LÁBLER, L., SCHWARZ, V., CÍFKA, J., Chromatografie na tenké vrstvě. Vyd. 1. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1965, 465 s.
- [38] GASPARIČ, J., CHURÁČEK, J., Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin: laboratorní příručka. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1981, 320 s.
- [39] BEYERMANN, K., HOLZBECHER Z., VLÁČIL, F., Organická stopová analýza. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1987, 309 s.
- [40] NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M., Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 1. vyd. Praha, 2013, 235 s., ISBN 978-80-260-4243-31.
- [41] HORÁK, M., PAPOUŠEK, D., Infračervená spektra a struktura molekul: použití vibrační spektroskopie při určování struktury molekul. Vyd. 1. Praha: Academia, 1976, 836 s.
- [42] MILDE, D., Infračervená a ramanova spektrometrie. [online]. [cit. 2015-04-12]. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/im-ir-raman-pdf-1287047361.pdf>.
- [43] Infračervená spektrometrie. [online]. [cit. 2015-04-12]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/lms/Zverze/Infrared.htm>.
- [44] DANLAMI, J., ARSAD, A., ZAINI, M., SULAIMAN, H., A comparative study of various oil extraction techniques from plants. *Reviews in Chemical Engineering*. 2014, s. 605-626.

- [45] QUACH, H., STEEPER, R., GRIFFIN, G., An Improved Method for the Extraction and Thin-Layer Chromatography of Chlorophyll a and b from Spinach. *Journal of Chemical Education*. 2014, vol. 81, s. 385-387.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ESI	elektrosprejová ionizace
MS	mass spectrometry
m/z	hmotnost iontu ku velikosti náboje
p.a.	pro analýzu
TLC	thin-layer chromatography

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Schéma rozdělení přírodních barviv.	13
Obrázek 2. Strukturní vzorec isoprenu.	14
Obrázek 3. Strukturní vzorec lykopenu a β -karotenu.	15
Obrázek 4. Strukturní vzorec luteinu.	16
Obrázek 5. Strukturní vzorce vybraných sloučenin s chinonovým skeletem.	18
Obrázek 6. Strukturní vzorec mauveinu.	20
Obrázek 7. Strukturní vzorec tantrazinu.	21
Obrázek 8. Strukturní vzorec erythrosinu.	22
Obrázek 9. Aparatura pro Soxhletovu extrakci.	25
Obrázek 10. Vyjádření retardačního faktoru.	31
Obrázek 11. Materiál použitý pro analýzu.	34
Obrázek 12. Srovnání acetonového a hexanového extraktu.	40
Obrázek 13. Výsledky TLC analýz extraktů z čerstvého špenátu.	43
Obrázek 14. Výsledky TLC analýz extraktů z čerstvého špenátu.	44
Obrázek 15. Srovnání TLC analýz extraktů z čerstvého a mraženého špenátu.	45
Obrázek 16. ESI-MS spektra extraktu čerstvého a mraženého špenátu.	47

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Přehled chromatografických metod.....	29
Tabulka 2. Seznam použitých mobilních fází.	36
Tabulka 3. Vyjádření retardačních faktorů barviv vyextrahovaných z čerstvého špenátu.	43
Tabulka 4. Vyjádření retardačních faktorů barviv vyextrahovaných z mraženého špenátu.	44
Tabulka 5. Exaktní hmotnosti pozorovaných barviv.....	46

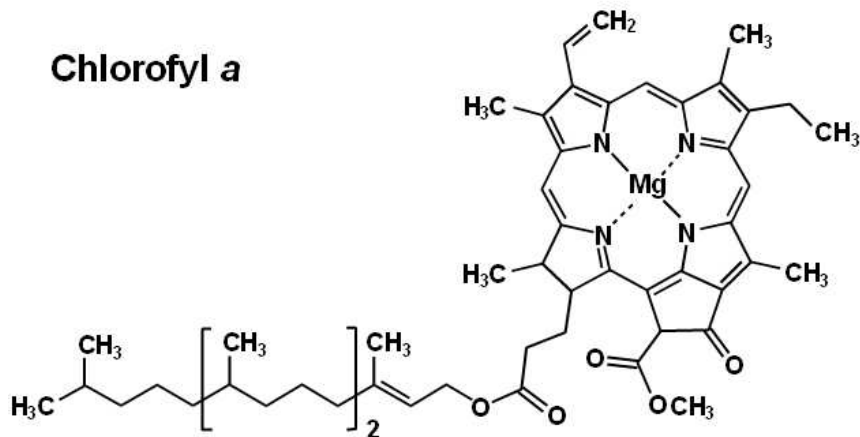
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha PI: Strukturní vzorec chlorofylu *a* a *b*

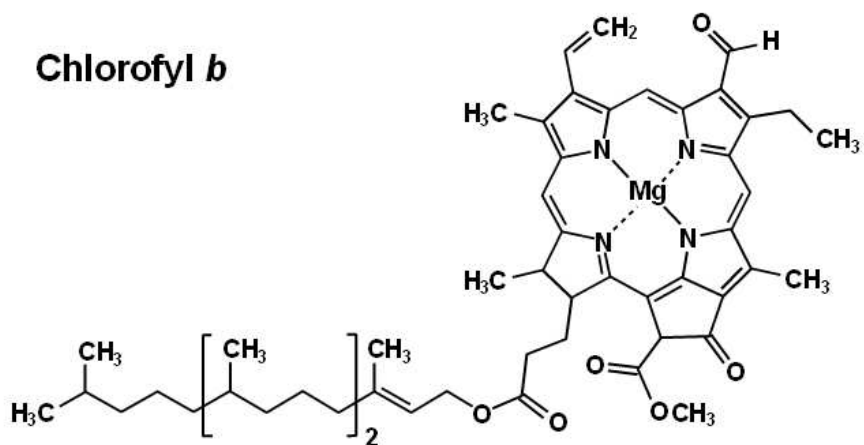
Příloha PII: Hmotnostní spektrometr amaZon X

PŘÍLOHA PI: STRUKTURNÍ VZOREC CHLOROFYLU A A B

Chlorofyl a



Chlorofyl b



PŘÍLOHA PII: HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR AMAZON X

