

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Separace porfyrinových potravinářských barviv kapalinovou chromatografií

Bc. Karin Sokolová

Diplomová práce

2020

UNIVERZITY OF PARDUBICE  
FAKULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Separation of porphyrin food dyes by liquid chromatography

Bc. Karin Sokolová

Diploma thesis

2020

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Karin Sokolová**  
Osobní číslo: **C18558**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Téma práce: **Separace porfyrinových potravinářských barviv kapalinovou chromatografií**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování

1. V teoretické části diplomové práce popište principy kapalinové chromatografie, instrumentaci a vybrané módy separace (fázové systémy). Rešeršně zpracujte téma potravinářských barviv, se zaměřením na barviva přírodní a porfyrinová barviva, včetně jejich analýzy.
2. Proměřte retenční chování vybraných vzorků porfyrinových barviv. Optimalizujte separaci porfyrinových barviv, zaměřte se na výběr stacionární fáze, složení mobilní fáze a gradientovou eluci s cílem dosáhnout co nejlepší separace vzorků.
3. Získaná experimentální data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Pavla Doležánová**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**



L.S.



---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil/a, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Karin Sokolová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala panu Doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za odborné vedení práce, věcné připomínky, dobré rady a vstřícnost při konzultacích diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Pavle Doležánové za pomoc, rady a připomínky při vypracovávání této práce. Zvláštní poděkování patří také mé rodině a přátelům za jejich podporu a pomoc, jak při zpracování diplomové práce, tak po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Diplomová práce je věnována analýze barviva chlorofylinu měďnatého. Analýzy probíhaly za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Cílem práce bylo optimalizovat podmínky chromatografické separace, zjistit vliv iontů kovů na chromatografickou separaci a identifikovat složky vzorku pomocí hmotnostní spektrometrie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

přírodní potravinářská barviva, porfyrinová barviva, chlorofyl, chlorofylin, sodná sůl chlorofylinu měďnatého, kapalinová chromatografie, UV/VIS detekce, hmotnostní spektrometrie

## **ANNOTATION**

The diploma thesis is devoted to the analysis of the copper chlorophyllin dye. Analyzes were performed using high performance liquid chromatography and mass spectrometry. The aim of the work was to optimize the conditions of chromatographic separation, to determine the effect of metal ions on the chromatographic separation and to identify the components of the sample using mass spectrometry.

## **KEYWORDS**

natural food dyes, porphyrin dyes, chlorophyll, chlorophyllin, sodium copper chlorophyllin, liquid chromatography, UV / VIS detection, mass spectrometry

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK .....	11
ÚVOD .....	12
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	13
1.1 Kapalinová chromatografie .....	13
1.1.1 Princip .....	13
1.1.2 Typy kapalinové chromatografie .....	13
1.1.3 Kapalinová chromatografie s chemicky vázanou stacionární fází .....	14
1.1.3.1 Chromatografie s normálními fázemi .....	14
1.1.3.2 Chromatografie s obrácenými fázemi .....	15
1.1.3.3 Iontově výměnná chromatografie .....	15
1.1.3.4 Gelová chromatografie .....	15
1.1.3.5 Afinitní chromatografie .....	15
1.1.3.6 Současné trendy v kapalinové chromatografii .....	15
1.1.4 Instrumentace v kapalinové chromatografii .....	16
Dávkovací systém .....	17
1.1.4.1 Kolony .....	18
1.1.4.2 Detektory .....	18
1.1.4.2.1 Spektrofotometrický detektor .....	18
1.1.4.2.1.1 Detektor diodového pole .....	19
1.1.4.2.2 Ostatní typy detektorů .....	19
1.1.4.2.3 Hmotnostní spektrometr .....	20
1.2 Potravinářská barviva .....	20
1.2.1 Syntetická potravinářská barviva .....	21
1.2.2 Přírodní potravinářská barviva .....	21
1.2.2.1 Rozdělení barviv .....	22
1.2.2.1.1 Karotenová barviva .....	22
1.2.2.1.2 Antokyany .....	23
1.2.2.1.3 Antrachinony .....	23
1.2.2.1.4 Betalainy .....	24
1.2.2.1.5 Tetrapyrrolová (porfyrinová) barviva .....	25
1.2.2.1.5.1 Chlorofyl .....	25



1.2.2.1.5.2	Měďnaté komplexy chlorofylu-chlorofyliny .....	26
1.2.2.1.5.3	Další metalokomplexy chlorofylu .....	27
2	REŠERŠNÍ ČÁST .....	28
2.1	Využití analytické separace chlorofylů .....	28
2.2	Využití analytické separace měďnatých komplexů chlorofylu .....	30
2.3	Využití analytické separace metalokomplexů chlorofylu .....	35
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	37
3.1	Použité přístroje a zařízení .....	37
3.2	Použité chemikálie .....	37
3.2.1	Použité standardy .....	38
3.2.2	Použitý vzorek .....	40
3.3	Pracovní postup .....	40
3.3.1	Příprava roztoků standardů .....	40
3.3.2	Příprava roztoku vzorku .....	40
3.3.3	Příprava standardních roztoků solí s přidanými ionty železa a zinku .....	41
3.3.4	Podmínky měření pomocí HPLC .....	41
3.3.5	Podmínky měření pomocí LC-MS a MS <sup>2</sup> .....	41
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	43
4.1	Určení vlnové délky pomocí UV-VIS spektrometru .....	43
4.1.1	Vliv přidání iontů kovů ke standardům na absorpci .....	43
4.2	Separace pomocí HPLC .....	45
4.2.1	Izokratická eluce .....	45
4.2.2	Gradientová eluce a vliv aditiv mobilní fáze na separaci .....	46
4.2.2.1	Profily gradientů při HPLC separaci standardů, za využití kyseliny mravenčí jako aditiva mobilní fáze .....	47
4.2.2.2	Profily gradientů při HPLC separaci standardů, za využití octanu amonného jako aditiva mobilní fáze .....	48
4.2.2.3	Gradientová eluce HPLC separace vzorku chlorofylinu měďnatého za využití kyseliny mravenčí jako aditiva mobilní fáze .....	48
4.2.2.4	Gradientová eluce HPLC separace vzorku chlorofylinu měďnatého za využití octanu amonného jako aditiva mobilní fáze .....	51
4.2.3	Separace derivátů chlorofylu s přidanými ionty kovů .....	53
4.2.3.1	Vliv různých koncentrací iontů kovů na separaci derivátů chlorofylu .....	56

4.3	Identifikace látek ve vzorku chlorofylinu měďnatého pomocí LC-MS a MS <sup>2</sup> .....	57
4.3.1	Analýza standardů pomocí LC-MS a MS <sup>2</sup> .....	57
4.3.2	Identifikace jednotlivých složek vzorku měďnatého komplexu chlorofylinu pomocí LC-MS a MS <sup>2</sup> .....	58
4.3.3	Identifikace komplexů chlorofylinu s ionty železa a zinku pomocí LC-MS a MS <sup>2</sup> .....	59
5	ZÁVĚR .....	62
	LITERATURA .....	63
	PŘÍLOHA GRAFY .....	69
	PŘÍLOHA TABULKY .....	82

## SEZNAM ZKRATEK

APCI	ionizace za atmosférického tlaku
DAD	detektor diodového pole
DMF	dimethylformamid
EC	elektrochemický detektor
ESI	ionizace elektrosprejem
FLD	fluorescenční detektor
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	spojení kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MS	hmotnostní spektrometrie
MS <sup>2</sup>	tandemová hmotnostní spektrometrie
NP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi
RI	refraktometrický detektor
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi

# ÚVOD

Porfyrinová, neboli tetrapyrrolová barviva, jsou zelená přírodní barviva, jejichž hlavním zástupcem je chlorofyl. Struktura porfyriu je tvořena čtyřmi pyrrolovými skupinami, které jsou symetricky uspořádány a tvoří tzv. porfyrinový kruh. Zdrojem chlorofylinu jsou zelené části rostlin, většinou pak různé trávy či vojtěška. Chlorofyl samotný ovšem podléhá snadné degradaci. Z tohoto důvodu se využívá pro výrobu chlorofylinů, což jsou kovové komplexy chlorofylu, které jsou značně stabilnější. Nejčastěji se využívají měďnaté komplexy chlorofylu. Lze však nalézt také barviva, kde je měď nahrazena jiným kovem, jako například železem, zinkem, či jinými kovy. K analýze měďnatých komplexů chlorofylinu se využívá HPLC s UV/VIS detekcí v systému s obrácenými fázemi, nebo analýzy probíhají za využití spojení LC-MS.

Tato diplomová práce se zabývá analýzou vzorku barviva sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu pomocí HPLC s UV/VIS detekcí. Optimalizace podmínek separace probíhaly za využití standardů, jakožto derivátů chlorofylinu. Při separaci byla jako mobilní fáze použita methanol/voda a bylo využito gradientové eluce. Byla zkoumána také aditiva mobilní fáze – kyselina mravenčí a octan amonný. Část této práce byla věnována vlivu iontů kovů železa a zinku na chromatografickou separaci standardů. Zároveň bylo sledováno, zda tyto ionty dokáží ze struktury chlorofylinu vytěsnit měďnatý iont. Poslední část diplomové práce se zabývala identifikací jednotlivých složek ve vzorku sodné soli chlorofylinu měďnatého.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Kapalinová chromatografie

Termín chromatografie byl poprvé použit v souvislosti s experimenty, prováděnými v letech 1903 a 1904<sup>[1]</sup>. U zrodu kapalinové chromatografie (LC) stál v těchto letech ruský botanik Tswett. Ten roku 1906 vydal článek, ve kterém popisoval metodu separace rostlinných pigmentů. K největšímu rozmachu chromatografie však dochází až od 30. let 20. století<sup>[2]</sup>.

### 1.1.1 Princip

Chromatografie jako taková patří dnes k jedním z nejmocnějších nástrojů analytické chemie. Jedná se o separační metodu, při které jsou jednotlivé složky směsi rozděleny mezi dvě fáze, stacionární a mobilní. Separace může probíhat na základě adsorpce jednotlivých molekul na povrch stacionární fáze, nebo mohou být absorbovány póry stacionární fáze. Další možností je pak vazba na kapalinu zakotvenou na stacionární fázi<sup>[1]</sup>. Látka procházející kolonou, je tedy rozdělena na základě molekulárních sil, existujících mezi separovanou látkou a jednotlivými fázemi. Na základě velikosti těchto sil mezi stacionární fází a molekulami analytu jsou poté jednotlivé molekuly zadržovány na stacionární fázi<sup>[3]</sup>. Jednotlivé molekuly jsou zadržovány na koloně po různě dlouhou dobu. Důsledkem toho separované složky analytu opouštějí kolonu v různých časech, tyto časy nazýváme retenční časy a jsou kvalitativním parametrem<sup>[1]</sup>.

Nezákladnějším rozdělením kapalinové chromatografie je podle uspořádání stacionární fáze. Podle toho ji dělíme na papírovou (tenkovrstvou) a kolonovou. Co se týče kolonové chromatografie, mluvíme dnes výhradně o vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC z ang. High Performance Liquid Chromatography), která nabízí lepší selektivitu a rozlišení než tradiční kolony<sup>[4]</sup>.

### 1.1.2 Typy kapalinové chromatografie

Kolonová kapalinová chromatografie se zpravidla dělí podle druhu stacionární (respektive mobilní) fáze. Stacionární fáze jsou stabilní fáze a mohou být kapalné nebo pevné. V případě kapalných stacionárních fází se jedná buď o nemísitelné kapaliny, kapalné filmy zakotvené na pevných nosičích nebo organické vrstvy chemicky vázané na pevné nosiče. Mluvíme-li pak o pevných fázích, jsou to zpravidla anorganické látky jako oxid křemičitý a oxid hlinitý nebo organické porézní polymery. Mobilní fáze jsou organická rozpouštědla<sup>[4]</sup>.

Existují však také speciální stacionární fáze, které mají adsorpční charakter. Toho využívá adsorpční kapalinová chromatografie. Jako stacionární fáze se využívá materiálů s velkým specifickým povrchem, jako je silikagel, alumina či oxid hořečnatý. Díky svému speciálnímu

povrchu je využívána především při dělení optických izomerů. Touto metodou je možné rozdělit látky s molární hmotností do 1000 g/mol<sup>[2][5]</sup>.

Dalším specifickým případem je rozdělovací kapalinová chromatografie. Jedná se o chromatografii v systému kapalina-kapalina. Principem je přítomnost dvou nemísitelných kapalin, mezi kterými probíhá distribuce jednotlivých molekul. V chromatografii s normálními fázemi je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. Stacionární fáze může být umístěna na různých nosičích, v závislosti na polaritě stacionární fáze (viz kapitola 1.1.3.1). Rozdělovací kapalinová chromatografie je využívána pro separaci tepelně citlivých a netěkavých látek, jako jsou například aminokyseliny. Lze ji také využít pro dělení řad homologů a lze separovat látky s molárními hmotnostmi v řádech několika tisíců<sup>[2][6]</sup>.

Adsorpční a rozdělovací chromatografie se již příliš nevyužívají, v současné době nabývá na významu chromatografie s chemicky vázanými stacionárními fázemi.

### **1.1.3 Kapalinová chromatografie s chemicky vázanou stacionární fází**

Většina aplikací kolonové LC je prováděna na silikagelu, který je chemicky modifikován. Tato modifikace spočívá v reakci mezi silanolovými skupinami a vazbami chlorsilanu. Uhlovodíkové části molekul chlorsilanu pak určují charakteristiky stacionárních fází. Využívají se silany, které obsahují dlouhé uhlíkové řetězce, počet uhlíků v těchto řetězcích je mezi 8 a 22. Tato struktura má hydrofobní charakter, mohou na ni být však navázány polárnější skupiny jako hydroxylové, aminové nebo kyanoskupiny. Kolony tvořené náplněmi z dlouhých uhlovodíkových řetězců se využívají ve chromatografii s obrácenými fázemi. Náplně s polárnějšími skupinami pak pro systémy s normálními fázemi, ale také pro systémy s obrácenými fázemi. Dalšími typy s chemicky vázanou stacionární fází jsou iontová a gelová chromatografie<sup>[4][7]</sup>.

#### **1.1.3.1 Chromatografie s normálními fázemi**

Kapalinová chromatografie s normálními fázemi (také normální LC, NP-HPLC) je založená na klasických principech kapalinové kolonové chromatografie. Separace probíhá mezi polární stacionární fází a nepolární mobilní fází. Jak už bylo zmíněno, využívá kolon tvořených silikagelem, nebo kolon s chemicky vázanými stacionárními fázemi. Tedy kolon, tvořených silikagelem nebo aluminou, jejichž alkylové řetězce nesou navázané polární funkční skupiny, jako jsou hydroxyskupiny, aminoskupiny a kyanoskupiny.

Principem separace je dělení složek směsi na základě jejich afinit k polárním skupinám stacionární fáze. Nejdříve tedy budou eluovány molekuly s nejnižší polaritou. Eluční síla mobilní fáze se zvyšuje s její polaritou. Látky jako uhlovodíky mají malou eluční sílu. Mezi nejúčinnější rozpouštědla, která lze použít jako mobilní fází v systému s normálními fázemi, jsou dichlormethan, tetrahydrofuran, acetonitril a popřípadě methanol<sup>[4][7]</sup>.

### 1.1.3.2 Chromatografie s obrácenými fázemi

Chromatografie s obrácenými fázemi (také reverzní LC, RP-HPLC) využívá k separaci nepolární stacionární a polární mobilní fázi. Stacionární fáze je tvořena silikagelem s navázaným dlouhým uhlíkatým řetězcem, jako je například oktadecylsilyl, nebo také homogenní polymery jako polystyren-divinylbenzen. Mobilní fáze je polární rozpouštědlo. Voda je nejslabší mobilní fáze a poskytuje nejlepší retenci. Eluční síla roste přes methanol, acetonitril k tetrahydrofuranu<sup>[4][7]</sup>.

### 1.1.3.3 Iontově výměnná chromatografie

Stacionární fáze v chromatografii iontové výměny je tvořena porézním materiálem, na jehož povrchu jsou navázány skupiny, které obsahují kationtové nebo aniontové výměnné skupiny. Separovat lze organické i anorganické látky, které obsahují ionty. Výměna kationtů probíhá na katexech, výměna aniontů na anexech. Katexy většinou obsahují sulfonátové výměnné skupiny, anexy pak amoniové výměnné skupiny<sup>[8]</sup>. Separace zde probíhá na základě stupně disociace složek analytu a jeho afinity k iontovým skupinám přítomných ve stacionární fázi. Mobilní fáze je většinou vodný pufr. Separaci lze snadno ovlivnit hodnotou pH a teplotou<sup>[2]</sup>.

### 1.1.3.4 Gelová chromatografie

Gelová (někdy také vylučovací) chromatografie využívá při separaci různé velikosti molekul analyzované látky. Stacionární fáze je polymer na bázi gelu, který má různě velké póry. Menší molekuly jsou pak zadržovány na stacionární fázi déle, než molekuly velké. Separace může probíhat ve vodných systémech, kde jsou separovány molekuly ve vodě rozpustných makromolekul, a jedná se o gelovou filtraci. Probíhá-li separace v nevodných systémech, mluvíme o gelové permeační chromatografii. Tuto metodu lze také využít při určování molárních hmotností<sup>[2][9]</sup>.

### 1.1.3.5 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie byla vytvořena za účelem zvýšení selektivity jednotlivých metod. Patří zde iontově výměnná chromatografie (viz kapitola 1.1.3.3) a bioafinitní chromatografie. Principiálně se jedná o adsorpční chromatografii, která je založena na schopnosti biologicky aktivních látek vázat na sebe z analyzovaného vzorku odpovídající molekuly. Tyto biologicky aktivní látky nazýváme ligandy a většinou to bývají komplexy enzymů a jejich inhibitorů, substráty, nebo třeba komplexy nukleových kyselin. Využívá se pro izolaci řady biomolekul, jako jsou enzymy, jejich inhibitory a kofaktory, polysacharidy, nukleové kyseliny nebo třeba hormony<sup>[2][10]</sup>.

### 1.1.3.6 Současné trendy v kapalinové chromatografii

V současnosti roste snaha zkrátit dobu analýzy, a zároveň příliš nesnížit účinnost chromatografické separace. Toho lze docílit jak zkrácením kolon, tak zmenšením částic sorbentu.

Z původních 25 cm se dnes kolony zkracují až na 5 cm, dostupné jsou však i kolony s délkou 2 cm, případně ještě kratší. Co se týče náplní kolon, dříve byly dostupné náplně s průměrem částic 5  $\mu\text{m}$ , dnes jsou nejpoužívanější částice o průměru 3  $\mu\text{m}$ , dostupnější se ale stávají také částice s průměrem pod 2  $\mu\text{m}$ . Použitím krátkých kolon s malými průměry částic lze dobu analýzy zkrátit až na 1-2 min, a to bez ztráty jejich účinnosti.

Dochází také ke zmenšování průměru kolon, což má za následek snížení množství použité mobilní fáze a vzorku. Proto jsou tyto kolony šetrnější, a to jak ekonomicky, tak ekologicky. Z úplně původních kolon o průměru 4,6 mm, došlo ke zmenšení na dnes už komerčně dostupné analytické kolony s průměrem 1 mm a kapilární kolony s průměry v řádech stovek  $\mu\text{m}$ .

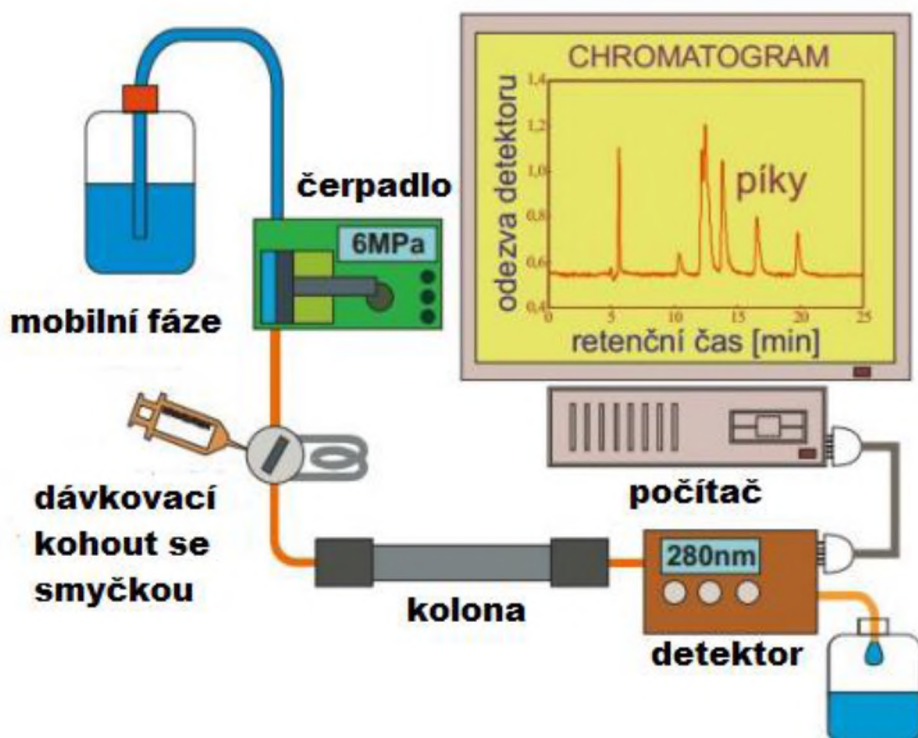
Na zlepšení chromatografických separací mají vliv také náplně kolon. Vedle klasických porézních částic silikagelu, jsou dnes využívány také částice neporézní, nebo povrchově porézní. Neporézní a povrchově porézní stacionární fáze jsou nanášeny na povrch neprostupných mikročástic. Jejich použitím při separaci pak dochází ke zvýšení rychlosti přenosu hmoty. Vůbec nejlepší kolonou je kolona monolitická. Neobsahuje velké množství zrn, ale je zhotovena z jednoho kusu porézního materiálu. To této koloně dává výjimečné vlastnosti, rychlost přenosu hmoty je velmi vysoká a doba separace je značně kratší. Z tohoto důvodu se využívá tam, kde je třeba rychlých separací<sup>[11]</sup>.

Chromatografie s obrácenými fázemi je často využívána k separaci homologických řad a látek s nízkou polaritou. Většina separací se dnes provádí v systému s obrácenými fázemi<sup>[4]</sup>.

#### **1.1.4 Instrumentace v kapalinové chromatografii**

Kapalinový chromatograf se v podstatě skládá z následujících částí: zařízení pro manipulaci s mobilní fází, dávkovacího systému, kolony (popřípadě systému kolon) a přístroje pro detekci<sup>[2]</sup>. Schéma kapalinového chromatografu je uvedeno na obrázku 1.





**Obrázek 1** Schéma kapalinového chromatografu

### **Dávkový systém**

Dávkový systém se skládá ze zásobníku mobilní fáze, filtru a čerpadla mobilní fáze. Dávkové systémy jsou dnes spolehlivé, již plně automatické s možností dávkovat samostatně více vzorků za sebou. To zaručuje, že systémy mohou pracovat i 24 hodin denně<sup>[2]</sup>.

Funkcí čerpadel je čerpání mobilní fáze. Využívají se čerpadla pístová či membránová. Čerpadla pro klasickou kapalinovou chromatografii čerpají mobilní fázi při tlaku do 40 MPa a měly by dosahovat průtoků v rozsahu od mikrolitrů po deset mililitrů mobilní fáze za minutu. Zhotoveny jsou pak z nerezové oceli, plastu či keramiky.

Co se týče dávkovacích zařízení, v dnešní době se již upustilo od dávkování klasickou injekční stříkačkou přímo na kolonu. Eliminovaly se tak problémy s kolísáním tlaku a zanášením nečistot při dávkování. Klasické injekční stříkačky byly nahrazeny šesticestným ventilem. Jsou zhotoveny z inertních materiálů, jako je nerezová ocel či polymerní materiály.

Součástí chromatografu může být také směšovací zařízení, které umožňuje měnit složení mobilní fáze. Pokud složení mobilní fáze zůstává neměnné, mluvíme o izokratické eluci. Pro zvýšení účinnosti separace je výhodné měnit složení mobilní fáze v průběhu separace. V takovém případě mluvíme o gradientové eluci. Lze tedy naprogramovat zařízení tak, aby se složky mobilní fáze měnily v různých poměrech<sup>[12]</sup>.

#### 1.1.4.1 Kolony

Separace pak následně probíhá na koloně. Aby se zabránilo případnému zanešení kolony nečistotami, může být do systému ještě připojena předkolonka. Kolony jsou plněny sorbentem, a jsou tvořeny z odolných materiálů, které odolávají vysokým tlakům.<sup>[2]</sup> Materiálem kolony je obvykle nerezová ocel. Jak už bylo zmíněno, náplní kolon bývá silikagel, alumina, nebo chemicky modifikované sorbenty.

Pro různé aplikace lze pak použít kolony různé délky, průměru a s různými sorbenty. Pro rutinní separace se využívají klasické kolony s délkou 10-25 cm a průměrem 2-4,6 mm. Pro urychlení separace jsou pak využívány kolony kratší, s délkou 5 cm. Pro zvýšení účinnosti separace se využívají kolony s malým vnitřním průměrem 1-2 mm<sup>[11][12]</sup>.

#### 1.1.4.2 Detektory

Výběr správného detektoru je pro analýzu velmi důležitý. Detektor by měl být vysoce citlivý, selektivní a měl by mít široký lineární rozsah. Preferují se pak nedestruktivní detektory s malými detekčními celami.<sup>[2]</sup> Klasické detektory pracují na principu absorpce světla v UV a viditelné oblasti, na principu fluorescence, využívají se detektory diodového pole, nebo se měří index lomu. Dnes jsou komerčně dostupné také přístroje s elektrochemickými detektory a velmi využívané jsou systémy HPLC spojené s hmotnostním spektrometrem.<sup>[2][13]</sup>

##### 1.1.4.2.1 Spektrofotometrický detektor

Jedním z nejpoužívanějších detektorů je dnes určitě spektrofotometrický UV/VIS detektor. Ten vykazuje vysokou citlivost pro většinu analyzovaných látek, podmínkou však je jejich absorpce záření v UV, popřípadě ve viditelné oblasti. S dnešními moderními technikami je však možné analyzovat také látky s velmi nízkou absorpční, stejně tak lze stanovovat také malá (stopová) množství vzorku<sup>[14]</sup>.

Princip UV/VIS detektoru je založen na měření množství monochromatického záření, které daný analyt absorboval. Na detektoru se tedy měří úbytek záření, způsobený absorpcí vzorkem po jeho průchodu chromatografickou kolonou.

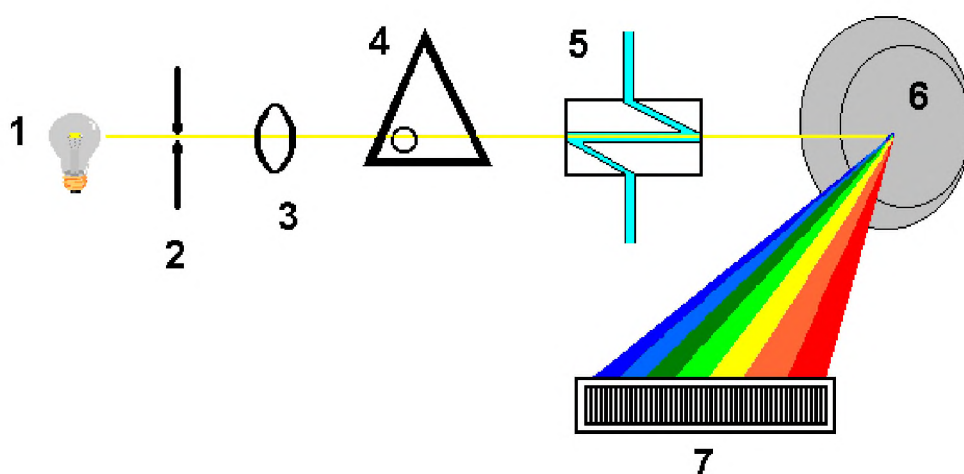
UV/VIS detektor se skládá celkem ze tří částí. První část je zdroj monochromatického záření. Zdrojem záření je lampa, která emituje záření v širokém rozsahu vlnových délek. Monochromátor pak z celého tohoto spektra vybírá jednu určitou vlnovou délku.

Další částí detektoru je průtoková cela. Ve většině komerčních přístrojů se používá průtoková cela typu „Z“. Jedná se o tenkou trubici s průměrem kolem 1 mm a s délkou 1 cm, jejíž konce jsou opatřeny křemennými okénky.

Poslední částí je detekční zařízení, které měří změny intenzity záření, vycházejícího z průtokové cely. Jedná se buď o fotodiodu, nebo o fotonásobič, jejichž funkcí je záznam signálu. Ten je posléze zesílen a převeden do záznamového zařízení či počítačového integrátoru. Schéma UV/VIS detektoru je uvedeno na obrázku 2.

Záznam detektoru se nazývá chromatogram, signál je po integraci zaznamenán ve tvaru píků. Píky pak odpovídají jednotlivým složkám vzorku, které byly separovány na koloně. Z plochy píku (popřípadě výšky píku) lze stanovit množství jednotlivých složek ve vzorku<sup>[13]</sup>.

UV/VIS detektor má široké využití. Velké množství sloučenin absorbuje v UV/VIS oblasti, což z něj dělá první volbu pro většinu chromatografických separací<sup>[2]</sup>. Podmínkou absorpce je však přítomnost absorbujících funkčních skupin v molekule. UV/VIS detektor je spolehlivý a není příliš drahý. Je selektivní, avšak ve srovnání s fluorescenčním detektorem méně citlivý<sup>[13]</sup>.



**Obrázek 2** Schéma UV/VIS detektoru

1 - Zdroj záření, 2, 3, 4 - monochromátor, 5 - průtoková cela typu „Z“, 6 - difrakční mřížka, 7 - fotodiodové pole

#### 1.1.4.2.1.1 Detektor diodového pole

Detektor diodového pole (DAD-z angl. Diode-array detectors) je dalším fotometrickým detektorem. Na rozdíl UV/VIS detektoru, kde se volí pouze jedna vlnová délka, využívá celé spektrum vlnových délek. Záření ze zdroje tedy prochází přímo detekční celou a následně je rozptýleno na difrakční mřížce. Odtud záření dopadá na velké množství fotodiod, tzv. diodové pole. To je tvořeno 500-600 citlivými fotodiodami, umístěnými ve stejných vzdálenostech od sebe. Jednotlivé fotodiody pak odpovídají jednotlivým vlnovým délkám. Signály z jednotlivých fotodiod jsou zaznamenány, a následně je vygenerováno celé spektrum analyzované látky najednou<sup>[13][14]</sup>.

#### 1.1.4.2.2 Ostatní typy detektorů

Mezi nejcitlivější detektory, využívané pro HPLC analýzy patří fluorescenční detektor (FLD). Jeho princip je založen na excitaci molekuly a následné emisi záření, které se měří.<sup>[15]</sup> Emitované záření je pak přes filtr či monochromátor vedeno na fotodiodu. Signál je pak dále převeden do záznamového zařízení<sup>[15]</sup>. FLD lze použít pro molekuly, které vykazují fluorescenci.

U nefluoreskujících sloučenin lze pak využít tvorby jejich fluoreskujících derivátů. Ve srovnání s UV/VIS detektorem je FLD citlivější a také selektivnější<sup>[2]</sup>.

Refraktometrický detektor (RI) je nejuniverzálnějším detektorem, používaným v HPLC. Lze jím detekovat jak anorganické, tak organické ionty, a to na základě rozdílu indexu lomu mezi stanovovanou látkou a čistou mobilní fází. Uplatňuje se také v iontové chromatografii<sup>[13][16]</sup>. RI je detektor univerzální, avšak málo citlivý. Z tohoto důvodu se využívá na stanovení těch látek, které nelze stanovit jinou metodou<sup>[2]</sup>.

Dalším využívaným detektorem je elektrochemický detektor (EC). Nejjednodušší elektrochemické detektory pro HPLC analýzy obsahují elektrody, zhotovené z ušlechtilého kovu. Obvyklými pracovními elektrodami jsou argentochloridové elektrody (Ag/AgCl), v kombinaci se standardní vodíkovou elektrodou jako srovnávací a pomocnou elektrodou. Analýzy s EC detektory dnes nachází široké využití v biochemických analýzách, např. analýza indolů, katecholaminů a jejich metabolitů<sup>[2][17]</sup>.

### 1.1.4.2.3 Hmotnostní spektrometr

Spojení HPLC a hmotnostní spektrometrie (MS) je dnes už rutinní záležitostí. K největšímu rozvoji metody došlo v posledních dvaceti letech. Nejdříve bylo nutno odstranit řadu problémů, se kterými se tato metoda potýkala. Problémy nastávaly s ionizací molekul, obsažených v eluátu, a jejich následným převedením do hmotnostního spektrometru, který pracuje za vysokého vakua. Metoda HPLC-MS využívá především dva způsoby ionizace. Prvním je ionizace elektrosprejem (ESI) a druhým je ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Po ionizaci jsou ionty převedeny do hmotnostního analyzátoru. Tím je obvykle kvadrupól, iontová past či analyzátor doby letu.<sup>[13]</sup> Pro zvýšení selektivity je pak možno zařadit několik analyzátorů za sebou. Taková metoda se nazývá tandemová hmotnostní spektrometrie (MS<sup>2</sup>). MS je dnes nejvyužívanějším detektorem. Je také standardním detektorem v bioanalytické chemii, při sledování vazeb léčiv na biologické organismy a je také nepostradatelný ve strukturální analýze<sup>[14]</sup>.

## 1.2 Potravinářská barviva

V současné době je přidávání barviv do jídel zcela běžnou záležitostí. Bylo prokázáno, že atraktivně barevné potraviny stimulují chuť k jídlu víc, než ty nebarevné. Existuje také vztah mezi očními a chuťovými nervy. Dalším účelem potravinářských barviv je poskytnout větší škálu produktů, čehož se využívá především v cukrářském průmyslu. Používání potravinářských barviv má však také svá omezení. Především nesmí být barviva používána za účelem maskování nekvalitních, či dokonce zkažených potravin. Dále pak musí být barviva velmi stabilní. Musí být teplotně stálá a to jak při vysokých, tak při velmi nízkých teplotách. Musí být odolná vůči

kyselinám a kyslíku, v neposlední řadě pak musí barvivo odolávat také dlouhodobému vystavení světlu<sup>[18]</sup>.

Obecně všechny přídatné látky nesou označení E, následované trojčíslím. U potravinářských barviv je to konkrétně E 100 - E 182. Jako příklad lze uvést kurkumin (E 100), chinolinovou žluť (E 104), chlorofyly a chlorofyliny (E 140), karamel (E 150a) nebo třeba karoteny (E 160a).

Existují však potraviny, do kterých se potravinářská barviva přidávat nesmějí. Jedná se o potraviny určené pro výživu kojenců, minerální a pramenité balené vody, mléko, oleje a tuky, vejce a vaječné produkty, mouky, škroby, cukry, ovocné a zeleninové šťávy a nektary, maso a ryby, med a další. Zakázáno je taky přidávání barviv do nezpracovaných potravin<sup>[19]</sup>.

### 1.2.1 Syntetická potravinářská barviva

Syntetická barviva se vyrábějí chemickou syntézou. Zvláštní skupinu barviv pak tvoří anorganické pigmenty (neboli laky). Ty se získávají buďto synteticky, v tom případě se jedná o oxidy a hydroxidy železa, nebo se získávají z přírodních zdrojů, jako je vápenec, oxid titaničitý a další<sup>[19]</sup>. Syntetická barviva mají hned několik výhod. Jsou stabilní vůči změnám pH, vůči kyslíku i dlouhodobému působení světla. Jejich barva zůstává jednotná, a jsou také vysoce odolná vůči působení mikrobů. Náklady na syntézu těchto barviv jsou velmi nízké.

Velkou nevýhodou je pak jejich toxicita. Ta se projevuje hlavně u dětí. Mnoho potravinářských barviv je kontrolováno a v některých částech světa i zakázáno<sup>[20]</sup>. Jako příklad syntetických potravinářských barviv lze uvést Tantrazin (E 102), Žluť SY (E 110), Camoisin (E 122), Ponceau 4R (E 124), Červeň Allura (E 129) nebo Chinolinová žluť (E 104). Při použití zmíněných barviv, musí být na obale přítomen štítek, který upozorňuje na nepříznivé vlivy na chování dítěte<sup>[20][21]</sup>.

### 1.2.2 Přírodní potravinářská barviva

Spotřebitelé v dnešní době preferují potraviny obsahující barviva přírodní, před těmi, které obsahují syntetická barviva. Ty mohou mít škodlivé vedlejší účinky při jejich konzumaci, a proto se i výrobci zaměřují na výrobu potravin, obsahujících přírodní barviva. Vzhledem k tomu, že syntéza přírodních barviv je složitá, je i jejich cena velmi vysoká, ve srovnání s dostupnými syntetickými barvivami. Navíc jsou přírodní barviva relativně nestabilní<sup>[22]</sup>. Je tedy zřejmé, že nahrazování syntetických barviv přírodními není snadné. Přírodní barviva nejsou tak čistá jako ta syntetická, obsahují další složky jako proteiny či cukry. Je tedy potřeba větší množství těchto barviv, což má poté za následek zvýšení nákladů a navíc může docházet k chemickým, či fyzikálním změnám konečného produktu. Například nízké pH barviv může způsobit inverzi cukrů, a to pak vede k lepivosti výrobků. Chemické mechanismy u některých barviv zase způsobují blednutí. U karotenoidů dochází k oxidaci, u antokyanů zase k hydrataci

a oxidaci. U chlorofylů pak může dojít k oxidaci iontů kovů. Všechny tyto chemické reakce jsou pak navíc umocňovány působením světla. V současné době se mnoho studií věnuje zamezení dopadu těchto vlivů na výsledné potravinové produkty. Navzdory vysoké ceně stále roste poptávka po potravinách, obsahujících přírodní barviva<sup>[21]</sup>.

Co se týče výroby barviv, využívají se přírodní zdroje. Nejčastěji jsou barviva extrahována z rostlinných materiálů, využívá se však také extraktů z řas, sinic či hub. Konečně lze využít pro extrakci barviv také hmyz. Barviva mohou být rozpustná ve vodě či tucích. Pro hydrofilní barviva se jako rozpouštědla využívá voda, nebo nižší alkoholy. Pro barviva rozpustná v tucích jsou to pak povolená organická rozpouštědla<sup>[23]</sup>.

### **1.2.2.1 Rozdělení barviv**

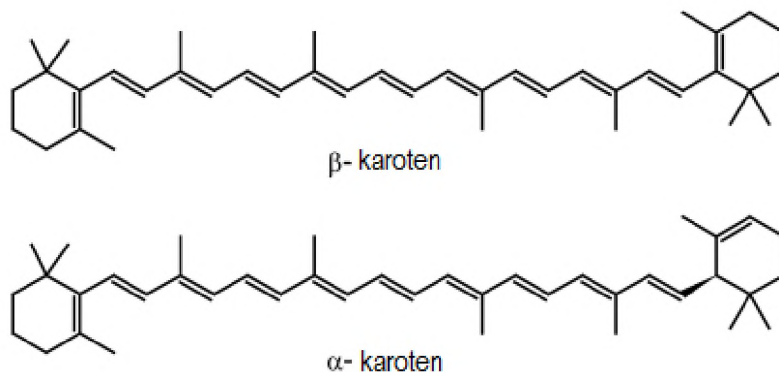
Zdroje pro výrobu přírodních barviv jsou velmi rozmanité. Stejně tak je rozmanitá i struktura jednotlivých barviv. Podle struktury je můžeme rozdělit do několika skupin:

- tetrapyrroly
- tetraterpenoidy
- flavonoidy
- antrachinony
- betalainy

Zástupcem tetrapyrrolů je chlorofyl, jehož zdrojem jsou všechny vyšší rostliny. Zástupcem tetraterpenoidů je karotenové barvivo, které je také obsaženo ve vyšších rostlinách. Jeho zdrojem je také většina ovoce. Antokyany jsou zástupci flavonoidů, a jejich zdrojem je většina bobulovitých plodů. Hlavním zástupcem antrachinonů je karmín. Zdrojem barviva betalainu je červená řepa<sup>[24]</sup>.

#### **1.2.2.1.1 Karotenová barviva**

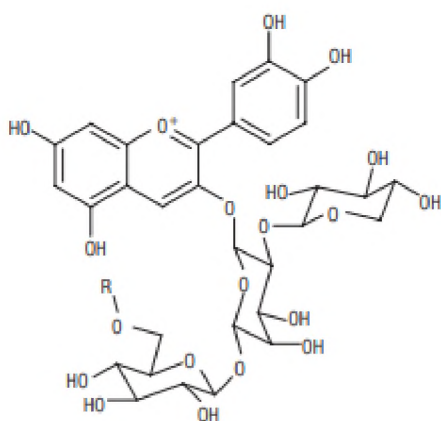
Karotenová barviva (neboli karotenoidy) jsou barviva rozpustná v tucích. Jedná se o žlutooranžové až červené barvivo. Zdrojem karotenoidů jsou všechny vyšší rostliny. Nejlepším zdrojem jsou plody olejových palem. Do karotenoidů řadíme dvě barviva. Prvním je karoten, jehož struktura je tvořena atomy uhlíku a vodíku. V rostlinách spolu koexistuje hned několik forem karotenoidů, převládají pak karoteny  $\alpha$  a  $\beta$  (v poměru 2:3). Struktury  $\alpha$  a  $\beta$  karotenu jsou uvedeny na obrázku 3. Druhým barvivem je xantofyl, tvořený atomy uhlíku, vodíku, kyslíku a je žluté. Karotenoidy jsou rozsáhlou třídou přírodních barviv, bylo identifikováno přibližně 750 struktur<sup>[23]</sup>.



**Obrázek 3** Struktura  $\alpha$  a  $\beta$  karotenu

### 1.2.2.1.2 Antokyany

Antokyany jsou ve vodě rozpustná barviva. Jako přírodní potravinářská barviva mají obrovský potenciál, vzhledem k jejich různorodé barevnosti. Jsou to barviva oranžová, červená a fialová. Jak již bylo zmíněno, patří do skupiny flavonoidů, což jsou sloučeniny fenolu. Konkrétně se pak jedná o glykosidy polyhydroxy – a polymethoxyderivátů 2-fenylbenzopyrylových solí. Nejcennějším zdrojem acylovaných antokyanů je červené zelí. Obsahuje až 15 druhů antokyanů, což umožňuje použití široké barevné škály. Typické jsou odstíny fialové, při nižším pH také odstíny modré. Dalším velmi ceněným zdrojem je černá mrkev. Barviva připravovaná z extraktu z černé mrkve mají jahodově červené odstíny a jsou také možnou alternativou k barvivu karmin. Na obrázku 4 je znázorněna struktura antokyanu v černé mrkvi<sup>[25]</sup>.

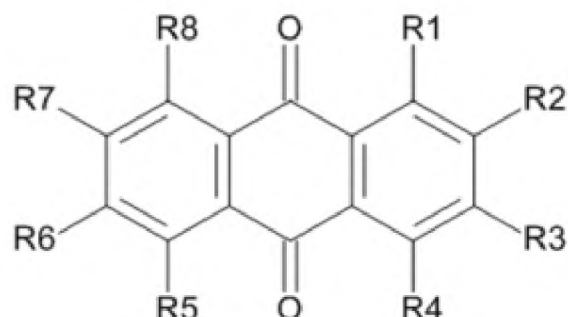


**Obrázek 4** Struktura barviva atokyanu v černé mrkvi

### 1.2.2.1.3 Antrachinony

Deriváty antrachinonu patří do skupiny žlutých a červených barviv. Jejich zdrojem jsou obvykle rostliny čeledi mořenovitých, bobovitých, liliovitých a dalších. Karmín, který je hlavním zástupcem antrachinonů, je komplex kyseliny karmínové s různými kovy. Obvyklým kovem je hliník. Poměr hliníku ke kyselině karmínové pak tvoří širokou škálu barev od světle červené

(jahodové) po tmavě fialovou (černý rybíz). Co se týče struktury, deriváty antrachinonu jsou deriváty 9, 10-dioxoantracenu. (obrázek 5) Antrachinony však neabsorbují záření, a jsou tedy nebarevné. Bavíme-li se o antrachinonových barvivech, jedná se konkrétně o 9, 10-hydroxyantrachinony. Vodíky jsou nahrazeny různým počtem hydroxylových skupin v různých polohách<sup>[26]</sup>.

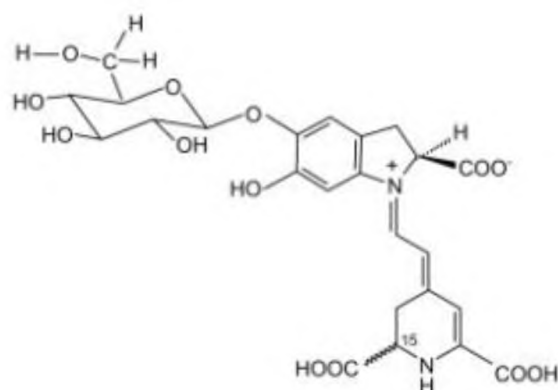


**Obrázek 5** Základní struktura antrachinonu

#### 1.2.2.1.4 Betalainy

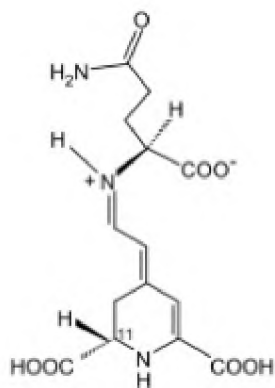
Betalainy jsou přírodní barviva, jejichž zdrojem jsou rostliny. Konkrétně jsou to pak rostliny rodu hvozdíkotvarých, červená a žlutá řepa, amarant, pichlavá hruška a další. Hlavním zdrojem je červená řepa, která obsahuje dva hlavní pigmenty. Prvním je betanin, což je červený betacyanin (obrázek 6), druhým je vulgaxantin, což je žlutý betaxantin (obrázek 7)<sup>[27]</sup>.

Betalainy jsou ve vodě rozpustné dusíkaté pigmenty. Podle chemické struktury je lze rozdělit na dvě hlavní skupiny: červeno-fialové betacyaniny, nebo žluté betaxanthiny<sup>[27][28]</sup>. Základem struktury betacyaninů je kyselina betalamová, jejíž reakcí s aminokyselinou cyklo-DOPA (5, 6-dihydroxyindolin-2-karboxylová kyselina) vzniká betanidinový aglykon. Ten je obvykle v konjugaci s glukózou (nebo také jiným sacharidem) a může být dále modifikován esterifikací kyselin. Co se týče struktury betaxantinů, jejich základem je také kyselina betalamová, která je v konjugaci s aminokyselinami či aminy<sup>[28]</sup>.



**Obrázek 6** Struktura betaninu





**Obrázek 7** Struktura vulgaxantinu

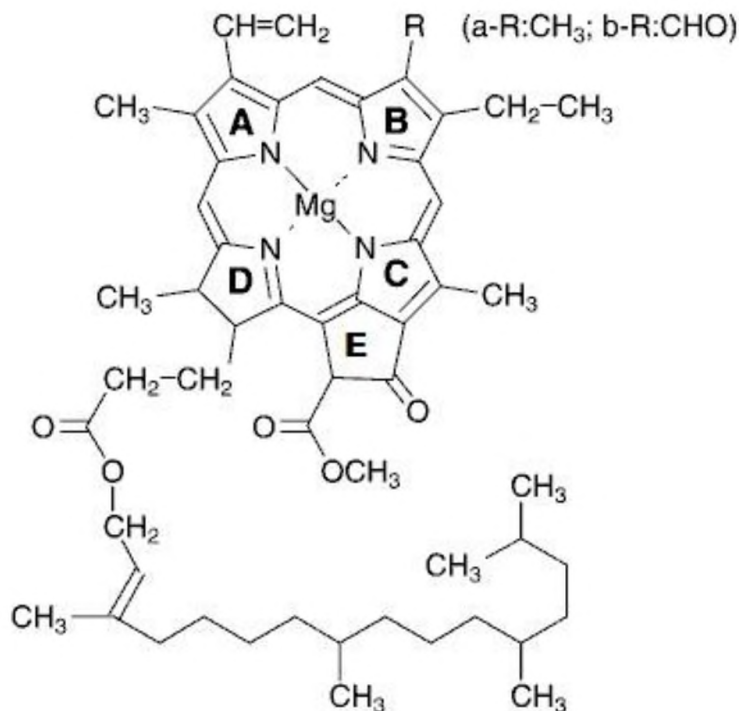
### 1.2.2.1.5 Tetrapyrrolová (porfyrinová) barviva

Jak už bylo zmíněno, hlavním zástupcem tetrapyrrolových barviv je chlorofyl, a je to barvivo zelené. Je ale velmi nestálý a podléhá tak velmi rychlé degradaci. Z tohoto důvodu spadají do této skupiny barviv také chlorofyliny, což jsou deriváty chlorofylu, které jsou značně stabilnější<sup>[29]</sup>.

#### 1.2.2.1.5.1 Chlorofyl

Chlorofyl je nejrozšířenějším přírodním pigmentem. Vyskytuje se v listech a dalších částech rostlin a jeho hlavní funkcí je fotosyntéza. Existuje několik typů chlorofylu, z nichž nejvýznamnější je chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. V rostlinách koexistují přibližně v poměru 3:1, kdy chlorofyl *a* převažuje. Zároveň má modřejší odstín a je méně stabilní.

Co se týče struktury chlorofylu (obrázek 8), jejím základem jsou celkem čtyři pyrrolové skupiny. Ty jsou symetricky uspořádány a tvoří tzv. porfyrinový kruh. Na ten jsou navázány čtyři pětičlenné cykly (A, B, C, D) a vzniká tzv. formin. Připojením posledního cyklu (E), několika funkčních skupin a zavedením hořčíku do středu struktury vzniká chlorofyl. Chlorofyly *a* a *b* se od sebe liší substituentem, kdy v případě chlorofylu *a* je substituentem methylová skupina, u chlorofylu *b* formyl<sup>[29]</sup>.



**Obrázek 8** Struktura chlorofylu

Jak již bylo zmíněno, zdrojem chlorofylu jsou zelené části rostlin. Každý list však obsahuje přibližně jen 0,3 %. Při komerční výrobě je první volbou vojtěška či tráva. Snadno se suší, jsou levné, dostupné a mají nízký obsah enzymu chlorofylázy, který je pro chlorofyl destruktivní. Po usušení je rostlina vylisována do kostiček či tablet. Následně probíhá extrakce vhodným, povoleným potravinovým rozpouštědlem, jako je aceton nebo dichlormethan. Po odstranění rozpouštědla je získán pryskyřicový produkt. Ten obsahuje částečně také tzv. feofytin, který vzniká po odstranění atomu hořčíku ze struktury chlorofylu. Lze jej využít pro tvorbu ve vodě rozpustných chlorofylinů a je také náchylnější ke tvorbě komplexů s jinými kovy, např. s mědí, za vzniku modrozeleného barviva<sup>[29]</sup>.

#### 1.2.2.1.5.2 Měďnaté komplexy chlorofylu-chlorofyliny

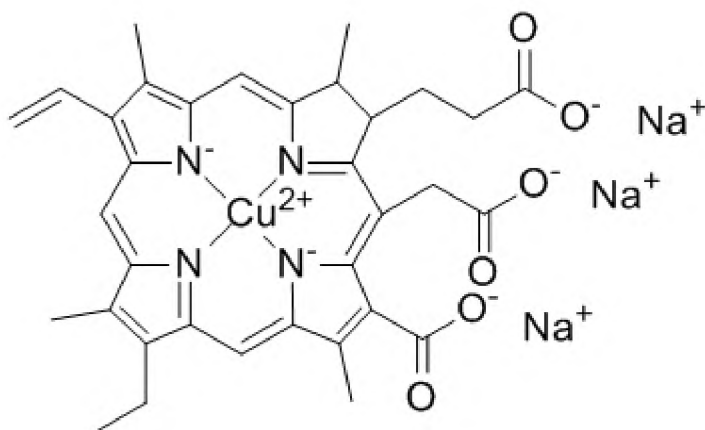
Chlorofylin je derivát chlorofylu. Jeho výhodou je jeho rozpustnost ve vodě a také jeho stabilita. Oproti chlorofylu má pak chlorofylin výraznější barvu. Komerčně se připravují především měďnaté komplexy chlorofylu.

Jak již bylo zmíněno, připravuje se z feofytinu, který vzniká při extrakci chlorofylu. Působením silné alkálie na feofytin dochází ke vzniku ve vodě rozpustného produktu. Vlivem alkálie je hydrolyzován methylester a odštěpen kruh E z molekuly feofytinu. Vzniká tak trikarboxylová kyselina, komerčně známá jako chlorofylin. Následně se přidají ionty mědi a dochází ke vzniku měďnatého komplexu. Struktura chlorofylinu je zobrazena na obrázku 9.

Přidání mědi k derivátům chlorofylu je nezbytné pro získání silnějších odstínů barev. Takto připravená barviva nepodléhají degradaci. Komplexy mědi jsou extrémně stabilní,

nedochází k uvolňování mědi působením tělesného metabolismu, ani vlivem kyseliny chlorovodíkové. To dovoluje jejich použití jako potravinářského barviva.

Chlorofylin konečně podléhá rozsáhlému procesu čištění, což zamezuje přítomnosti ostatních pigmentů. Komerčně se pak chlorofyliny prodávají jako pevné látky, v podobě sodných či draselných solí. Ty jsou rozpustné ve vodě za vzniku mírně alkalických roztoků<sup>[29]</sup>.



**Obrázek 9** Struktura měďnatého komplexu chlorofylinu

### 1.2.2.1.5.3 Další metalokomplexy chlorofylu

Vedle měďnatých derivátů chlorofylu, jsou dostupné také ve vodě rozpustné chlorofyliny dalších kovů. Konkrétně se pak jedná o komplexy kovů zinku, železa, niklu či kobaltu. Tyto barviva jsou také značně stabilnější než chlorofyl. Zinečnaté komplexy se pak komerčně využívají při konzervování fazolí, ke zvýraznění konečné barvy produktu. Své využití nalézají také při výrobě zelených aditiv. Komerčně je však stále nejvyužívanější chlorofylin měďnatý, který je dnes už zcela běžným barvivem v Evropě, Asii i Spojených státech<sup>[30]</sup>.

## 2 REŠERŠNÍ ČÁST

V následující části diplomové práce bude reprezentován přehled prací, které se zabývaly analýzou porfyrinových barviv. Separace byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí v ultrafialové a viditelné oblasti. Tato rešerše popisuje práce, zabývající se využitím analytických separací chlorofylů, především ale jejich měďnatých derivátů. Jsou zde také popsány práce, které se zabývaly analýzou nikelnatých, zinečnatých a železitých derivátů chlorofylu.

### 2.1 Využití analytické separace chlorofylů

Separace chlorofylů byla prováděna většinou na kolonách C8 (C18). Jako mobilní fáze byly používány směsi s methanolem, nejčastěji pak methanol voda. Detekce probíhala buď při 400-450 nm, nebo při vlnových délkách okolo 650 nm. Jako reálné vzorky byly použity potraviny obsahující chlorofyl, například špenát, či různé kosmetické přípravky.

První, kteří použili pro separaci chlorofylů HPLC s UV detekcí, byli Kenneth Eskins, Charles R. Scholfield a Herbert J. Dutton. V roce 1977 zveřejnili studii, která se zabývala chromatografickou separací rostlinných pigmentů (včetně chlorofylů). Zdrojem pigmentů byl špenát, hnědá křemelina *Nitzschia closterium*. Chromatograf obsahoval dvě náplňové kolony s rozměry 61x7 mm. Průtok mobilní fáze 2,5 nebo 4 ml/min. Absorbance byla měřena na UV detektoru při 440 nm. Špenát (16,4 g) a *Nitzschia closterium* (1 l živé kultury) byly extrahovány acetonem. Acetonový extrakt byl rozpuštěn ve 100 ml etheru a získaný roztok byl šestkrát extrahován 10% chloridem sodným. Etherová vrstva byla usušena a převedena do 6 ml methanolu. Jako mobilní fáze byla použita směs methanol-voda. Po zvýšení rozlišení pomocí gradientové eluce byly získány chromatogramy extraktů špenátu a křemeliny. Výsledkem bylo rozdělení pigmentu na chlorofyly *a*, *b* a *c*, rozděleny byly také karoteny či xantiny<sup>[31]</sup>.

Roku 1987 publikoval J. W. Wegener a kol. studii, která se zabývala stanovením organických barviv v kosmetických produktech. Bylo zde analyzováno celkem 126 barviv, včetně 13 organických za pomoci HPLC-DAD v reverzní fázi. Jako kosmetické vzorky byly použity krém, šampon, lesk na rty, oční stíny a další. 0,5 g těchto vzorků bylo smícháno s 10 ml dimethylformamidu, obsahujícího 5% koncentrovanou kyselinu fosforečnou (DMF/H<sup>+</sup>). Směs byla zahřívána při 60°C po dobu 60 min a filtrována. K filtrátu byl přidán 0,1 mol/l roztok tetrabutylamonium v methanolu, a byla provedena extrakce do chloroformu. Po optimalizaci se ukázala jako nejvýhodnější kolona s rozměry 100x4,6 mm a částicemi 3 μm. Do systému byla také zařazena předkolona pro obohacování. Detekce probíhala v rozsahu vlnových délek 400-600 nm. První složkou mobilní fáze byla voda, druhou složkou byl 0,005 mol/l roztok tetrabutylamonium v methanolu. Bylo využito gradientové eluce. Tato metoda se ukázala jako

účinná pro všechny studované kosmetické přípravky, v některých případech však bylo nutné omezit předúpravu vzorku na minimum<sup>[32]</sup>.

Následující studie se věnovala separaci a kvantifikaci chlorofylů v syrové a čerstvé zelenině. Tato práce byla publikována roku 2002 a autory byli V. Gokmen, S. Bahçeci a J. Acar. Zdrojem pigmentu chlorofylu byl hrách. Vzorky byly homogenizovány a extrahovány methanolem v homogenizátoru ve dvou krocích. Postačující objem vzorku k rozpouštění byl 1:10 (hm/obj). Standardy chlorofylu *a* a *b* byly připraveny rozpuštěním 1 mg chlorofylu v 250  $\mu$ l methanolu. Následně byly z tohoto roztoku připraveny pracovní roztoky o koncentracích 1, 5, 25, 50 a 100  $\mu$ g/l. Chromatograf obsahoval C8 kolonu s velikostí částic 5  $\mu$ m. Jako detektor byl použit detektor diodového pole (DAD). Injektovaný objem byl 10  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,75 ml/min. Mobilní fází byla směs methanol-voda a byla využita gradientová eluce. Chromatogramy byly zaznamenány při vlnových délkách 432, 450, 470, 652 a 666 nm. Výsledkem bylo dosažení dobré separace chlorofylů *a* a *b*. Bylo prokázáno, že tato metoda je vhodná pro kvantifikaci chlorofylu v jak čerstvém, tak zpracovaném hrachu<sup>[33]</sup>.

Roku 2008 byla publikována studie, která se zabývala chromatografickou analýzou chlorofylu a jeho derivátů v těstovinách. Autory této práce byli Michele Suman, Roberta De Maria a Dante Catellani. Zabývali se také účinky pasterizace a vlivem rozkladu chlorofylů na organoleptické vlastnosti. Rozemleté vzorky těstovin (5 g) byly při nízké teplotě smíchány s N, N-dimethylformamidem a následně extrahovány do 50 ml hexanu. Poté byly roztoky odstředovány po dobu pěti minut a odfiltrovány. Standardy chlorofylu *a* (5 mg) a *b* (5 mg) byly rozpuštěny v 50 mg acetonu. K chromatografické separaci byla použita kolona C18 s reverzní fází, s rozměry 250x460 mm. Mobilní fáze byla tvořena složkami A, B a C. Složka A se skládala z 15% ethylacetátu, 65% methanolu, 20% vody, mobilní fáze B z 60% ethylacetátu, 30% methanolu a 10% vody, mobilní fáze C ze 100 % ethylacetátu. Dávkovaný objem byl 100  $\mu$ l a průtok mobilní fáze byl 1,5 ml/min. Při separaci bylo využito gradientu. Detekce probíhala při vlnové délce 658 nm. Bylo dokázáno, že tato metoda je využitelná k rozdělení jednotlivých typů chlorofylů a jejich derivátů. Zároveň tato studie prokázala, že k degradaci pigmentů dochází během šestého až sedmého měsíce, v této době tedy dochází ke ztrátě chuťového profilu<sup>[34]</sup>.

Roku 2014 byla v práci Mikela Latasa využita HPLC analýza pro kvantifikaci fytoplanktonových pigmentů. Studie se také zabývala zvýšením citlivosti metody. Pigmenty byly extrahovány z hnědé řasy *Fucus vesiculosus*. Ta obsahuje chlorofyly *a*, *c*<sub>1</sub> a *c*<sub>2</sub>, ale také beta-karoten a další pigmenty. 0,5 mg řasy bylo extrahováno do 100 ml roztoku aceton voda, v poměru 90:10 a filtrováno. Pro separaci byla použita kolona C8 150x4,6 mm, s průměrem částic 3,5  $\mu$ m. Dávkovaný objem byl 100  $\mu$ l. Mobilní fáze byla tvořena složkami A, B a C. Mobilní fáze A se sestávala z methanolu, pyridinu a acetonitrilu (50:25:25), B byla tvořena acetonitrem,

methanolem a acetonem (60:20:20), mobilní fází C byl aceton. Detekce probíhala při 454 nm. Navržená metoda se ukázala jako levný a snadný způsob analýzy fytoplanktonu<sup>[35]</sup>.

## 2.2 Využití analytické separace měďnatých komplexů chlorofylu

K analýze chlorofylinu měďnatého byly použity kolony C18. UV/VIS detekce probíhala v rozmezí od 400-600 nm. Jako mobilní fáze byly nejčastěji využívány směsi methanol a voda, velmi často pak také směsi voda, methanol a octan amonný. Co se týče použitých vzorků, jednalo se o vzorky potravinové, jako například barvené cukrovinky, olivy či olivový olej.

Jedním z prvních, kteří se zabývali vytvořením metody pro stanovení chlorofylinu měďnatého byl H. Inoue a kol. Roku 1994 zveřejnili studii, která popisovala stanovení jednotlivých složek chlorofylinu měďnatého za účasti RP- HPLC s UV/VIS detekcí. Vzorky komerčně dostupného sodného chlorofylinu mědi byly upraveny následujícím způsobem. 30 mg chlorofylinu bylo rozpuštěno ve 40 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena na 2,3 pomocí 30% HCl, a poté bylo přidáno 40 ml diethyletheru. Směs byla extrahována třepáním a vzniklá etherová vrstva byla následně pětkrát promyta vodou. Extrakt byl vysušen a proběhla separace. Chromatografická kolona C18 měla rozměry 25x4,6 mm, průtok mobilní fáze byl 1,4 ml/min a detekce probíhala při 423 nm. Jako mobilní fáze byla použita směs methanol a voda, v poměru 97:3, která obsahovala také 1% kyselinu octovou. Komerčně dodávaná sodná sůl chlorofylinu měďnatého obsahuje celkem čtyři sloučeniny mědi. Jedná se o feoforbid měďnatý, chlorin měďnatý e<sub>4</sub> a e<sub>6</sub>, rhodin měďnatý g<sub>7</sub>. Byly stanoveny jejich detekční limity: feoforbid měďnatý a (3,5 ng/cm<sup>3</sup>), chlorin měďnatý e<sub>4</sub> (1,4 ng/cm<sup>3</sup>), chlorin měďnatý e<sub>6</sub> (1,5 ng/cm<sup>3</sup>) a rhodin měďnatý g<sub>7</sub> (3,3 ng/cm<sup>3</sup>). Bylo prokázáno, že tato metoda je použitelná ke stanovení komerčně dodávaného chlorofylinu měďnatého, a že je také použitelná pro jeho stanovení v potravinářských aditivech<sup>[36]</sup>.

Roku 2005 byla zveřejněna autorem Michaelem J. Scotterem a kol. studie, která se věnovala stanovení chlorofylu měďnatého a chlorofylinu měďnatého v barvených potravinách. Barvivo obsahující chlorofyly a chlorofyliny mědi je označeno E 141 (ii). Jako vzorky potravin byly použity želé, želé bonbóny, a jiné cukrovinky, mátová omáčka, mátová zmrzlina, sušenky či sušená polévka. Před extrakcí byly vzorky želé a cukrovinek rozpuštěny v horké vodě, vzorky sušenek a polévek byly homogenizovány. 5 g vzorku bylo smícháno s 200 ml interního standardu (Solvent Green 3), 15 ml fosfáto-citrátového pufru a 10 ml směsi ethylacetát-aceton (5:1). Směs byla odstředěna a po odstranění rozpouštědla byl extrakt rozpuštěn ve 2 ml směsi aceton-methanol (2:1). Po ochlazení na 4-5°C a filtraci byla směs nadávkována do chromatografu. Standardy (chlorin e<sub>4</sub>, chlorin e<sub>6</sub>, feoforbid, chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, sodná sůl chlorofylinu měďnatého a trisodná sůl chlorofylinu měďnatého) byly připraveny následujícím způsobem. 5 mg standardu bylo smícháno s přibližně 10 mg octanu měďnatého, rozpuštěného v ledové kyselině octové (10 ml). Poté bylo přidáno 20 ml chloroformu a směs byla promyta

destilovanou vodou. Organická fáze byla vysušena a rozpuštěna v 50 ml mobilní fáze B (methanol-aceton, 60:40). Konečná koncentrace byla přibližně 100 mg/l. Pro kalibraci bylo pipetováno 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 a 2,5 ml jednotlivých standardů do 10 ml odměrné baňky, bylo přidáno 200  $\mu$ l vnitřního standardu a doplněno roztokem methanolu a fosfátového pufru (80:20) na objem 10 ml a proměřeno. Byla použita kolona C18 250x4,6 mm. Mobilní fáze byla tvořena dvěma složkami A a B. Složka A obsahovala methanol a octan amonný (80:20), složka B methanol a aceton (60:40). Při separaci byl použit gradient. Dávkovaný objem byl 50 ml. Detekce probíhala při 650 nm. Byly zaznamenány retenční časy, plochy píků a absorpční maxima jednotlivých složek. Limit kvantifikace byl stanoven na (LOQ) 1 mg/kg a limit detekce (LOD) 0,6 mg/kg. Bylo zjištěno, že ve všech analyzovaných potravinách byl obsah chlorofylinu měďnatého nižší než 15 mg/kg (v rozmezí 0,7-13 mg/kg)<sup>[37]</sup>.

Následující práce se zabývala vytvořením metody pro analýzu falšovaného olivového oleje, do kterého byla přidávána potravinářská barviva. Článek byl zveřejněn roku 2010 a autory byli María Roca, Lourdes Gallardo-Guerrero, María Isabel Mínguez-Mosquera a Beatriz Gandul Rojas. Standardy jako chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, pyrofeofytin *a* a *b*, měďnaté komplexy chlorofylu, byly rozpuštěny v acetonu a byla k nim přidána kyselina askorbová. Zfalšovaný vzorek byl získán smícháním olivového oleje s komerčně dostupným potravinářským barvivem. Vzorky olivového oleje byly připraveny následujícím způsobem. 15 g olivového oleje bylo smícháno s N, N-dimethylformamidem (DMF), syceným MgCO<sub>3</sub> a následně byl přidán hexan. Lipidy a karoteny přešly do hexanové fáze, chlorofyly a jejich deriváty zůstaly ve fázi DMF. Do DMF fáze byl přidán 10% NaCl a směs byla převedena do 100 ml roztoku diethylether-hexan (1:1). Byla přidána destilovaná voda. Vodná vrstva obsahující polyfenoly a jiné, ve vodě rozpustné, sloučeniny byla odstraněna. Organická fáze byla zfiltrována, vysušena a před HPLC analýzou rozpuštěna v 1,5 ml acetonu. K separaci byla využita C18 kolona 20x0,4 cm a analýza byla prováděna za použití gradientu. Mobilní fáze A se sestávala z vody, směsi tetrabutylamonia a octanu amonného a methanolu (1:1:8). Mobilní fáze B byla tvořena methanolem a acetonem (1:1). Průtok mobilní fáze byl 1,25 ml/min a detekce probíhala při 430 nm. V olivových olejích je možné nalézt deriváty chlorofylu, ne však deriváty s obsahem mědi. Pokud takové deriváty jsou nalezeny, indikuje to falšování oleje. Hlavním zástupcem měďnatých derivátů byl v této studii pyrofeofytin měďnatý a jeho LOD byl stanoven na 6,58 ng/g. Metoda se ukázala jako účinná při detekci měďnatých komplexů chlorofylu v olivovém oleji<sup>[38]</sup>.

Falšováním zelených stolních oliv se roku 2011 zabýval Beatriz Gandul-Rojas a kol. Studie byla zaměřena na vytvoření metody pro detekci potravinářských barviv E 141(ii), ve vzorcích zelených oliv. Přidávání potravinářských barviv do oliv není povoleno Evropskou unií. Podobně jako v předchozím článku lze říci, že přirozený výskyt měďnatých komplexů v olivách je nemožný. Standardy byly připraveny rozpuštěním různých podílů barviva E 141 (ii)

v deionizované vodě. Falšovaný vzorek byl připraven ponořením oliv (200 g) do 2,5% solného roztoku, který obsahoval barvivo, a byl tak ponechán po čtyři dny. Poté byly olivy promyty vodou a vzorky solného roztoku (100 ml) byly smíchány s acetonem (100 ml) a diethyletherem (100 ml). Po promíchání bylo přidáno 40 ml 10% vodného roztoku NaCl. Diethyletherová fáze byla následně odpařena tak, aby se zmenšil její objem. K analýze byl odebrán mililitrový podíl, ke kterému byly přidáno 2 ml acetonu, kvůli vznikajícímu zákalu. K analýze reálných vzorků bylo vybráno šest druhů oliv. 7 g homogenizovaného vzorku oliv bylo přidáno k 50 ml DMF. Následně byla směs odfiltrována a pevný podíl byl opakovaně přidáván k DMF, dokud nebyl vzorek zcela odbarven. Filtráty byly smíchány s hexanem, aby došlo k extrakci tukové části. Beztukové pigmenty byly přeneseny do 150 ml směsi hexanu a diethyletheru (1:1), následně bylo přidáno 400 ml 10% NaCl. Oddělená organická vrstva byla promyta 2% vodným roztokem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a následně filtrována přes bezvodý Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Roztok byl odpařen do sucha a poté rozpuštěn v 1,5 ml acetonu. Po centrifugaci byly vzorky analyzovány pomocí HPLC. HPLC separace probíhala na koloně C18 20x0,46 cm. Dávkované objemy byly 5, 20 a 50 µl, průtok mobilní fáze 1,25 ml/min. Mobilní fáze A se sestávala z vody, směsi tetrabutylamonium a octanu amonného a methanolu (1:1:8). Mobilní fáze B byla tvořena methanolem a acetonem (1:1). Byl použit eluční gradient. Detekce probíhala při 410, 630 a 666 nm. Studie prokázala, že jeden ze šesti analyzovaných vzorků skutečně obsahoval přidané barvivo E 141 (ii). Metoda se ukázala jako rychlá (12 min) a účinná. Je ale také univerzální a lze ji využít při analýze jiných potravinových vzorků<sup>[39]</sup>.

Detekci barviva E 141 (ii) v olivách se zabývali také autoři C. Negro, L. De Bellis, E. Sabella, E. Nutricati, A. Luvisi a A. Miceli. Studie byla provedena roku 2017 za jiných podmínek, než za kterých prováděl detekci Beatriz Gandul-Rojas a kol. Tato studie se také zabývala možností přidávat k olivám roztok síranu měďnatého, který by měl způsobit obnovení přirozené zelené barvy tím, že vytvoří měďnatý komplex s chlorofylem. Byly tedy připraveny také falešné vzorky oliv, které byly před analýzou ošetřeny síranem měďnatým. Jako standardy byly využity komerčně dodávaná barviva E 141(ii), jako reálné vzorky pak bylo použito 16 druhů italských zelených oliv. Bylo odebráno 16 g olivové buničiny, homogenizováno methanolem a vodou (80:20) a vzniklá pasta byla filtrována. Tuhý zbytek byl přidán do 50 ml methanolu a míchán po dobu 1 hodiny. To bylo opakováno, dokud vzorky neztratily svou barvu. Filtráty byly poté smíchány s hexanem, aby došlo k oddělení lipofilních a hydrofilních částí. Vodná fáze byla izolována a odpařena. Zbytek po odpaření byl rozpuštěn ve 2 ml methanolu a analyzován. Separace byla provedena na C30 koloně s rozměry 205x4,6 mm. Byl použit eluční gradient, průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Mobilní fáze A byla tvořena methanolem, destilovanou vodou a kyselinou octovou (90:10:0,5) a mobilní fáze B methyl-tercbutyletherem, methanolem a kyselinou octovou (100:10:0,5). Pro analýzu vzorků ošetřených CuSO<sub>4</sub> byl snížen průtok



mobilní fáze na 0,7 ml/min. Detekce probíhala při 430 a 650 nm. Výsledkem studie bylo prokázání barviva E 141 (ii) v 8 z 16 analyzovaných vzorků. Pokud se jedná o obnovení barvy přidavkem  $\text{CuSO}_4$ , při použití 5% a 20% roztoku je barva opravdu výraznější. Takto ošetřené olivy pak na chromatogramu vykazují píky odpovídající chlorinu měďnatému  $e_6$  a pyrofeoforbidu měďnatému. Tato jednoduchá metoda prokázala, že 50 % vzorků obsahuje měďnaté komplexy chlorofylu, jejichž výskyt je zapříčiněn buď přidáváním barviva E 141 (ii), nebo přidáváním síranu měďnatého během výrobního procesu. Metoda se ukázala jako univerzální a účinná při analýze vzorků falšovaných potravin<sup>[40]</sup>.

Jedna z novějších studií byla publikována roku 2018. Indický autor Siva Mathiyalagan a kol. zveřejnil studii, která se zabývala stanovením a kvantifikací přírodních a syntetických barviv v barvených potravinách. Mimo chlorofylinu měďnatého byly stanovovány i další barviva, například tartrazin karmín či Sunset Yellow. Jako reálné vzorky pro analýzu chlorofylinu měďnatého byly použity cukrovinky jako měkké a tvrdé bonbony a želatinové bonbony. Vzorky byly připraveny následujícím způsobem. 2 g bonbonů byly za třepání rozpuštěny v 10 ml vody. Hodnota pH byla upravena na 2,5 kyselinou chlorovodíkovou, poté byly přidány 3 ml ethylacetátu a směs byla protřepávána po dobu 10 minut. Vzniklá organická fáze byla odstředěna a vysušena za použití plynného dusíku. Zbytek byl rozpuštěn ve 2 ml methanolu a zfiltrován. Takto připravený vzorek byl dávkován do chromatografu. Standardy byly připraveny rozpuštěním 10 mg barviva ve 100 ml destilované vody. Pracovní standardní roztok byl připraven zředěním tohoto roztoku na výslednou koncentraci 10 mg/l. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada. RP-HPLC analýza probíhala za použití kolony C18 s rozměry 250x4,6 mm. Dávkovaný objem byl 20  $\mu\text{l}$ . Mobilní fáze A byla tvořena methanolem a acetonitrilem (1:1), mobilní fáze B se sestávala ze 40 mmol/l roztoku octanu amonného o pH 7,4. Detekce byla prováděna pomocí UV/VIS detektoru při vlnových délkách 400 a 600 nm. Touto metodou byla zjištěna koncentrace chlorofylinu měďnatého v tvrdých bonbónech 3,334 mg/kg a 4,489 mg/kg v měkkých bonbónech. Limit detekce byl stanoven na 3,57  $\mu\text{g/l}$ , limit kvantifikace na 10,82  $\mu\text{g/l}$ . Tato metoda se ukázala jako účinná při stanovení a kvantifikaci nejen chlorofylinu, ale také ostatních barviv, a to s LOD a LOQ v jednotkách  $\mu\text{g/l}$ . Celkově je metoda schopna stanovit syntetická i přírodní barviva v jedné analýze a to i v komplexních maticích<sup>[22]</sup>.

Další studií publikovanou v roce 2018 je studie autorů Hee Sun Chong a kol., která se zabývala stanovením měďnatých a železitých komplexů chlorofylinu v potravinách. Jako reálné vzorky byly použity cukrovinky, konkrétně tvrdé bonbony. Byla vyvinuta metoda pro extrakci měďnatých a železitých komplexů chlorofylinu ze vzorků potravin. Komerčně dostupné bezbarvé bonbony byly obohaceny o chlorofyliny mědi a železa. 5-10 g obohacených vzorků bylo rozdrceno, a bylo přidáno 5 ml kyseliny chlorovodíkové. Směs byla míchána vložením do ultrazvuku při 50°C po dobu 10 min. Bylo přidáno 20 ml methanolu a tato směs byla

promíchána a odstředěna. Organická vrstva byla zfiltrována a nadávkována do kapalinového chromatografu. Standardy byly připraveny rozpuštěním 0,1 g chlorofylinů ve vodě a doplněním na objem 100 ml. 1 ml tohoto roztoku byl zředěn fosfátovým pufrům (1 mol/l) na objem 100 ml. Kalibrační řada byla připravena ředěním methanolem na koncentrace 10, 25, 50, 100, 300 a 500 mg/l. Chromatografická separace probíhala na koloně C18 250x4,6 mm. Mobilní fáze A byla tvořena methanolem a vodou (97:3), obsahující 1% kyselinu octovou. Mobilní fáze B byla také tvořena methanolem a vodou (80:20), obsahující 1% kyselinu octovou. Byla použita gradientová eluce. Absorbance byla měřena při 395 nm a průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Pro chlorofylin železitý byly zjištěny LOD 1,2 mg/kg a LOQ 4,1 mg/kg. Pro chlorofylin měďnatý byl stanoven na LOD 1,4 mg/kg a LOQ na 4,8 mg/kg<sup>[41]</sup>.

Vytvořením metody pro stanovení barviv v potravinách se zabýval roku 2018 také Julien Brazeau. Ve své studii se zabýval stanovením celkem 27 barviv, včetně chlorofylinu měďnatého. Před extrakcí byly vzorky ošetřeny  $\alpha$ -amylázou, která zabraňuje enzymatickému štěpení v potravinách, které obsahují škrob. Extrakce pak probíhala ve dvou krocích, kdy v prvním kroku byly vzorky extrahovány směsí methanolu a octanu amonného (100 mmol/l), v poměru 3:10, ve druhém kroku pak byl tento poměr 1:20. Vzorky potravin pak byly připraveny následujícím způsobem. Bylo naváženo 10 g každého potravinového vzorku, každý vzorek byl navážen dvakrát. Všechny pak byly smíchány s 5 ml  $\alpha$ -amylázy a 30 ml octanu amonného (100 mmol/l). Vzorky byly promíchány. Poté bylo k prvnímu duplikátu přidáno 5 ml methanolu a 25 ml 100 mmol/l roztoku octanu amonného (extrakční roztok 1) a do druhého duplikátu bylo přidáno 30 ml methanolu a 25 ml 100 mmol/l octanu amonného (extrakční roztok 2). Extrakty byly promíchány na ultrazvukové lázni při 60°C, následně ochlazeny a vloženy do centrifugy. Po odstředění bylo 25  $\mu$ l jednotlivých extraktů dávkováno do chromatografu. Standardy jednotlivých barviv byly připraveny stejným způsobem, bez enzymatického ošetření  $\alpha$ -amylázou. Separace probíhala na koloně C18 100x3 mm. Mobilní fáze byla tvořena třemi složkami. Fáze A se sestávala ze směsi octanu amonného (50 mmol/l), methanolu a acetonitrilu, okyseleném 1% kyselinou octovou, v celkovém poměru 97:3:0. Fáze B byla také složena ze směsi octanu amonného (50 mmol/l), methanolu a acetonitrilu, okyseleném 1% kyselinou octovou, v celkovém poměru 10:3:7. Fáze C pak z octanu amonného (1 mol/l), methanolu a acetonu, v poměru 1:5:4. Bylo využito gradientové eluce, průtoková rychlost byla 0,75 ml/min. Detekce barviv probíhala při vlnových délkách 408, 428, 450, 506, 526, 540 a 610 nm a konkrétně chlorofylin byl detekován při vlnové délce 408 nm. Použití dvou extrakčních roztoků vedlo k maximalizaci účinnosti, zlepšení chromatografického rozlišení a k zajištění krátké doby analýzy. LOD se pohybovaly v rozmezí od 0,1 do 0,43  $\mu$ g/g a LOQ od 0,34 do 1,45  $\mu$ g/g. Metoda byla prokázána jako účinná, citlivá a vhodná pro simultánní kvantifikaci barviv

v potravinách. Metoda je použitelná pro velkou škálu potravinových vzorků, od svého zavedení byla použita k analýze již 3000 vzorků<sup>[42]</sup>.

### 2.3 Využití analytické separace metalokomplexů chlorofylu

Kromě studií, zabývajících se stanovením chlorofylinu mědi, byly zveřejněny také studie zabývající se analýzou dalších kovokomplexů chlorofilu. Jednalo se o komplexy niklu, železa a zinku. Stanovení chlorofylinu nikelnatého probíhalo na kolně C18, mobilní fáze byla tvořená směsí acetonitril/methanol. Detekce probíhala při 420 a 428 nm. Analýza chlorofylinu železitého probíhala na kolně C18, mobilní fázi zde byla směs acetonitrilu a fosfátového pufru a detekce probíhala při vlnových délkách 606, 650 a 646 nm. Stanovení chlorofylinu zinečnatého probíhalo za využití kolony C18, mobilní fáze byla směs acetonitril/voda/methanol a detekce probíhala při 656 a 436 nm.

Stanovením chlorofylových derivátů niklu se roku 1988 zabýval K. Furuya a kol. Konkrétně se jednalo o stanovení feofytinu niklu, který vzniká nahrazením hořčíku ve struktuře feofytinu niklem. Příprava derivátu feofytinu nikelnatého *a* byla provedena následujícím způsobem. Feofytin *a* byl mísen s chloroformem a následně byl přidán roztok tetrahydrátu octanu nikelnatého v ledové kyselině octové. Směs byla promíchávána po 3 hodiny při 60°C. Feofytin nikelnatý *b* byl připraven rozpuštěním v acetonu a následným přidáním roztoku bezvodého bromidu nikelnatého v acetonu. Směs byla promíchávána po dobu 20 hodin při 60°C. Separace byla provedena na kolně C18, 250x4,6 mm. Jako nejvhodnější mobilní fáze byla zvolena směs acetonu a methanolu, v poměru 50:50. Průtok mobilní fáze byl 1,4 ml/min a UV/VIS detektor zaznamenával spektra při 420 nebo 428 nm. Detekční limit pro feofytin nikelnatý *a* byl stanoven na 28 ng/ml a limit detekce pro feofytin *b* na 38 ng/ml<sup>[43]</sup>.

Vytvořením metody pro stanovení chlorofylinu železitého se zabýval Y. Nonomura a kol. Studie byla zveřejněna roku 1995 a byla zaměřena na HPLC separaci železitých derivátů chlorofylu, jako součást potravinářských barviv. Jako hlavní deriváty chlorofylu železa byly detekovány chlorin železitý *e*<sub>4</sub> a *e*<sub>6</sub> a feoforbid železitý. Všechny deriváty byly připraveny z chlorofylu *a*, získaného extrakcí z listů špenátu. Standardní roztok feoforbidu železitého byl připraven následujícím způsobem. 2 mg feoforbidu bylo rozpuštěno v 5 ml acetonu, bylo přidáno 7,4 mg tetrahydrátu chloridu železnatého. Následně byl přidán roztok 7,5 mg kyseliny askorbové v 5 ml methanolu. Směs byla promíchávána 3,5 hod při 60°C. Poté bylo přidáno 50 ml dichlormethanu a směs byla promyta roztokem NaCl a následně HCl (0,01 mol/l). Organická fáze byla vysušena a odpařena do sucha. Chlorin železitý *e*<sub>6</sub> byl připraven smícháním 5 mg chlorinu *e*<sub>6</sub>, 5 ml acetonu 16,8 mg tetrahydrátu chloridu železnatého. Následně byl přidán roztok 18 mg kyseliny askorbové v 5 ml acetonu. Směs byla promíchána a dále zpracována stejným způsobem jako feoforbid železitý. Chlorin *e*<sub>4</sub> byl připraven podobně jako chlorin *e*<sub>6</sub>. Separace probíhala na C18 kolně s rozměry 250x30 mm. Jako nejvhodnější mobilní fáze byl

zvolen acetonitril-fosfátový pufr (60:40), obsahující roztok tetramethylamoniumchloridu o koncentraci 0,01 mol/l. Dávkovaný objem byl 100  $\mu$ l, průtok mobilní fáze byl 1,4 ml/min. Byly identifikovány píky chlorinu železitého  $e_4$  (606 nm), chlorinu železitého  $e_6$  (650 nm) a feoforbidu železitého (646 nm)<sup>[44]</sup>.

Analýzou zinečnatých komplexů chlorofylinu se roku 2007 zabývali T. Ngo a Y. Zhao. Konkrétně se zabývali stanovením chlorofylových derivátů v hruškách a využitím zinečnatých komplexů k obnovení zelené barvy při procesu vaření a konzervování. Vzorky, obohacené o zinečnaté ionty, byly připraveny následujícím způsobem. 330 g celých hrušek (předem zbavených vosku) a 30 g zmražených slupek bylo smícháno s horkým roztokem zinečnatých iontů (1 l), o koncentracích 0, 1300 nebo 2600 ppm, po dobu 6, 12 nebo 18 minut. Poté byly konzervovány při 94°C po dobu 20 min a následně zmrazeny při teplotě -22°C. Pro extrakci pigmentů byly použity slupky hrušek. Ty byly rozemlety na prášek a poté bylo 1,5 g tohoto prášku smícháno s 15 ml 100% ethyletheru. Směs byla vložena do ultrazvuku, odstředěna a tuhý podíl byl oddělen. Extrakce etherem probíhala celkem čtyřikrát. Podíly poté byly smíchány a převedeny do 10 ml baňky, která byla doplněna etherem na konečný objem. 2 g takto připraveného vzorku byly vysušeny. Standardní roztoky zinečnatých komplexů byly získány extrakcí feofytinů a pyrofeofytinů ze zeleného špenátu. Tyto deriváty byly vloženy do etheru a vysušeny v proudu dusíku. Následně byl přidán roztok 3 g chloridu zinečnatého ve 20 ml acetonu. Poté byly zinečnaté deriváty extrahovány 30 ml etheru a promyty vodou. 1 ml extraktu byl vysušen a následně rozpuštěn v 0,2 ml acetonu. 20  $\mu$ l tohoto extraktu bylo nadávkováno na kolonu C18 150x4,6 mm. Mobilní fáze byla tvořena směsí ethylacetátu, methanolu a vody, v poměru 40:54:10. Separace probíhala za izokratické eluce. Detekce pigmentů probíhala při 656 a 436 nm. Identifikace byla provedena srovnáním retenčních časů a spektrálních charakteristik vzorků se standardy feofytinů a pyrofeofytinů a jejich komplexů zinku, připravených z listů špenátu, a komerčně dostupným standardem chlorofylu *a*. Bylo prokázáno, že tepelné zpracování hrušek způsobuje degradaci chlorofylů, za vzniku degradačních produktů jako feofytiny a pyrofeofytiny, což vedlo ke ztrátě zelené barvy. U hrušek, které byly obohaceny o zinečnaté ionty, nedocházelo ke vzniku degradačních produktů, vznikal především feofytin zinečnatý, a tedy nedocházelo ani ke ztrátě zelené barvy. Zároveň nebyla prokázána zvýšená antioxidační aktivita ve srovnání s čerstvými, či konzervovanými hruškami<sup>[45]</sup>.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité přístroje a zařízení

- UV-VIS spektrofotometr Shimadzu UV-2600 (Kyoto, Japonsko)
- Kapalinový chromatograf Agilent Infinity II (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), u kterého byly využity následující moduly:
  - Binární čerpadlo (1260, G1312B) s tlakovým limitem 60 MPa
  - Autosampler (G7114B, Vialsampler) s oddílem pro termostatování kolon
  - Detektor s proměnnou vlnovou délkou (G7114B)
  - Kolona: Kinetex Biphenyl 100 Å, velikost částic 2,6 µm, rozměry 150 x 3 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru
  - Kapalinový chromatograf
    - Autosampler SIL-20DXR (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
    - Směšovač mobilní fáze (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
    - Čerpadla mobilní fáze LC-20XR (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
    - Termostat kolon LCO 102 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
    - UV/VIS detektor SPD-20A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
  - Hmotnostní spektrometr
    - QTRAP 4500 (ABSCIEX, USA)
- Ultrazvuková lázeň (Kraintek 12, Slovensko)
- Stolní centrifuga Eppendorf 5424 (Fisherscientific, Pardubice)
- Analytické digitální váhy (Sartorius, Ústí nad Labem)

### 3.2 Použité chemikálie

Methanol (Merck KGaA, Dormstadt, Německo), čistota HPLC gradient grade

Acetonitril (Merck KGaA, Dormstadt, Německo), čistota HPLC gradient grade

Kyselina mravenčí (Tokyo chemical industry Co., LTD., Kita-Ku, Tokyo, Japonsko)

Octan amonný (Sigma Aldrich, St. Louis), čistota p. a

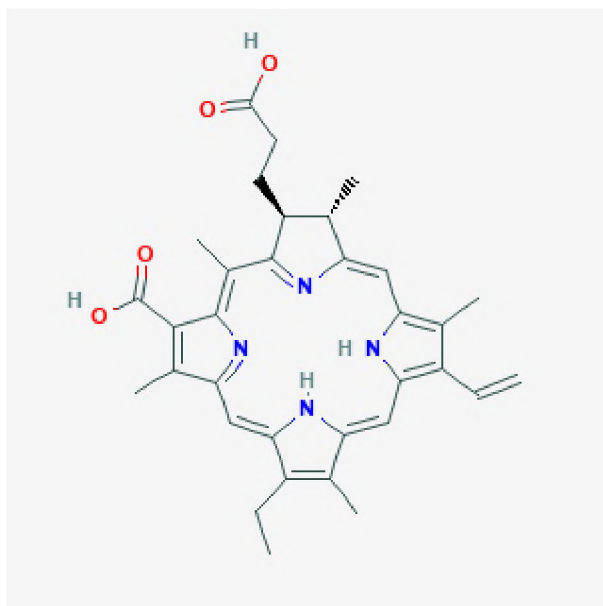
Chlorid železnatý, chlorid zinečnatý (Lach-Ner s.r.o., Česká republika), čistota p. a.

### 3.2.1 Použité standardy

**Chlorin e<sub>4</sub>** (Frontier Scientific, Inc.)

- Molární hmotnost: 552, 675 g/mol

- Sumární vzorec: C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

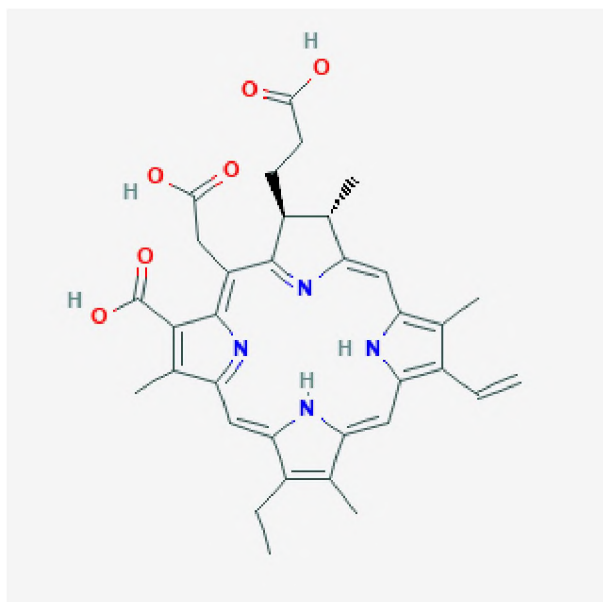


**Obrázek 10** Struktura chlorinu e<sub>4</sub>

**Chlorin e<sub>6</sub>** (Frontier Scientific, Inc.)

- Molární hmotnost: 596.684 g/mol

- Sumární vzorec: C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>

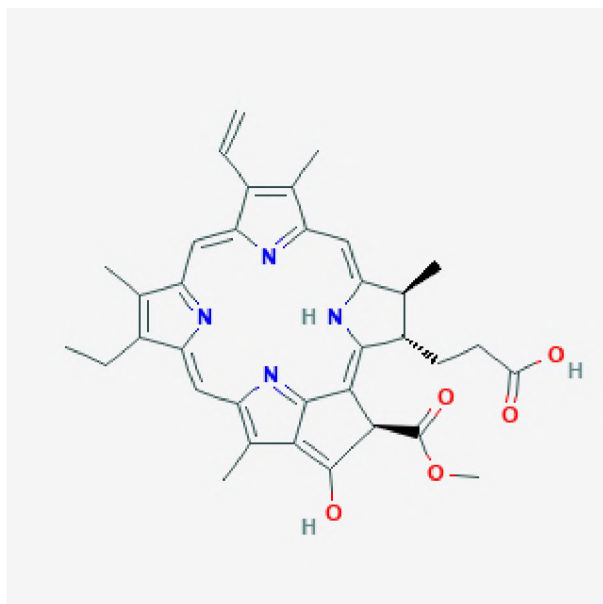


**Obrázek 11** Struktura chlorinu e<sub>6</sub>

**Feoforbid *a*** (Frontier Scientific, Inc.)

- Molární hmotnost: 592,680 g/mol

- Sumární vzorec:  $C_{35}H_{36}N_4O_5$

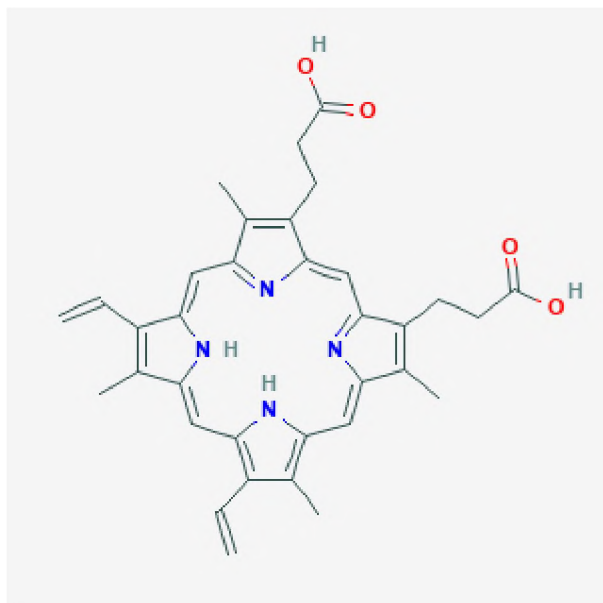


**Obrázek 12** Struktura feoforbidu *a*

**Protoporfyriu IX** (Frontier Scientific, Inc.)

- Molární hmotnost: 562,6581g/mol

- Sumární vzorec:  $C_{34}H_{34}N_4O_4$



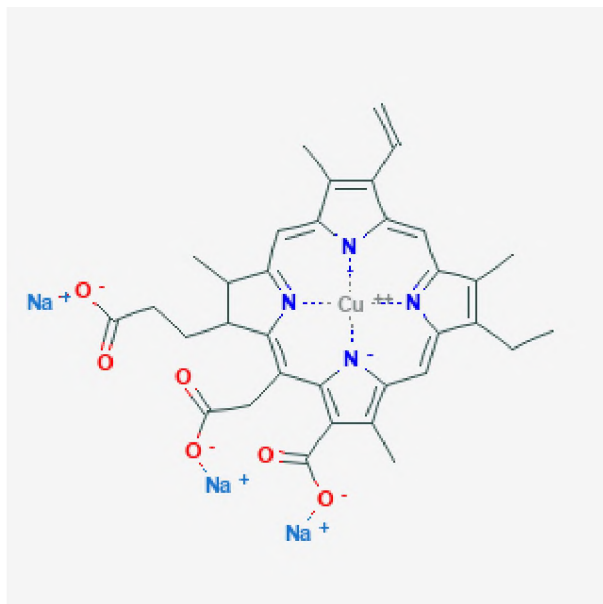
**Obrázek 13** Struktura protoporfyriu IX

### 3.2.2 Použitý vzorek

**Sodná sůl chlorofylinu měďnatého** (Sigma Aldrich, St. Louis)

- Molární hmotnost: 724.15 g/mol

- Sumární vzorec:  $C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$



**Obrázek 14** Struktura sodné soli chlorofylinu měďnatého

## 3.3 Pracovní postup

### 3.3.1 Příprava roztoků standardů

Standardní roztoky byly připraveny navážením 1 mg každého standardu do skleněné vialky. Bylo přidáno 5 ml acetonitrilu a vody 50:50 (v/v). Takto připravené roztoky byly vloženy do ultrazvukové lázně na 10 minut. Následně byly převedeny do Eppendorf zkumavek a vloženy do odstředivky na 10 minut. K analýze na UV-VIS spektrometru bylo odebráno 300  $\mu$ l standardního roztoku do kyvety a doplněno na objem 2 ml destilovanou vodou. K analýze pomocí HPLC a LC-MS bylo odpipetováno 200  $\mu$ l standardu do skleněné vialky a bylo přidáno 200  $\mu$ l destilované vody.

### 3.3.2 Příprava roztoku vzorku

Roztok vzorku byl připraven rozpuštěním 1 mg chlorofylinu měďnatého v 5 ml acetonitrilu. Roztok byl vložen na 10 minut do ultrazvukové lázně, poté byl převeden do Eppendorf zkumavky a odstředován po dobu 10 minut. K analýze pomocí HPLC a LC-MS bylo odpipetováno 200  $\mu$ l takto připraveného roztoku vzorku do skleněné vialky a bylo přidáno 200  $\mu$ l destilované vody.

Pokud byla odezva detektoru nízká, byl použit koncentrovaný roztok vzorku. Ten byl připraven navážením 5 mg chlorofylinu měďnatého do skleněné vialky a přidáním 2 ml



acetonitrilu. K analýze pomocí HPLC a LC-MS bylo odpipetováno 200  $\mu$ l koncentrovaného roztoku vzorku do skleněné vialky a bylo přidáno 200  $\mu$ l destilované vody.

### 3.3.3 Příprava standardních roztoků solí s přidávanými ionty železa a zinku

Ionty kovů byly ke standardům přidávány v desetinasobném nadbytku. Roztoky solí kovů byly připraveny navážením 100 mg chloridu železitého a chloridu zinečnatého do skleněné vialky. Následně byl přidán 1 ml destilované vody. Takto připravené roztoky byly vloženy na 5 minut do ultrazvuku. Standardní roztoky byly připraveny stejně jako v kapitole 3.3.1. Do skleněné vialky bylo vloženo 5 ml standardu a bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku solí. Takto připravené roztoky byly vloženy do ultrazvuku na 10 minut. K analýze na UV-VIS spektrometru bylo odebráno 300  $\mu$ l roztoků do kyvety a doplněno na objem 2 ml destilovanou vodou. K analýze pomocí HPLC a LC-MS bylo odpipetováno 200  $\mu$ l roztoků do skleněné vialky a bylo přidáno 200  $\mu$ l destilované vody.

Byly také připraveny roztoky s různými koncentracemi iontů kovů. Ty byly připraveny navážením 100 mg chloridu železitého a chloridu zinečnatého do skleněné vialky. Následně byl přidán 1 ml destilované vody a roztoky byly vloženy na 5 minut do ultrazvuku. Z takto připravených roztoků bylo odpipetováno 5, 10, 15 a 20  $\mu$ l a přidáno k 0,5 ml standardu. Standardní roztoky byly připraveny stejně jako v kapitole 3.3.1. K analýze pomocí HPLC a LC-MS bylo odpipetováno 200  $\mu$ l roztoků do skleněné vialky a bylo přidáno 200  $\mu$ l destilované vody.

### 3.3.4 Podmínky měření pomocí HPLC

Analýza standardů chlorinu e<sub>4</sub>, chlorinu e<sub>6</sub>, feoforbidu  $\alpha$ , protoporfyrinu IX a také analýza vzorku chlorofylinu měďnatého byla prováděna na kapalinovém chromatografu, v systému s obrácenými fázemi, na koloně Kinetex Biphenyl. Jako mobilní fáze byla použita směs voda (A) a methanol (B). Byly využity různé koncentrační gradienty, a to od 10 % do 75 % methanolu. Pro zlepšení separace byla k mobilním fázím přidávána aditiva (kyselina mravenčí, octan amonný). Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min, dávkovací objem 5  $\mu$ l. První separace probíhaly na koloně vyhřáté na 30 °C, docházelo však k častému zanášení kolony. Proto byly další separace realizovány za teploty 40 °C. Detekce standardů i vzorku probíhala při vlnové délce 400 nm. Doba analýzy byla 30 minut.

### 3.3.5 Podmínky měření pomocí LC-MS a MS<sup>2</sup>

Pro analýzu pomocí LC-MS byla využita stejná mobilní fáze jako při analýze pomocí HPLC. Průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min, dávkovací objem 1  $\mu$ l. Bylo využito gradientové eluce (viz tabulka 1). Detekce na UV detektoru probíhala při 400 nm.

MS spektra byla měřena v režimu lineární iontové pasti - Enhanced MS. Byly zaznamenávány kladné i záporné ionty. Spektra byla zaznamenávána v rozsahu od 50 do

900 m/z. Parametry zdroje byly následující: CUR (curtain gas) 20 psi, napětí na iontovém spreji 4500/-4500 V, TEM (teplota sušícího plynu) 200 °C, tlak plynů (dusík) GS1 40 psi, GS2 50 psi. Deklasterační potenciál byl 60/-60 V, vstupní potenciál 10/-10 V.

Při analýze pomocí LC-MS<sup>2</sup> byly parametry pro kapalinový chromatograf stejné jako pro LC-MS. MS<sup>2</sup> spektra se zaznamenávala v rozsahu 50-900 m/z. Z takto zaznamenaných spekter byly vybrány tři nejintenzivnější signály v rozsahu 450-900 m/z, které přesahovaly intenzitu  $3 \cdot 10^5$ . Tyto signály byly fragmentovány s kolizní energií 25 V a byly zaznamenávány pouze kladné ionty. Doba analýzy byla 60 minut.

**Tabulka 1** Gradient pro LC-MS, LC-MS<sup>2</sup>

t (min)	c <sub>methanol</sub> (%)
0	50
30	100
60	100

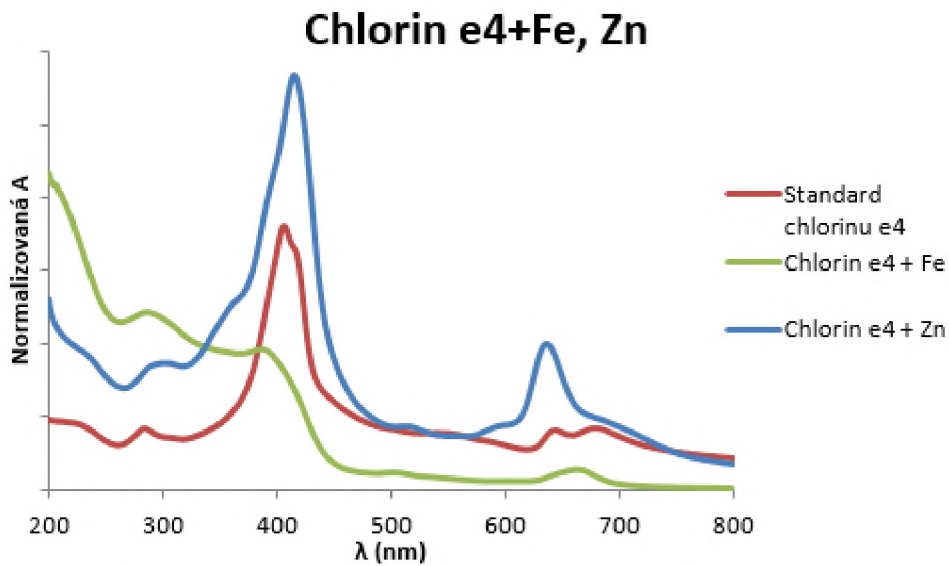
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Určení vlnové délky pomocí UV-VIS spektrometru

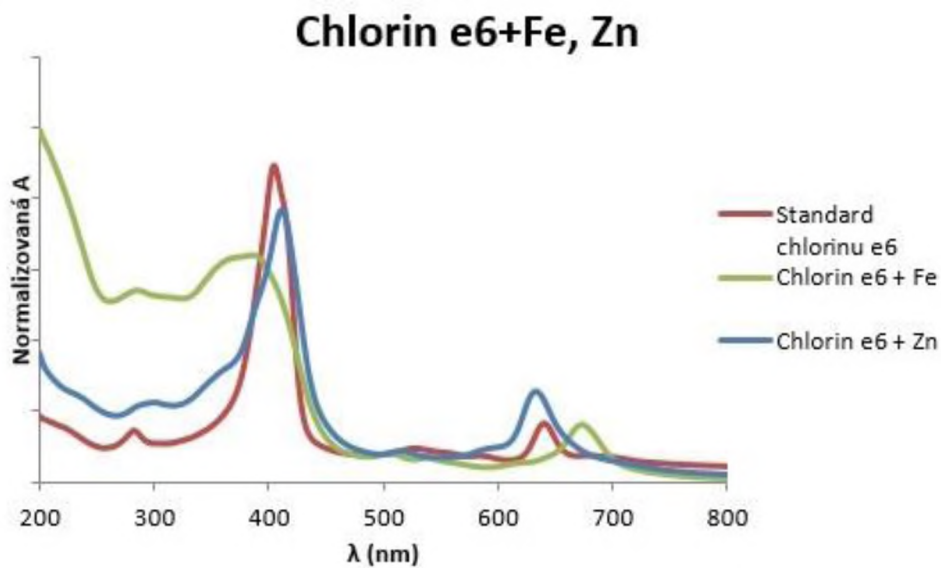
Pro zjištění vhodné vlnové délky pro detekci v HPLC separaci komplexů chlorofylinů bylo využito UV-VIS spektrometrie. Standardní roztoky chlorin  $e_4$ , chlorin  $e_6$ , feoforbid  $a$  a protoporfyrin IX byly připraveny podle postupu, popsáném v kapitole 3.3.1. Vzorky v kyvetě byly proměřovány proti srovnávací kyvetě, která obsahovala destilovanou vodu. UV/VIS spektra čistých standardů jsou uvedeny v příloze GRAFY, UV/VIS spektrum chlorinu  $e_4$  (Graf P 1), chlorinu  $e_6$  (Graf P 2), feoforbidu  $a$  (Graf P 3) a spektrum protoporfyrinu IX (Graf P 4). Absorpční spektra byla proměřována v rozmezí vlnových délek 200-800 nm. Absorpční spektra derivátů chlorofylinů jsou velmi charakteristická. Vznik spekter je přisuzován vlivu porfyrinové struktury, která je tvořena násobnými konjugovanými vazbami. Absorpční maxima všech těchto analyzovaných standardů se pohybovala kolem 400 nm. Menší pásy byly pak vidět také kolem 600-700 nm. Pro následnou analýzu pomocí HPLC byla tedy zvolena vlnová délka 400 nm.

#### 4.1.1 Vliv přidání iontů kovů ke standardům na absorpci

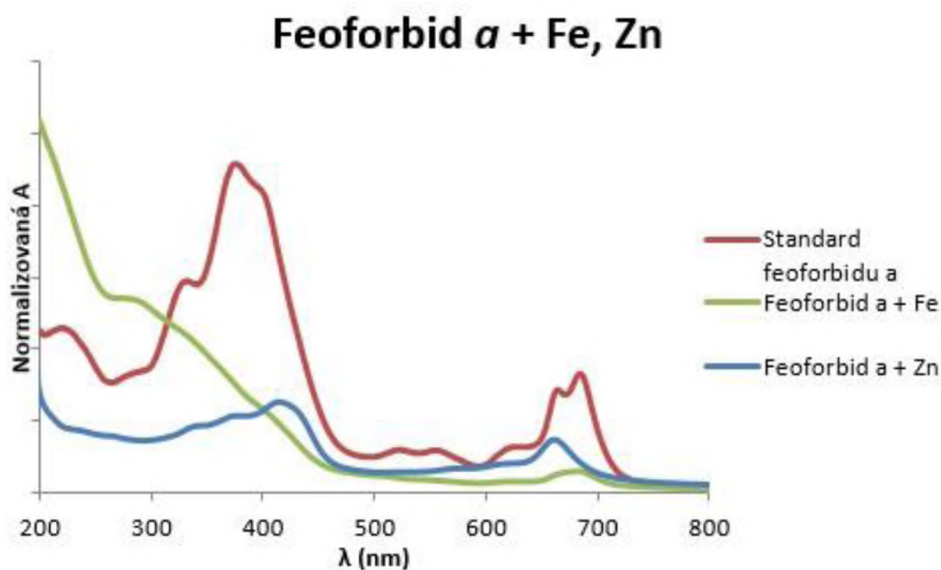
Součástí této diplomové práce bylo také zjištění, zda má přídavek iontů kovů vliv na absorpci a následně pak také na separaci porfyrinových barviv. Byla tedy snaha začlenit do chlorofylinového komplexu jiný kovový iont, než měď, jak je tomu u vzorku chlorofylinu měďnatého. Z tohoto důvodu byly ke standardním roztokům přidány ionty železa a zinku, a zprvu byla sledována změna absorbance jednotlivých standardů. Ionty kovů byly ke standardům přidávány v desetinásobném nadbytku. Příprava těchto roztoků je popsána v kapitole 3.3.3. UV/VIS spektra standardů s přidávanými ionty kovů a čistých standardů jsou vyobrazeny v grafech 1-4. Absorbance u těchto spekter byla normalizovaná (normalizovaná A) tak, aby jednotlivá spektra byla ve stejném měřítku.



**Graf 1** UV/VIS spektrum chlorinu e4 a chlorinu e4 s přidáním ionty železa a zinku

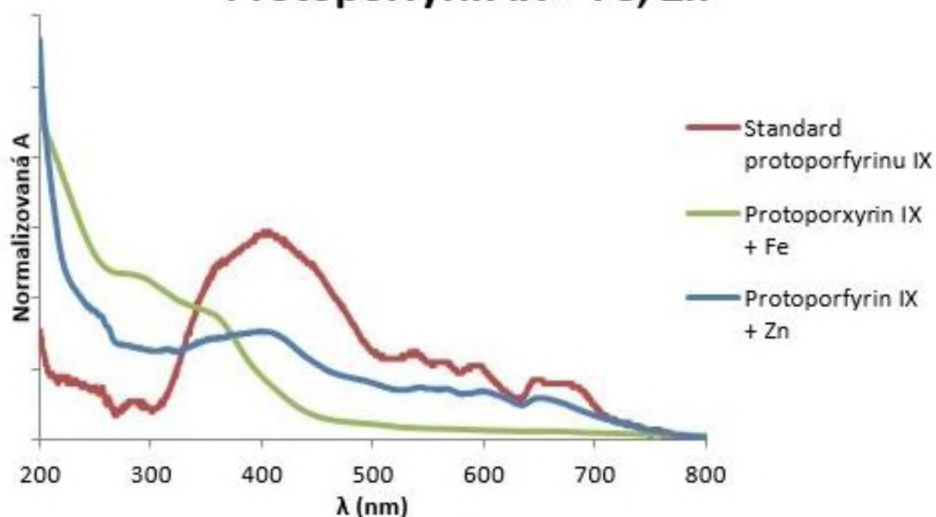


**Graf 2** UV/VIS spektrum chlorinu e6 a chlorinu e6 s přidáním ionty železa a zinku



**Graf 3** UV/VIS spektrum feoforbidu a a feoforbidu a s přidáním ionty železa a zinku

## Protoporfyryn IX + Fe, Zn



**Graf 4** UV/VIS spektrum protoporfyrynu IX a protoporfyrynu IX s přidáním iontů železa a zinku

Z grafů je patrné, že vlivem iontů kovů dochází k posunu absorpčních maxim, či k rozšíření absorpčních pásů. Vlivem působení iontů železa na chlorin  $e_4$  (Graf 1) došlo k rozšíření absorpčního pásu okolo 400 nm. Působením zinečnatých iontů pak došlo k mírnému posunu absorpčního maxima ze 410 na 420 nm, zároveň také došlo k nárůstu absorpčního pásu okolo 650 nm.

Vlivem působení iontů železa na chlorin  $e_6$  (Graf 2) došlo k rozšíření absorpčního pásu okolo 400 nm, a také k posunu absorpčního maxima ze 407 na 375 nm. Zároveň došlo k posunu druhého absorpčního pásu z 642 na 681 nm. Vlivem působení iontů zinku došlo k mírnému posunu absorpčního maxima ze 407 na 417 nm. Zároveň došlo k nárůstu druhého pásu okolo 650 nm.

Působením iontů železa na feoforbid  $a$  (Graf 3) došlo k velkému rozšíření absorpčního pásu okolo 400 nm, zároveň pak také k zúžení druhého pásu v oblasti okolo 600-700 nm. Vlivem zinečnatých iontů došlo také k rozšíření absorpčního pásu okolo 400 nm a k posunu absorpčního maxima v této oblasti z 385 na 428 nm. Došlo také k zúžení pásu okolo 600-700 nm.

Působením iontů kovů na protoporfyryn IX (Graf 4) došlo k rozšíření absorpčního pásu v oblasti pod 400 nm, zejména pak u iontů železa.

Přestože při přidání iontů železa a zinku došlo k posunu absorpčního pásu okolo 400 nm k vyšším vlnovým délkám, z důvodu rozsahu instrumentace HPLC byla detekční vlnová délka ponechána na 400 nm.

## 4.2 Separace pomocí HPLC

### 4.2.1 Izokratická eluce

Nejdříve byly standardy chlorin  $e_4$ , chlorin  $e_6$ , feoforbid  $a$  a protoporfyryn IX proměřeny za podmínek izokratické eluce. Ta byla provedena při koncentracích 85, 90 a 95% methanolu

(B). Jako aditivum zde byla použita kyselina mravenčí, která byla přidána do methanolu v koncentraci 0,3 obj. %. Jednotlivé standardy byly proměřeny při těchto koncentracích. Byly zaznamenány retenční časy ( $t_R$ ) jednotlivých standardů. Za stejných podmínek byla proměřena také thiomočovina, která se na koloně nezadržuje, a byla proto využita pro stanovení mrtvého objemu kolony ( $t_M$ ). Z těchto hodnot byl vypočítán retenční faktor ( $k$ ) a následně byl vytvořen graf závislosti logaritmu retenčního faktoru ( $\log k$ ) na koncentracích methanolu (objemový zlomek –  $\phi$ ) pro jednotlivé standardy. Retenční faktor byl vypočítán podle vztahu (1). Retenční časy a retenční faktory pro jednotlivé koncentrace methanolu jsou uvedeny v příloze TABULKY (Tabulka P 1). Graf závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku methanolu je uveden v příloze GRAFY (Graf P 5).

Vzorec pro výpočet retenčního faktoru:

$$k = \frac{t_R}{t_M} - 1 \quad (1)$$

$t_R$  - retenční čas standardu (min)

$t_M$  – retenční čas thiomočoviny - mrtvý objem kolony (min)

Byla zjištěna lineární závislost logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku methanolu (Graf P 5). Dále bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací methanolu v mobilní fázi klesá retence standardů, což odpovídá typickému chování látek v systému s obrácenými fázemi. Regresní parametry retenčního modelu ukazují na velice podobnou retenci chlorinu  $e_6$  a feoforbidu  $a$ , které je tedy obtížné rozdělit ve studovaném rozsahu koncentrací methanolu. Regresní parametry (směrnice přímky) dále indikují rostoucí strmost závislostí s rostoucí molární hmotností standardů a s počtem ionizovatelných skupin (karboxylová kyselina u chlorinu  $e_6$ , hydroxylová skupina u feoforbidu  $a$ ), které jsou však díky přítomnosti kyselých aditiv v mobilní fázi v nedisociovaném stavu.

#### 4.2.2 Gradientová eluce a vliv aditiv mobilní fáze na separaci

Standardy, a poté i vzorek, byly separovány pomocí HPLC za využití několika gradientů. Rozsah koncentrací při gradientech byl 10-75% methanolu. Zároveň byly tyto gradienty proměnlivé také v čase (10-20 min). Gradienty (Příloha TABULKY P 2, P 4, P 6, P 7) jsou popsány dobou gradientu  $t_g$ , a strmostí gradientu  $B$ . Strmost gradientu byla vypočtena podle vzorce (2). První separace probíhaly za využití kyseliny octové jako aditiva. Pro separaci v systému HPLC bylo toto aditivum dostačující. Pro následnou analýzu standardů, a především pak vzorku, pomocí hmotnostní spektrometrie se však tohle aditivum ukázalo jako ne příliš vhodné. Proto bylo využito druhého aditiva octanu amonného, který se ukázal jako vhodnější. Také s tímto aditivem byly standardy a vzorek proměřeny při několika profilech gradientů. Gradienty byly označeny čísly a indexy písmen a-d. Profily gradientů použité při separaci

standardů, za využití aditiva kyseliny mravenčí, byly označeny 1<sub>a</sub>-7<sub>a</sub>. Gradienty použité při separaci standardů, za využití aditiva octanu amonného, byly označeny 1<sub>b</sub>-7<sub>b</sub>. Profily gradientů použité při separaci vzorku, za využití aditiva kyseliny mravenčí, byly označeny 1<sub>c</sub>-8<sub>c</sub>. Profily gradientů použité při separaci vzorku, za využití aditiva octanu amonného, byly označeny 1<sub>d</sub>-9<sub>d</sub>. Některé profily gradientů byly shodné při všech těchto měřeních (gradient 1<sub>a</sub>, 1<sub>b</sub>, 1<sub>c</sub>, 1<sub>d</sub>), další gradienty se pro daná měření lišily.

Vzorec pro výpočet strmosti gradientu:

$$B = \frac{\varphi_k - \varphi_p}{t_g} \quad (2)$$

B – strmost gradientu (min<sup>-1</sup>)

φ<sub>k</sub> – koncová koncentrace methanolu

φ<sub>p</sub> – počáteční koncentrace methanolu

t<sub>g</sub> – doba gradientu (min)

#### 4.2.2.1 Profily gradientů při HPLC separaci standardů, za využití kyseliny mravenčí jako aditiva mobilní fáze

Standardy byly separovány pomocí HPLC za využití několika profilů gradientové eluce. Jako aditivum byla nejdříve použita kyselina mravenčí (0,3 obj. %), která byla přidána k methanolu (B). Rozsah koncentrace methanolu při separaci byl od 10 do 75 obj. % methanolu. Tyto profily, spolu s dobou gradientu (t<sub>g</sub>) a strmostí gradientu (B), jsou zobrazeny v příloze TABULKY (Tabulka P 2). Chromatogramy jednotlivých standardů při různých gradientech byly porovnány, jejich záznam je vyobrazen v grafech P 6-P 9, které se nachází v příloze GRAFY. Následně byly zaznamenány retenční časy standardů v závislosti na použitém profilu gradientu. Tyto závislosti jsou zobrazeny v příloze TABULKY (Tabulka P 3). Gradienty, u kterých byla využita kyselina mravenčí jako aditivum, jsou označeny jako gradient č. 1<sub>a</sub>-7<sub>a</sub>. Pro další analýzu vlivu kovových iontů na chromatografickou separaci byl zvolen gradient č. 6<sub>a</sub> (t<sub>g</sub> = 15 min, B = 0,017 min<sup>-1</sup>). Tento gradient je zobrazen v tabulce 2.

**Tabulka 2** Profil gradientu č. 6<sub>a</sub>, doba gradientu t<sub>g</sub>, strmost gradientu B

gradient č. 6 <sub>a</sub>		
t (min)	c <sub>methanol</sub> (%)	t <sub>g</sub> = 15min
0	75	B = 0,017 min <sup>-1</sup>
15	100	
29	100	
29,2	75	

#### 4.2.2.2 Profily gradientů při HPLC separaci standardů, za využití octanu amonného jako aditiva mobilní fáze

Standardy byly separovány za využití několika profilů gradientů. Jako aditivum mobilní fáze zde byl použit octan amonný. Ten byl přidán v koncentraci 10 mmol/l jak k methanolu (B), tak k vodě (A). Rozsah koncentrací methanolu byl od 10-70 %. Tyto profily, spolu s dobou gradientu ( $t_g$ ) a strmostí gradientu (B), jsou zobrazeny v příloze TABULKY (Tabulka P 4). Chromatogramy jednotlivých standardů při různých gradientech byly porovnány, jejich záznam je vyobrazen v grafech P 10-P 13, který se nachází v příloze GRAFY. Následně byly zaznamenány retenční časy standardů v závislosti na použitém profilu gradientu. Tyto závislosti jsou zobrazeny v příloze TABULKY (Tabulka P 5). Gradienty, u kterých byla využita kyselina mravenčí jako aditivum, jsou označeny jako gradient č. 1<sub>b</sub>-7<sub>b</sub>. Pro následnou analýzu pomocí LC-MS ( $MS^2$ ) byl zvolen gradient č. 6<sub>b</sub> ( $t_g = 15$  min,  $B = 0,02$  min<sup>-1</sup>), tento gradient je zobrazen v Tabulce 3.

**Tabulka 3** Profil gradientu č. 6<sub>b</sub>, doba gradientu  $t_g$ , strmost gradientu B

gradient č. 6 <sub>b</sub>		
t (min)	c <sub>methanol</sub> (%)	$t_g = 15$ min $B = 0,02$ min <sup>-1</sup>
0	70	
15	100	
29	100	
29,2	70	

S rostoucí strmostí gradientů dochází k většímu rozmývání píků. Vlivem doby gradientu pak dochází k posunu retence k vyšším hodnotám. Optimálně zvolený gradient je gradient č. 6<sub>a</sub> pro aditivum kyseliny mravenčí ( $t_g = 15$  min,  $B = 0,02$  min<sup>-1</sup>), a 6<sub>b</sub> pro aditivum octanu amonného ( $t_g = 15$  min,  $B = 0,02$  min<sup>-1</sup>). U těchto gradientů lze pozorovat vznik úzkých píků a nižší retenci v porovnání s ostatními gradienty.

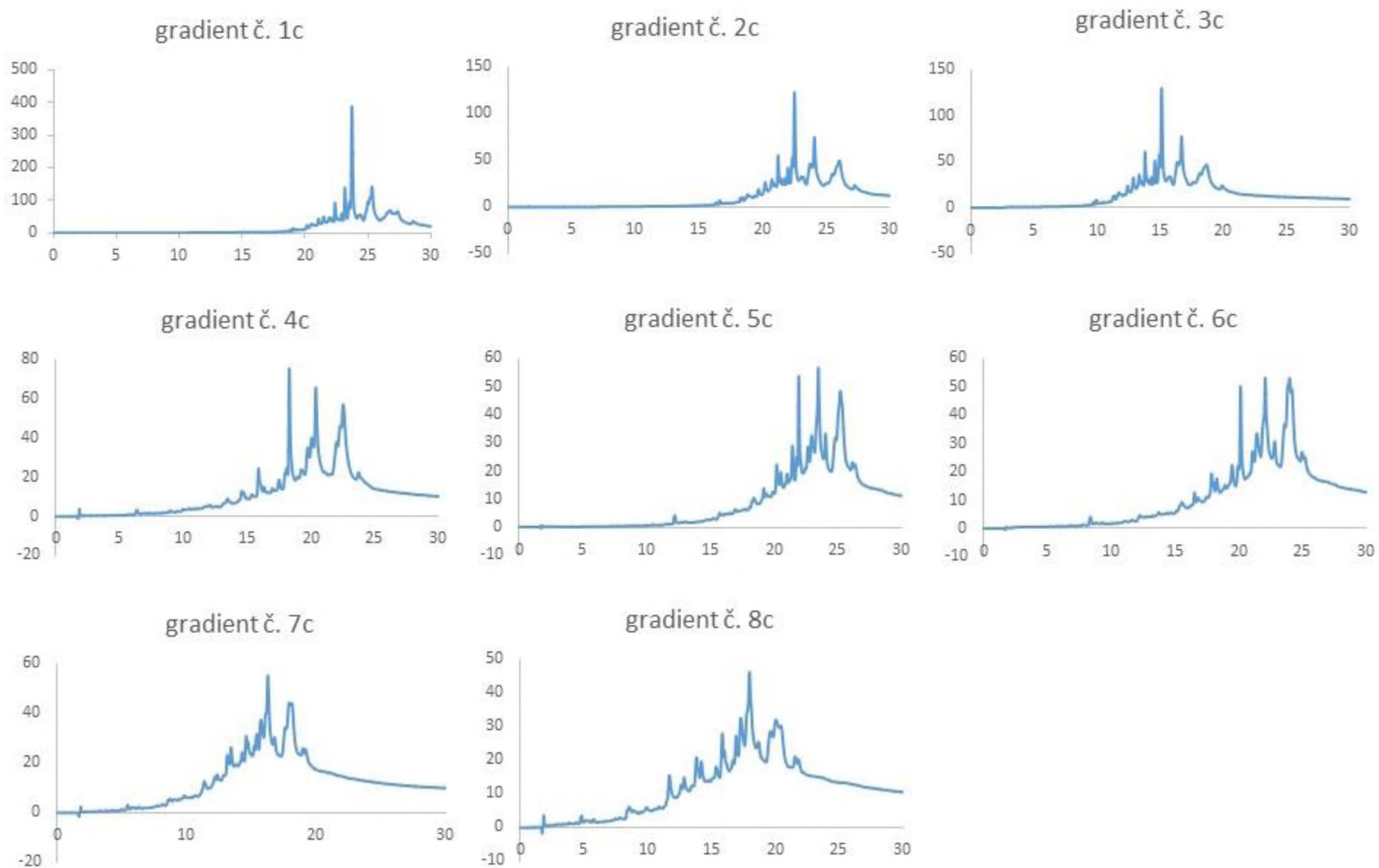
#### 4.2.2.3 Gradientová eluce HPLC separace vzorku chlorofylinu měďnatého za využití kyseliny mravenčí jako aditiva mobilní fáze

Vzorek byl proměřen za využití HPLC, bylo využito několika profilů gradientů. Jako aditivum mobilní fáze zde byla využita kyselina mravenčí, která byla přidána k methanolu (B) v koncentraci 0,3 obj. %. Rozsah koncentrace methanolu při separaci byl od 10 do 75 obj. %. Tyto profily, spolu s dobou gradientu ( $t_g$ ) a strmostí gradientu (B), jsou zobrazeny v příloze TABULKY (Tabulka P 6). Chromatogramy vzorku při různých gradientech jsou vyobrazeny v grafu 5. Vzhledem k možnému zkrácení doby analýzy byl pro další chromatografické analýzy zvolen stejný gradient jako při analýzách standardů, tedy gradient č. 7<sub>c</sub> ( $t_g = 15$  min,  $B = 0,017$  min<sup>-1</sup>). Gradient je zobrazen v Tabulce 4.



**Tabulka 4** Gradient č. 7<sub>c</sub>, doba gradientu t<sub>g</sub>, strmost gradientu B

gradient č. 7 <sub>c</sub>		
čas (min)	c methanol (%)	t <sub>g</sub> = 15 min
0	75	B = 0,017 min <sup>-1</sup>
15	100	
29	100	
29,2	75	



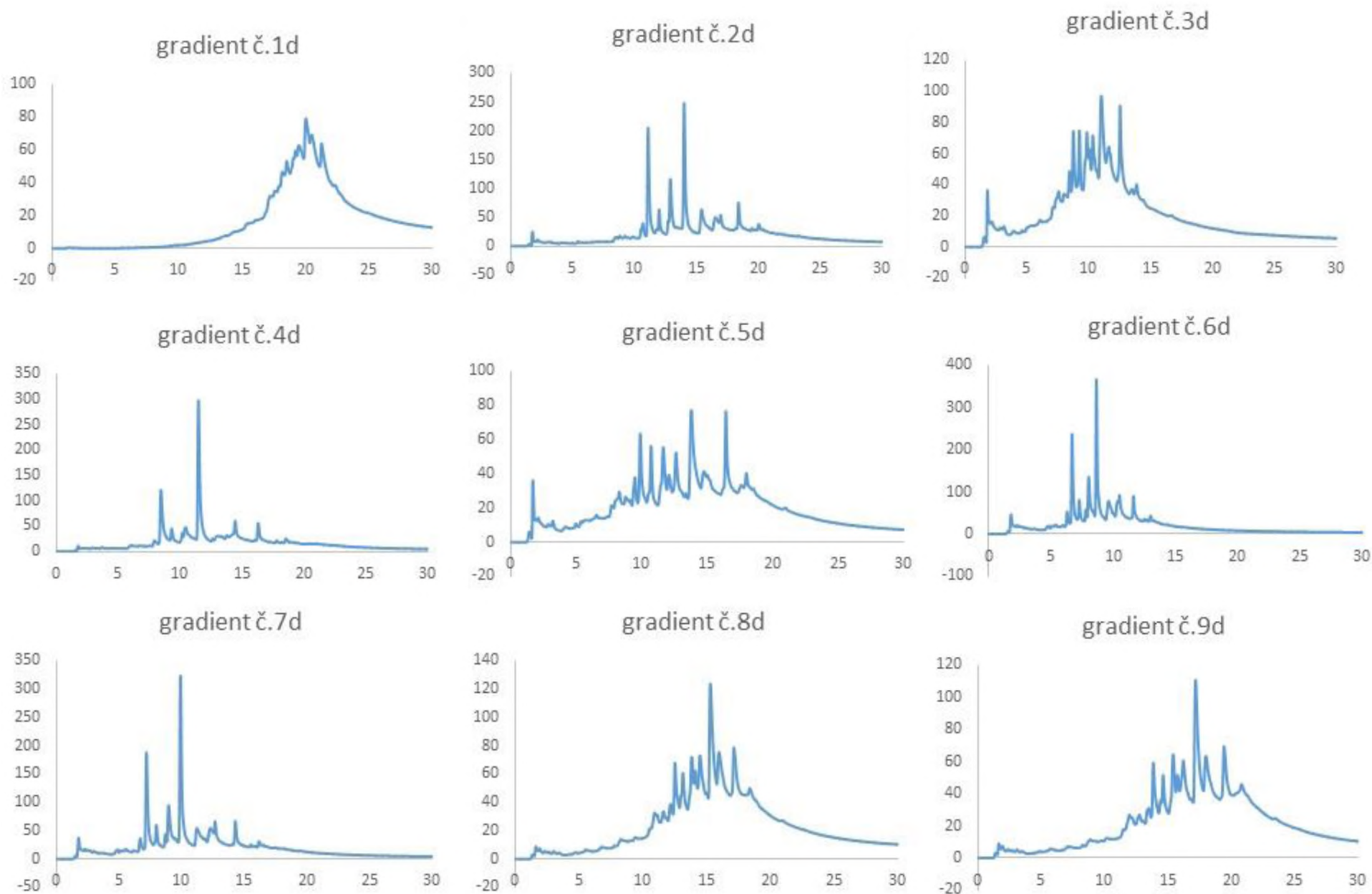
**Graf 5** Profily gradientů při chromatografické separaci vzorku chlorofylinu měďnatého, za využití kyseliny mravenčí jako aditiva

#### 4.2.2.4 Gradientová eluce HPLC separace vzorku chlorofylinu měďnatého za využití octanu amonného jako aditiva mobilní fáze

Vzorek chlorofylinu měďnatého byl analyzován pomocí kapalinové chromatografie. Bylo využito několika profilů gradientů. Jako aditivum mobilní fáze zde byl použit octan amonný, který byl přidán k methanolu (B) i k vodě (A). Koncentrace octanu amonného byla v obou složkách mobilní fáze 10 mmol/l. Rozsah koncentrace methanolu při separaci byl od 10 do 70 obj. %. Profily gradientů, spolu s dobou gradientu ( $t_g$ ) a strmostí gradientu (B), jsou zobrazeny v příloze TABULKY (Tabulka P 7). Chromatogramy vzorku při různých gradientech jsou vyobrazeny v grafu 6. Pro další analýzy (LC-MS, LC-MS<sup>2</sup>) byl zvolen stejný gradient, jako při analýzách standardů, tedy gradient č. 7<sub>d</sub>, ( $t_g = 15$  min,  $B = 0,02$  min<sup>-1</sup>).

**Tabulka 5** Gradient č. 7<sub>d</sub>, doba gradientu  $t_g$ , strmost gradientu B

gradient č.7 <sub>d</sub>		
t (min)	c methanol (%)	$t_g = 15$ min $B = 0,02$ min <sup>-1</sup>
0	70	
15	100	
29	100	
29,2	70	

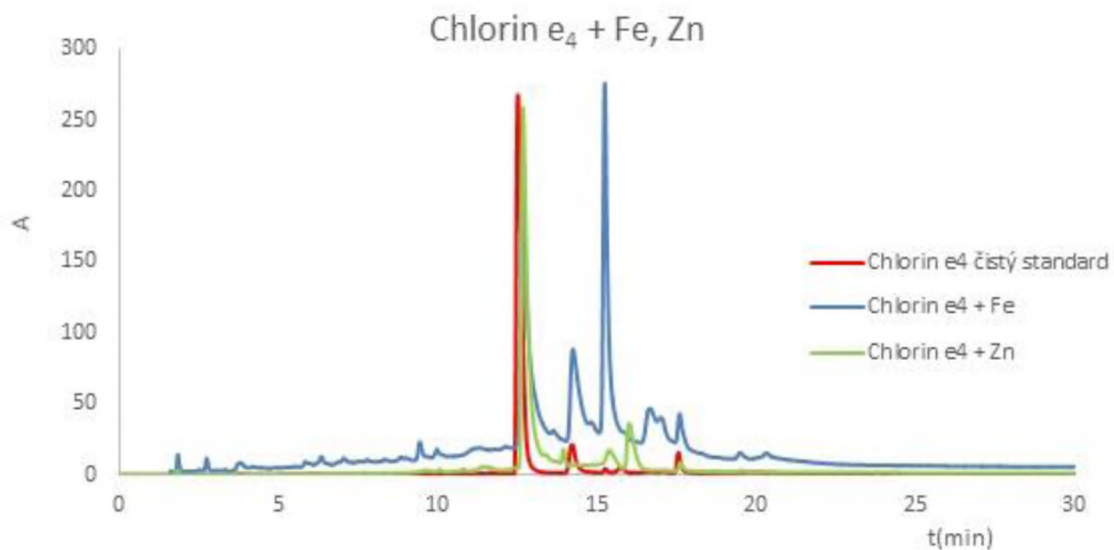


**Graf 6** Profily gradientů při chromatografické separaci vzorku chlorofylinu měďnatého, za využití octanu amonného jako aditiva

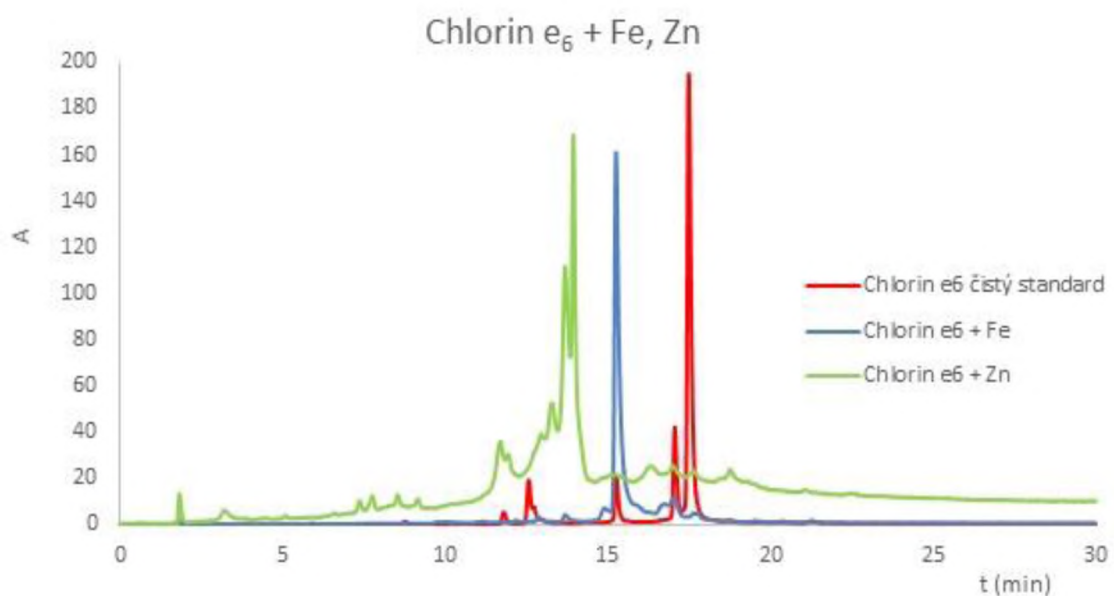
Pro porovnání vlivu aditiv mobilní fáze na separaci byl zvolen nejdříve gradient č. 1<sub>c</sub> (1<sub>d</sub>), který je stejný pro obě aditiva. Tento gradient začíná na 10 % ( $t_g = 18 \text{ min}$ ,  $B = 0,05 \text{ min}^{-1}$ ). Z grafů 5 a 6 je patrné, že tato nízká koncentrace vyhovuje spíše separaci za použití kyseliny mravenčí (1<sub>c</sub>). Retenční čas je sice větší, nedochází však k driftu nulové linie, jako je tomu v případě separace s octanem amonným (1<sub>d</sub>). V případě aditiva octanu amonného nedošlo k úplné separaci. Pokud pak srovnáme chromatogramy s gradienty 7<sub>c</sub> ( $t_g = 15 \text{ min}$ ,  $B = 0,017 \text{ min}^{-1}$ ) a 7<sub>d</sub> ( $t_g = 15 \text{ min}$ ,  $B = 0,02 \text{ min}^{-1}$ ), které začínají na 70 a 75 %, zjistíme, že gradient s takto vysokou koncentrací methanolu vyhovuje spíše separacím za využití octanu amonného jako aditiva (7<sub>d</sub>). Celková analýza je kratší, než je tomu v případě separace s kyselinou mravenčí (7<sub>c</sub>). Zároveň zde nedochází ke zvedání nulové linie, což je možné přisuzovat tomu, že aditivum bylo přidáno do obou složek mobilní fáze, tedy jak do vody (A), tak do methanolu (B). Jak již bylo zmíněno, gradient 7<sub>c</sub>, tedy gradient za použití kyseliny mravenčí, byl využíván v pouze chromatografických analýzách, protože nebyl příliš vhodný pro analýzy pomocí hmotnostního spektrometru. K tomuto účelu byla vytvořena metoda, která jako aditivum využívala octan amonný.

#### 4.2.3 Separace derivátů chlorofylu s přidáním ionty kovů

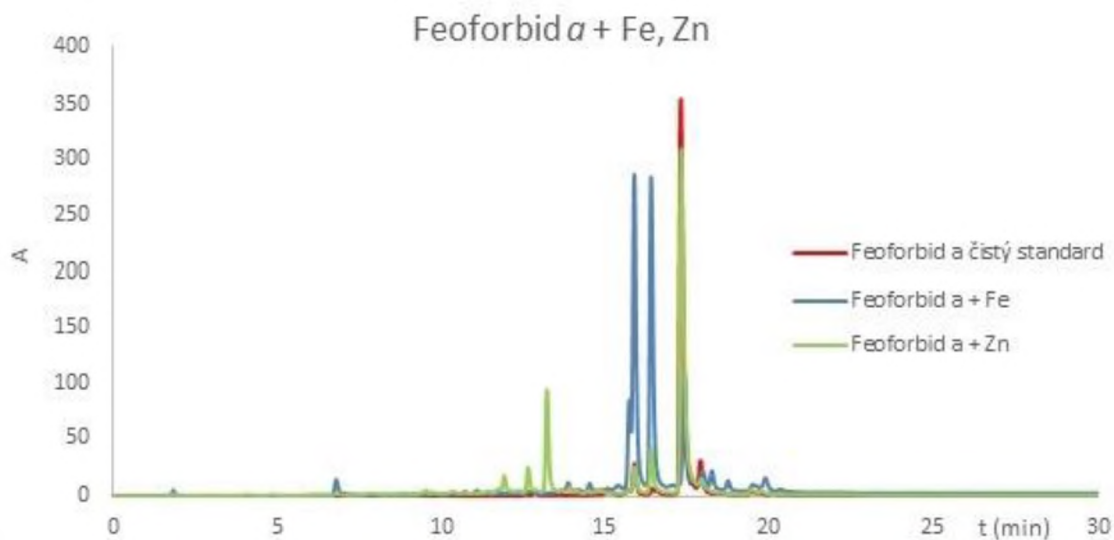
Jak již bylo zmíněno, součástí této diplomové práce bylo také sledování vlivu kovových iontů na separaci chlorofylových derivátů. Z UV/VIS spekter bylo zjištěno, že absorbance a profil spektra jednotlivých standardů se působením iontů kovů mění. Proto byly tyto standardy, ke kterým byly přidány ionty železa a zinku, analyzovány pomocí HPLC. Ionty byly přidávány v desetinásobném nadbytku a příprava těchto roztoků je popsána v kapitole 3.3.3. K této analýze byla využita mobilní fáze voda/methanol, s přidáním aditivem kyselinou mravenčí (0,3 obj. %). Separace probíhala při gradientové eluci. Byl použit profil gradientu, který byl vybrán jako nejvhodnější při separaci čistých standardů (gradient č. 7<sub>a</sub>). Porovnání chromatogramů čistých standardů a standardů s přidáním ionty kovů je zobrazeno v grafech 7-10. Vlivem přidání iontů ke standardům docházelo k velkému poklesu intenzit absorbance. Z tohoto důvodu byla absorbance normalizována tak, aby byly jednotlivé chromatogramy ve stejných jednotkách.



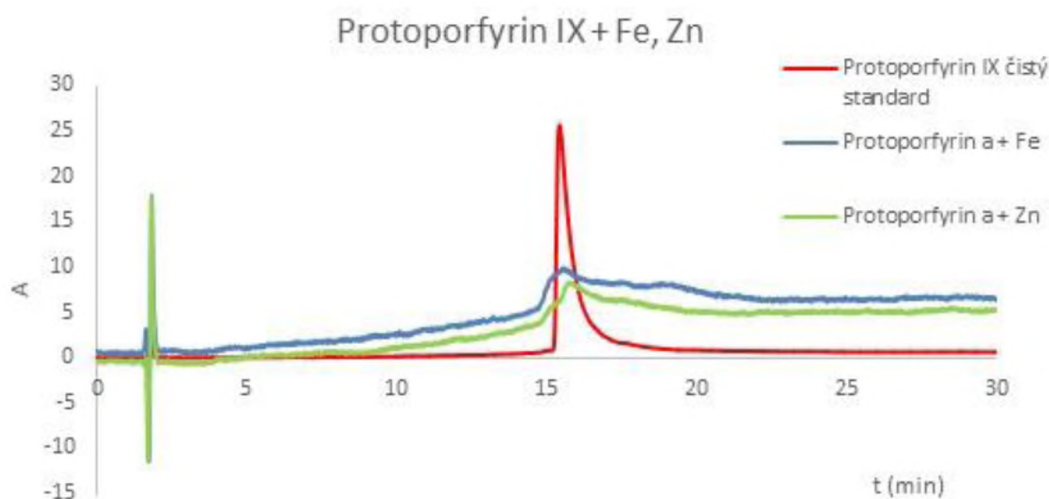
**Graf 7** Chromatogram čistého standardu chlorinu e<sub>4</sub> a standardu s přidánými ionty kovů za využití gradientu 7<sub>a</sub>



**Graf 8** Chromatogram čistého standardu chlorinu e<sub>6</sub> a standardu s přidánými ionty kovů za využití gradientu 7<sub>a</sub>



**Graf 9** Chromatogram čistého standardu feoforbidu  $\alpha$  a standardu s přidanými ionty kovů za využití gradientu 7<sub>a</sub>



**Graf 10** Chromatogram čistého standardu protoporfyryinu IX a standardu s přidanými ionty kovů za využití gradientu 7<sub>a</sub>

Z chromatogramů je patrné, že ionty kovů mají vliv na separaci standardů. U chlorinu e<sub>4</sub> (Graf 7) došlo vlivem přidání železitých iontů ke vzniku dalšího píku (15,3 min). Vlivem přidání zinečnatých iontů pak došlo k mírné změně retence, a také ke vzniku menšího píku (16,0 min). Vlivem obou iontů pak došlo ke snížení intenzity signálu.

Přidáním železitých iontů ke standardu chlorinu e<sub>6</sub> (Graf 8), došlo ke změně retence. Přidáním zinečnatých iontů došlo ke vzniku nového píku (13,9 min) a k velkému snížení píku chlorinu e<sub>6</sub>. Zároveň také došlo u obou iontů ke snížení intenzity signálu.

Vlivem přidání železitých iontů ke standardu feoforbidu  $\alpha$  (Graf 9), došlo ke snížení intenzity píku feoforbidu  $\alpha$ , a zároveň došlo ke vzniku dvou nových píků v časech 16,4 a 16,9 min. Vlivem působení zinečnatých iontů také došlo ke snížení intenzity píku feoforbidu  $\alpha$ , a zároveň došlo ke vzniku nových, menších píků v časech 11,9, 12,7 a 1,03,2 min.

Z grafu 10 je patrné, že působení iontů železa a zinku na standard protoporphyrinu mělo za následek ztrátu signálu. Z tohoto důvodu byly další experimenty prováděny pouze s předešlými třemi standardy.

#### 4.2.3.1 Vliv různých koncentrací iontů kovů na separaci derivátů chlorofylu

V následujícím experimentu byl zjišťován vliv rostoucích koncentrací iontů kovů na chromatografickou separaci chlorofylinových derivátů. K experimentu bylo využito standardů chlorinu  $e_4$ , chlorinu  $e_6$  a feoforbidu  $a$ . Byly připraveny standardy, ke kterým byly přidávány ionty kovů v pěti-, deseti-, patnácti- a dvacetinásobném nadbytku. Příprava těchto roztoků je uvedena v kapitole 3.3.3. K této analýze byla využita mobilní fáze voda/methanol, s přidaným aditivem kyselinou mravenčí (0,3 obj. %). Separace probíhala při gradientové eluci. Byl použit profil gradientu, který byl vybrán jako nejvhodnější při separaci čistých standardů (gradient č. 7a). Chromatogramy jednotlivých standardů s přidanými ionty železa a zinku o různých koncentracích jsou vyobrazeny v příloze GRAFY (Graf P 14 – P 19). Vlivem přidání iontů ke standardům docházelo k velkému poklesu intenzit absorbance. Z tohoto důvodu byla absorbance normalizována tak, aby byly jednotlivé chromatogramy ve stejných jednotkách, přičemž poměr mezi jednotlivými koncentracemi přidávaných kovových iontů zůstal zachován.

Z chromatogramu standardu chlorinu  $e_4$  s přidanými ionty železa (Graf P 14) je patrné, že došlo ke vzniku dalšího píku (15,3 min). Tento pík rostl zároveň s rostoucí koncentrací železitých iontů ve standardu. Zároveň s rostoucí koncentrací železitých iontů došlo k postupnému poklesu píku chlorinu  $e_4$ . Graf P 15 pak zobrazuje standard chlorinu  $e_4$  s přidanými zinečnatými ionty. Zde došlo k mírnému posunu retence, zároveň pak s rostoucí koncentrací iontů zinku docházelo ke snižování píku standardu chlorinu  $e_4$ . U obou iontů došlo k poklesu intenzity signálu.

Přidáním železitých iontů o různých koncentracích ke standardu chlorinu  $e_6$  (Graf P 16) došlo k posunu retence, tento pík se dále snižoval s rostoucí koncentrací železitých iontů. Vlivem zinečnatých iontů (Graf P 17) došlo ke vzniku nového píku (13,9 min), který rostl s rostoucí koncentrací iontů zinku. Zároveň došlo k velkému snížení píku standardu chlorinu  $e_6$ .

Na chromatogramu standardu feoforbidu  $a$  s přidanými železitými ionty o různých koncentracích (Graf P 18) lze vidět dva nové píky (16,4 a 16,9 min). Tyto píky rostou s rostoucí koncentrací železitých iontů. Pík feoforbidu  $a$  pak s touto rostoucí koncentrací klesal. Z Grafu P 19 je patrné, že vlivem zinečnatých iontů na feoforbid  $a$  došlo ke vzniku třech nových píků v časech 11,9, 12,7 a 13,2 min, které rostly s rostoucí koncentrací standardu. Pík standardu feoforbidu  $a$  pak s touto rostoucí koncentrací klesal.

Vytvoření komplexů mezi analyzovanými standardy bylo v dalších experimentech ověřována pomocí analýzy LC-MS, a MS<sup>2</sup>.



### 4.3 Identifikace látek ve vzorku chlorofylinu měďnatého pomocí LC-MS a MS<sup>2</sup>

#### 4.3.1 Analýza standardů pomocí LC-MS a MS<sup>2</sup>

Následující část diplomové práce se zabývala identifikací látek ve vzorku pomocí hmotnostní spektrometrie. Podmínky měření jsou popsány v kapitole 3.3.5. Nejdříve byly proměřeny standardy chlorin e<sub>4</sub>, chlorin e<sub>6</sub> a feoforbid *α*. U protoporphyrinu IX nebyl v hmotnostním spektru zaznamenán žádný signál. Součástí hmotnostního spektrometru byl také UV-VIS detektor, na kterém však také žádný signál nebyl nalezen. Absence signálu mohla být způsobena buď krátkou detekční celou, popřípadě pak nízkou ionizační účinností, nebo malou rozpustností vzorku. Z tohoto důvodu další analýzy tohoto standardu nebyly prováděny. Vzorky standardů chlorinu e<sub>4</sub>, chlorinu e<sub>6</sub> a feoforbidu *α* byly připraveny způsobem popsáným v odstavci 3.3.1. Analýza probíhala za gradientové eluce. Profil tohoto gradientu je vyobrazen v Tabulce 1. Byla použita mobilní fáze methanol/voda, jako aditivum byl použit octan amonný (10 mmol/l), který byl přidán k oběma složkám mobilní fáze. Byla provedena analýza pomocí LC-MS a MS<sup>2</sup>. Byly zaznamenány retenční časy (t<sub>R</sub>) a m/z jednotlivých standardů. Byly také popsány fragmentové ionty (ztráty). Tímto způsobem byl proveden záznam kladných i záporných iontů (MS<sup>+</sup>, MS<sup>-</sup>). Stejným způsobem byl proveden záznam kladných iontů při měření pomocí MS<sup>2+</sup>. Tento záznam je zobrazen v Tabulce 6. MS spektra jednotlivých standardů jsou zobrazeny v příloze GRAFY (Grafy P 20 – P 22).

**Tabulka 6** Záznam retenčních časů, ztrát a m/z nalezených v hmotnostních spektrech jednotlivých standardů

Standard	sumární vzorec	M (g/mol)	t <sub>R</sub> (min) MS	t <sub>R</sub> (min) MS <sup>2</sup>	m/z nalezena v MS <sup>+</sup> , ztráty	m/z nalezena v MS <sup>2+</sup> , ztráty	m/z nalezena v MS <sup>-</sup> , ztráty
Chlorin e <sub>4</sub>	C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	552,264	23,9	22,8	553,2 [M+H] <sup>+</sup>	553,2 [M+H] <sup>+</sup>  nefragmentuje	550,8 [M-H] <sup>-</sup> 506,9 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> 1102,7 [2M-H] <sup>-</sup>
Chlorin e <sub>6</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	596,264	33,0	32,9	551,2 [M+H-HCOOH] <sup>+</sup> 1101,2 [2M+H-HCOOH] <sup>+</sup>	551,2 [M+H-HCOOH] <sup>+</sup>  nefragmentuje	548,9 [M-H-HCOOH] <sup>-</sup> 1098,7 [2M-H-HCOOH] <sup>-</sup> 460,9 [M-H-HCOOH-2CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>
Feoforbid <i>α</i>	C <sub>35</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	592,269	32,7	32,7	593,2 [M+H] <sup>+</sup> 1185,2 [2M+H] <sup>+</sup>	593,3 [M+H] <sup>+</sup> 533,2 [M+H-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	590,8 [M-H] <sup>-</sup> 1182,7 [2M-H] <sup>-</sup>

Poté co byly zaznamenány m/z pro každý standard, byly sledovány další potenciální fragmentové ionty. U standardu chlorinu e<sub>4</sub> byl v čase 23,9 min v hmotnostním spektru nalezen pík, který odpovídal monoizotopické hmotnosti chlorinu e<sub>4</sub>, o m/z 553,2. Tento pík byl nalezen

také v spektru MS<sup>2</sup>. Další fragmentové ionty nebyly pozorovány, pravděpodobně vlivem nízké kolizní energie. Fragmentové ionty se projevíly v záznamu záporných iontů. U deprotonované molekuly došlo k dekarboxylaci.

U standardu chlorinu e<sub>6</sub> byl v čase 33 minut v hmotnostním spektru zaznamenán pík, o m/z 551,2 který neodpovídá monoizotopické hmotnosti chlorinu e<sub>6</sub> (596,264 g/mol). Tento pík pravděpodobně odpovídá fragmentovému iontu způsobenému ztrátou kyseliny mravenčí. Projevil se také ve spektru MS<sup>2</sup>, další fragmentové ionty nebyly pozorovány. Fragmentové ionty se opět projevíly v záznamu záporných iontů. Byl nalezen pík odpovídající dekarboxylaci a ztrátě kyseliny mravenčí.

V hmotnostním spektru standardu feoforbidu *a* byl v čase 32,7 min nalezen pík, odpovídající monoizotopické hmotnosti feoforbidu *a*, o m/z 593,2. Tento pík byl nalezen také ve spektru MS<sup>2</sup>. Při analýze pomocí MS<sup>2</sup> došlo k fragmentaci molekuly za vzniku fragmentového iontu, jenž odpovídal ztrátě kyseliny octové. V záznamu kladných i záporných iontů byl pak nalezen pík, odpovídající protonované, respektive deprotonované molekule.

#### **4.3.2 Identifikace jednotlivých složek vzorku měďnatého komplexu chlorofylinu pomocí LC-MS a MS<sup>2</sup>**

Analýza vzorku pomocí hmotnostní spektrometrie probíhala při stejných podmínkách měření jako analýza standardů (viz kapitola 3.3.5.). Také zde bylo využito gradientové eluce (viz Tabulka 1). Byla použita mobilní fáze methanol/voda, jako aditivum byl k oběma složkám mobilní fáze přidán octan amonný (10 mmol/l). Identifikace složek vzorku probíhala na základě srovnání s publikovanými daty (MORTENSEN, A. a kol. 2007)<sup>[46]</sup>. Byla provedena LC-MS a MS<sup>2</sup> analýza vzorku chlorofylinu měďnatého barvivo E 141 (ii). Identifikace proběhla na základě použitých standardů a pomocí srovnání publikovaných m/z jednotlivých měďnatých komplexů chlorofylinu s experimentálně získanými daty z hmotnostních spekter. V MS spektru byly nalezeny jednotlivé m/z a byly zaznamenány jejich retenční časy - t<sub>R</sub> (MS). Stejně m/z byly následně hledány také ve spektru MS<sup>2</sup>. V Tabulce 7 jsou zaznamenány retenční časy experimentálně nalezených měďnatých komplexů chlorofylinu ve spektru MS, retenční časy ve spektru MS<sup>2</sup> - t<sub>R</sub>(MS<sup>2</sup>), publikované m/z a m/z nalezené ve spektru MS<sup>2</sup>.

**Tabulka 7** Retenční časy a m/z jednotlivých složek vzorku

	$t_R$ (min) MS	$t_R$ (min) MS <sup>2</sup>	m/z	m/z nalezena v MS <sup>2</sup>	poznámka
Cu chlorin e <sub>6</sub>	31,14	31,29	657	656,6	
Cu chlorin p <sub>6</sub>	30,86	20,64	643	643,7	nízká intenzita
Cu rhodin	35,90	37,98	667	668,8	nízká intenzita
Cu purpurin 7, Cu rhodin g <sub>7</sub>	31,13	31,20	627	626,5	
Cu Chlorin e <sub>4</sub> , Cu isochlorin e <sub>4</sub>	30,81	28,97	614	614,4	
Cu pyrofeoforbid <i>a</i>	40,44	-	595	-	nenalezen v MS <sup>2</sup>
Cu porfyrin	30,80	31,37	583	582,4	nízká intenzita
Cu porfyrin chlorinu e <sub>6</sub>	32,16	31,29	655	656,6	

Z patnácti hlavních složek sodné soli chlorofylinu měďnatého, které byly publikovány, bylo ve vzorku nalezeno celkem devět komplexů (Cu chlorin e<sub>6</sub>, Cu chlorin p<sub>6</sub>, Cu rhodin, Cu purpurin 7, Cu rhodin g<sub>7</sub>, Cu chlorin e<sub>4</sub>, Cu isochlorin e<sub>4</sub>, Cu pyrofeoforbid *a*, Cu porfyrin a Cu porfyrin chlorinu e<sub>6</sub>). Avšak Cu purpurin 7 a Cu rhodin g<sub>7</sub> nelze rozlišit, protože mají stejné m/z. Stejně je tomu u Cu Chlorinu e<sub>4</sub>, Cu isochlorinu e<sub>4</sub>. Všechny m/z těchto složek byly nalezeny ve hmotnostním spektru. Kromě Cu pyrofeoforbidu *a*, byla přítomnost všech dalších složek potvrzena také pomocí MS<sup>2</sup>. Některé ionty se pak v MS<sup>2</sup> vyskytovaly s malou intenzitou. Jako příklad jsou v příloze GRAFY uvedeny dvě MS<sup>2</sup> spektra, a sice Cu chlorinu e<sub>6</sub> (Graf P 23) a Cu purpurinu 7/Cu rhodinu g<sub>7</sub> (Graf P 24).

#### 4.3.3 Identifikace komplexů chlorofylinu s ionty železa a zinku pomocí LC-MS a MS<sup>2</sup>

Ke vzorku chlorofylinu měďnatého byly přidány ionty železa a zinku. Bylo zjišťováno, zda tyto dva ionty dokáží nahradit měďnatý iont ve struktuře chlorofylinu. Analýza pomocí hmotnostní spektrometrie probíhala za stejných podmínek jako analýza čistého vzorku (viz kapitola 3.3.5.). Také zde bylo využito gradientové eluce (viz Tabulka 1). Byla použita mobilní fáze methanol/voda, jako aditivum byl k oběma složkám mobilní fáze přidán octan amonný (10 mmol/l). Roztok vzorku byl připraven rozpuštěním 1 mg chlorofylinu měďnatého v 5 ml acetonitrilu, poté byl vložen na 10 minut do ultrazvukové lázně. Vzorek byl převeden do Eppendorf zkumavky a odstředován po dobu 10 minut. Ke vzorku byl přidán roztok železité a zinečnaté soli. Roztoky iontů kovů byly připraveny stejně, jako při analýze standardů (viz kapitola 3.3.3.), ionty kovů byly přidány v desetinásobném nadbytku. Následně byla provedena analýza pomocí LC-MS a MS<sup>2</sup>. Byly sledovány monoizotopické hmotnosti, které odpovídaly jednotlivým složkám čistého vzorku chlorofylinu měďnatého (viz kapitola 4.3.2.). Od těchto hodnot byla odečtena monoizotopická hmotnost mědi (62,930 g/mol), poté k nim byla přičtena monoizotopická hmotnost železa (55,935 g/mol) a zinku (63,929 g/mol). Nalezené m/z, retenční časy pro MS a MS<sup>2</sup> spektra jsou zobrazeny v Tabulkách 8 (pro ionty železa) a 9 (pro ionty zinku).

**Tabulka 8** Záznam m/z a t<sub>R</sub> jednotlivých komplexů chlorofylinu, s přidáním ionty železa

Vzorek + Fe	m/z (vzorek)	m/z (vzorek-Cu+Fe)	t <sub>R</sub> (min) MS	t <sub>R</sub> (min) MS <sup>2</sup>	m/z nalezena v MS <sup>2</sup>	poznámka
chlorin e <sub>6</sub>	657	650,005	-	-	-	nenalezen v MS, MS <sup>2</sup>
chlorin p <sub>6</sub>	643	636,005	24,6	24,56	636,1	nízká intenzita
rhodin	667	660,005	32,3	-	-	nenalezen v MS <sup>2</sup>
purpurin 7 rhodin g <sub>7</sub>	627	620,005	40,5	41,4	619,2	
chlorin e <sub>4</sub> isochlorin e <sub>4</sub>	614	607,005	41,3	42,58	606,5	
pyrofeoforbid a	595	588,005	-	-	-	nenalezen v MS, MS <sup>2</sup>
porfyrin	583	576,005	34,6	34,64	577,6	
porfyrin e <sub>6</sub>	655	648,005	49,5	-	-	nenalezen v MS <sup>2</sup>

**Tabulka 9** Záznam m/z a t<sub>R</sub> jednotlivých komplexů chlorofylinu, s přidáním ionty zinku

Vzorek +Zn	m/z (vzorek)	m/z (vzorek-Cu+Zn)	t <sub>R</sub> (min) MS	t <sub>R</sub> (min) MS <sup>2</sup>	m/z nalezena v MS <sup>2</sup>	poznámka
chlorin e <sub>6</sub>	657	657,9995	31,11	31,16	656,5	
chlorin p <sub>6</sub>	643	643,9995	25,60	25,93	644,5	nízká intenzita
rhodin	667	667,9995	34,86	-	-	nenalezen v MS <sup>2</sup>
purpurin 7 rhodin g <sub>7</sub>	627	627,9995	31,04	31,15	626,2	
chlorin e <sub>4</sub> isochlorin e <sub>4</sub>	614	614,9995	-	-	-	nenalezen v MS, MS <sup>2</sup>
pyrofeoforbid a	595	595,9995	31,54	29,21	595,4	
porfyrin	583	583,9995	26,49	26,78	584,4	
porfyrin e <sub>6</sub>	655	655,9995	31,16	31,4	656,5	

Po přidání iontu železa ke komplexu chlorofylinu, byly ve spektru hledány m/z odpovídající železitému komplexu chlorofylinu. Byly nalezeny signály chlorinu p<sub>6</sub>, purpurinu 7 (rhodinu g<sub>7</sub>), chlorinu e<sub>4</sub> (isochlorinu e<sub>4</sub>) a porfyrinu. Komplexy chlorin p<sub>6</sub> a pyrofeoforbid a nebyly nalezeny ve spektru MS ani MS<sup>2</sup>. Komplexy rhodin a porfyrin e<sub>6</sub> byly nalezeny v hmotnostním spektru, nebyly ale nalezeny ve spektru MS<sup>2</sup>.

Po přidání iontu zinku ke komplexu chlorofylinu, byly ve spektru hledány m/z odpovídající zinečnatému komplexu chlorofylinu. Byly nalezeny signály odpovídající chlorinu e<sub>6</sub>, chlorinu p<sub>6</sub>, purpurinu 7 (rhodinu g<sub>7</sub>), pyrofeoforbidu a, porfyrinu a porfyrinu e<sub>6</sub>. Chlorin e<sub>4</sub> (isochlorin e<sub>4</sub>) nebyly nalezeny ani ve spektru MS, ani ve spektru MS<sup>2</sup>. Komplex rhodinu nebyl nalezen ve spektru MS<sup>2</sup>.

Z dat uvedených v Tabulce 8 je patrné, že pravděpodobně došlo k náhradě iontu mědi za iont železa, a to jak na základě srovnání hmotnostních spekter, tak i retenčních časů při porovnání s Tabulkou 7. Pro experimenty s přidáním ionty zinku (Tabulka 9) díky podobné atomové

hmotnosti mědi a zinku nebylo možné jednoznačně potvrdit, že došlo k výměně iontů v molekulách chlorofylinů. U některých chlorofylinů (chlorin  $p_6$ , porfyrin) došlo k výraznějšímu posunu retenčních časů, u ostatních chlorofylinů byly změny v retenčních časech malé.

## 5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat podmínky chromatografické separace pro analýzu vzorku barviva sodné soli chlorofylinu měďnatého. Separace probíhala za využití mobilní fáze voda (A) a methanol (B) a bylo využito gradientové eluce. Optimalizovány byly jednotlivé profily gradientu. Další optimalizace se týkala aditiv mobilní fáze. Byla využita dvě aditiva, a to kyselina mravenčí a octan amonný. Byl sledován vliv aditiv na separaci standardů a vzorku při různých profilech gradientu. Při využití aditiva kyseliny mravenčí se ukázal jako optimální gradient č. 6<sub>a</sub>, ( $t_g = 15 \text{ min}$ ,  $B = 0,17 \text{ min}^{-1}$ ). Tento gradient začínal na 75% B, v 15 minutě vzrostl na 100 % B a ve 29,2 minutě klesl na 75% B. Celková doba analýzy byla 30 minut. Jako optimální profil gradientu pro analýzu za použití octanu amonného jako aditiva se ukázal gradient č. 6<sub>b</sub>, ( $t_g = 15 \text{ min}$ ,  $B = 0,02 \text{ min}^{-1}$ ). Tento gradient začínal na 70% B, v 15 minutě vzrostl na 100 % B a ve 29,2 minutě klesl na 70% B.

Další součástí této práce bylo zkoumání vlivu iontů kovů železa na chromatografickou separaci. Bylo zjištěno, že přidáním železnatých a zinečnatých iontů ke standardům chlorinu e<sub>4</sub>, chlorinu e<sub>6</sub>, feoforbidu  $\alpha$  a protoporfyrinu IX, dochází ke snížení intenzity signálů jednotlivých standardů, zároveň také ke změně retence a vzniku nových píků. S rostoucí koncentrací iontů kovů pak byly tyto změny větší.

Dalším cílem této práce byla identifikace jednotlivých komplexů chlorofylinu měďnatého ve vzorku. Tato analýza probíhala za využití LC-MS a MS<sup>2</sup>. Ve vzorku byly nalezeny komplexy Cu chlorin e<sub>6</sub>, Cu chlorin p<sub>6</sub>, Cu rhodin, Cu purpurin 7, Cu rhodin g<sub>7</sub>, Cu chlorin e<sub>4</sub>, Cu isochlorin e<sub>4</sub>, Cu pyrofeoforbid  $\alpha$ , Cu porfyrin a Cu porfyrin chlorinu e<sub>6</sub>, Cu purpurin 7, (Cu rhodin g<sub>7</sub>), Cu chlorin e<sub>4</sub> (Cu isochlorin e<sub>4</sub>).

V návaznosti na to, že ionty kovů měly vliv na chromatografickou separaci standardů, byla provedena analýza pomocí hmotnostní spektrometrie. Bylo zjišťováno, zda dojde v komplexech chlorofylinu měďnatého k vytěsnění měďnatého iontu ze struktury komplexu a jeho nahrazení jiným kovem. Ve spektrech vzorku chlorofylinu s přidávanými železitými ionty byly nalezeny signály chlorinu p<sub>6</sub>, purpurinu 7 (rhodinu g<sub>7</sub>), chlorinu e<sub>4</sub> (isochlorinu e<sub>4</sub>), porfyrinu, rhodinu a porfyrinu e<sub>6</sub>. Ze získaných dat je patrné, že pravděpodobně došlo k náhradě iontu mědi za iont železa, a to jak na základě srovnání hmotnostních spekter, tak i retenčních časů. Pro experimenty s přidávanými ionty zinku díky podobné molární hmotnosti mědi a zinku nebylo možné jednoznačně potvrdit, že došlo k výměně iontů v molekulách chlorofylinů. U některých chlorofylinů (chlorin p<sub>6</sub>, porfyrin) došlo k výraznějšímu posunu retenčních časů, u ostatních chlorofylinů byly změny v retenčních časech malé.

## LITERATURA

- [1] DEAN, John, A. *Chemical separation methods*. Litton Educational Publishing, Inc. 1969. 60-61. [2].
- [2] DEYL, Zdeněk. *Separation methods*. New York, NY, USA: Sole distributors for the U. S. A. and Canada, Elsevier Science Pub. Co., 1984. [2]. ISBN 0-444-80527-3.
- [3] CAZES, Jack a Galen Wood EWING. *Ewing's analytical instrumentation handbook*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, c2005. Online [2]. ISBN 0824753488
- [4] SMITH, Roger M. *Gas and liquid chromatography in analytical chemistry*. New York: Wiley, c1988. [2]. ISBN 0471909807.
- [5] Adsorption Chromatography. MEYER, Veronika R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2004, 2006-03-08, s. 146-158 [cit. 2020-01-28]. DOI: 10.1002/0470032677.ch9. ISBN 9780470032671.
- [6] BARKER, P. E., R. W. BOAZ a J. L. GREGORY. *The separation of biological mixtures by a liquid–liquid chromatography column containing differentially permeable partitions*. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1964, **6**(2), 235-240 [cit. 2020-01-28]. DOI: 10.1002/bit.260060210. ISSN 0006-3592.
- [7] KAZAKEVICH, Yuri. HPLC Theory. KAZAKEVICH, Yuri a Rosario LOBRUTTO, ed. *HPLC for Pharmaceutical Scientists* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2007, 10-14 [cit. 2020-01-28]. DOI: 10.1002/9780470087954.ch2. ISBN 9780470087954.
- [8] FRITZ, James S. *Ion chromatography*. *Analytical Chemistry* [online]. 1987, **59**(4), 335A-344A [cit. 2020-01-28]. DOI: 10.1021/ac00131a002. ISSN 0003-2700.
- [9] HEITZ, Walter. *Gel Chromatography*. *Angewandte Chemie International Edition in English* [online]. 1970, **9** (9), 689-702 [cit. 2020-01-28]. DOI: 10.1002/anie.197006891. ISSN 0570-0833.
- [10] MEYERS, Robert A., ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2006 [cit. 2020-01-28]. ISBN 0471976709.
- [11] SÝKORA, D., TESAŘOVÁ, E. *Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC*. *Chem. listy*, 2007, 101: 190-199. Online [2].
- [12] KLOUDA, Pavel. *Chromatografie*. In: *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 25-26. ISBN 80-86369-07-2
- [13] ANDERSON, J., BERTHOD, A., ESTÉVEZ, V., STALCUP, A. *Analytical separation science*. Weinheim: Wiley-VCH, 2015. Online [2]. ISBN 978-3-527-33374-5.

- [14] SNYDER, Lloyd R. *Introduction to modern liquid chromatography*. 2. ed. New York: John Wiley, 1979. Online [2]. ISBN 0-471-03822-9.
- [15] FRANZ, Holger; JENDREIZIK, Verena. *Fluorescence Method Development Handbook*. Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany, 2013. Online [2]. 1-2.
- [16] HADDAD, P.R. a A.L. HECKENBERG. *High-performance liquid chromatography of inorganic and organic ions using low-capacity ion-exchange columns with indirect refractive index detection*. In: *Journal of Chromatography A* [online]. 1982, **252**, 177-184. [cit. 2019-11-14]. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)88409-0. ISSN 00219673.
- [17] FLANAGAN, Robert, PERRETT, D., WHELPTON, R. *Electrochemical detection in HPLC: Analysis of drugs and poisons*. Cambridge (UK): RSC, 2005. Online [2]. ISBN 0854045325.
- [18] ELVERS, Barbara, BELLUSSI, G. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 7th, completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. Vol. 15, 682. [2]. ISBN 9783527329434
- [19] BABIČKA, Luboš. *Přidatné látky v potravinách: publikace České technologické platformy pro potraviny*. 1. vyd. Praha: Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, 2012, 13 - 16. ISBN 978-809-0509-634.
- [20] ALVES, Simone Pereira, BRUM, D. M., BRANCO DE ANDRADE, É. C., PEREIRA NETTO, A. D. *Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection*. *Food Chemistry* [online]. 2008, **107**(1), 489-496 [cit. 2019-11-19]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.054. ISSN 03088146
- [21] GHIDOUCHE, Souhila, REY, B., MICHEL, M., GALAFFU, N. *A Rapid tool for the stability assessment of natural food colours*. *Food Chemistry* [online]. 2013, **139**(1-4), 978-985 [cit. 2019-11-19]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.12.064. ISSN 03088146.
- [22] MATHIYALAGAN, Siva, MANDAL, B. K., LING, Yong-Chien. *Determination of synthetic and natural colorants in selected green colored foodstuffs through reverse phase-high performance liquid chromatography*. *Food Chemistry* [online]. 2018, **278**, 381-387 [cit. 2019-11-19]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.077. ISSN 03088146.
- [23] MORTENSEN, Alan. *Carotenoids and other pigments as natural colorants*. *Pure and applied chemistry* [online]. 2006, 78.8: 1477-1491. [cit. 2019-11-21].
- [24] ABEROUMAND, Ali, et al. *A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry*. *World Journal of*



- Dairy & Food Sciences [online]. 2011, 6.1: 71-78. [cit. 2019-11-19]. ISSN 1817-308X
- [25] BAKOWSKA-BARCZAK, Anna. *Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants—a review*. Polish journal of food and nutrition sciences [online]. 2005, 14: 55. [cit. 2019-11-21]
- [26] CARO, Yanis, et al. *Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview*. Natural Products and Bioprospecting [online]. 2012, 2.5: 174-193. [cit. 2019-11-21]
- [27] GENGATHARAN, Ashwini, Gary A. DYKES a Wee Sim CHOO. *Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods*. LWT - Food Science and Technology [online]. 2015, **64**(2), 645-649 [cit. 2019-11-21]. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.06.052. ISSN 00236438.
- [28] STINTZING, Florian C. a Reinhold CARLE. *Betalains – emerging prospects for food scientists*. Trends in Food Science & Technology [online]. 2007, **18**(10), 514-525 [cit. 2019-11-21]. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.04.012. ISSN 09242244.
- [29] HUMPHREY, A. M. *Chlorophyll as a Color and Functional Ingredient*. Journal of Food Science [online]. 2004, **69**(5), C422-C425 [cit. 2019-11-20]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb10710.x. ISSN 00221147.
- [30] FERRUZZI, Mario G. a Joshua BLAKESLEE. *Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives*. Nutrition Research [online]. 2007, **27**(1), 1-12 [cit. 2019-12-05]. DOI: 10.1016/j.nutres.2006.12.003. ISSN 02715317
- [31] ESKINS, Kenneth; SCHOLFIELD, Charles R.; DUTTON, Herbert J. *High-performance liquid chromatography of plant pigments*. Journal of Chromatography A [online]. 1977, 135.1: 217-220. [cit. 2019-12-05]
- [32] WEGENER, J. W., J. C. KLAMER, H. GOVERS a U. A. Th. BRINKMAN. *Determination of organic colorants in cosmetic products by high-performance liquid chromatography*. Chromatographia [online]. 1987, **24**(1), 865-875 [cit. 2019-12-05]. DOI: 10.1007/BF02688601. ISSN 0009-5893.
- [33] GOKMEN, V., S. BAHÇEÇI a J. ACAR. *Liquid chromatographic method for the determination of chlorophylls, carotenoids, and their derivatives in fresh and processed vegetables*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies [online]. 2002, **25**(8), 1201-1213 [cit. 2019-12-05]. DOI: 10.1081/JLC-120004019. ISSN 1082-6076.
- [34] SUMAN, Michele, Roberta DE MARIA a Dante CATELLANI. *Chromatographic evaluation of chlorophyll derivatives in pasta-based food products:*

- effects of pasteurization treatments and correlation with sensory profiles*. Journal of the Science of Food and Agriculture [online]. 2008, **88**(3), 471-478 [cit. 2019-12-05]. DOI: 10.1002/jsfa.3109. ISSN 00225142.
- [35] LATASA, Mikel. *A simple method to increase sensitivity for RP-HPLC phytoplankton pigment analysis*. Limnology and Oceanography: Methods [online]. 2014, **12**(1), 46-53 [cit. 2019-12-05]. DOI: 10.4319/lom.2014.12.46. ISSN 15415856.
- [36] INOUE, H., H. YAMASHITA, K. FURUYA, Y. NONOMURA, N. YOSHIOKA a S. LIB. *Determination of copper(II) chlorophyllin by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A [online]. 1994, **679**(1), 99-104 [cit. 2019-12-09]. DOI: 10.1016/0021-9673(94)80315-3. ISSN 00219673.
- [37] SCOTTER, Michael J., Laurence CASTLE a Dominic ROBERTS. *Method development and HPLC analysis of retail foods and beverages for copper chlorophyll (E141[i]) and chlorophyllin (E141[ii]) food colouring materials*. Food Additives and Contaminants [online]. 2005, **22**(12), 1163-1175 [cit. 2019-12-10]. DOI: 10.1080/02652030500306885. ISSN 0265-203X.
- [38] ROCA, María, Lourdes GALLARDO-GUERRERO, María Isabel MÍNGUEZ-MOSQUERA a Beatriz GANDUL ROJAS. *Control of Olive Oil Adulteration with Copper-Chlorophyll Derivatives*. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2010, **58**(1), 51-56 [cit. 2019-12-10]. DOI: 10.1021/jf902084d. ISSN 0021-8561.
- [39] GANDUL-ROJAS, Beatriz, María ROCA a Lourdes GALLARDO-GUERRERO. *Detection of the color adulteration of green table olives with copper chlorophyllin complexes (E-141ii colorant)*. LWT - Food Science and Technology [online]. 2012, **46**(1), 311-318 [cit. 2019-12-10]. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.09.012. ISSN 00236438.
- [40] NEGRO, C., De Bellis, L., Sabella, E., Nutricati, E., Luvisi, A., & Miceli, A. *Detection of not allowed food-coloring additives (copper chlorophyllin; copper-sulphate) in green table olives sold on the Italian market*. Advances in Horticultural Science [online]. 2017, 31 (4), 225-233. DOI: 10.13128/ahs-2081
- [41] CHONG, Hee Sun, Sol SIM, Tokutaro YAMAGUCHI, et al. *Simultaneous determination of sodium iron chlorophyllin and sodium copper chlorophyllin in food using high-performance liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry*. Food Chemistry [online]. 2018, **276**, 390-396 [cit. 2019-12-11]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.10.015. ISSN 03088146.

- [42] BRAZEAU, Julien. *Identification and Quantitation of Water-Soluble Synthetic Colors in Foods by Liquid Chromatography/Ultraviolet-Visible Method Development and Validation*. ACS Omega [online]. 2018, **3**(6), 6577-6586 [cit. 2019-12-11]. DOI: 10.1021/acsomega.8b00761.
- [43] FURUYA, K., N. OHKI, H. INOUE a T. SHIRAI. *Determination of pheophytinatonickel(II) by reversed-phase highperformance liquid chromatography*. Chromatographia [online]. 1988, **25**(4), 319-323 [cit. 2019-12-12]. DOI: 10.1007/BF02324707. ISSN 0009-5893.
- [44] NONOMURA, Y., M. YAMAGUCHI, T. HARA, K. FURUYA, N. YOSHIOKA a H. INOUE. *High-performance liquid chromatographic separation of iron (III) chlorophyllin*. Journal of Chromatography A [online]. 1995, **721**(2), 350-354 [cit. 2019-12-12]. DOI: 10.1016/0021-9673(95)00775-X. ISSN 00219673.
- [45] NGO, T. a Y. ZHAO. *Formation of Zinc-Chlorophyll-Derivative Complexes in Thermally Processed Green Pears (Pyrus communis L.)*. Journal of Food Science [online]. 2007, **72**(7), C397-C404 [cit. 2019-12-12]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00465.x. ISSN 0022-1147
- [46] MORTENSEN, Alan a Asger GEPPEL. *HPLC-MS analysis of the green food colorant sodium copper chlorophyllin*. Innovative Food Science & Emerging Technologies [online]. 2007, **8**(3), 419-425 [cit. 2020-06-15]. DOI: 10.1016/j.ifset.2007.03.018. ISSN 14668564.

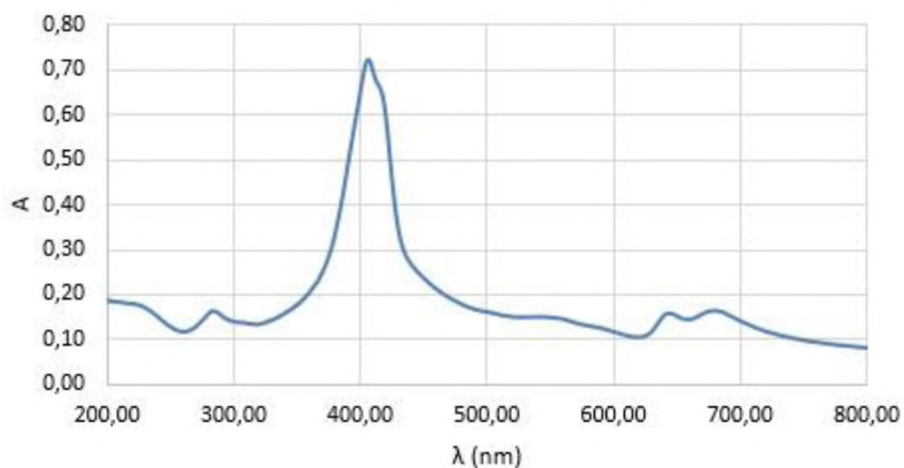
## Obrázky

1. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1411/jaro2016/BVCP0222p/um/chromatografie.pdf> [2]
2. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/UV\\_VIS\\_detector.html#\\_top](http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html#_top) [2]
3. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/journals/pac/78/8/article-p1477.xml> [online-cit. 2019-11-21].
4. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.471.6401&rep=rep1&type=pdf> [online-cit. 2019-11-21].
5. Dostupné z: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s13659-012-0086-0.pdf> [online-cit. 2019-11-21].
6. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224407001434> [online-cit. 2019-11-21].
7. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224407001434> [online-cit. 2019-11-21].

8. Dostupné z: <https://leporelo.info/chlorofyly> [2]
9. Dostupné z: <https://focusbio.com.au/products/chlorophyllin-sodium-copper-salt/> [2]  
[online-cit. 2019-11-21].
10. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25060996#section=2D-Structure> [2]
11. Dostupné z: <http://orders.frontiersci.com/Orders/WebPlugin/BrowseResults.aspx?Cat=Porphyrins>  
[2]
12. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/253193#section=2D-Structure> [2]
13. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/protoporphyrin\\_IX#section=2D-Structure](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/protoporphyrin_IX#section=2D-Structure)  
[2]
14. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/58773742#section=Structures>  
[2]

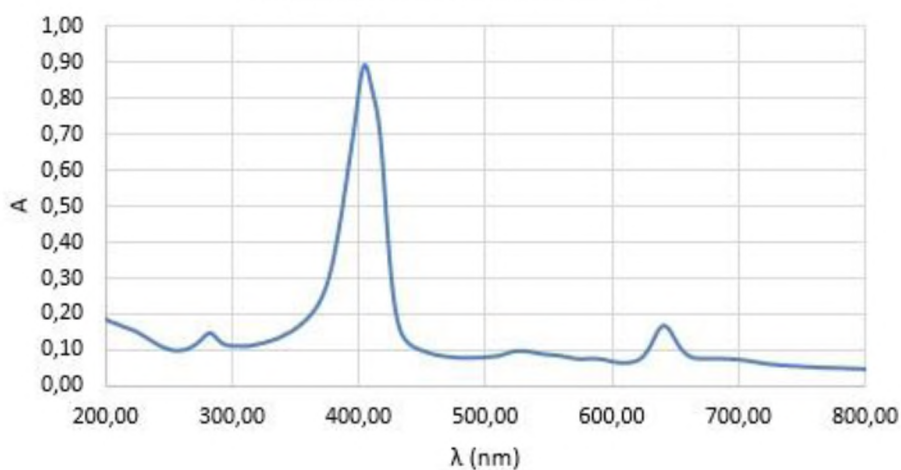
## **Příloha GRAFY**

UV/VIS spektrum chlorinu e4



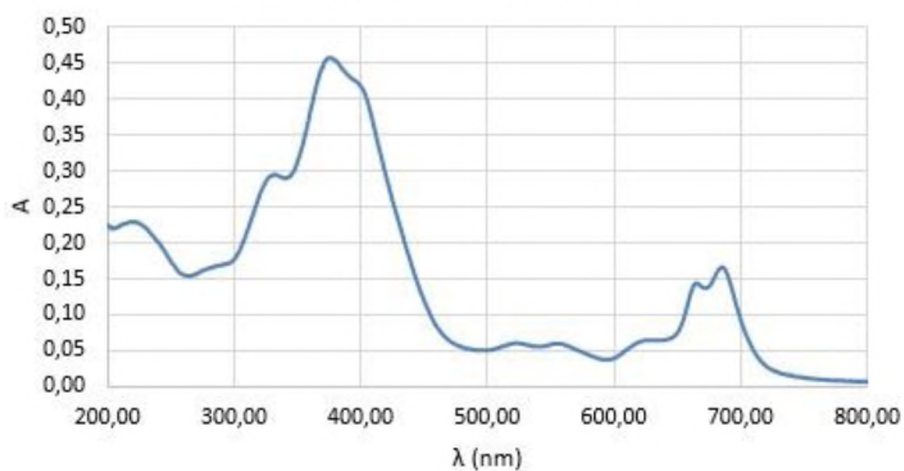
Graf P 1 UV/VIS spektrum chlorinu e4

UV/VIS spektum chlorinu e6



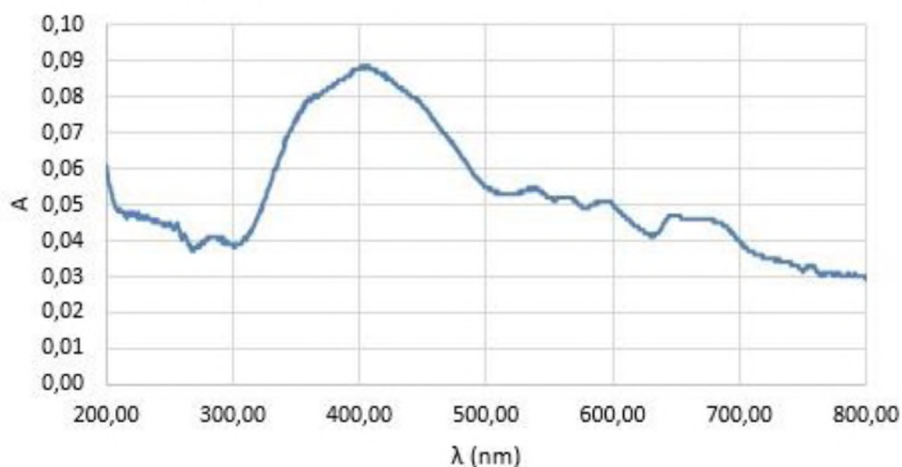
Graf P 2 UV/VIS spektrum chlorinu e6

UV/VIS spektrum feoforbidu  $\alpha$

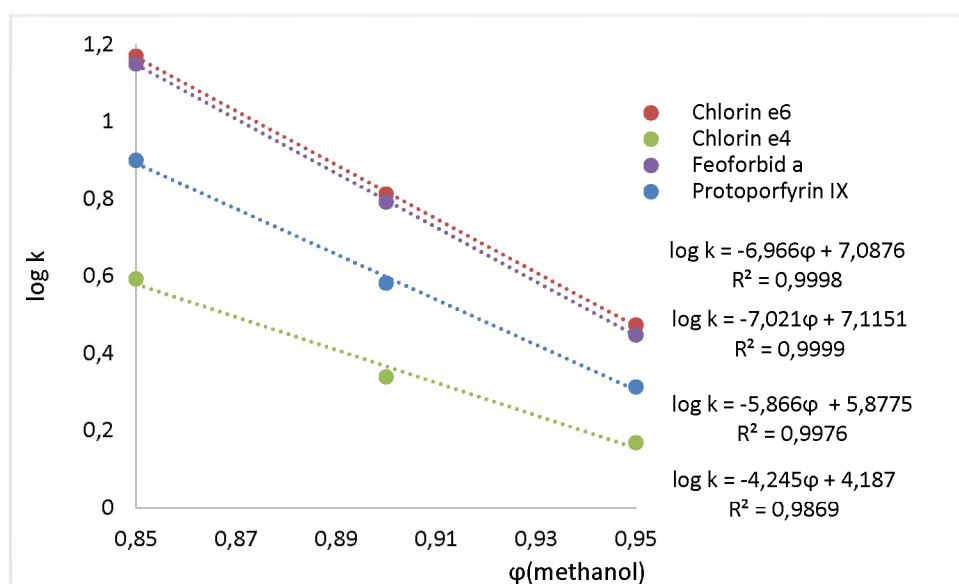


Graf P 3 UV/VIS spektrum feoforbidu  $\alpha$

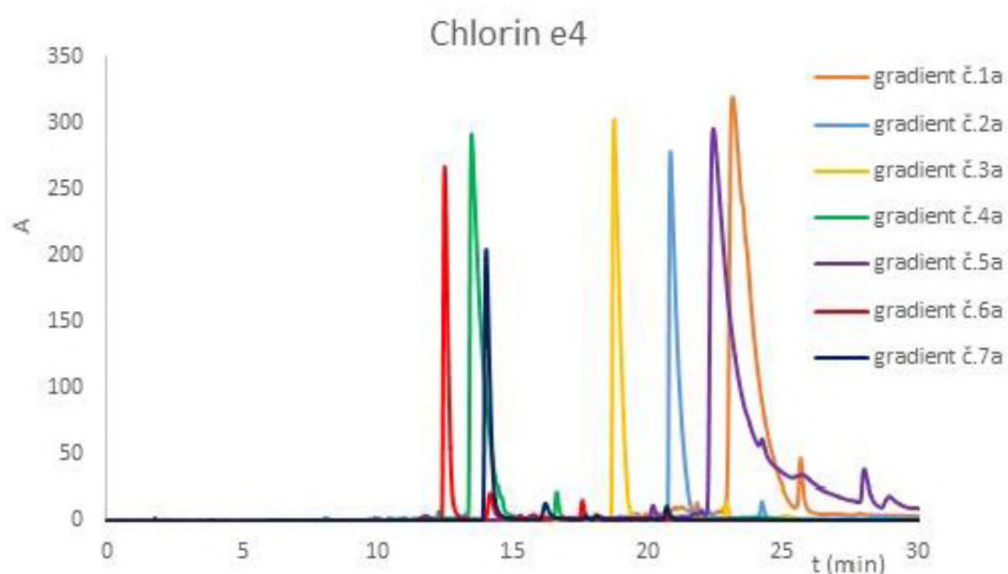
UV/VIS spektrum protoporfyrinu IX



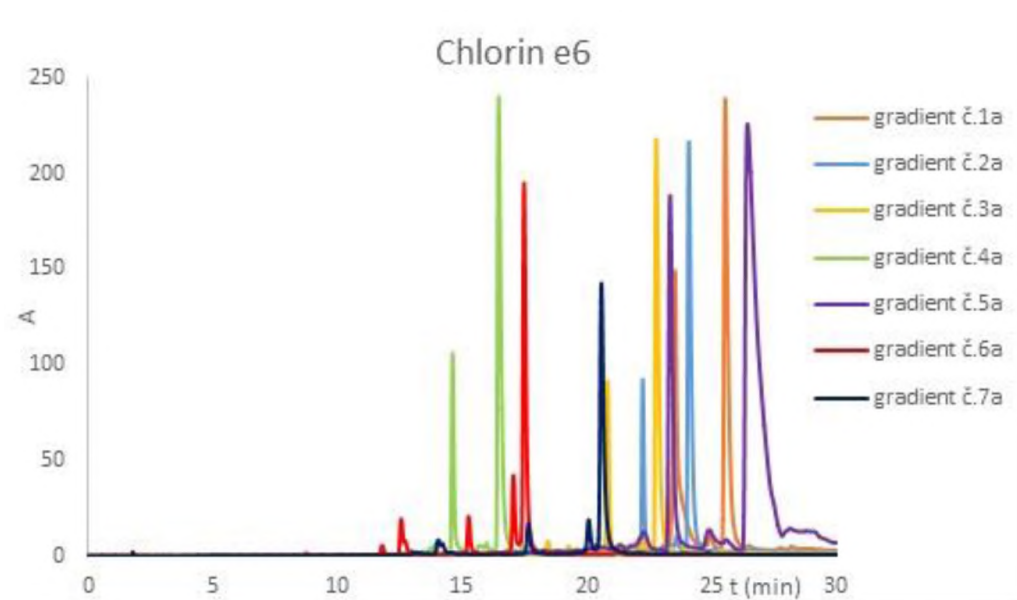
Graf P 4 UV/VIS spektrum protoporfyrinu IX



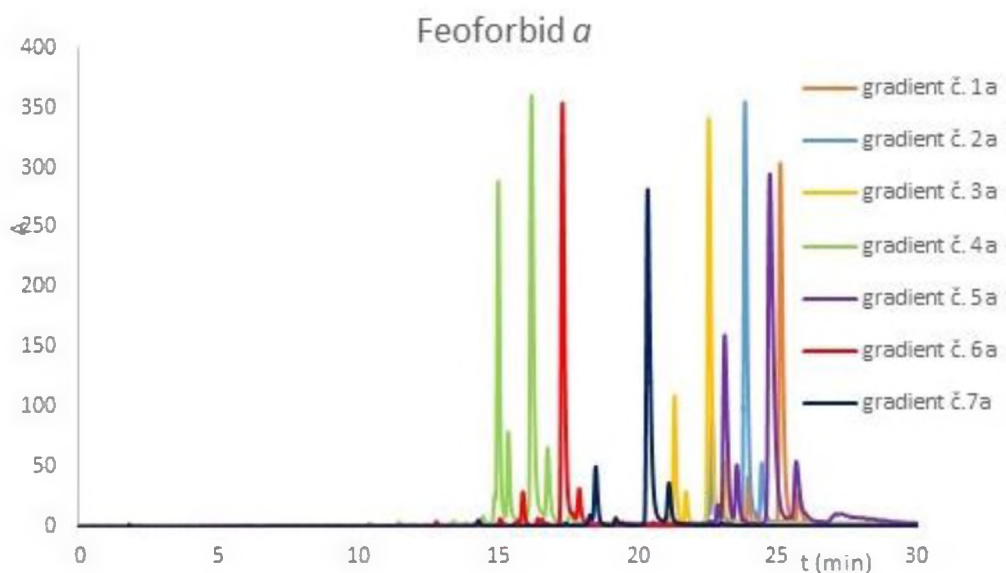
Graf P 5 Závislost retenčního faktoru na objemovém zlomku pro standardy



Graf P 6 Závislost absorbance na čase standardního roztoku chlorofylinu e<sub>4</sub> pro gradienty č. 1<sub>a</sub>-7<sub>a</sub>, za použití aditiva kyseliny mravenčí

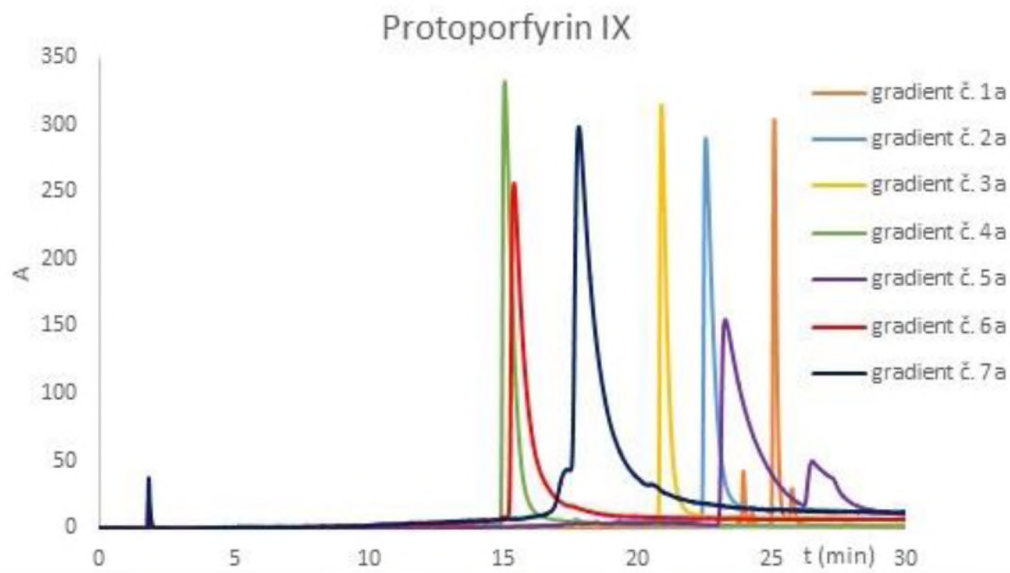


**Graf P 7** Závislost absorbance na čase standardního roztoku chlorofylinu e<sub>6</sub> pro gradienty č. 1<sub>a</sub>-7<sub>a</sub>, za použití aditiva kyseliny mravenčí

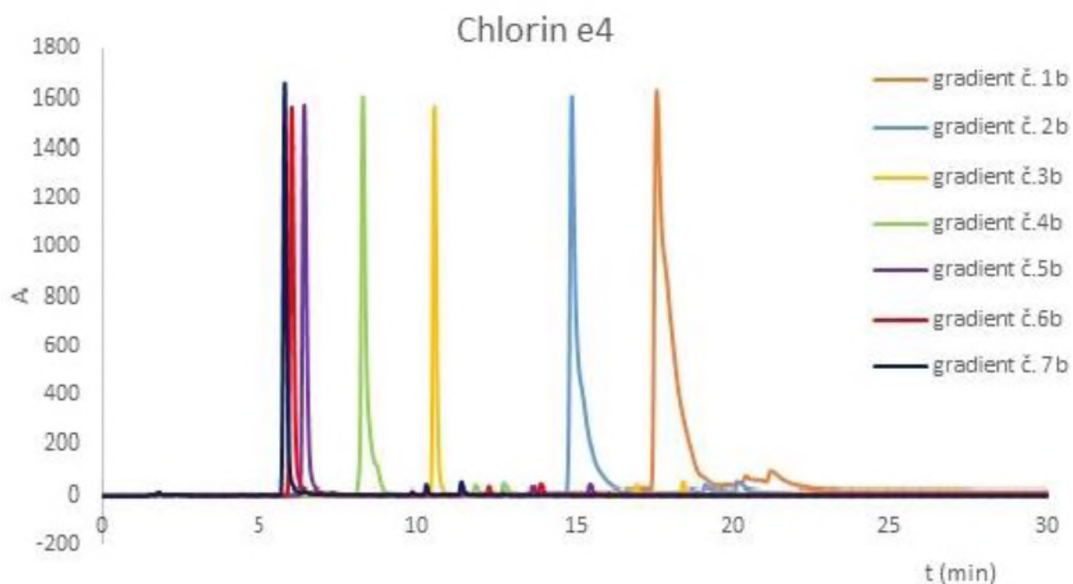


**Graf P 8** Závislost absorbance na čase standardního roztoku feoforbidu a pro gradienty č. 1<sub>a</sub>-7<sub>a</sub>, za použití aditiva kyseliny mravenčí

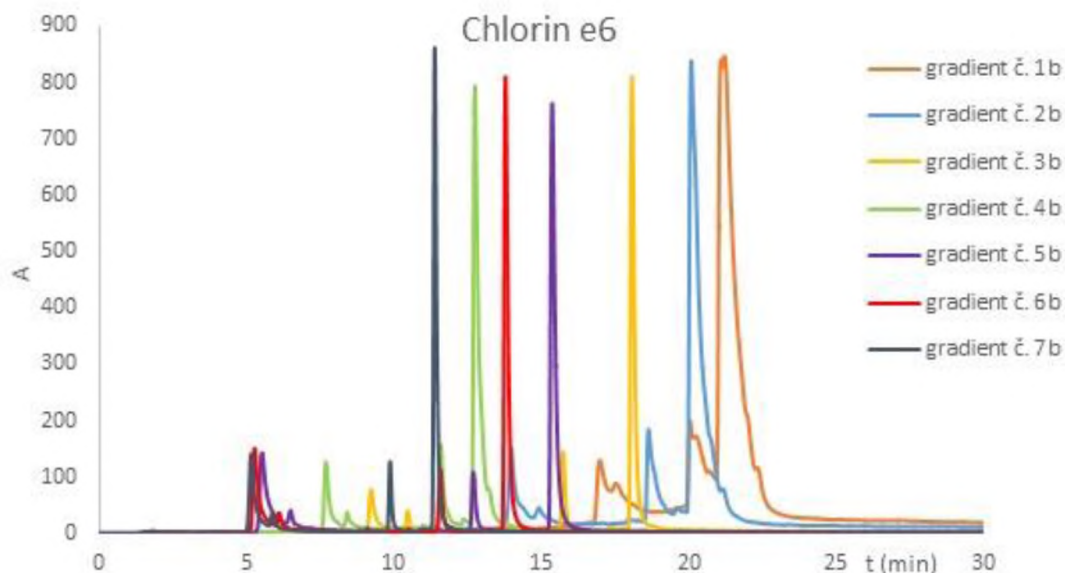




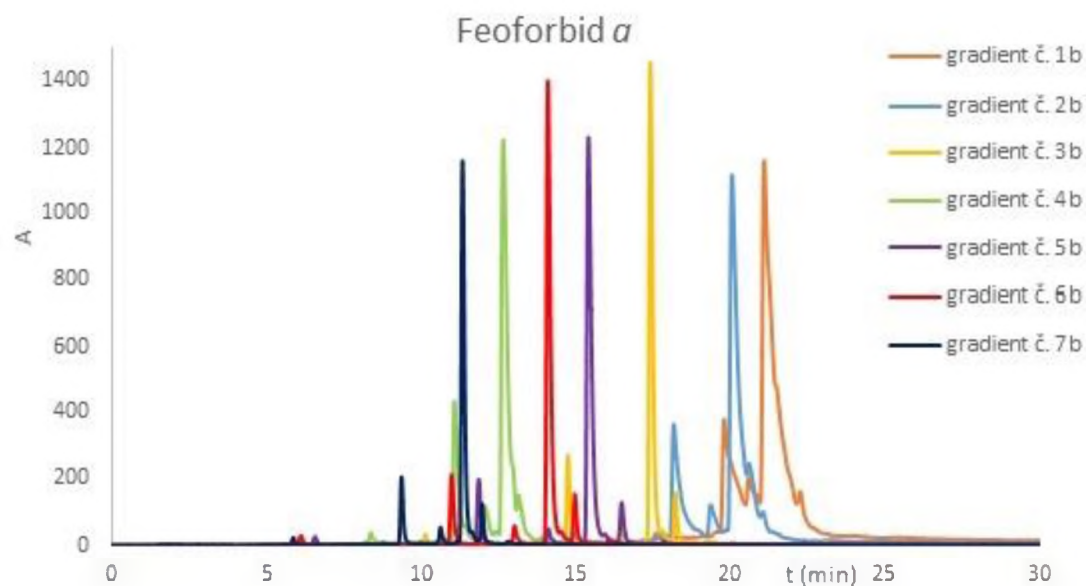
**Graf P 9** Závislost absorbance na čase standardního roztoku protoporphyrinu IX pro gradienty č. 1a-7a, za použití aditiva kyseliny mravenčí



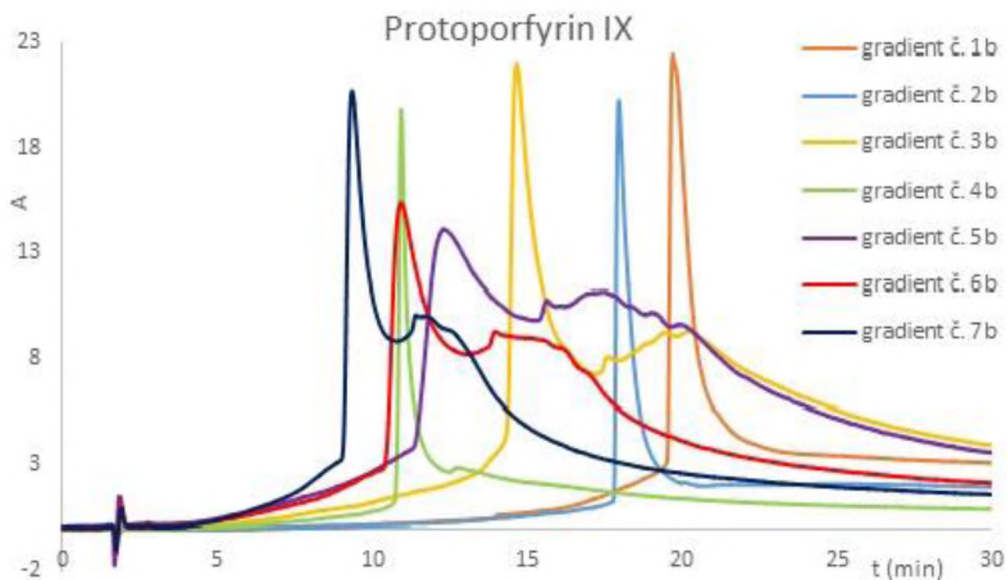
**Graf P 10** Závislost absorbance na čase standardního roztoku chlorinu e4 pro gradienty č. 1b-7b, za použití aditiva octanu amonného



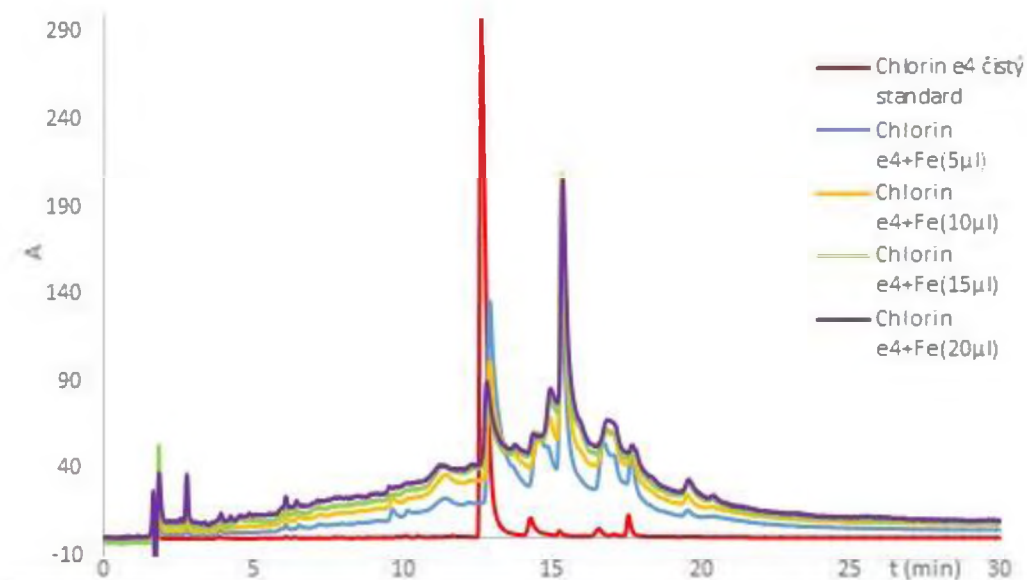
**Graf P 11** Závislost absorbance na čase standardního roztoku chlorinu e<sub>6</sub> pro gradienty č. 1b-7b, za použití aditiva octanu amonného



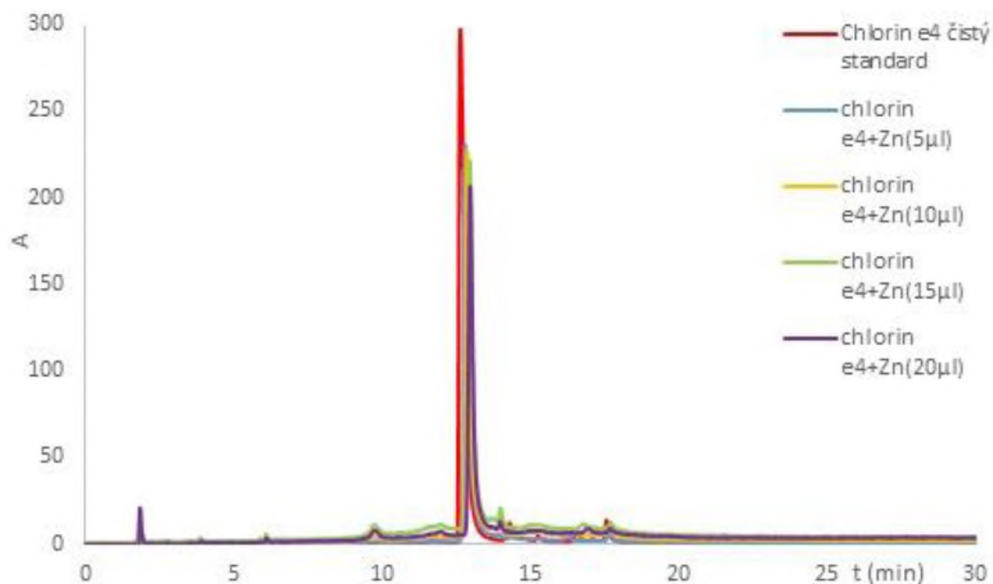
**Graf P 12** Závislost absorbance na čase standardního roztoku feoforbidu  $\alpha$  pro gradienty č. 1b-7b, za použití aditiva octanu amonného



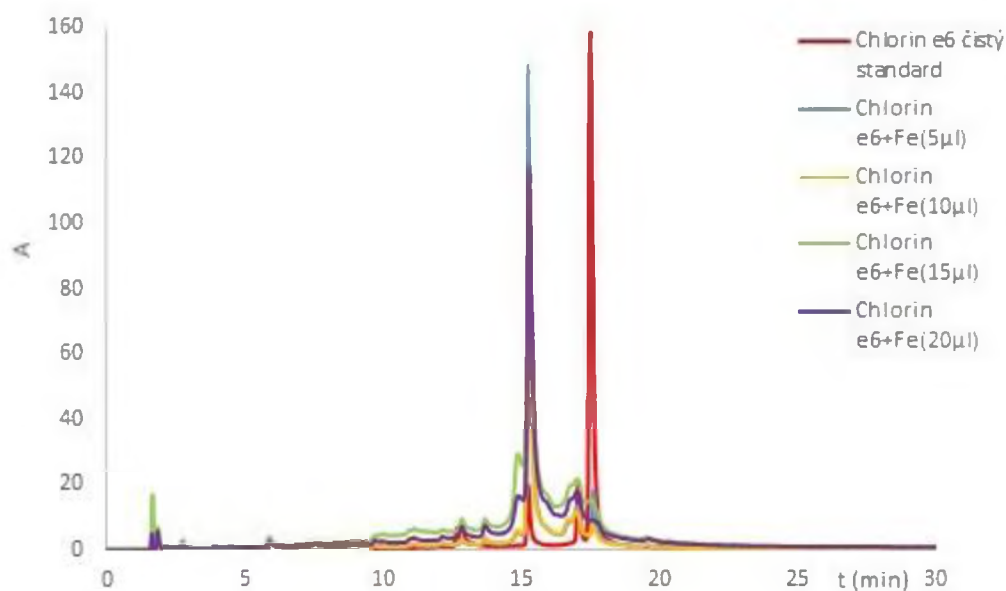
**Graf P 13** Závislost absorbance na čase standardního roztoku protoporphyrinu IX pro gradienty č. 1b-7b, za použití aditiva octanu amonného



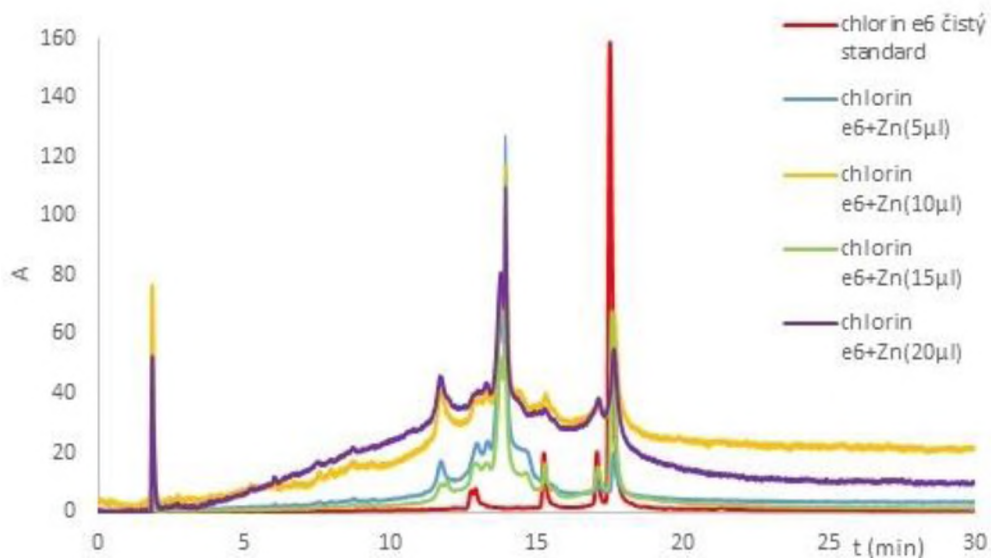
**Graf P 14** Chromatogram porovnání čistého standardu chlorinu e<sub>4</sub> a chlorinu e<sub>4</sub> s přidaným železitým iontem o různých koncentracích za využití gradientu 7<sub>a</sub>



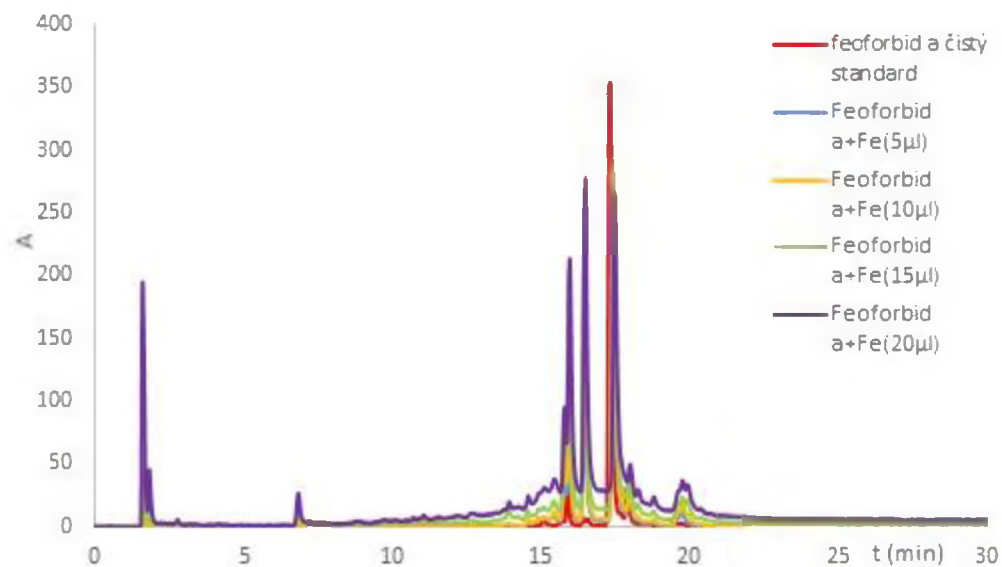
**Graf P 15** Chromatogram porovnání čistého standardu chlorinu e<sub>4</sub> a chlorinu e<sub>4</sub> s přidaným zinečnatým iontem o různých koncentracích za využití gradientu 7<sub>a</sub>



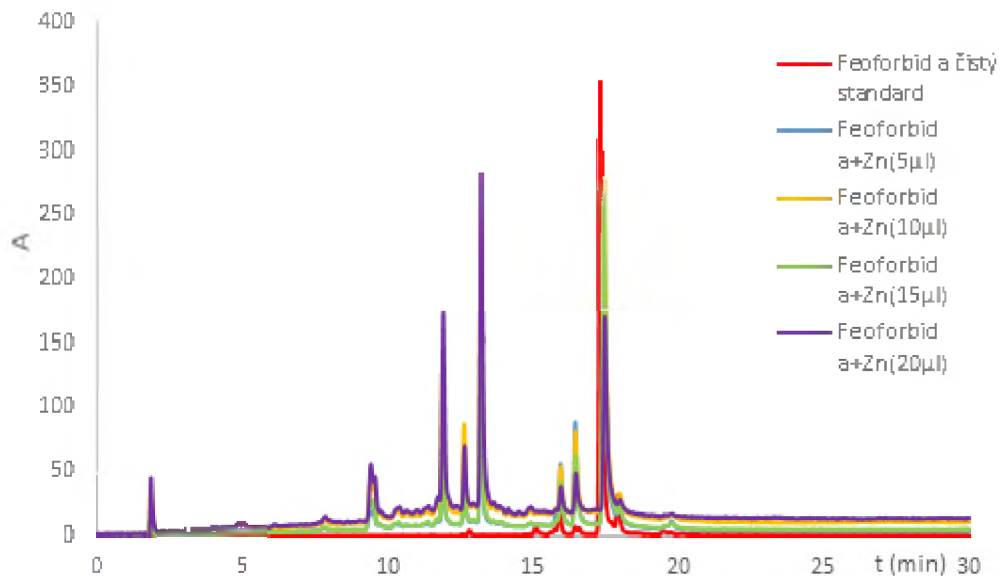
**Graf P 16** Chromatogram porovnání čistého standardu chlorinu e<sub>6</sub> a chlorinu e<sub>6</sub> s přidaným železitým iontem o různých koncentracích za využití gradientu 7<sub>a</sub>



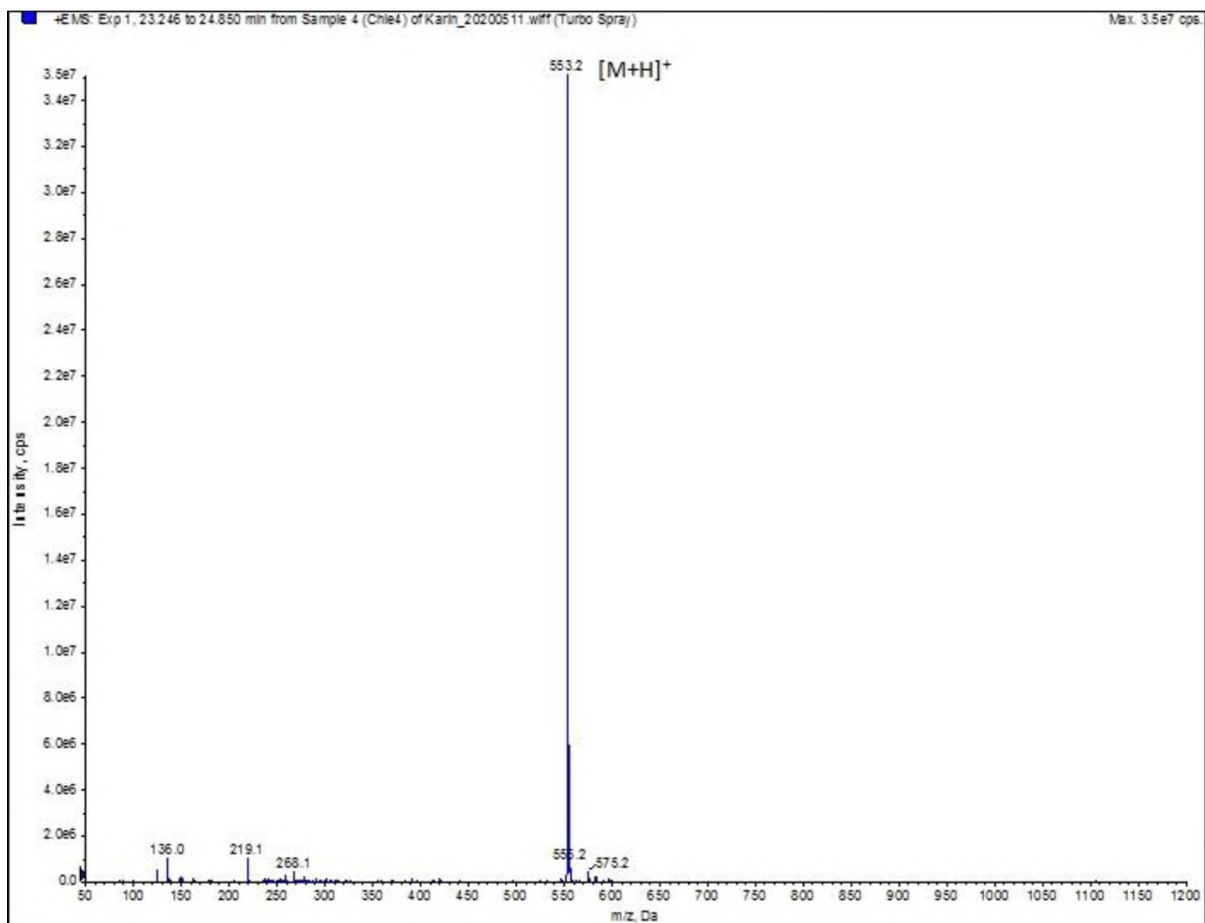
**Graf P 17** Chromatogram porovnání čistého standardu chlorinu e<sub>6</sub> a chlorinu e<sub>6</sub> s přidaným zinečnatým iontem o různých koncentracích za využití gradientu 7<sub>a</sub>



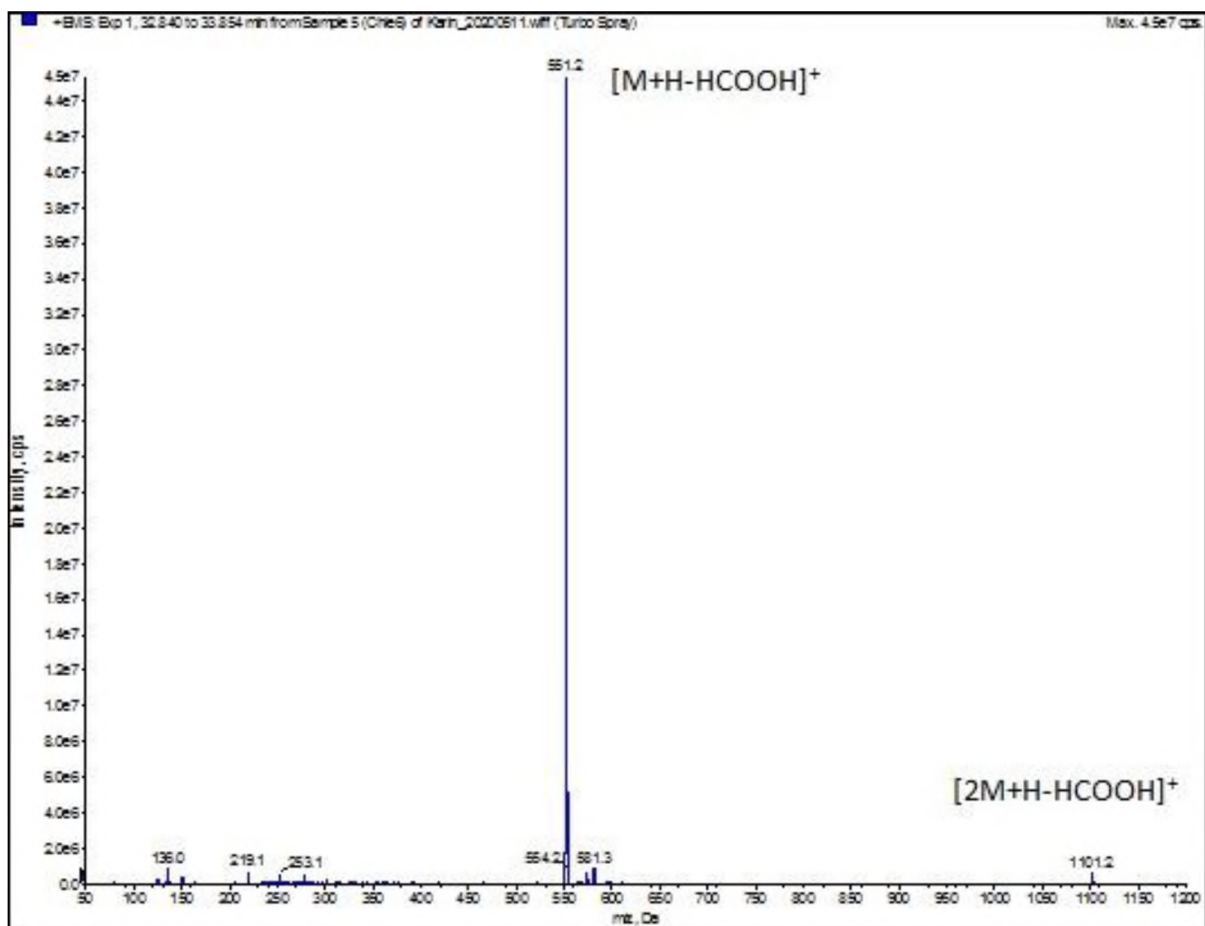
**Graf P 18** Chromatogram porovnání čistého standardu feoforbidu *a* a feoforbidu *a* s přidaným železitým iontem o různých koncentracích za využití gradientu 7<sub>a</sub>



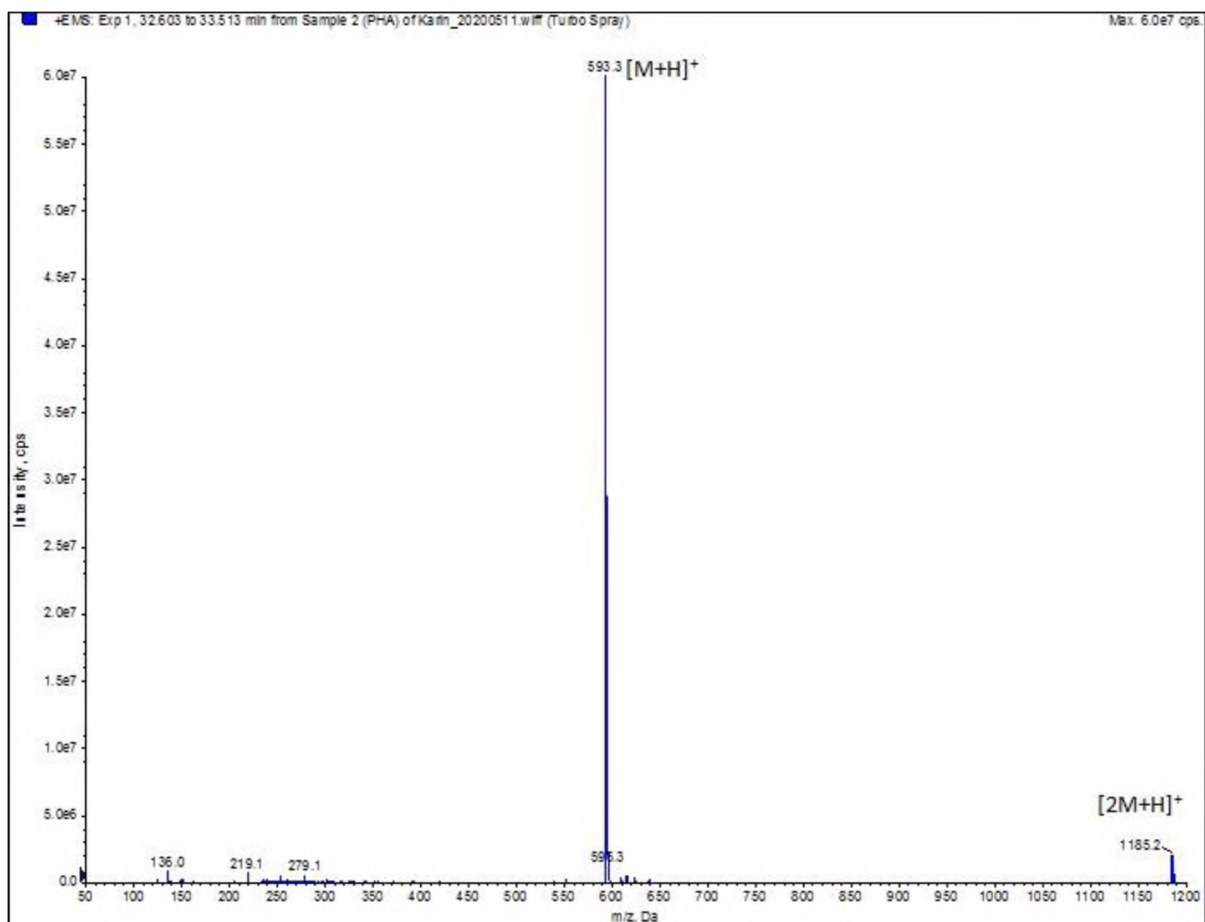
**Graf P 19** Chromatogram porovnání čistého standardu feoforbidu *a* a feoforbidu *a* s přidáním zinečnatým iontem o různých koncentracích za využití gradientu 7<sub>a</sub>



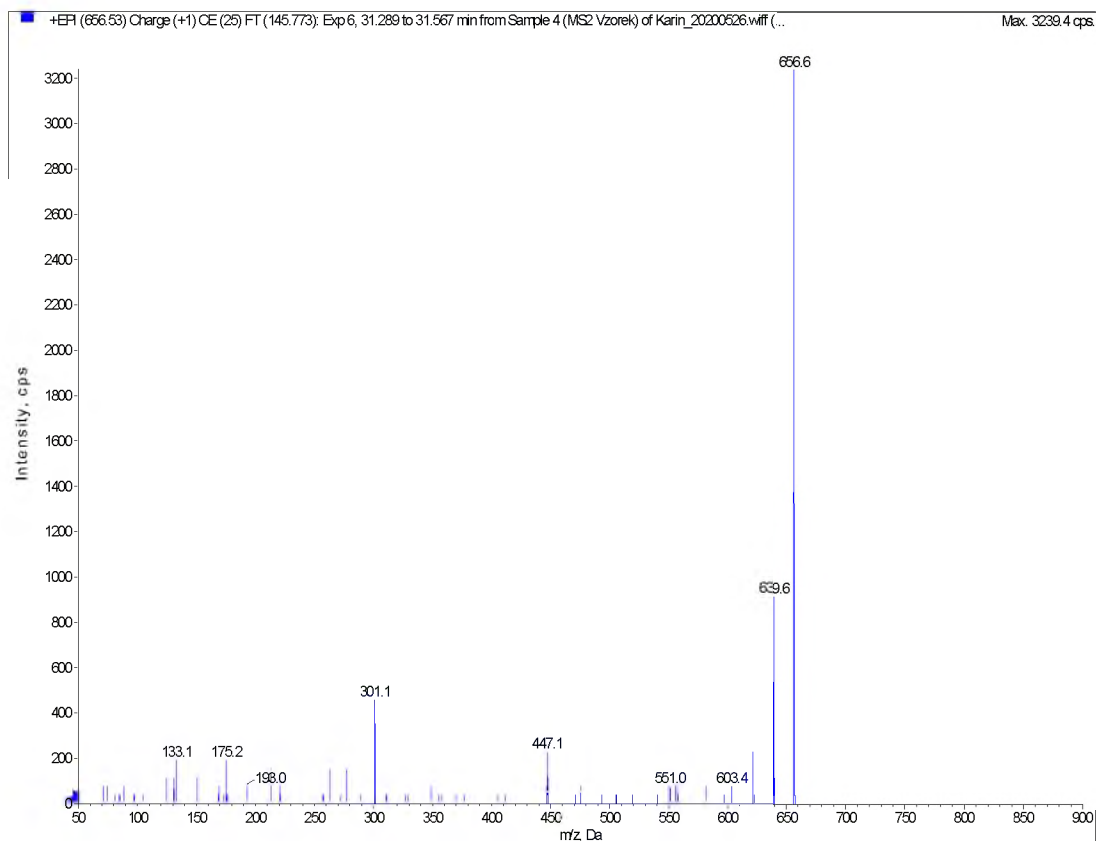
**Graf P 20** MS spektrum standardního roztoku chlorinu e<sub>4</sub>



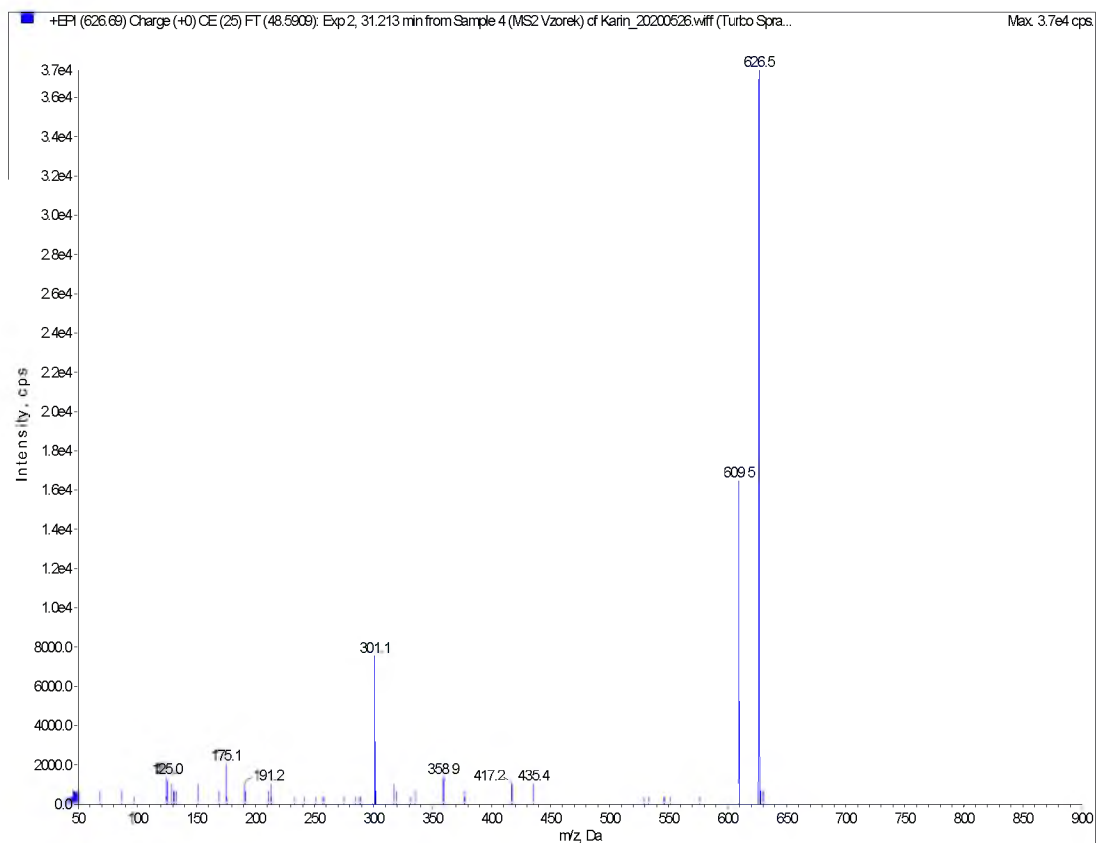
Graf P 21 MS spektrum standardního roztoku chlorinu e<sub>6</sub>



Graf P 22 MS spektrum standardního roztoku feoforbidu a



**Graf P 23** MS<sup>2</sup> spektrum Cu chlorinu e<sub>6</sub>



**Graf P 24** MS<sup>2</sup> spektrum Cu purpurinu 7(Cu rhodinu g<sub>7</sub>)





## **Příloha TABULKY**

**Tabulka P 1** Retenční časy a retenční faktory standardů při různých koncentracích methanolu

85% methanol	$t_M$	$t_{R1}$ (min)	$t_{R2}$ (min)	$t_{Rprům}$ (min)	k
chlorin e6	1,83	28,80	28,93	28,87	14,77
chlorin e4	1,83	8,99	9,01	9,00	3,92
feoforbid a	1,83	27,68	27,65	27,66	14,11
protoporfyrin IX	1,83	16,37	16,36	16,36	7,94

90% methanol	$t_M$	$t_{R1}$ (min)	$t_{R2}$ (min)	$t_{Rprům}$ (min)	k
chlorin e6	1,83	13,74	13,73	13,74	6,49
chlorin e4	1,83	5,82	5,83	5,83	2,18
feoforbid a	1,83	13,19	13,16	13,18	6,19
protoporfyrin IX	1,83	8,83	8,82	8,83	3,82

95% methanol	$t_M$	$t_{R1}$ (min)	$t_{R2}$ (min)	$t_{Rprům}$ (min)	k
chlorin e6	1,85	7,35	7,34	7,34	2,97
chlorin e4	1,8	4,57	4,58	4,58	1,47
feoforbid a	1,85	7,02	7,04	7,03	2,80
protoporfyrin IX	1,85	5,65	5,66	5,65	2,06

**Tabulka P 2** Profily gradientů pro chromatografickou separaci standardů, za využití kyseliny mravenčí jako aditiva

gradient č. 1 <sub>a</sub>		
t (min)	c <sub>methanol</sub> (%)	$t_g = 18$ min $B = 0,05 \text{ min}^{-1}$
0	10	
18	100	
29	100	
29,2	10	
gradient č. 2 <sub>a</sub>		
t (min)	c <sub>methanol</sub> (%)	$t_g = 18$ min $B = 0,033 \text{ min}^{-1}$
0	40	
18	100	
29	100	
29,2	40	
gradient č. 3 <sub>a</sub>		
t (min)	c <sub>methanol</sub> (%)	$t_g = 18$ min $B = 0,022 \text{ min}^{-1}$
0	60	
18	100	
29	100	
29,2	60	
gradient č.4 <sub>a</sub>		
t (min)	c <sub>methanolu</sub> (%)	$t_g = 60$ min $B = 0,04 \text{ min}^{-1}$
0	60	
10	100	
29	100	
29,2	60	

<b>gradient č. 5<sub>a</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 18 min</b>
0	75	B = 0,014 min <sup>-1</sup>
18	100	
29	100	
29,2	75	
<b>gradient č. 6<sub>a</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 15min</b>
0	75	B = 0,017 min <sup>-1</sup>
15	100	
29	100	
29,2	75	
<b>gradient č. 7<sub>a</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 20 min</b>
0	75	B = 0,0166 min <sup>-1</sup>
20	100	
29	100	
29,2	75	

**Tabulka P 3** Přehled závislosti retenčních časů jednotlivých standardů na profilu gradientu

	<b>gradient č. 1<sub>a</sub></b>	<b>gradient č. 2<sub>a</sub></b>	<b>gradient č. 3<sub>a</sub></b>	<b>gradient č. 4<sub>a</sub></b>	<b>gradient č. 5<sub>a</sub></b>	<b>gradient č. 6<sub>a</sub></b>	<b>gradient č. 7<sub>a</sub></b>
<b>t<sub>R</sub> chlorin e<sub>4</sub></b>	23,206	20,858	18,770	13,499	22,501	12,508	14,048
<b>t<sub>R</sub> chlorin e<sub>6</sub></b>	25,545	24,081	22,771	16,460	26,502	17,501	20,616
<b>t<sub>R</sub> feoforbid a</b>	25,117	23,845	22,579	16,198	24,725	17,338	20,358
<b>t<sub>R</sub> protoporpyrin IX</b>	25,109	29,670	29,897	15,144	23,429	15,536	17,767

**Tabulka P 4** Profily gradientů pro chromatografickou separaci, za využití octanu amonného jako aditiva

<b>gradient č. 1<sub>b</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 18 min</b>
0	10	B = 0,05 min <sup>-1</sup>
18	100	
29	100	
29,2	10	
<b>gradient č. 2<sub>b</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 18 min</b>
0	40	B = 0,033 min <sup>-1</sup>
18	100	
29	100	
29,2	40	

<b>gradient č. 3<sub>b</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 18 min</b>
0	60	B = 0,022 min <sup>-1</sup>
18	100	
29	100	
29,2	60	
<b>gradient č. 4<sub>b</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 10 min</b>
0	60	B = 0,04 min <sup>-1</sup>
10	100	
29	100	
29,2	60	
<b>gradient č. 5<sub>b</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 18 min</b>
0	70	B = 0,017 min <sup>-1</sup>
18	100	
29	100	
29,2	70	
<b>gradient č. 6<sub>b</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 15 min</b>
0	70	B = 0,02 min <sup>-1</sup>
15	100	
29	100	
29,2	70	
<b>gradient č. 7<sub>b</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 10 min</b>
0	70	B = 0,03 min <sup>-1</sup>
10	100	
29	100	
29,2	70	

**Tabulka P 5** Přehled závislosti retenčních časů jednotlivých standardů na profilu gradientu

	<b>gradient č. 1<sub>b</sub></b>	<b>gradient č. 2<sub>b</sub></b>	<b>gradient č. 3<sub>b</sub></b>	<b>gradient č. 4<sub>b</sub></b>	<b>gradient č. 5<sub>b</sub></b>	<b>gradient č. 6<sub>b</sub></b>	<b>gradient č. 7<sub>b</sub></b>
<b>t<sub>R</sub> chlorin e<sub>4</sub></b>	17,608	14,89	10,572	8,343	6,483	6,078	5,852
<b>t<sub>R</sub> chlorin e<sub>6</sub></b>	21,277	20,153	18,115	12,732	15,385	13,780	11,404
<b>t<sub>R</sub> feoforbid a</b>	21,168	20,096	17,434	12,744	15,488	14,162	11,386
<b>t<sub>R</sub> protoporfyrin IX</b>	18,837	18,026	14,725	10,958	12,501	11,056	9,416

**Tabulka P 6** Profily gradientů pro chromatografickou separaci vzorku, za využití kyseliny mravenčí jako aditiva

<b>gradient č. 1<sub>c</sub></b>		
<b>čas (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 18 min</b>
0	10	<b>B = 0,05 min<sup>-1</sup></b>
18	100	
29	100	
29,2	10	
<b>gradient č. 2<sub>c</sub></b>		
<b>čas (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 18 min</b>
0	60	<b>B = 0,022 min<sup>-1</sup></b>
18	100	
29	100	
29,2	60	
<b>gradient č. 3<sub>c</sub></b>		
<b>čas (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 10 min</b>
0	60	<b>B = 0,04 min<sup>-1</sup></b>
10	100	
29	100	
29,2	60	
<b>gradient č. 4<sub>c</sub></b>		
<b>čas (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 18 min</b>
0	75	<b>B = 0,014 min<sup>-1</sup></b>
18	100	
29	100	
29,2	75	
<b>gradient č. 5<sub>c</sub></b>		
<b>čas (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 20 min</b>
0	60	<b>B = 0,02 min<sup>-1</sup></b>
20	100	
29	100	
29,2	60	
<b>gradient č. 6<sub>c</sub></b>		
<b>čas (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 0,015 min</b>
0	70	<b>B = 20 min<sup>-1</sup></b>
20	100	
29	100	
29,2	70	

gradient č. 7 <sub>c</sub>		
čas (min)	c methanol (%)	t <sub>g</sub> = 15 min
0	75	B = 0,017 min <sup>-1</sup>
15	100	
29	100	
29,2	75	
gradient č. 8 <sub>c</sub>		
čas (min)	c methanol (%)	t <sub>g</sub> = 20 min
0	75	B = 0,0125 min <sup>-1</sup>
20	100	
29	100	
29,2	75	

**Tabulka P 7** Profily gradientů pro chromatografickou separaci vzorku, za využití octanu amonného jako aditiva

gradient č.1 <sub>d</sub>		
t (min)	c methanol (%)	t <sub>g</sub> = 18 min
0	10	B = 0,05 min <sup>-1</sup>
18	100	
29	100	
29,2	10	
gradient č.2 <sub>d</sub>		
t (min)	c methanol (%)	t <sub>g</sub> = 18 min
0	60	B = 0,022 min <sup>-1</sup>
18	100	
29	100	
29,2	60	
gradient č. 3 <sub>d</sub>		
t (min)	c methanol (%)	t <sub>g</sub> = 10 min
0	60	B = 0,04min <sup>-1</sup>
10	100	
29	100	
29,2	60	
gradient č. 4 <sub>d</sub>		
t (min)	c methanol (%)	t <sub>g</sub> = 18 min
0	70	B = 0,017 min <sup>-1</sup>
18	100	
29	100	
29,2	70	

<b>gradient č.5<sub>d</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 15 min</b>
0	60	B = 0,027 min <sup>-1</sup>
15	100	
29	100	
29,2	60	
<b>gradient č.6<sub>d</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 10 min</b>
0	70	B = 0,03 min <sup>-1</sup>
10	100	
29	100	
29,2	70	
<b>gradient č.7<sub>d</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 15 min</b>
0	70	B = 0,02 min <sup>-1</sup>
15	100	
29	100	
29,2	70	
<b>gradient č.8<sub>d</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 15 min</b>
0	50	B = 0,033 min <sup>-1</sup>
15	100	
29	100	
29,2	50	
<b>gradient č.9<sub>d</sub></b>		
<b>t (min)</b>	<b>c methanol (%)</b>	<b>t<sub>g</sub> = 18 min</b>
0	50	B = 0,028 min <sup>-1</sup>
18	100	
29	100	
29,2	50	



