

SENZORICKY VÝZNAMNÉ LÁTKY

AROMATICKE (TEKAVÉ) LÁTKY

Fyzikálně-chemické vlastnosti významné pro stanovení aromatických sloučenin:

- * bod varu
- * tlak nasycených par
- * rozměry molekuly
- * tvar molekuly
- * přítomnost funkčních skupin

Techniky používané pro izolaci těkavých složek

❖ DESTILACE

❖ EXTRAKCE

- rozpouštědlem
- na tuhou fázi -SPE

❖ MIKROEXTRAKCE NA PEVNOU FÁZI - SPME

❖ HEAD-SPACE

- statická
- dynamická

IZOLAČNÍ A KONCENTRAČNÍ TECHNIKY

■ Extrakce

- * organickým rozpouštědlem - volba podle typu matrice (tuk, voda, pigmenty a další netěkavé látky)
- * superkritická fluidní extrakce (SFE) - nejčastěji oxid uhličitý

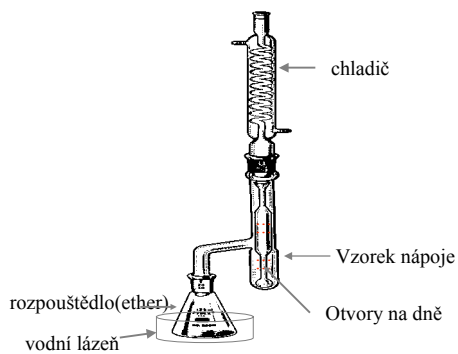


problém - koizolace velkého množství netěkavých látek

■ Destilace

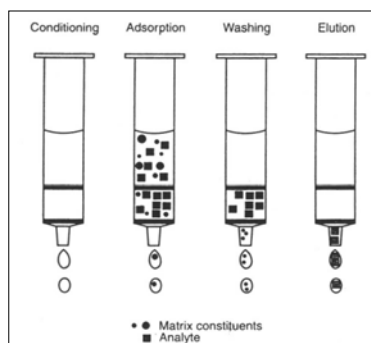
nejčastěji s vodní parou, šetrnější při sníženém tlaku (→ nižší teploty → menší tvorba artefaktů)

Kontinuální extrakce rozpouštědlem



Zakonzentrování vodných kondenzátů

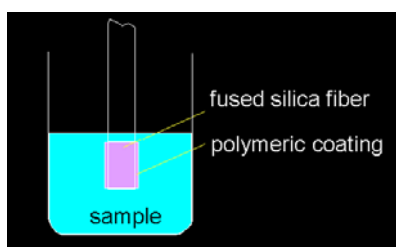
→ extrakce nemísitelným rozpouštědlem nebo **SPE**



• **Optimalizace izolačního kroku**

SPME – mikroextrakce pomocí chemicky modifikovaných křemenných optických vláken (0.05 – 1 mm průměr), desorpce teplem

Princip SPME

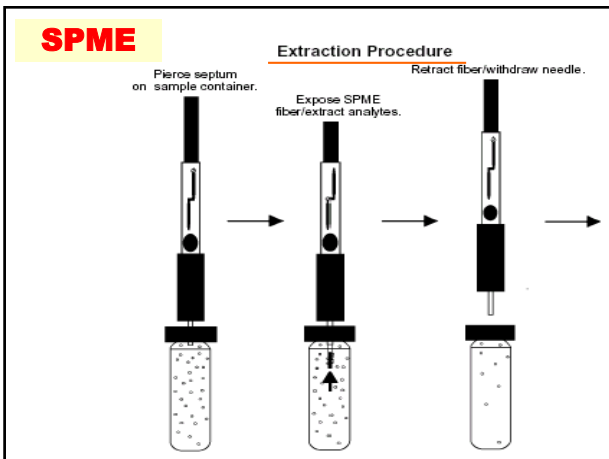


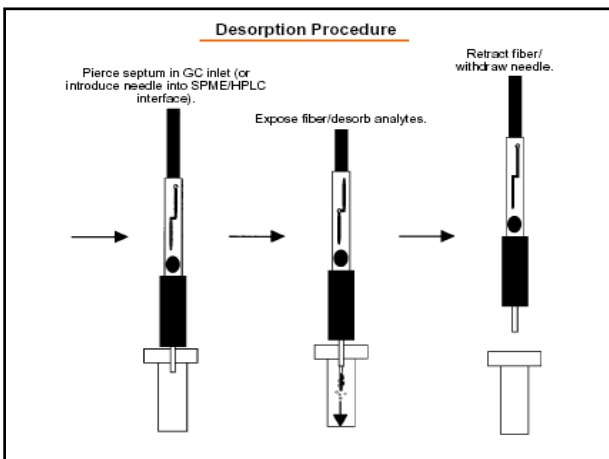
Distribuční konstanta: $K = c_s / c_{aq}$

SPME – GC: nástřík bez rozpouštědla

Možnost užití kolon s tenčím filmem a menším vnitřním průměrem

- Zvýšení separační účinnosti
- Zkrácení doby analýzy





HEAD SPACE TECHNIKY

➔ vyšetření těkavých látek v parní fázi nad vzorkem

Základní varianty :

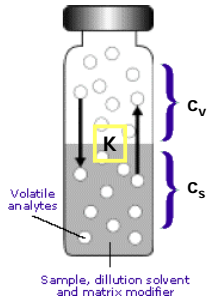
- **ROVNOVÁŽNÁ - statická**

distribuční koeficient : $K = C_s / C_v$

zvýšení přidavkem soli

👉 významné matriční efekty

HEADSPACE: statická varianta



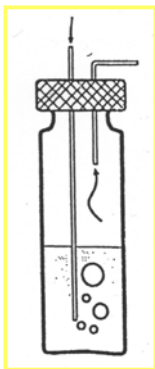
■ Dynamická

stripování vzorku inertním plynem → vyšší citlivost – větší množství izolovaných složek
(termodynamická rovnováha není dosažena)

metoda “purge and trap” izolace těkavých látek do proudu plynu → zachycení na sorbentu při nízké teplotě → tepelná desorbce do GC

☝ problémy s vlhkostí

HEADSPACE: dynamická varianta



Identifikace a kvantifikace těkavých organických sloučenin metodou GC-MS

GC-MS systém
Agilent 5973 ▶



http://www.shsu.edu/~chm_tac/students/Czechdir/GCMS%20Czech.swf

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

➔ Unikátní způsob identifikace i velmi nízkých koncentrací organických sloučenin

Princip:

1. krok: IONIZACE

CH₃OH + 1 elektron → CH₃OH⁺ + 2 elektrony

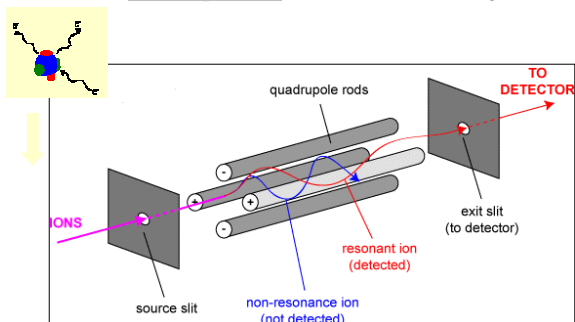
CH₃OH⁺ (molecular ion) → CH₂OH⁺ (fragment ion) + H⁺

nebo

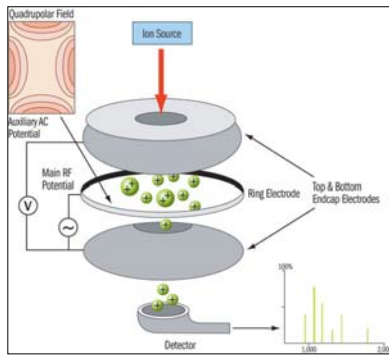
CH₃OH⁺ (molekulární ion) → CH₃⁺ (fragment ion) + .OH

2. krok: SEPARACE IONTŮ

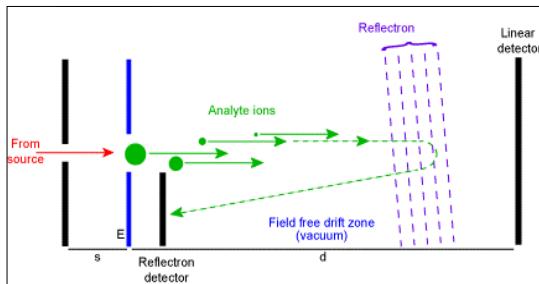
Funkce kvadrupolového hmotnostního analyzátoru



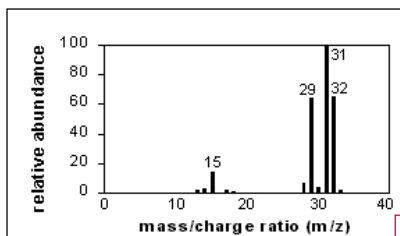
Funkce hmotnostního analyzátoru typu iontová past



Funkce hmotnostního analyzátoru typu „time-of-flight“ - TOF



3. krok: DETEKCE – ZÁZNAM SPEKTRA

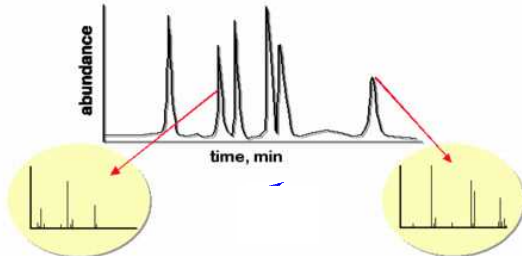


↑ hmotnostní spektrum methanolu

ions	m/z
$\text{CH}_3\text{OH}^{+\bullet}$	32
$\text{H}_2\text{C}=\text{OH}^+$	31
$\text{HC}\equiv\text{O}^+$	29
H_3C^+	15


Total ion chromatogram

Each point in a total ion chromatogram consists of an entire mass spectrum. Response for that point is determined by simply summing the abundances.



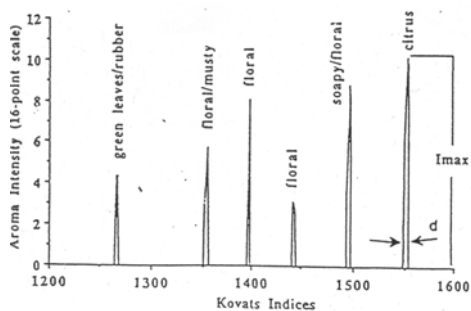
STUDIUM SLOŽEK AROMA POMOCÍ GC VE SPOJENÍ S OLFAKTOMETRIÍ

Cíl → identifikace významných nositelů aroma - látek se senzickou relevancí

 profil získaný při GC analýze nemusí odrážet profil vlastního aroma - některé látky mohou mít velmi nízké podnětové prahy vnímání a na čichovém vjemu se podílí maximálně

A. MĚŘENÍ INTENZITY AROMA V ČASE

- pomocí 16 bodové stupnice - komputerovaný záznam - "osmagram"

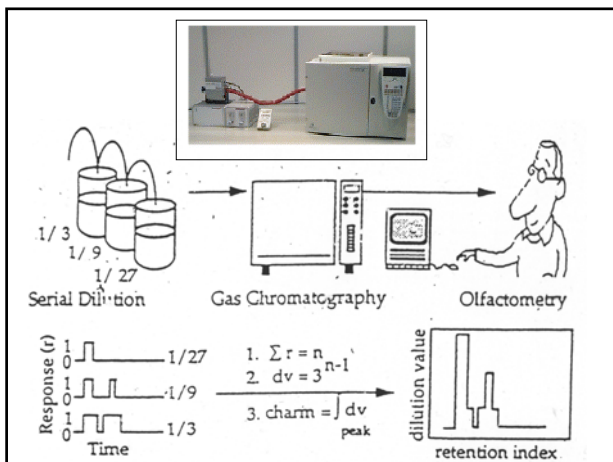


B. ZŘEĐOVACÍ TECHNIKY - hodnocení GC
 efluentu v rámci sérií zředění původního
 extraktu - detekce prahových koncentrací

- CHARM analýza → vzorky analyzovány v náhodném pořadí. Hodnotitel detekuje začátek a konec percepce čichového vjemu. CHARM hodnota: $C = d^{n-1}$,
 kde d - je zředění, n - počet hodnocení

“Purge and trap“ system

- a) purge mod
- b) desorbce



■ **Metoda AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis)**

→ hodnotitel indikuje zda vnímá či nevnímá aromatický vjem a zaznamenává sensorický deskriptor.

➤ Výsledek je vyjádřen jako “flavour dilution” (FD) - relativní hodnota reprezentující práh vnímání dané sloučeniny při dané koncentraci

AROMATICKÉ (VONNÉ) LÁTKY

➤ silice, produkty fermentací, autooxidačních reakcí, reakcí neenzymového hnědnutí aj. reakcí

CELKOVÝ OBSAH AROMATICKÝCH LÁTEK

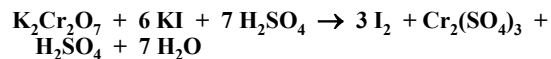
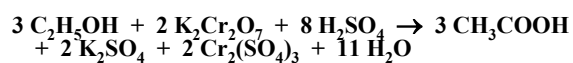
■ Metoda objemová a vázková

➔ destilace s vodní parou a určení objemu vrstvy silice

➔ extrakce rozpouštědlem a určení hmotnosti odparku extraktu (gravimetrie)

■ Metoda titrační

➔ destilace s vodní parou, oxidace dichromanem



STANOVENÍ POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÝCH AROMATICKÝCH LÁTEK

Stanovení pryskyřic v silicích

- destilace, extrakce zbytků rozpouštědlem a určení hmotnosti odparku extraktu

<http://www.chamomile.co.uk/distframe.htm>

STANOVENÍ TĚKAVÝCH SLOUČENIN

■ STANOVENÍ ESTERŮ

neutrální sloučeniny, nelze je oddělit selektivně úpravou pH → izolace z výchozí matrice některým z běžných způsobů pro těkavé látky - např. destilace s vodní parou

→ Analýza destilátu

■ CELKOVÉ MNOŽSTVÍ ESTERŮ (nejčastěji jako ethylacetát)

• metoda titrační

zmýdelnění → acidimetrická titrace
nespotřebovaného hydroxidu
(automatizace : potenciometrická indikace bodu ekvivalence)

• metoda spektrofotometrická

zmýdelnění → převedení reakcí
s hydroxylaminem na hydroxamové kyseliny →
reakce se solemi Fe^{3+} (kyselé pH) → barevné
komplexy

• PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

skupinový důkaz → eliminace z chromatogramu
po zmýdelnění

■ Stanovení jednotlivých esterů

• izolace z destilátu → GC/FID, GC/MS

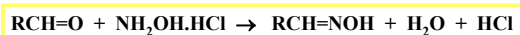
STANOVENÍ KARBONYLOVÝCH SLOUČENIN

alkanaly	formaldehyd, acetaldehyd, propanal n-dekanal
n-alk-2-enaly	propenal (akrolein), butenal,decenal
n-alka-2,4-dienaly	pentadienal,dekadienal
n-alkan-2-ony	propanon (aceton), butanon (methylethyl keton),...dekanon
dikarbonylové + hydroxykarbonylové	glyoxal, methylglyoxal, biacetyl, malondialdehyd, glyceraldehyd, acetoin
aromatické	benzaldehyd, salicyldehyd, vanilin
heterocyklické	2-furaldehyd...

■ STANOVENÍ SUMY KARBONYLŮ

Metody titrační

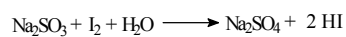
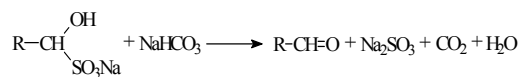
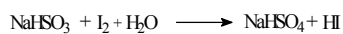
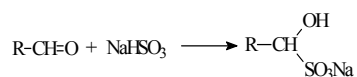
- ◆ Metoda alkalimetrická (oximační)
- ✓ extrakce či destilace vzorku
- ✓ reakce s hydrochloridem hydroxylaminu →
kyselina chlorovodíková → alkalimetrické
stanovení



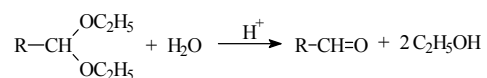
◆ Metoda jodometrická

- ✓ reakce s hydrogensířičitanem → reakce
hydroxysulfonáty s hydrogenuhličitanem za
vzniku sířičitanu

- ✓ stanovení jodometrickou titrací



uvolnění karbonylů z acetalů - hydrolýza:



◆ **Metoda spektrofotometrická**

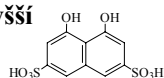
kondenzace karbonylů s 2,4-dinitrofenylhydrazinem
→ izolace produktů do organického rozpouštědla

■ **STANOVENÍ JEDNOTLIVÝCH
POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÝCH
KARBONYLOVÝCH SLOUČENIN**

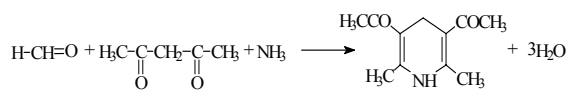
FORMALDEHYD

◆ **Metoda spektrofotometrická**

✓ reakce s chromotropovou kyselinou v prostředí kyseliny sírové (ruší látky jež se hydrolyzují na formaldehyd - např. methylethylketon; také vyšší alkoholy)



✓ reakce s acetylacetonem



2,4-pentadion (acetylaceton)

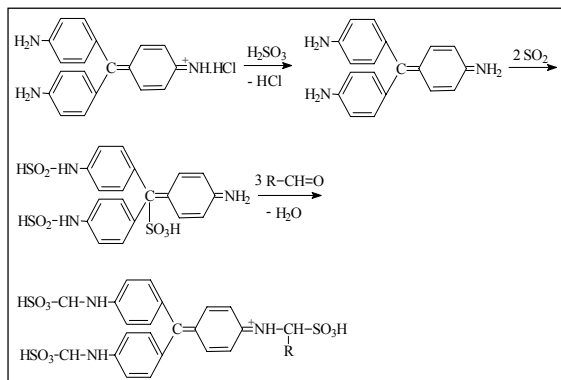
3,5-biacetyl-1,4-dihydro
lutidin

ACETALDEHYD

◆ Metoda titrační (jodometrická) – nespecifická

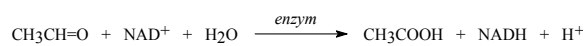
◆ Metoda spektrofotometrická

➔ reakce s fuchsinsířčitou kyselinou



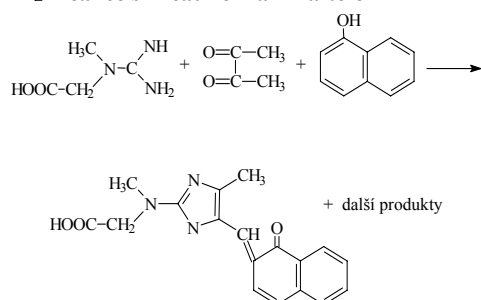
◆ **Metoda enzymová**

- ✓ oxidace v přítomnosti aldehyd dehydrogenasy (EC 1.2.1. 4.)
- ✓ NADH se stanoví spektrofotometricky (334 nm)



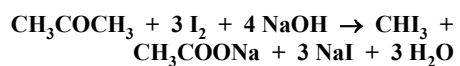
BIACETYL A ACETOIN

- ◆ **Metoda spektrofotometrická**
→ reakce s kreatinem a 1-naftolem



ACETON

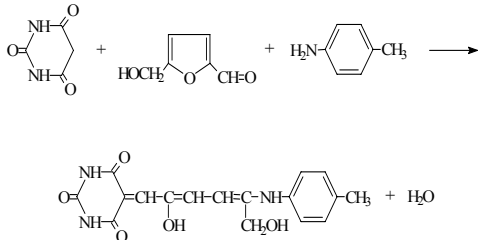
- ◆ **Metoda jodometrická**
→ reakce s jodem v alkalickém prostředí (= jodoformová reakce)



5-HYDROXYMETHYL-2-FURALDEHYD

♦ Metoda spektrofotometrická

➔ reakce s barbiturovou kyselinou a 4-toluidinem



STANOVENÍ ALKOHOLŮ

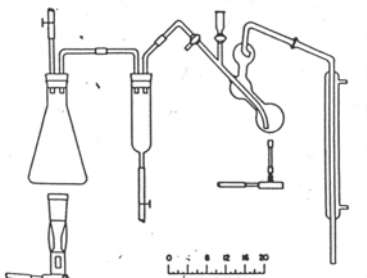
- ◇ methanol
- ◇ ethanol
- ◇ vyšší alkoholy
- ◇ ethylenglykol
- ◇ glycerol

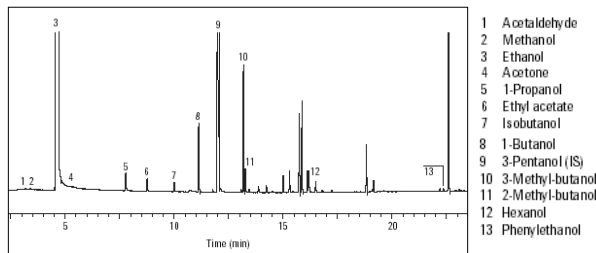
Metody stanovení

* Fyzikální - zvláště při vyšších obsazích ethanolu
⇒ rychlé screeningové postupy

- ebulliometrie (měření bodu varu)
- densitometrie (měření hustoty destilátu)
- refraktometrie (měření indexu lomu)

* Chemické - spočívají v oxidaci izolovaného alkoholu (destilace s vodní parou) např. dvojchroman draselným, titrace nezreagovaného přebytku ⇒ omezená selektivita





Příklad: GC stanovení alkoholů v brandy

Kolona: DB-624 (60 m x 0.25 mm x 1.4 μm)

Detektor: MS (kvadrupol)

Kuhn et al., Application Note 43786, Agilent Technologies

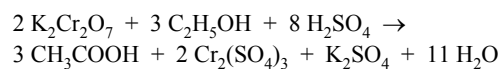
METHANOL

- GC
- Spektrofotometrie
- oxidace pomocí $KMnO_4$ na formaldehyd - tvorba barevných produktů

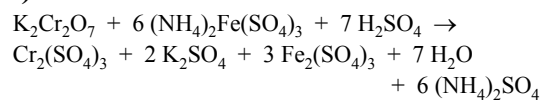
ETHANOL

- GC metoda - (n-propanol jako vnitřní standard), možnost varianty headspace

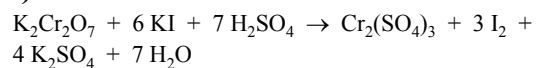
- AOAC – metody pyknometrické (destilát), refraktometrické
- Metody chemické oxidace dichromanem, stanovení jeho přebytku
a) sranem železito-amonným (indikátor o-fenantrolin)
b) jodometricky



a)

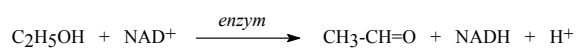


b)



• **Metody enzymové**

**oxidace alkoholdehydrogenasou (EC 1. 1. 1. 1.),
NADH se stanoví spektrofotometricky**



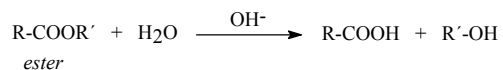
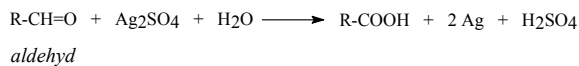
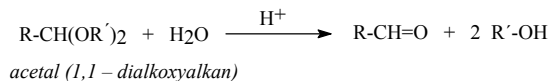
VYŠŠÍ ALKOHOLY

• **Metody spektrofotometrické**

➤ reakce se salicylaldehydem v přítomnosti horké
 H_2SO_4

➤ reakce s N,N-dimethyl-4-aminobenzaldehydem

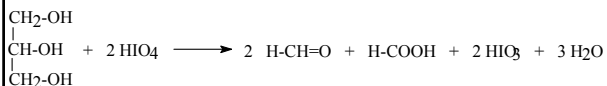
✓ odstranění látek rušících stanovení:



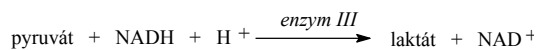
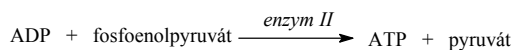
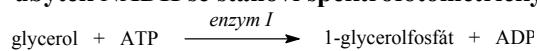
• **METODY CHROMATOGRAFICKÉ**
prakticky výhradně metoda GC/FID

GLYCEROL

- Metoda spektrofotometrická
oxidace HIO_4 na formaldehyd a mravenčí
kyselinu, která se stanoví titračně (barevný
produkt formaldehydu s floroglucinolem)



• **Metody enzymové**
úbytek NADH se stanoví spektrofotometricky



enzym I: glycerolkinasa (EC 2. 7. 1. 30)
enzym II: laktáthydrogenasa (EC 2. 7. 1. 40)
enzym III: pyruvátkinasa (EC 1. 1. 1. 27.)

- **Metody chromatografické**
Metoda HPLC

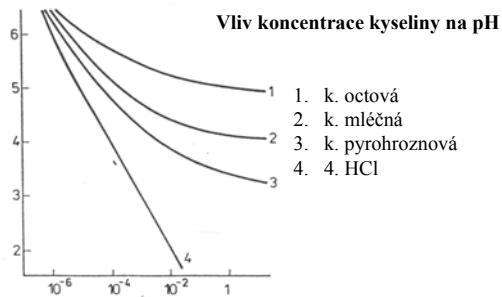
KARBOXYLOVÉ KYSELINY

Původ v potravinách:

- Biochemická syntéza (přirozená složka)
- Mikrobiální fermentace přítomných substrátů (cukrů...)
- Aditiva (látky cíleně přidávané)
 - acidulanty (okyselovadla)
 - konzervační prostředky
 - synergisty antioxidantů
 - stabilizátory barvy

→ významný vliv na senzorycké vlastnosti

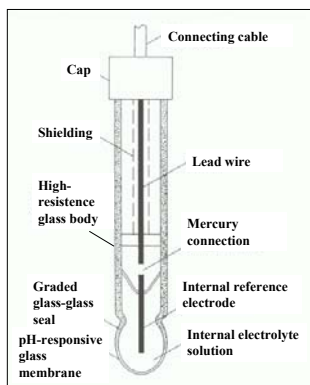
CHARAKTER CHUTI - různý podle typu kyseliny →
velmi odlišné podnětové prahy vnímání



■ Stanovení pH

→ skleněná elektroda

KALIBRACE
pomocí certifikovaných
pufrů



■ **Celková (titrační) kyselost**

a) množství ml 1M NaOH potřebných k neutralizaci 100g potraviny / produktu

b) % dominující kyseliny (mléčná, vinná, octová...)

➤ **alkalimetrická titrace**

indikace bodu ekvivalence:

- barevný indikátor, např. fenolftalein
- potenciometricky, do pH 8.2 (AOAC) nebo 7 (EU)

➤ **FIA**

automatizované stanovení: do proudu roztoku hydroxidu ve směsi s indikátorem (fenolftalein, bromkresolová zeleň + methylčerveně) se vstříkuje vzorek

→ pokles absorbance při 500 -550 nm) - velikost píku
log funkce koncentrací

STANOVENÍ VÝZNAMNÝCH KARBOXYLOVÝCH KYSELIN

SEPARAČNÍ METODY → současné stanovení více analytů

■ **HPLC**

často nutná úprava vzorku či extraktu (horká voda, přídavek ethanolu, acetonitrilu apod.) :

- ❖ *filtrace, centrifugace* - odstranění pevných částic
- ❖ *precipitace* - odstranění proteinů čířidlem (želatina...)
- ❖ *dialýza* - odstranění pigmentů, polyfenolů
- ❖ *adsorpční chromatografie, nejlépe SPE* - odstranění fenolických sloučenin a barviv (PVP) nebo naopak izolace (zadržení kyselin na katexu)

HLAVNÍ VYUŽÍVANÉ SEPARAČNÍ MECHANISMY

• CHROMATOGRRAFIE V REVERZNÍ FÁZI

Foma analytů:

volné nedisociované kyseliny - solvofobní chromatografie

mobilní fáze pufr - pH 2-3 (např. 0.01M KH_2PO_4 upravený fosforečnou kyselinou, někdy přídavek tetrabutylamonium fosfátu - iontové páry)

kyseliny po derivatizaci (nejčastěji jako fenacyl- nebo p-nitrobenzyl estery) → **hydrofobní interakce**
→ výrazné zlepšení separace, často i detektability

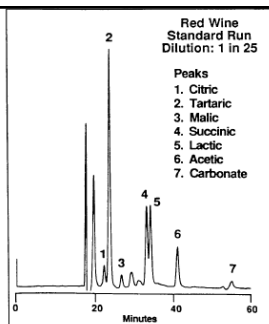
• IONEXOVÁ CHROMATOGRRAFIE

- katexy v H^+ formě

(mobilní fáze zředěná kyselina, např. sírová apod., vyšší t)

⇒ **faktory podmiňující retenci (kapacitní faktor, k):**
pK, molekulová hmotnost, rozpustnost ve vodě

➤ **Detekce: RI, UV, příp. elektrochemická**
(nitroderiváty)



HPLC stanovení organických kyselin v červeném víně:

IONEXOVÁ CHROMATOGRRAFIE

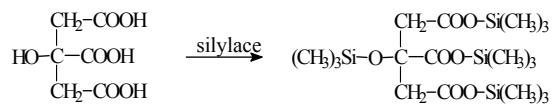
Kolona: HPICE AS-1, **Mobilní fáze:** 2 mM oktansulfonová kyselina

Detektor: elektrochemický

Application Note AN21, Dionex

■ Plynová chromatografie - GC

➤ **těkavé možno přímo, častěji jako deriváty**
(alkylestery, trimethylsilylestery) – precipitace ve formě nerozpustných Pb solí



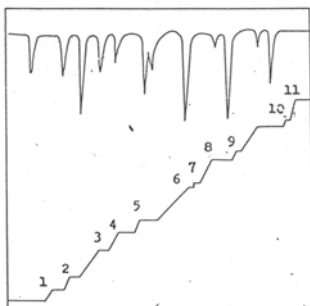
k. citronová

■ Isotachoforéza

separační princip:

➤ **diference v mobilitě iontů v elektrickém poli**
(terminální elektrolyt, nosný pufr)

Stanovení karboxylových kyselin v lehké šťávě pomocí kapilární isotachoforézy

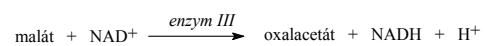
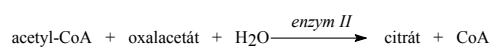
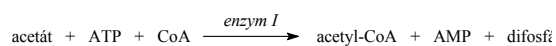


1. dusičnany
2. k. šťavelová
3. k. mravenčí
4. k. jablečná
5. k. citronová
6. k. glykolová
7. k. octová
8. k. mléčná
9. k. propionová
10. prolin
11. k. asparagová

Stanovení jednotlivých kyselin

OCTOVÁ KYSELINA

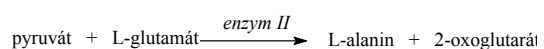
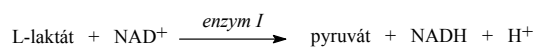
- **Titrační metoda**
jen pro jednoduché vzorky
- **Metoda enzymová**
➤ spektrofotometrické stanovení NADH



enzym I: acetyl-CoA synthetasa (EC 6. 2. 1. 1.)
enzym II: citrát synthasa (EC 4. 1. 3. 7.)
enzym III: maláidehydrogenasa (EC 1. 1. 1. 37.)

MLÉČNÁ KYSELINA

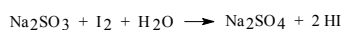
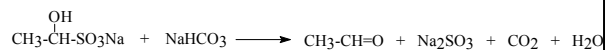
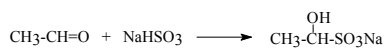
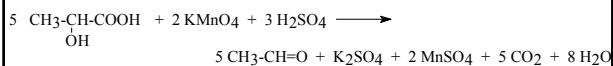
- **Metoda enzymová**



enzym I: L-laktát dehydrogenasa (EC 1. 1. 1. 27)
enzym II: glutamát-pyruvát transaminasa (EC 2. 6. 1. 2.)

■ Metoda titrační (jodometrická)

➤ oxidace manganistanem, stanovení acetaldehydu



VINNÁ KYSELINA

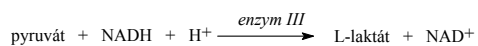
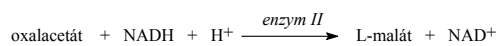
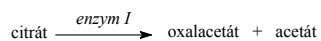
■ Metoda titrační

➤ hydrogenvinán alkalimetry

CITRONOVÁ KYSELINA

■ Metoda enzymová

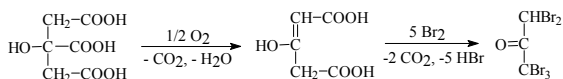
➤ spektrofotometrické stanovení úbytku NADH



enzym I: citrát lyasa (EC 4. 1. 3. 6.)
enzym II: malát dehydrogenáza (EC 1. 1. 1. 37.)
enzym III: laktát dehydrogenáza (EC 1. 1. 1. 27.)

■ **Metoda vážková**
 “historická” metoda

➤ **převedení na pentabromaceton**



TŘÍSLOVINY

polyhydroxyfenoly - jen v rostlinných materiálech
 ➤ často vliv na senzorické vlastnosti (barva, chuť, vůně)

- **hydrolyzovatelné: gallotaniny a ellagotaniny**
 → účinkem minerálních kyselin se štěpí na gallovou či ellagovou kyselinu a sacharid
- **kondenzované** → působením minerálních kyselin nehydrolyzují, ale tvoří červenohnědé kondenzační produkty - flobafeny (významné např. v čaji)
prekurzory - katechiny, leukoanthokyanidiny
 → při zrání ovoce postupný úbytek

CELKOVÝ OBSAH TŘÍSLOVIN

➔ *tekuté vzorky se analyzují přímo, tuhé se extrahují horkou vodou*

■ **Metoda titrační (manganometrická)**
 ➤ oxidace manganistanem - diferenční stanovení před a po adsorpci analytů na polyamidový sorbent

➤ *vhodné pro víno, čaj, kávu - použití empirických přepočítávacích faktorů pro různé komodity*

■ **Metoda srážení solemi kovů**

solí Cu (sráží i k. gallovou a pektin), Sn – stanoví se buď množství kovu ve sraženině nebo úbytek v supernatantu

➤ *Vhodné pro všechny typy rostlinných materiálů – empirické přepočítávací faktory*

■ **Metoda spektrofotometrická**

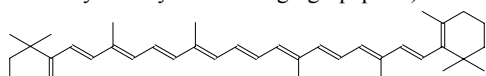
barevné produkty se solemi Fe³⁺ v alkalickém prostředí

➤ *Vhodné pro vzorky s malým obsahem pigmentů*

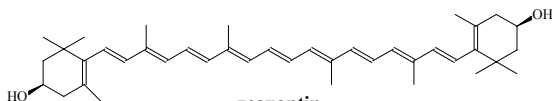
PŘIROZENÁ BARVIVA

KAROTENOIDY

přírodní: all trans izomery (známo asi 50 druhů, obsahy desítky až tisíce mg/kg - paprika)



β - karoten



zeaxantin

➤ **IZOLACE**

šetrná extrakce - aceton, methanol, ethanol (u materiálů s nižším obsahem vody - např. diethylether) *přídavek antioxidantů (BHT) a neutralizačního činidla*

↓

roztřepání

↓

zmýdelnění (nejlépe při pokojové teplotě a v inertní atmosféře) - odstranění lipidů a chlorofylů; odstranění sterolů vymražením

■ **Spektrofotometrické metody**

někdy předchází frakcionace na vhodném sorbentu (kolonová chromatografie, TLC) separace podle polarity

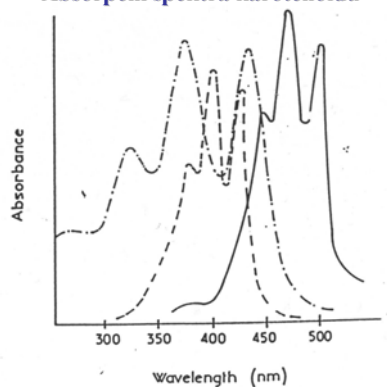
■ **HPLC**

často v normální fázi, možná i reverzní identifikace jednotlivých sloučenin LC-MS

Extinkční koeficienty ($E_{1\text{cm } 1\%}$) karotenoidů v rozpouštědlech

Karotenoid	$E_{1\text{cm } 1\%}$	Vlnová délka (l)	Rozpouštědlo
astaxanthin	1900	473	aceton
kapsanthin	2072	483	benzen
kapsorubin	2200	489	benzen
a-karoten	2800	444	benzen
b-karoten	2505	457	cyklohexan
a-kryptoxanthin	2636	446	hexan
lutein	2236	458	benzen
lykopen	3370	487	benzen
rubixanthin	2909	462	aceton
violaxanthin	2240	454	benzen
zeaxanthin	2340	452	aceton

Absorpční spektra karotenoidů



Adsorbenty pro dělení karotenoidů kolonovou chromatografií

Typ karotenoidu	Adsorbent
karoteny	alumina, silikagel
monohydroxykarotenoidy	alumina
karotenoidy o střední polaritě	oxid hořečnatý
polární xantofyly	celulosa

CHLOROFYLOVÁ BARVIVA

porfyrinové pigmenty – přítomny ve všech fotosyntetizujících organismech

➤ extrakce acetonem, případně methanolem

⚠ riziko degradace - enzymová (nutnost inhibice chlorofylázy) i chemická (potřeba neutralizace - zvýšení pH)

■ spektrofotometrické metody

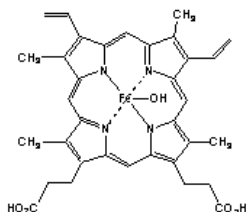
stanovení chlorofylu *a* a *b* vedle sebe výpočtem

HEMATINOVÁ BARVIVA

extrakce acetonem,

➔ chromatografické metody

➔ spektrofotometrické metody



ANTHOKYANY A JINÉ FLAVONOIDY

ve vodě rozpustné polyhydroxyfenoly - glykosidy

➤ **Extrakce**

zředěné kyseliny v polárním rozpouštědle
(často methanol s 1% HCl); pro nativní
anthokyaniny
