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

Stanovení profilu triacylglycerolů technikou HPLC–TOFMS a DART–TOFMS pro hodnocení autenticity olivového oleje

Cíl laboratorní úlohy:

Na základě tanovení profilů triacylglycerolů technikou HPLC–MS a DART–TOFMS pro odlišení extra panenského oleje a oleje z lískových oříšků

Dílčí úlkoly:

1. Získejte chromatografické profily triacylglycerolů extra panenského olivového oleje a oleje z lískových oříšků pomocí vysokoúčinné kapalinového chromatografie (HPLC) a vysokorozlišovacím hmotnostně spektrometrickým detektorem s analyzátorem doby letu iontů (HR TOF-MS) s ionizací elektrosprejem (ESI).

2. Porovnejte získané profily a určete chromatografické píky odlišující oba oleje.

3. Na základě hmotnostních spekter (aduktových iontů) jednotlivých píků analytů, se s použitím softwaru a níže uvedené Tabulky 3 pokuste identifikovat detekované triacylglyceroly.

4. S použitím DART iontového zdroje s autosamplerem a vysokorozlišovacího hmotnostního spektrometru s analyzátorem doby letu iontů (HR TOF-MS) získejte hmotnostní spektra triacylglycerolů extra panenského olivového oleje a lískooříškového oleje.

5. Získané hmotnostní spektra olejů porovnejte a určete ionty, jejichž relativní intenzity se významně liší a jsou tak vhodné pro vzájemné odlišení obou vzorků.

6. S pomocí softwaru určete pravděpodobné elementární složení vybraných iontů včetně chyby měření přesné hodnoty *m*/*z*. Na základě informací uvedených níže v Tabulce 3 předběžně identifikujte sledované ionty triacylglycerolů.

Materiál a laboratorní sklo:

- Analytická kolona Spherisorb ODS2 100 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 Odměrné baňky

Rozpouštědla a chemikálie:

- Chloroform (HPLC-grade, Merck)
- Aceton (HPLC-grade, Merck)
- Acetonitril (HPLC-grade, Sigma-Aldrich)
- Toluen (HPLC-grade, Merck)
- Methanol (HPLC-grade, Merck)
- Octan amonný (≥99%, Sigma-Aldrich)
- Vodný roztok amoniaku, 25 % (*m/m*),(Penta)
- polyethylen glykol, průměrná M_r 600 (Sigma-Aldrich)

Přístroje a zařízení:

- „Rapid resolution“ kapalinový chromatograf serie 1200 s autosamplerem a termostatem (Agilent)
- DART iontový zdroj DP-100 (IonSense)
- Hmotnostní spektrometr AccuTOF LP (Jeol)
- Autosampler AutoDART HTC PAL (Leap Technologies)
- Váhy AND, model GR – 202EC (A&D Instruments LTD)
- Automatická pipeta FinnPipette 0,2 – 1 ml (Thermo Scientific)

Vzorky: extra panenský a lískooříškový olej

A. HPLC–TOFMS

Princip metody:

Triacylglyceroly, hlavní složky tuků a olejů, jsou na HPLC koloně s reverzní stacionární fázi separovány dle své polarity a molekulové hmotnosti. Pro charakterizaci jednotlivých analytů se používá tzv. ECN (equivalent carbon number), které se vypočítá dle vztahu ECN = CN – DB (CN – počet uhlíků v mastných kyselinách triacylglycerolu, DB – počet dvojných vazeb v molekule). Retence triacylglycerolů na koloně se zvyšuje s rostoucím ECN. Eluované triacylglyceroly jsou v ESI (electrospray ionization) iontovém zdroji ionizovány, dochází ke tvorbě amonných aduktových iontů $[M+NH_4]^+$. Vzniklé ionty jsou analyzovány a detekovány hmotnostním spektrometrem. Získané chromatografické profily se liší pro oleje různého botanického původu a mohou tak posloužit k jejich odlišení. Na základě hmotnostních spekter jednotlivých píků, resp. přesných hodnot *m/z* aduktových iontů analytů lze triacylglyceroly identifikovat.

Pracovní postup:

Příprava vzorku:
0,5 ml vzorku se automatickou pipetou převede do 10 ml odměrné baňky, která se doplní po rysku chloroformem. Takto naředěný olej se převede do 2 ml vialky a analyzuje se pomocí HPLC–TOFMS.

HPLC–TOFMS:
Při HPLC separaci triacylglycerolů se jako mobilní fáze používá směs aceton–acetonitril v poměru 64:36 (*v/v*), přičemž acetonitril obsahuje 10 mmol/l octanu amonného pro podporu ionizace triacylglycerolů. Nastřikuje se 5µl vzorku, eluce se provádí izokraticky při průtoku 0,4 ml/min. Doba analýzy je 25 min. Optimální nastavení ESI iontového zdroje a hmotnostního spektrometru uvádí Tabulka 1.

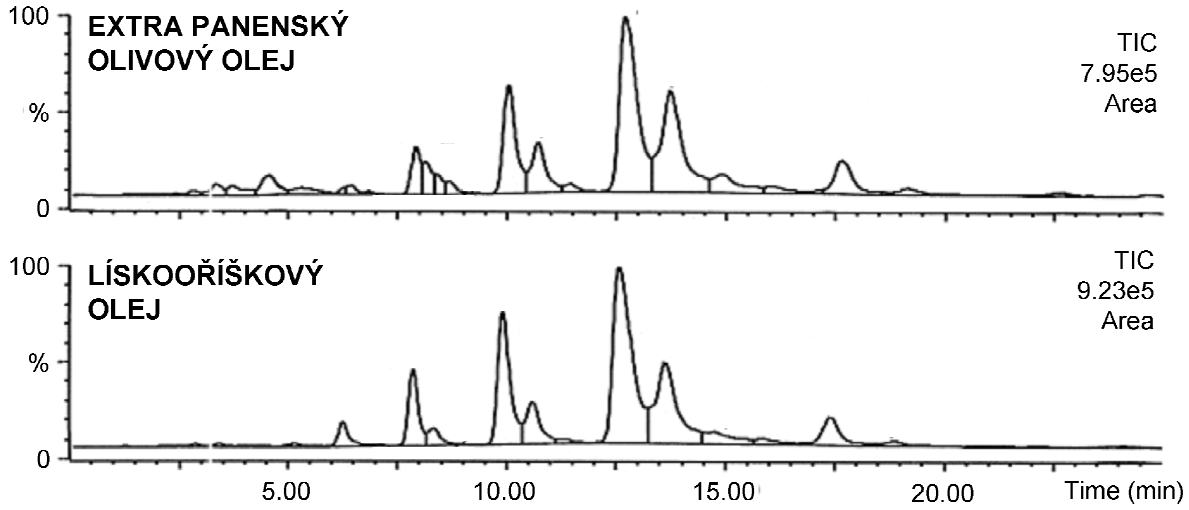
Tabulka 1. Nastavení ESI–TOFMS systému pro analýzu triacylglycerolů

Parametr	Nastavení
Mód ionizace	pozitivní
Napětí na kapiláře	3500 V
Napětí na kóně	+20 V
Teplota zdroje	120 °C

Průtok desolv. plynu	900 l/hod
Desolvatační teplota	400 °C
Průtok kónového plynu	100 l/hod
Napětí na iontové optice	+1000 V
Napětí na MCP detektoru	–2200 V
Rychlost akvizice spekter	5 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 hmotnostních spekter triacylglycerolů a výpočet elementárního složení.

Obrázek 1 Typický chromatogram triacylglycerolů extra panenského lískooříškového oleje



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 plynný) do prostoru mezi iontový zdroj a vstup 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 plasmy (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 matric.
Při přímé analýze rostlinných olejů jsou v hmotnostním spektru pozorovány současně pseudomolekulární ionty všech přítomných triacylglycerolů $[M+H]^+$, v přítomnosti par amoniaku pak jejich aduktové ionty $[M+NH_4]^+$. Současně dochází ke tvorbě dalších iontů o nižší hodnotě *m/z*, které vznikají fragmentací iontů triacylglycerolů odštěpením jedné či dvou molekul mastných kyselin. Tyto hmotnostně spektrometrické profily triacylglycerolů mohou posloužit k odlišení olejů s různým složením triacylglycerolů.

Pracovní postup:

Příprava vzorku a roztoku polyethylen glykolu:
Do 10 ml odměrné baňky se pomocí automatické pipety převede 0,2 ml vzorku, objem se doplní po rysku toluenem a baňka se důkladně protřepe. Pro účel DART–TOFMS analýzy se přibližně 0,7 ml 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 pasteurovy 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 30 s. Pro zvýšení efektivity ionizace triacylglycerolů (tvorba aduktových iontů s amoniakem) se pod výstup z iontového zdroje umístí 2 ml vialka naplněná vodným roztokem amoniaku. Optimální nastavení parametrů DART–TOFMS systému uvádí Tabulka 2.

Tabulka 2. Nastavení parametrů DART–TOFMS systému pro analýzu triacylglycerolů.

Parametr	**Nastavení**
Mód ionizace	pozitivní
Průtok hélia	4,0 l/min
Teplota plynu	350°C
Napětí na výbojové jehle	–3000 V
Elektroda 1	+150 V
Elektroda 2	+250 V
Napětí na kóně	+20 V
Napětí na iontové optice	+1100 V
Napětí na MCP detektoru	–2400 V
Rychlost akvizice spekter	5 spekter/s

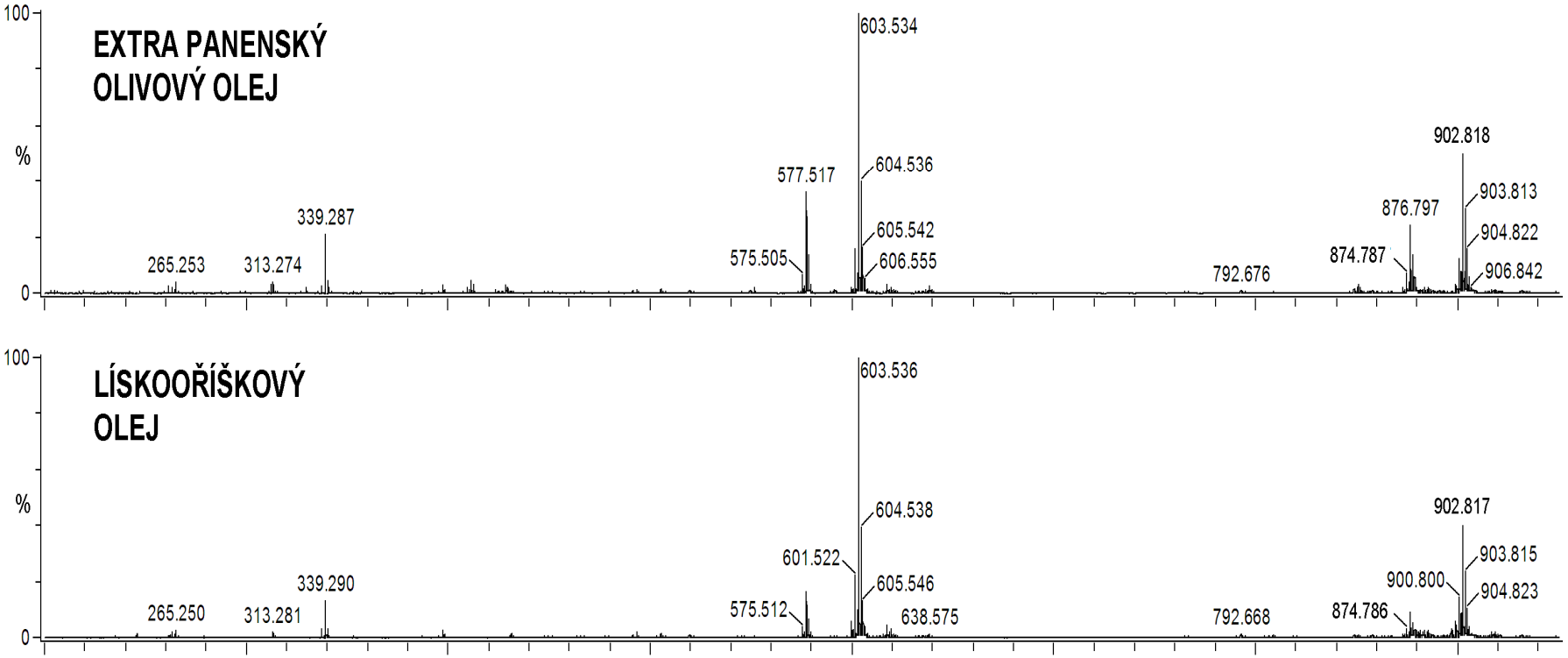
Každý vzorek se analyzuje ve třech opakováních, na konci každé analýzy je před iontový zdroj na vzorkovací tyčince ručně umístěn roztok polyethylen glykolu.

Zpracování dat:
Pro zpracování dat, tj. kvalitativní zhodnocení hmotnostních spekter olejů a určení elementárního složení se používá software 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 3 Hlavní triacylglyceroly extra panenského olivového a lískooříškového oleje.

Triacylglycerol	***m/z***	**Elementární složení iontu $[M+NH_4]^+$**
OOO	902,82	$C_{57}H_{108}NO_6$
LOO	900,80	$C_{57}H_{106}NO_6$
LLO	898,79	$C_{57}H_{104}NO_6$
LLL	896,77	$C_{57}H_{102}NO_6$
POS	878,82	$C_{55}H_{108}NO_6$
POO	876,80	$C_{55}H_{106}NO_6$
PLO	874,79	$C_{55}H_{104}NO_6$

PPO	850,79	$C_{53}H_{104}NO_6$
POPo	848,77	$C_{53}H_{102}NO_6$

Zbytky mastných kyselin v iontech triacylglycerolů jsou označeny dle následující legendy: O = olejová kys.; L = linolová kys.; P = palmitová kys; S = stearová kys.; Po = palmitoolejová kys.

Obrázek 2 Typické DART–TOFMS hmotnostní spektrum extra panenského olivového oleje a lískooříškového oleje.