

VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE
ÚSTAV CHEMIE A ANALÝZY POTRAVIN

Technická 5, 166 28 Praha 6

tel./fax.: + 420 220 443 185; jana.hajslova@vscht.cz



**LABORATOŘ Z ANALÝZY POTRAVIN A PŘÍRODNÍCH
PRODUKTŮ**

**Kvalitativní analýza sacharidů a aditivních
látek v nápoji s využitím techniky
HPLC–TOFMS a DART–TOFMS**

Cíl laboratorní úlohy:

Realizovat kvalitativní analýzu sacharidů a aditivních látek v nealkoholickém nápoji pomocí techniky HPLC–TOFMS a DART–TOFMS

Dílčí úkoly:

1. Proved'te HPLC-TOFMS analýzu vzorku ochucené minerální vody se sníženým obsahem cukru v pozitivním a negativním ESI ionizačním módu.
2. Na základě hmotnostních spekter jednotlivých píků detekovaných analytů proved'te s použitím softwaru a Tabulky 5 jejich identifikaci.

Materiál a laboratorní sklo:

- Separační analytická kolona ZORBAX SB-C18 75 mm × 2,3 mm, 3 μm (Supelco)
- Vzorkovací tyčinky Dip-it[®] (IonSense)
- Vzorkovací jamky Deepwell Microplates (Life systéme Design)
- Skleněné pasteurovy pipety (Poulen & Graf)
- 10 ml a 20 ml Odměrné baňky

Rozpouštědla a chemikálie:

- Deionizovaná voda (získaná pomocí purifikačního systému Milipore)
- Acetonitril (HPLC-grade, Sigma-Aldrich)
- Methanol (HPLC-grade, Merck)
- Polyethylen glykol, průměrná M_r 600 (Sigma-Aldrich)

Přístroje a zařízení:

- „Rapid resolution“ kapalinový chromatograf série 1200 s autosamplerm a termostatem (Agilent)
- ESI iontový zdroj (Jeol)
- DART iontový zdroj DP-100 (IonSense)
- Hmotnostní spektrometr AccuTOF LP (Jeol)
- Autosampler AutoDART HTC PAL (Leap Technologies)
- Analytické váhy AND, model GR – 202EC (A&D Instruments LTD)

Vzorek: ochucená minerální voda se sníženým obsahem cukru

A. HPLC–TOFMS

Princip metody:

Sacharidy a další aditivní látky přítomné ve vzorku jsou na HPLC koloně s reverzní fází separovány dle své polaritě a molekulové hmotnosti. Eluované analyty jsou v ESI (electrospray ionization) iontovém zdroji ionizovány a následně analyzovány a detekovány hmotnostním spektrometrem. V průběhu analýzy dochází k rychlému přepínání pozitivního a negativního módu ionizace, v rámci jedné analýzy tak lze získat oba chromatografické záznamy i hmotnostní spektra. Na základě měření přesné hmoty lze jednotlivým iontům analytů přiřadit elementární složení a identifikovat je.

PRACOVNÍ POSTUP:

Příprava vzorku:

Vzorek ochucené minerální vody se odplyní sonikací (2 minuty). 0,2 ml vzorku se převede do 20 ml odměrné baňky a objem se doplní po rysku deionizovanou vodou. Takto naředěný vzorek se převede do 2 ml vialky a analyzuje se pomocí HPLC–TOFMS.

HPLC–TOFMS:

Při HPLC separaci analytů se jako mobilní fáze používá směs acetonitril–voda v poměru 70:30 (v/v). Nastříkuje se 5 µl vzorku, eluce se provádí izokraticky při průtoku 0,4 ml/min. Doba analýzy je 10 min. Optimální nastavení ESI iontového zdroje a hmotnostního spektrometru v pozitivním a negativním ionizačním módu je uvedeno v Tabulce 1 a 2.

Tabulka 1. Nastavení ESI–TOFMS v pozitivním módu.

Parametr	Nastavení
Mód ionizace	pozitivní
Napětí na kapiláře	3200 V
Napětí na kóně	+20 V
Teplota zdroje	120 °C
Průtok desolv. plynu	700 l/hod
Desolvatační teplota	350 °C
Průtok kónového plynu	100 l/hod
Napětí na iontové optice	+600 V
Napětí na MCP detektoru	–2200 V
Rychlost akvizice spekter	10 spekter/s

Tabulka 2. Nastavení ESI–TOFMS v negativním módu.

Parametr	Nastavení
Mód ionizace	negativní
Napětí na kapiláře	3100 V
Napětí na kóně	–20 V
Teplota zdroje	120 °C
Průtok desolv. plynu	700 l/hod
Desolvatační teplota	350 °C
Průtok kónového plynu	100 l/hod
Napětí na iontové optice	–600 V
Napětí na MCP detektoru	+2200 V
Rychlost akvizice spekter	10 spekter/s

Zpracování dat:

Pro zpracování dat získaných HPLC–TOFMS analýzou se používá software Mass Center v 1.3, který umožňuje integraci píků analytů, kvalitativní vyšetření jejich hmotnostních spekter a výpočet elementárního složení.

B. DART–TOFMS

Princip metody:

DART (Direct Analysis in Real Time) je nový typ iontového zdroje pro hmotnostní spektrometrii pracující za atmosférického tlaku. Hlavní výhodou DART zdroje je možnost získat informaci (hmotnostní spektrum) analyzovaného vzorku v reálném čase. Vlastní analýza, která se provádí pouhým umístěním vzorku (pevný, kapalný či plyný) do prostoru mezi iontovým zdrojem a vstupem do hmotnostního spektrometru, trvá pouze několik sekund. Do iontového zdroje je vháněno hélium, které je dále vedeno do výbojové komory s jehlovou elektrodou. Na elektrodu je vloženo napětí o velikosti několika tisíc voltů (3000–4000 V), v jehož důsledku dochází k výboji a tvorbě plazmy (směs kladně a záporně nabitých iontů plynu a nenabitých metastabilních atomů plynu). Nabité částice jsou z proudu plynu odstraněny a v další části zdroje je zahříván (typicky na 250 až 350°C), kontrola teploty plynu usnadňuje zplynění/desorpci látek ze vzorkovaných matic.

Při přímé analýze vzorku nápoje lze v hmotnostních spektrech (v závislosti na zvoleném ionizačním módu) pozorovat pseudomolekulární ionty ($[M+H]^+$, $[M]^+$ nebo $[M-H]^-$, $[M]^-$) sacharidů, umělých sladidel a dalších aditivních látek.

Pracovní postup:

Příprava vzorku a roztoku polyethylen glykolu:

Vzorek ochucené minerální vody se odplyní sonikací (2 minuty). Pro účel DART–TOFMS analýzy se přibližně 0,7 ml odplyněného vzorku převede do vzorkovací jamky. Roztok polyethylen glykolu (~200 µg/ml), používaný při DART–TOFMS analýze pro účel vnitřní kalibrace při měření přesné hmoty, se připraví následovně: do 10 ml odměrné baňky se pomocí pasturovy pipety naváží přibližně 2 mg polyethylen glykolu a baňka se doplní po rysku methanolem.

DART–TOFMS:

Při měření se používá automatický přenos vzorku s využitím autosampleru, doba desorpce vzorku před iontovým zdrojem je 10 s. Optimální nastavení parametrů DART–TOFMS systému pro měření v pozitivním a negativním módu uvádí Tabulka 3 a 4.

Tabulka 3. Nastavení parametrů DART–TOFMS v pozitivním módu.

Parametr	Nastavení
Mód ionizace	pozitivní
Průtok hélia	2,7 l/min
Teplota plynu	300°C
Napětí na výbojové jehle	–3000 V
Elektroda 1	+150 V
Elektroda 2	+250 V
Napětí na kóně	+20 V
Napětí na iontové optice	+600 V
Napětí na MCP detektoru	–2400 V
Rychlost akvizice spekter	5 spekter/s

Tabulka 4. Nastavení parametrů DART–TOFMS v negativním módu.

Parametr	Nastavení
Mód ionizace	negativní
Průtok hélia	2,7 l/min
Teplota plynu	300°C
Napětí na výbojové jehle	+3000 V
Elektroda 1	–150 V
Elektroda 2	–350 V
Napětí na kóně	–20 V
Napětí na iontové optice	–600 V
Napětí na MCP detektoru	+2400 V
Rychlost akvizice spekter	5 spekter/s

Každý vzorek se analyzuje ve třech opakováních, na konci každé analýzy je před iontový zdroj na vzorkovací tyčince ručně umístěn roztok polyethylen glykolu.

Zpracování dat:

Pro zpracování dat, tj. kvalitativní zhodnocení hmotnostních spekter vzorku a určení elementárního složení iontů se používá softwaru Mass Center v 1.3. Před dalším zpracováním je nutné provést korekci pozadí, tj. odstranit ze spektra vzorku veškeré ionty vznikající v důsledku kontaminace zdroje nebo ionizace komponent atmosféry a provést vnitřní kalibraci s použitím hmotnostního spektra polyethylen glykolu.

Tabulka 5 Sacharidy a aditivní látky v ochucené minerální vodě se sníženým obsahem cukru.

Analyt	<i>m/z</i>	Typ iontu	Elementární složení iontu
Acesulfam K	161,9861	$[M]^-$	$C_4H_4NO_4S$
Aspartam	295,1294	$[M+H]^+$	$C_{14}H_{19}N_2O_5$
Citrónová kys.	191,0192	$[M-H]^-$	$C_6H_7O_7$
Glukosa/Fruktosa	179,0556	$[M-H]^-$	$C_6H_{11}O_6$
Sacharosa	341,1084	$[M-H]^-$	$C_{12}H_{21}O_{11}$
Benzoát	121,0290	$[M]^-$	$C_7H_5O_2$
Sorbová kys.	111,0446	$[M-H]^-$	$C_6H_7O_2$
Askorbová kys.	175,0243	$[M-H]^-$	$C_6H_7O_6$

Obrázek 1 Typické DART-TOFMS hmotnostní spektrum vzorku ochucené minerální vody se sníženým obsahem cukru měřené v pozitivním a negativním ionizačním módu.

