

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2009

Milan Sýs

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Katedra analytické chemie

Mikroextrakční metody využívající tuhé sorbenty

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Milan Sýs

VEDOUcí PRÁCE: Ing. Martin Adam, Ph.D.

2009

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Katedra analytické chemie

Microextraction methods based on the solid sorbents

BACHELOR WORK

AUTHOR: Milan Sýs

SUPERVISOR: Ing. Martin Adam, Ph.D.

2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 14. 6. 2009

Milan Sýs

Poděkování:

Na začátku bych velmi rád poděkoval vedoucímu práce Ing. Martinu Adamovi, Ph.D., který mi velmi pomohl s vypracováním této bakalářské práce prostřednictvím potřebných rad, odborného vedení a hlavně vstřícností. Také musím poděkovat svým rodičům, kteří mě směřovali k cílevědomé práci a přátelům za psychickou podporu.

Děkuji vám!

Souhrn

Tato bakalářská práce je zaměřena na mikroextrakční techniky založené na využití tuhých sorbetů a jejich uplatnění pro analýzu potravin. Mezi tyto mikroextrakční metody patří mikroextrakce tuhou fází (SPME), mikroextrakce se sorbentem umístěným v mikrostříkačce (MEPS) a mikroextrakce na magnetickém míchadle (SBSE). Základní principy jednotlivých mikroextrakčních metod jsou uvedeny v jednotlivých kapitolách. Použitelnost mikroextrakčních metod pro analýzu potravin je demonstrována pomocí jednotlivých aplikací zaměřených na stanovení různých látek v určité potravine.

Klíčová slova

Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

Mikroextrakce na magnetickém míchadle (SBSE)

Mikroextrakce se sorbentem umístěným v mikrostříkačce (MEPS)

Mikroextrakční analýza potravin

Summary

This bachelor thesis is focused on the microextraction technology based on the use of solid sorbents and their application for analysis of food. These microextraction methods include Solid Phase Microextraction (SPME), Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) and Stir Bar Sorptive Microextraction (SBSE). Basic principles of individual microextraction methods are described in individual chapters. Applicability microextraction methods for food analysis is demonstrated through various applications, which are used for the determination of various substances in the food.

Keywords

Solid Phase Microextraction (SPME)

Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)

Microextraction by Packed Sorbent (MEPS)

Micro extraction analysis of food

OBSAH

Seznam použitých zkratek

1. Úvod	11
2. Mikroextrakce tuhou fází	12
2.1. Úvod do problematiky mikroextrakce tuhou fází	12
2.2 Princip metody SPME	12
2.3. Zařízení pro mikroextrakci tuhou fází	13
2.3.1. Držák pro automatické vzorkování a HPLC analýzy.....	14
2.3.2. Držák pro ruční vzorkování.....	14
2.3.3. Přenosný SPME držák pro vzorkování v terénu.....	14
2.3.4. Postup při sorpci analytu.....	14
2.3.5. Postup při desorpci analytu.....	16
2.4. Faktory ovlivňující extrakci u SPME	16
2.4.1. Výběr SPME vlákna.....	16
2.4.1.1. Absorpce.....	19
2.4.1.2. Adsorpce.....	20
2.4.2. Způsob vzorkování.....	22
2.4.3. Míchání vzorku.....	22
2.4.4. Přídavek soli a změna pH.....	22
2.4.5. Extrakční čas.....	23
2.4.6. Teplota extrakce.....	23
3. Mikroextrakce se sorbetem umístěným v mikrostríkačce	24
3.1. Princip MEPS	24
3.2. Výhody MEPS	24
3.2.1. Citlivost a velikost vzorků.....	25
3.2.2. Automatizace.....	25
3.2.2. Flexibilita a jednoduché použití.....	26

3.3. Postup při práci s MEP	26
3.4. Kompatibilní systémy pro MEPS	27
4. Mikroextrakce na magnetickém míchadle	29
4.1. Princip extrakce na magnetickém míchadle	29
4.1.1. SBSE ve spojení s GC	30
4.1.2. SBSE ve spojení s HPLC	30
4.2. Teoretické základy SBSE	31
4.3. Porovnání výtěžnosti SBSE a SPME	32
5. Přínos mikroextrakčních metod pro analýzu potravin	33
5.1. Senzoricky aktivní látky a jejich význam v potravinách	33
5.1.1. Kontrola jakosti medu	35
5.1.2. Využití SPME/GC/FPD pro stanovení sirných látek v pivu	35
5.1.2.1. Sledované sirné látky v pivu	35
5.1.2.2. Optimalizace podmínek pro SPME	36
5.1.2.3. Podmínky pro GC	37
5.1.2.4. Vyhodnocení obsahu sirných látek ve vzorcích piva	37
5.1.3. Senzorická analýza vín typu Sauvignon	38
5.1.3.1. Optimalizace výsledky použité metody	38
5.2. Mykotoxiny v potravinách	39
5.2.1. SPME/HPLC/FD pro stanovení Ochratoxin A ve vzorku piva	41
5.2.2. SPME/HPLC/ESI-MS/MS metoda pro stanovení OTA	43
5.3. Rezidua pesticidů v jahodách	43
6. Závěr	44
Přehled použité literatury	45

Seznam použitých zkratk

BIN	Jehla se SPE fází
CW	Carbowax
CAR	Carboxen™
DI-SPME	Přímá mikroextrakce tuhou fází
DVB	Divinylbenzen
ETMP	3-ethyl-2-methoxypyrazín
FD	Fluorescenční detekce
FPD	Plamenová fotometrická detekce
GC	Plynová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie - hmotnostní spektrometrie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS-SPME	Mikroextrakce tuhou fází v prostoru nad vzorkem
IBMP	3-isobutyl-2-methoxypyrazín
IPMP	2-methoxy-3-isopropylpyrazín
LC	Kapalinová chromatografie
MP	Methoxypyrazíny
MS	Hmotnostní spektrometrie
MW	Molekulová hmotnost
OTA	Ochratoxin A
PA	Polyakrylát
PDMS	Polydimethylsiloxan
SPE	Extrakce tuhou fází
SPME	Mikroextrakce tuhou fází

1. Úvod

Tato bakalářská práce je zaměřena na mikroextrakční techniky založené na využití tuhých sorbetů a jejich uplatnění pro analýzu potravin. Mezi mikroextrakční metody patří mikroextrakce tuhou fází (SPME), mikroextrakce se sorbentem umístěným v mikrostřikačce (MEPS) a mikroextrakce na magnetickém míchadle (SBSE). V prvních třech částí jsou podrobně popsány principy jednotlivých zmíněných mikroextrakčních metod, které spočívají na sorpci analyzovaných látek z různých matric (potravin) na tuhou fázi. Jako tuhá fáze se u těchto mikroextrakčních metod používají polymerní látky jako jsou PDMS, CAR, DVB atd. Výběr tuhé fáze záleží jen na typu extrahované látky. Samotná desorpce a následná separace analytů ze vzorku se provádí nejčastěji chromatografickými metodami. Uplatnění jednotlivých mikroextrakčních metod pro analýzu potravin je demonstrováno na příkladech stanovení různých látek v určité potravíně. Některé látky a jejich stanovená koncentrace v dané potravíně může charakterizovat kvalitu, pravost původu (odhalit možné falšování), dodržení technologických procesů, kontaminaci mikroorganismy atd. Mikroextrakční metody využívající tuhých sorbentů mohou být právě vděčný nástroj pro kontrolu kvality potravin.

2. Mikroextrakce tuhou fází

2.1. Úvod do problematiky mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Microextraction, SPME) je jednoduchá a velmi účinná sorpčně-desorpční technika zakoncentrování analyzovaného vzorku (analytu), kde není zapotřebí přítomnosti rozpouštědla nebo sestavování komplikované aparatury. Cílem všech používaných metod pro přípravu vzorků před analýzou je získání analytu v dostatečném, detekovatelném množství, bez nežádoucích příměsí, což SPME splňuje. [1]

Tato technika byla vyvinuta v roce 1989 na pracovišti Univerzity ve Waterloo v Kanadském Ontariu skupinou analytiků pod vedením profesora Janusze Pawliszyna. [2] SPME se rozšířila do laboratoří po celém světě pro její rychlé a účinné použití při izolaci látek, zakoncentrování, stanovení organických sloučenin z přírodních vzorků, jako například potravin. [3] SPME se hodí jak pro kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu vzorků. [1]

Správnost a celkovou přesnost výsledků u SPME ovlivňuje celá řada faktorů (výběr vlákna, iontová síla, pH, míchání, velikost a druh molekul sorbované látky, teplota atd.). [4] U SPME se pro její linearitu v širokém koncentračním rozmezí obvykle používá kalibrační metoda. Při správném výběru vhodného typu vlákna lze dosáhnout reprodukovatelných výsledků i při nízkých koncentracích analytů. [1] SPME se dá použít v kombinaci s náplňovými i kapilárními kolonami v plynové chromatografii. Její použití má velký význam ve spojení GC-MS a split/splitless nebo pro přímý nástřik na kolonu. Kombinace s kapalinovou chromatografií se provádí za pomoci adapteru SPME-HPLC. Při jeho použití se analyt eluuje rozpouštědlem a je nesen na kolonu kapalinového chromatografu. [4]

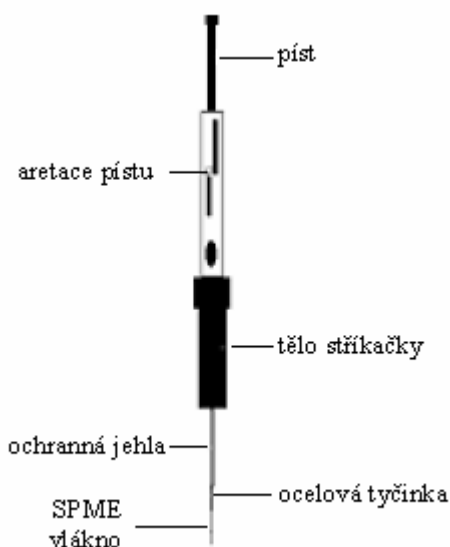
2.2. Princip metody SPME

Podstatou SPME je křemenné vlákno pokryté různými typy stacionární fáze, které se od sebe liší různou polaritou i sorpčními vlastnostmi. SPME vlákna mohou být používána opakovaně až cca 100 analýz v závislosti na typu aplikace a péči o vlákno. [5]

Při opakovaném použití se vlákno aktivuje zahřátím. Vlákna se dají koupit pouze od výrobců společnosti Supelco v baleních po třech kusech. [6] Sorbce analytů probíhá na zmíněném vlákne, dokud není dosažena rovnováha. [1] SPME se liší od klasických extrakčních metod tím, že analyt není extrahován ze vzorku v co největší koncentraci, ale jen do dosažení rovnovážného stavu. Z fyzikálně-chemického hlediska je rovnovážný stav u SPME metody závislý na koncentraci analytu ve vzorku a na druhu a tloušťce polymeru, který tvoří povrch křemenného vlákna. Množství sorbovaného analytu závisí rovněž na velikosti distribuční konstanty. Celkovou dobu, při které probíhá extrakce, určuje analyt s nejvyšší distribuční konstantou. Hodnota distribuční konstanty obecně roste s zvyšující se molekulovou hmotností a bodem varu analytu. [1]

2.3. Zařízení pro mikroextrakci tuhou fází

SPME zařízení (obr. 1) se skládají z držáku a jehly, ve které je uloženo křemenné vlákno. Při práci se SPME analytik jednou rukou drží tělo stříkačky a druhou pohybuje pístem dle potřeby. [4] Jehlu s požadovaným vláknem lze jednoduše vyměnit za jinou. SPME vlákno je z části uložené v ochranné jehle, na kterou nasedá okování a poté těsnící víčko s pružinou. Pro rozlišení se využívá barevné koncovky. [7]



Obrázek 1 – Popis SPME držáku [8]

2.3.1. Držák pro automatické vzorkování a HPLC analýzy

Tento držák je použitelný s autosamplery Varian 8100/8200, CombiPal CTC nebo pro adapter SPME-HPLC. Prostřednictvím tohoto adapteru dochází k eluci analytu rozpouštědlem a poté už následuje vlastní analýza na HPLC systému. [6]

2.3.2. Držák pro ruční vzorkování

Pozice vlákna pro vzorkování a správné umístění do vyhřívaného bloku nástřiku GC je nastavitelná. Vlákno lze zajistit v pozici, při které dochází k sorpci a desorpci a jednoduše zatáhnout zpět do jehly. [6]

2.3.3. Přenosný SPME držák pro vzorkování v terénu

Tento držák je určen pro práci v terénu a slouží jen pro jednorázové použití, protože vlákno uložené v ocelové jehle se u tohoto typu držáku nedá nahradit za nové. [6] Jednotlivé typy SPME držáků (obr. 2) jsou uspořádány sestupně:

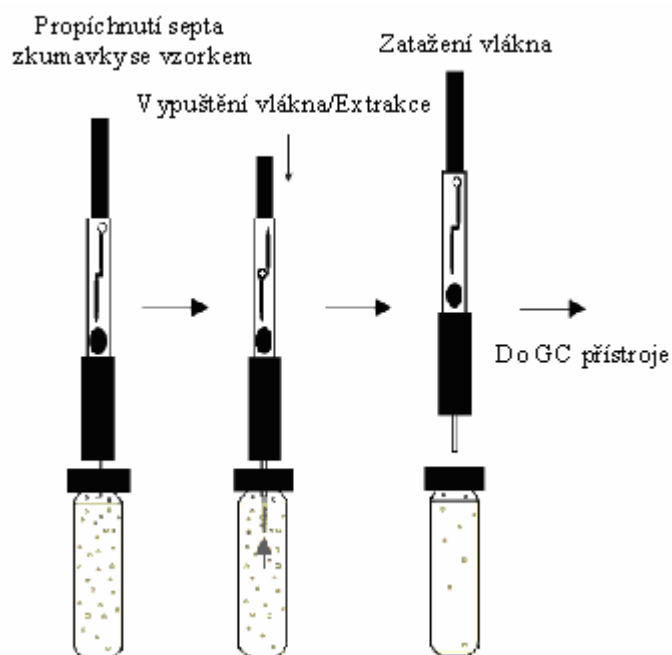


Obrázek 2 – Přehled používaných SPME držáků [4]

2.3.4. Postup při sorpci analytu

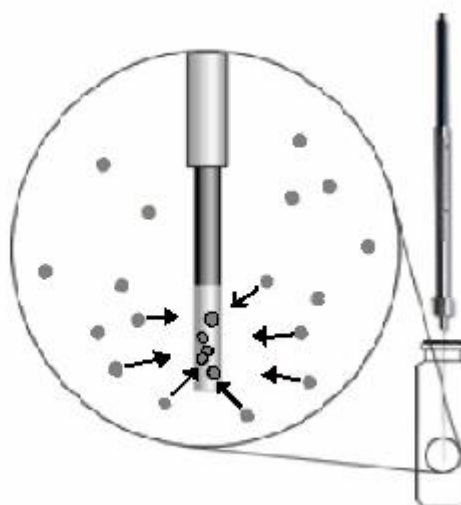
Křemenné vlákno potažené sorpční vrstvou je připojeno na ocelový píst a umístěno v duté ocelové jehle, která má ochrannou funkci před mechanickým poškozením vlákna. [9] Obr. 3 schématicky ukazuje postup při sorpci analytu, kdy ocelová jehla propíchne septum v zátce zkumavky. Pomocí pístu se vlákno dostane do vzorku (DI-SPME, direct immersing SPME) nebo jen nad hladinu vzorku, kde je koncentrace par zkoumaných látek největší (HS-SPME, head-space SPME). [4]

Analyt je sorbován do vrstvy pokrývající vlákno. Po dosažení sorpční rovnováhy je vlákno opět zasunuto do jehly a spolu s ní je vytaženo ze zkumavky se vzorkem. Při této fázi je velmi důležité určit délku extrakce (extrakční čas), ten je různý a závisí na mnoha faktorech (tloušťka sorpční vrstvy, úprava vzorku, poloha vlákna atd.). Extrakce většinou trvá 15-20 minut, ale může být samozřejmě kratší, někdy i v řádech desítek sekund. [4]



Obrázek 3 – Postup při vzorkování u SPME [8]

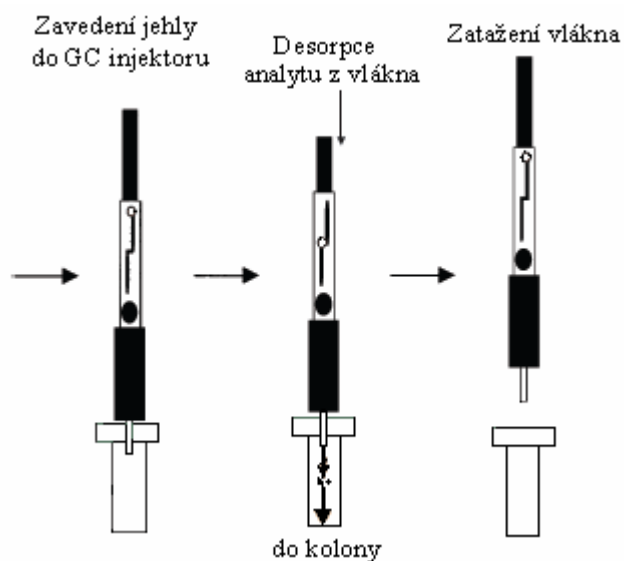
Extrakční čas je kratší s klesající molekulovou hmotností analyzovaných látek. Při vyšší koncentraci analytů a použití tenké vrstvy polymeru se extrakční čas významně zkracuje. [4]



Obrázek 4 – Absorpce analytu na vlákno [9]

2.3.5. Postup při desorpci analytu

Postup při desorpci analytu demonstruje obr. 5. Jehla je zavedena do nástřikového prostoru plynového chromatografu, kde může být analyt tepelně desorbován a unášen na GC kolonu nebo použitím SPME-HPLC adapteru je analyt eluován rozpouštědlem a je dále nesen na kolonu kapalinového chromatografu. [4]

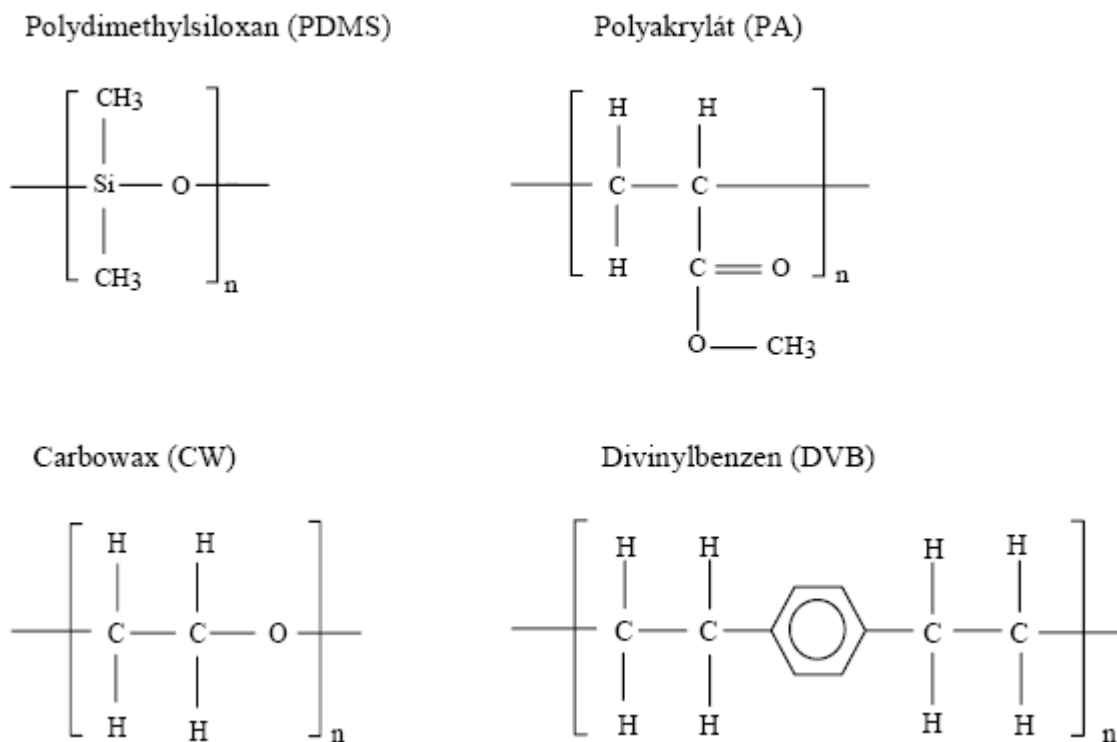


Obrázek 5 – Desorpce analytu z SPME vlákna [8]

2.4. Faktory ovlivňující extrakci u SPME

2.4.1. Výběr SPME vlákna

Selektivitu ovlivňuje správná volba polymeru, který pokrývá vlákno. Přehled polymerů (stacionárních fází) a jejich použití je uvedeno v tabulce 1. Velikost (tloušťka) vrstvy polymeru také ovlivňuje selektivitu a závisí na tom, jaké látky lze stanovit. Obecně platí, že těkavé látky vyžadují silnější vrstvu polymeru a pro méně těkavé látky se používají obvykle polymery s tenčí vrstvou. [10] Chemické vzorce některých polymerních látek, které mohou pokrývat křemenné vlákno, jsou uvedeny na obr. 6.



Obrázek 6 – Chemické vzorce polymerních látek, které pokrývají křemenné vlákno [11]

Fáze nevázané na křemenné vlákno jsou obvykle stabilnější v organických rozpouštědlech mísitelných z vodou, ve kterých mohou slabě bobtnat. Nesmí být nikdy čištěny nepolárními organickými rozpouštědly. Pevně vázané fáze jsou stabilní ve všech organických rozpouštědlech. V některých nepolárních rozpouštědlech mohou slabě bobtnat. [10] Při objednání SPME vláken by měl vždy zákazník obdržet podrobnosti o kompatibilitě vláken a rozpouštědel. [11] Chlorovaná rozpouštědla mohou rozpouštět epoxidová lepidla, která se používají k lepení vláken. U vláken pokrytých PDMS/DVB vrstvou může dojít až k úplnému stažení stacionární fáze. [12]

Tabulka 1-Přehled komerčně dostupných SPME vláken [13]

Pokrytí	Tl. vlákna (ga)	Materiál	Pro manuální držák (k.č. 57330-U)	Pro automatický nebo HPLC držák (k.č. 57331)	Použití
Pro plyny a nízkomolekulární látky (MW 30-225) Carboxen / polydimethylsiloxan (CAR) PDMS					
75 µm	24	Fused silica	57318	57319	GC
75 µm	23	Fused silica	57344-U	57343-U	GC
85 µm	24	StableFlex	57334-U	57335-U	GC
85 µm	23	StableFlex	-	57295-U	GC
85 µm	23	Metal Alloy	-	57906-U	GC
Pro těkavé látky (MW 60-275) 100 µm Polydimethylsiloxan (PDMS)					
100 µm	24	Fused silica	57300-U	57301	GC/HPLC
100 µm	23	Fused silica	57342-U	57341-U	GC/HPLC
100 µm	23	Metal alloy	-	57928-U	GC/HPLC
Pro nepolární středně těkavé látky (MW 80-500) 30 µm polydimethylsiloxan (PDMS)					
30 µm	24	Fused silica	57308	57309	GC/HPLC
30 µm	23	Fused silica	-	57289-U	GC/HPLC
30 µm	23	Metal alloy	-	57922-U	GC/HPLC
Pro nepolární vysokomolekulární látky (MW 125-600) 7 µm polydimethylsiloxan (PDMS)					
7 µm	24	Fused silica	57302	57303	GC/HPLC
7 µm	23	Fused silica	-	57291-U	GC/HPLC
7 µm	23	Metal alloy	-	57919-U	GC/HPLC
Pro těkavé látky, aminy, nitroaromáty (MW 50-300) 65 µm polydimethylsiloxan / divinylbenzen (PDMS/DVB)					
65 µm	24	Fused silica	57310-U	57311-U	GC
65 µm	23	Fused silica	57346-U	57345-U	GC
65 µm	24	StableFlex	57326-U	57327-U	GC
65 µm	23	StableFlex	-	57293-U	GC
65 µm	23	Metal alloy	-	57902-U	GC
Pro aminy a polární látky 60µm polydimethylsiloxan / divinylbenzen (PDMS/DVB)					
60 µm	24	StableFlex 1cm	-	57317	HPLC
Pro polární středně těkavé látky (MW 80-500) 85 µm Polyakrylát (PA)					
85 µm	24	Fused silica	57304	57305	GC/HPLC
85 µm	23	Fused silica	-	57294	GC/HPLC
Pro chuťové látky (těkavé a středně těkavé) C3-C20 (MW 40-275) 50/30µm Divinylbenzen / Carboxen / Polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS)					
50/30 µm	24	StableFlex 1cm	57328-U	57329-U	GC
50/30 µm	23	Metal alloy 2cm	-	57914-U	GC
50/30 µm	23	Metal alloy 1cm	-	57912-U	GC
Pro vonné látky (MW 40-275) 50/30µm Divinylbenzen / Carboxen / Polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS)					
50/30 µm	24	StableFlex 2cm	57348-U	57348-U	GC
50/30 µm	23	StableFlex 2cm	57299-U	57299-U	GC
50/30 µm	23	StableFlex 1cm	-	57298-U	GC
Pro alkoholy a polární látky (MW 40-275) Carbowax-Polyethylen Glykol (PEG), (MW 40-275) (CW/PEG)					
60 µm	23	Metal alloy	57355-U	57354-U	GC
60 µm	23	Metal alloy	-	-	GC
Pro povrchově aktivní látky 50µm Carbowax v syntetické pryskyřici (CW/TPR)					
50 µm	24	StableFlex 1cm	-	57315	HPLC

2.4.1.1. Absorpce

U SPME je analyt rozdělen mezi maticí vzorku, který může být ve všech třech skupenstvích, a vláknem, jehož povrch může mít charakter kapalné nebo tuhé fáze. Nikdy nedochází k úplné extrakci analytu z matrice, ale jen do ustálení rovnováhy. Pro dvoufázové systémy (tuhá fáze – plyn) nebo (tuhá fáze - kapalina) je množství analytu absorbované při extrakci v kapalné vrstvě vyjádřeno pomocí rovnice (1):

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (1)$$

Kde nmnožství absorbovaného analytu při extrakci

V_fobjem vrstvy stacionární fáze na povrchu vlákna

V_sobjem vzorku

C_0počáteční koncentrace analytu ve vzorku

K_{fs}rozdělovací koeficient pro analyt mezi polymerem a vzorkem

Při osamostatnění počáteční koncentrace analytu ve vzorku (C_0), tím pádem lze ostatní veličiny vnímat v rovnici jako konstanty. Lze tak získat lineární závislost mezi C_0 a množstvím analytu. Cílem všech vláken je mít co největší rozdělovací koeficient (K_{fs}), ten zaručuje vysokou sorpční schopnost. Při nedostatečně velkém K_{fs} se SPME stává rovnovážnou metodou. Je-li objem vzorku (V_s) dostatečně velký, nemá žádný vliv na množství extrahovaného analytu. [1] Této vlastnosti se velmi často využívá při odběrech v přírodě (např. jezera, řeky atd.). [4] V případě, kdy K_{fs} má malou nebo V_s velikou hodnotu, tedy nastává tato podmínka ($K_{fs} \cdot V_f \ll V_s$), dostává rovnice jednoduchý tvar (2):

$$n = K_{fs} \cdot V_f \cdot C_0 \quad (2)$$

Je-li K_{fs} velké, a pokud platí podmínka ($K_{fs} \cdot V_f \gg V_s$), dostává rovnice (1) tvar (3):

$$n = V_s \cdot C_0 \quad (3)$$

Tyto rovnice platí pro ID-SPME (přímá SPME), pro Head-Space SPME se používá níže uvedená rovnice (3):

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot C_0 \cdot V_s}{K_{fs} \cdot V_f + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad (4)$$

2.4.1.2. Adsorpce

Podle sorpčního mechanismu (obr. 7) můžeme vlákna rozdělit na absorbenty (homogenní čisté polymery) a adsorbenty (porézní částice suspendované v polymeru). [10] Adsorpce probíhá pomocí porézních částic suspendovaných v polymeru (DVB, CARTM atd.) V případě čistých homogenních polymerů hovoříme o absorpci. Mezi adsorpční vlákna patří například Carboxen-polydimethylsiloxan (CAR-PDMS), Polydimethylsiloxan-divinylbenzen (PDMS-DVB), Divinylbenzen-Carboxen-Polydimethylsiloxan (DVB-CAR-PDMS). [10]

Schéma počátku sorpce [7]

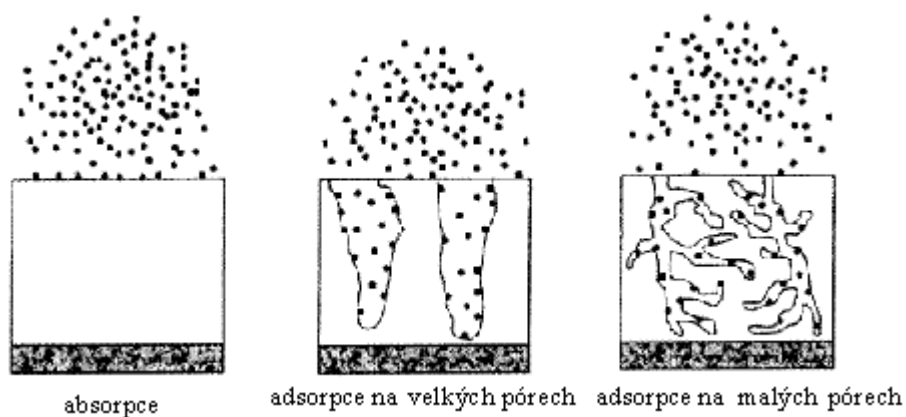
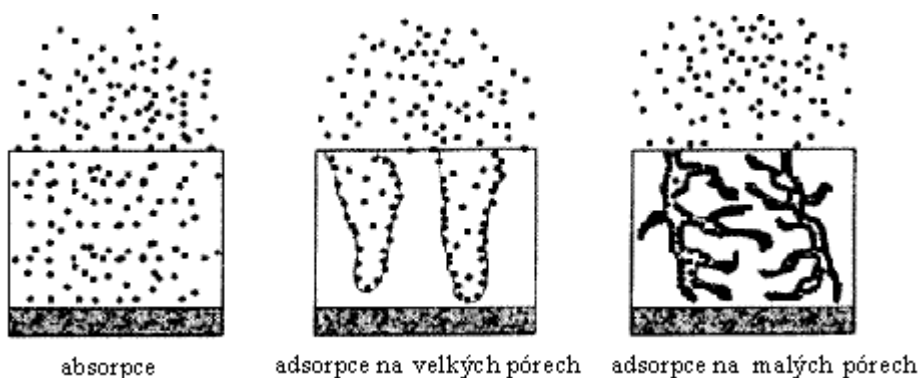


Schéma rovnovážného stavu sorpce [7]

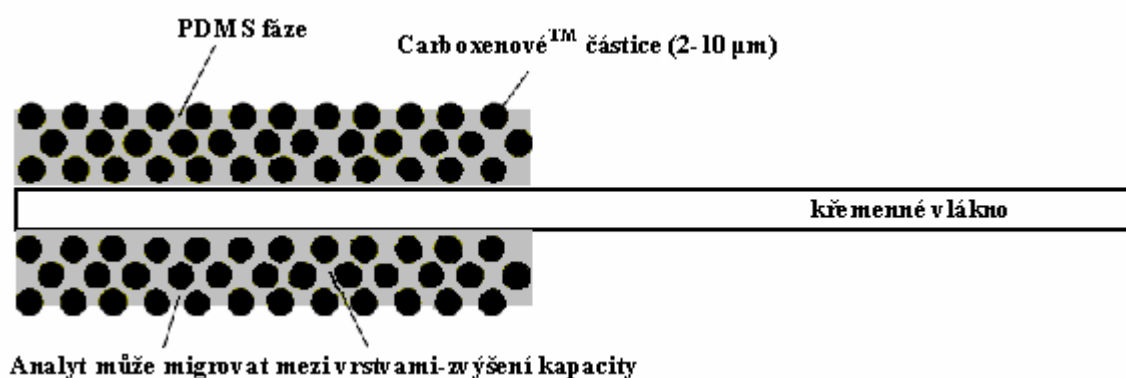


Obrázek 7 – Typy sorpce při SPME [5]

Experimentálně bylo zjištěno, že s rostoucí porózitou částic roste celková kapacita vlákn, schopnost vrstvy zadržovat analyty a celková selektivita vlákn. [12] Je-li koncentrace analytu ve vzorku mnohem větší než u rovnovážného stavu nebo afinita k sorpční vrstvě velmi malá, lze pozorovat lineární závislost mezi počáteční koncentrací a extrahovaným množstvím. [10]

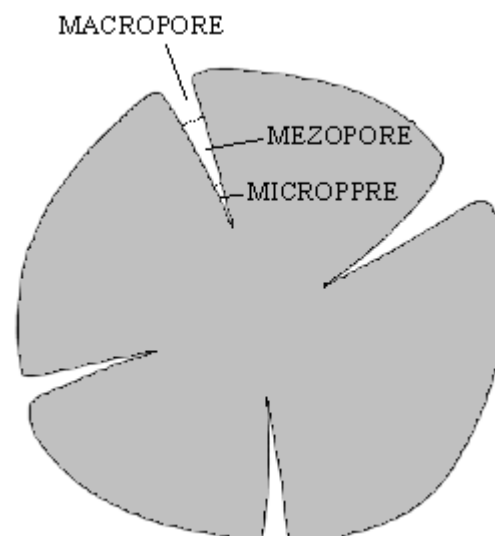
Pro větší kapacitu a celkovou účinnost SPME byla vyvinuta v devadesátých letech minulého století křemenná vlákna potažená několikanásobnou vrstvou CARTM částic v PDMS (obr. 8). Tvar pórů v uhlíkových částicích také výrazně ovlivňuje sorpční a desorpční aktivitu. [10]

Takto konstruovaná vlákna jsou vhodná pro extrakci molekul s uhlíkovým řetězcem v rozsahu C₂ – C₁₂. Pro větší molekuly, tím je myšleno C > 12, se uvedené vlákno nedoporučuje, protože tyto molekuly jsou silně zachyceny a jejich desorpce se stává obtížnou. [10]



Obrázek 8 – Carboxen/PDMS vlákno [11]

CARTM není nic jiného než porézní syntetický materiál, který se připravuje tak, aby byly rovnoměrně zastoupeny póry všech velikostí. Částice bývají syntetizovány ve velikosti od 2 do 10 μm. Velikost makropórů je > 500 Å, mezopórů 20 – 500 Å a mikropórů < 20 Å. [11]



Obrázek 9 - Částice CARTM [11]

2.4.2. Způsob vzorkování

Jak už bylo zmíněno v kapitole 2.3.4., existují dva typy vzorkování: [11]

- DI-SPME (Direct Immersing SPME) je přímé ponoření vlákna do vzorku [1]
- HS-SPME. (Head Space SPME) je extrakce z prostoru nad vzorkem v uzavřené nádobě [1]

DI-SPME se používá především pro látky v kapalném skupenství a u některých tuhých látek. V potravinářství mohou matrice obsahovat makromolekulární látky, jako jsou například proteiny, které mohou ovlivňovat průběh SPME, je tedy zapotřebí jejich odstranění pomocí filtrace, odstředění atd. [1]

HS-SPME se používá pro extrakci těkavých látek. Ustálení rovnováhy mezi vláknem a analytem v plynném stavu je rychlejší než u DI-SPME, protože molekuly analytu se rychleji pohybují v plynu než v ostatních skupenstvích. [1]

2.4.3. Míchání vzorku

Mezi další významné faktory ovlivňující SPME patří míchání vzorku, které zlepšuje a zkracuje extrakci u molekul s vyšší molekulovou hmotností a s vysokým difusním koeficientem. Občasné (proměnlivé) míchání se neprovádí kvůli zhoršené přesnosti stanovení. Míchání pomocí ultrazvuku zvyšuje sorpci analytu, ale také vede k zahřívání vzorku a možnému odpaření vzorku do prostoru headspace. [10]

2.4.4. Přídavek soli a změna pH

Přídavek 20-30 % roztoku chloridu sodného (NaCl) nebo úprava pH vzorku má za následek zvýšení iontové síly roztoku a tím se sníží požadovaná rozpustnost analytů. [4] Pomocí přidání soli se u nízko polárních těkavých látek zvýší výtěžek extrakce. Pro vysoce polární látky se přídavek soli nepoužívá kvůli vzniku interferujících píků. [10]

2.4.5. Extrakční čas

Čas je u SPME kritický parametr. SPME má maximální účinnost v rovnovážném stavu, ale pro stanovení není dosažení úplné rovnováhy nezbytně nutné. Extrakce obvykle trvá 15-20 minut, ale může být samozřejmě kratší, někdy až pouhých 30 sekund. U HS-SPME extrakce je extrakční čas obvykle kratší než DI-SPME. [4]

Čas extrakce závisí na několika faktorech:[4]

- velikost molekuly dané sloučeniny
- typ SPME fáze, která pokrývá křemenné vlákno
- způsob extrakce stanovovaného analytu ze vzorku
- koncentrace analytu ve vzorku

Celkovou dobu extrakce lze několikanásobně zkrátit, pokud se: [4]

- analyzují sloučeniny malé molekulové hmotnosti ($< 150 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- použije tenká sorpční vrstva pokrývající SPME vlákno
- pracuje s HS-SPME technikou
- využívá práce s vysokou koncentrací analytů ve vzorku

2.4.6. Teplota mikroextrakce

Teplota vzorku je kritickým parametrem pro přesnou kvantifikaci vzorku. Musí se vždy použít konstantní teplota pro všechny extrakce. Využití teploty během headspace extrakce pomůže k uvolnění analytu ze vzorku a ke zlepšení citlivosti a zkrácení celkové doby potřebné pro extrakci. Při vysoké teplotě může docházet k uvolnění analytů z SPME fáze a tím dojde ke snížení celkové citlivosti. To platí zejména při použití kapalné fáze a absorpčního typu vlákna, jako je PDMS. Ty většinou nevyžadují při extrakci zvýšení teploty a vše se provádí za laboratorních podmínek. Pro některé aplikace s těkavými nebo vysoce těkavými sloučeninami i malé zvýšení teploty může významně zkrátit čas potřebný na extrakci vzorku. [4]

3. Mikroextrakce se sorbentem umístěným v mikrostríkačce

3.1. Princip MEPS

Mikroextrakce se sorbentem umístěným v mikrostríkačce (Microextraction by Packed Sorbent, MEPS) představuje nový vývoj v oblasti přípravy vzorků a manipulace s nimi. MEPS vznikl vlastně miniaturizací konvenční SPE (Solid Phase Extraction), která se používá pro objemy v mililitrech zatímco MEPS v mikrolitrech. [14] Princip této metody spočívá v extrakci (sorpci) zkoumané látky na sorbent (stacionární fáze), který se nachází celý v injekční stríkačce v podobě „patrony“. U MEPS se aplikují podobné fáze jako u SPE. [14]

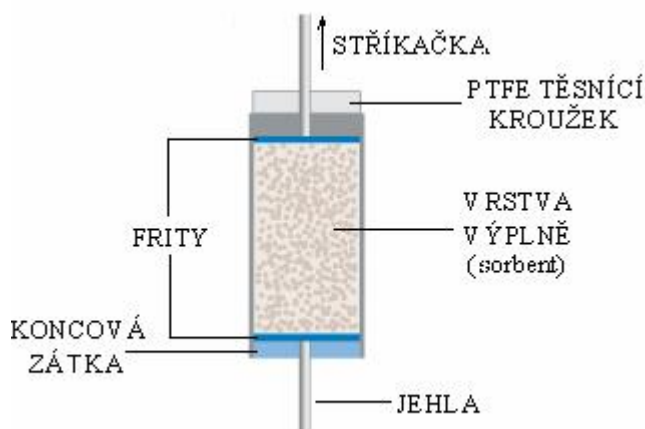
MEPS se skládá ze dvou částí, stríkačky MEPS („MEPS Syringe“) a jehly s BIN („Barrel Insert and Needle Assembly“). BIN (obr. 10) není nic jiného než ocelová jehla s malou patronou, která obsahuje různé SPE fáze - C18, C8, C8/SCX, C2 atd. BIN se používá s plynotěsnou injekční stríkačkou s objemem 100 μ l nebo 250 μ l, která umožňuje dávkování kapalin za běžných podmínek SPE. [15] Je-li BIN vypotřebována nebo je požadována jiná fáze, lze ji snadno vyměnit odšroubováním pojistné matice. Každá BIN jehla má své samostatné označení. MEPS plní stejné funkce jako SPE - odstranění rušivých komponent a zakoncentrování sledovaných sloučenin z matrice. Umožňuje selektivní izolaci a měření koncentrace analytů.

MEPS zvyšuje výhody konvenční SPE. [14] MEPS se spojením s GC nebo HPLC systémy poskytuje dobré výsledky v některých parametrech zdaleka převyšující výhody SPE, a to zejména: [15]

- Významně snižuje čas potřebný na přípravu vzorků.
- Může být kombinována s HPLC nebo GC a plně automatizována - jednotlivé kroky jsou prováděny on-line pomocí stejné stríkačky.
- Významně snižuje objem rozpouštědla a zvyšuje schopnost pracovat se vzorky velmi malého objemu, a to v řádech mikrolitrů oproti mnoha mililitrům pro SPE.

3.2. Výhody MEPS

- Čas na přípravu vzorku lze zkrátit z hodin na minuty.
- Odstraní se veškeré další kroky (filtrace, precipitace aj.) pro přípravu vzorků.
- MEPS pracuje s menším objemem vzorku než klasická SPE.
- MEPS lze plně automatizovat.
- Zpracování vzorku, extrakce a nástřik jsou zajištěny stejnou stříkačkou.
- MEPS lze aplikovat ve spojení s GC i LC.



Obrázek 10 – Schéma MEPS BIN v injekční stříkačce [15]

3.2.1. Citlivost a velikost vzorků

Větší vzorky (přibližující se k objemu 1 ml) lze zpracovávat nebo zakoncentrovávat odebráním alikvotních podílů 100 μ l nebo 250 μ l. Většinou se pracuje se vzorky, které mají velmi malý objem, někdy pouze v násobcích 10 μ l. [15]

3.2.2. Automatizace

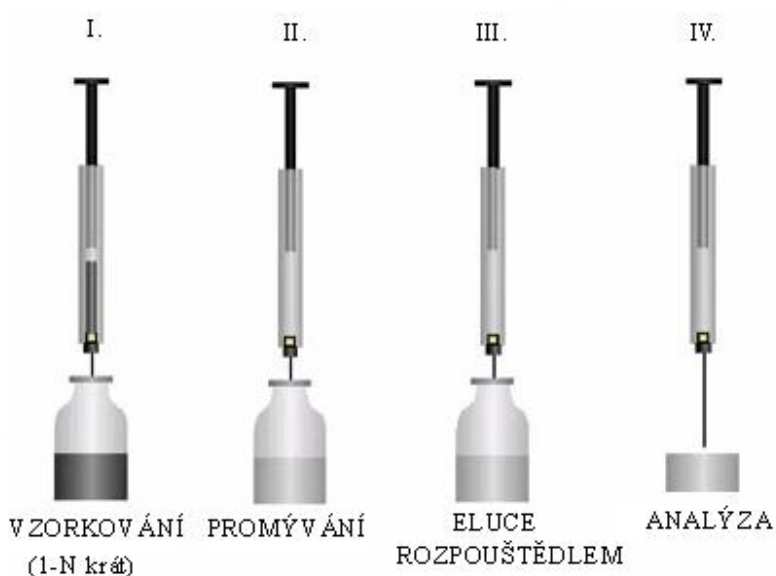
Možnost provedení „on-line“ pomocí jednoho zařízení zkracuje potřebnou dobu na zpracování vzorku a eliminuje nutnost častého zásahu analytika. Typická životnost jehly BIN je 40 až 100 vzorků (konzervativní odhad), ale ta samozřejmě závisí na konkrétním typu vzorku. Malé množství MEPS fáze v jehle BIN lze snadno a účinně promývat mezi jednotlivými vzorky, což snižuje riziko vzájemné kontaminace mezi vzorky. Toto je u MEPS mnohem jednodušší ve srovnání s konvenční SPE. [15]

3.2.3. Flexibilita a jednoduché použití

Jehly BIN se dodávají (komerčně dostupné) s různými SPE fázemi. [17] Rozměry místa uložení sorbentu zajišťují, že separační schopnost sorbentu se stává totožnou s konvenční SPE. [14] Příprava vzorků z komplexních biologických matric je pomocí MEPS jednoduchá a snižuje nároky na objem vzorku a používaných rozpouštědel ve srovnání se SPE nebo jinými „mikroextrakčními technikami“. MEPS využívá separaci pomocí reverzní fáze, normální fáze, směšného módu a iontové výměny. Jelikož MEPS umožňuje práci s malými objemy (několika μl), je vhodnou technikou pro přímé propojení s LC-MS systémy. Současný rozsah stříkaček umožňuje ruční použití nebo využití automatických dávkovačů Thermo Scientific, CTC Analytics, HTA 300APlus a Varian 8400 bez nutnosti jejich úpravy. Jehly BIN existují v provedení pro LC a GC aplikace. Jehly bývají baleny v utěsněných fóliích po 5 kusech. [15]

3.3. Postup při práci s MEPS

- Čerpaní vzorku prostřednictvím MEPS BIN. (Jeden nebo více analytů ze vzorku mohou být sorbovány).
- Promytím MEPS BIN 20 μl pracovního roztoku dojde k odstranění interferencí.
- Eluce analytu do rozpouštědla.
- Vstříknutí analytu do nástřikového prostoru analytického systému. [14]



Obrázek 11 – Jednotlivé kroky při práci s MEPS [14]

Jako promývací a eluční roztoky bývají používána různá rozpouštědla, jako např. voda, směsi vody a organických rozpouštědel (například methanol, acetonitril atd.) nebo jiná organická rozpouštědla. Vždy záleží na druhu vzorku a v jaké matici se nachází. Objem, kterým se provádí promývání, odpovídá velikosti 50 μl . Účinky promývání až do požadovaného stavu systému jsou různé, protože se rozpouštědla ředí v různém poměru, vždy dle potřeby analytika. Objem elučního roztoku bývá obvykle 20 μl . [14]

3.4. Kompatibilní systémy pro MEPS

Za kompatibilní systémy (tab. 2) se považují ty, které mohou některé jehly s BIN MEPS plně používat, a to buď za přítomnosti analytika nebo plně automatizovány za pomoci dávkovačů. Jehly s potřebnými fázemi o dané velikosti jsou komerčně dostupné. Rozměry lože sorbentu zajišťují, že separační schopnost sorbentu je identická s konvenční SPE, a proto se výborně aplikují na GC (Gas chromatography) a LC (Liquid chromatography), kam patří i HPLC (High-performance liquid chromatography), samozřejmě záleží na správném výběru jehly s BIN a na druhu stanovované látky. [15]

Na obr. 12 je MEPS C18-BINS, Thermo/CTC 23GA. Tato sada je balena po 5 kusech a určena pro GC aplikace: jehla má rozměry 23 gauge, vnější průměr 0,63 mm „cone point style“ a základní silikagel má střední velikost částic 45 μm , velikost pórů 60 Å. Označení Thermo/CTC znamená, že je jehla BIN použitelná s automatickými dávkovači Thermo Scientific, HTA 300A Plus, Varian 8400 a 100 μl CTC Analytics. Označení CTC znamená, že jehla BIN se hodí pouze pro automatické dávkovače CTC Analytics. [16]



Obrázek 12 – MEPS C18-BINS, Thermo/CTC 23GA [16]

Výška MEPS stříkačky (MEPS Syringe – obr. 13) je variabilní a záleží na výrobci. Rychlost vstřikování se pohybuje v intervalu 0,1 – 100 μ l/s. [17]



Obrázek 13 – MEPS Syringe [17]

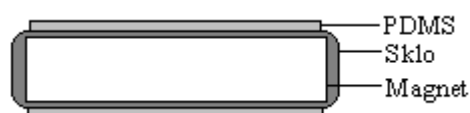
Tabulka 2 – Přehled použitelných HPLC a GC systémů pro MEPS BIN [16]

Objem stříkačky (MEPS)	100 a 250 μ l	Objem stříkačky (MEPS)	100 a 250 μ l
HPLC Kompatibilita	HPLC podporované systémy	GC Kompatibilita:	GC podporované systémy
Veškeré HPLC systémy se dají použít, zde jsou uvedeny některé z nich.	Automated LC200 Series	*Jen pokud je specifikováno při objednávání GC.	Dani Master GC
	Manual LC200 Series		Shimadzu GC-14A/B/C (GC-17A)
	CHANCE isocratic Smartline 6600		Shimadzu GC-2010 (2014; QP-2010)
	HP 1100 Series HPLC System		Agilent/HP (5890, 6850A, 4890, 6890)
	YL 9100 HPLC Systém		Varian 3800 (3300/3400, 430/450)
	Shimadzu SIL-HT HPLC Dual Gradient System		SRI 8610*
	Hitachi High Technologies America LaChrom Elite HPLC		Carlo Erba (5300 Mega, 8000, 8000 Tops)
	Shimadzu Multiplexed HPLC System		Chrompack CP9001/2
	Shimadzu LC-2010HT Liquid Chromatograph		Trace SX

4. Extrakce na magnetickém míchadle

4.1. Princip extrakce na magnetickém míchadle

Extrakce na magnetickém míchadle (Stir bar sorptive extraction, SBSE) také patří mezi mikroextrakční metody. [19] Tato metoda probíhá výhradně na PDMS (polydimethylsiloxan) fázi, která rovnoměrně pokrývá skleněný obal, ve kterém je uloženo magnetické míchadlo. Mikroextrakci na magnetickém míchadle (obr. 13) vyvinuli Baltussen a kol. v roce 1999. [20] SBSE je vhodná pro extrakci vodných roztoků s vysokou citlivostí v kombinaci s jednoduchostí SPME. SBSE slouží k izolaci látek z matric a zakoncentrování analytu ze vzorku a vše bez přítomnosti organického rozpouštědla. [21]



Obrázek 13- Schéma zařízení pro SBSE [20]

Přednosti PDMS jako sorpčního média:

- analyty nejsou sorbovány na aktivní povrch
- nedochází k degradaci nestabilních analytů, případně jen nepatrné
- absorpce je mnohem slabší než adsorpce
- slabé interakce mezi PDMS vrstvou a molekulami analytů mají za následek desorpci látek i při nízkých teplotách, nedochází k rozkladu termolabilních látek
- sorpční kapacita PDMS závisí pouze na rovnováze mezi polymerní fází a vzorkem
- možná degradace PDMS vrstvy neovlivňuje výsledky měření, protože při degradaci PDMS vnikají silikonové fragmenty, které se dají snadno rozlišit a tím pádem nemohou nijak ovlivnit kvantitativní analýzu

Vlastní extrakce začíná v momentě vložení míchadla (extraktantu) do analyzovaného vzorku a následného zapnutí míchání. [21] Doba, po kterou probíhá extrakce, se pohybuje v rozmezí mezi 30 až 60 minutami [20], ale některá literatura uvádí až 4 hodiny. [22]. Délka míchadla se pohybuje v rozměrech 10, 20 a 40 mm. [20] Objem potažené PDMS fáze je 55 a 219 μl . [20]

Jaký typ míchadla se použije závisí čistě na objemu vzorku. [21] Pro vzorky o objemu 1 až 50 ml se používá míchadlo o délce 10 mm, pro vzorky s objemem 100 až 250 ml se vkládá míchadlo s délkou 40 mm. [20] Míchadla jsou komerčně dostupná pod označením TWISTER (obr. 14) a dodávána firmou Gerstel sídlící v Německu. [23].



Obrázek 14 – TWISTER [23]

4.1.1. SBSE ve spojení s GC

Po dokončení extrakce je Twister zaveden do tepelné desorpční jednotky TDU (Thermal Desorption Unit) nebo do tepelného desorpčního systému TDS (Thermal Desorption System). Oba systémy jsou přímo napojeny na GC. To znamená, že po termální desorpci analytu z Twisteru je sledovaná látka unášena nosným plynem na kolonu plynového chromatogramu.

4.1.2. SBSE ve spojení s HPLC

V případě, kdy se požaduje stanovení málo těkavých nebo tepelně labilních sloučenin, mohou být tyto látky extrahovány pomocí Twister s TBE (Twister Back Extraction) a následně analyzovány LC nebo LC-MS. [24] Desorpce stanovovaných látek se provádí pomocí elučních činidel (rozpouštědla). Aplikovatelnost jednotlivých rozpouštědel závisí jen na vlastnostech stanovované látky.

Výhody extrakce na magnetickém míchadle:

- až 1000 krát nižší detekční limity než u SPME
- kvantitativní analýza má velký lineární rozsah
- některé stanovované látky (analyty) mohou být extrahovány zároveň
- vyžaduje minimální čas a obsluhu analytika
- tepelná desorpce a GC-MS analýzy jsou prováděny automaticky

4.2. Teoretické základy SBSE

Možnost zvýšení množství stacionární fáze u extrakce na magnetickém míchadle vysvětluje vysoký faktor obohacení a vysokou citlivost ve srovnání se SPME. Z teoretického hlediska je SBSE popisována podobně jako SPME.

Za předpokladu, že rozdělovací koeficienty PDMS / voda a ($K_{PDMS/W}$) jsou přibližně proporcionální k rozdělovacím koeficientům oktanol / voda v oblasti koeficientů ($K_{O/W}$) lze použít následující rovnice (5):

$$K_{O/W} \approx K_{PDMS/W} = \frac{C_{SBSE}}{C_W} = \frac{m_{SBSE}}{m_W} \times \frac{V_W}{V_{SBSE}} \quad (5)$$

Kde C_{SBSE} a C_W je koncentrace analytu v PDMS a vodné fázi, m_{SBSE} a m_W jsou hmotnosti analytu v PDMS a ve vodní fázi, V_{SBSE} a V_W jsou objemy PDMS a vodné fáze. Náhradou poměru V_W/V_{SBSE} fází za β , může rovnice (5) mít tento písemný tvar (6):

$$\frac{K_{O/W}}{\beta} = \frac{m_{SBSE}}{m_W} = \frac{m_{SBSE}}{m_0 - m_{SBSE}} \quad (6)$$

Kde m_0 je celková hmotnost analytu původně přítomného ve vzorku vody. Rovnice (6) pak může být znovu uspořádána tak, aby mohla být stanovena účinnost extrakce (7):

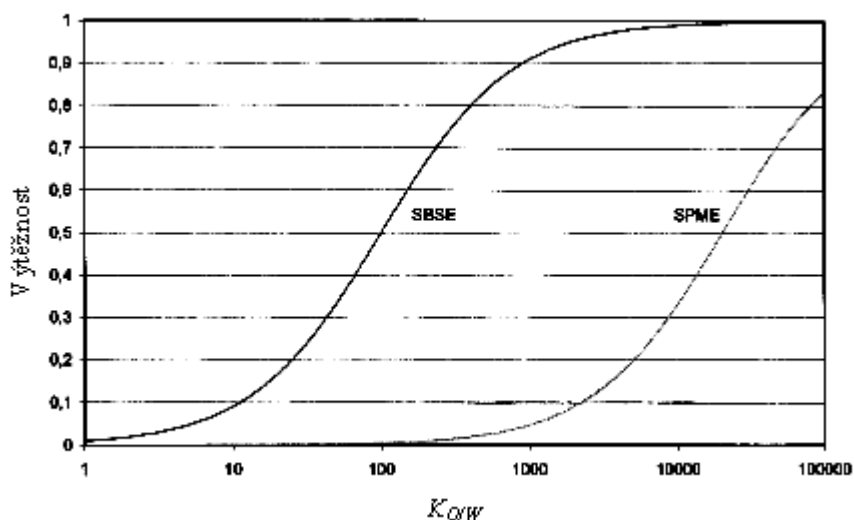
$$\frac{m_{SBSE}}{m_0} = \frac{\left(\frac{K_{O/W}}{\beta}\right)}{1 + \left(\frac{K_{O/W}}{\beta}\right)} \quad (7)$$

Z rovnice (7) je zřejmé, že proměnné, které určují výtěžnost analytu ze vzorku, jsou rozdělovací koeficient ($K_{O/W}$) a poměr fází (β), implicitně, když nastane $K_{O/W} / \beta = 1$, bude výtěžnost 50 %. Pro nízké hodnoty $K_{O/W} / \beta$ je využití přibližně úměrné $K_{O/W} / \beta$, zatímco u $K_{O/W} / \beta$ hodnoty vyšší než 5 se výtěžnost prakticky stává kvantitativní, jak je to vyobrazeno na obr. 15. [20]

4.3. Porovnání výtěžnosti SBSE a SPME

Srovnání SBSE a SPME metod na teoretické úrovni je uvedeno na obr. 15, který znázorňuje výtěžnost jednotlivých metod v závislosti na rozdělovacím koeficientu $K_{O/W}$ (oktanol-voda). U SPME bylo použito křemenné vlákno s objemem 0,5 μ l PDMS fáze a u zařízení pro SBSE (míchadlo) byl objem 100 μ l PDMS fáze.

Stanovovaný objem vzorku odpovídal velikosti 10 ml. Při použití SPME byla výtěžnost vždy vyšší než 50 % pro látky s hodnotou $K_{O/W} > 10000$, zatímco u SBSE je ta samá výtěžnost i pro látky, jejichž $K_{O/W} > 100$. Kdyby stanovované látky měly $K_{O/W} > 10000$, předpokládá se při SBSE téměř 100 % výtěžnost. [20]



Obrázek 15 – Výtěžnost analytů u SBSE a SPME z 10 ml vzorku vody v závislosti na jejich rozdělovacím koeficientu oktanol – voda ($K_{O/W}$). Objem PDMS vlákna: 0,5 μ l; objem PDMS na SBSE míchadle je 100 μ l [20]

5. Přínos mikroextrakčních metod pro analýzu potravin

Tato část bakalářské práce je zaměřena na využití mikroextrakčních metod jakožto nástroje pro získávání stanovovaných látek z různých matric, konkrétně potravin. Pomocí mikroextrakčních metod s kombinací GC, popřípadě s HPLC, se dají snadno stanovit senzorické látky v potravinách, mykotoxiny, pesticidy a spousta dalších významných látek, které buď mají pozitivní nebo negativní význam v potravinách.

5.1. Senzoricky aktivní látky a jejich význam v potravinách

Senzorické látky jsou organické sloučeniny, mohou to být různé deriváty uhlovodíků, jak alkoholy (fenolické látky), či aldehydy, ketony, estery, aminy, heterocyklické látky a mnoho dalších, které charakterizují danou potravinu svojí vůní a chutí.[25] Tyto látky mohou být ukazateli zralosti dané potraviny (ovoce, zelenina a jiné zemědělské plodiny), pravosti původu (med, víno), nesprávně dodržené technologie při výrobě potravin, začínající kazivosti potravin nebo se mohou využívat v potravinářském průmyslu jako additiva, která se uměle přidávají například do nápojů s cílem zlepšit jejich senzorické vlastnosti. Některé aromatické látky (myšleno senzoricky aktivní – vydávající aroma - vůni) jsou přehledně vypsány v následující tabulce 3.

Senzoricky aktivní látky se dají izolovat z potravin pomocí SPME, MEPS i SBSE a následně provést kvalitativní i kvantitativní analýza pomocí GC. [1] Pomocí SBSE se dají stanovit i velmi nízké koncentrace těchto látek. [20] Mezi senzoricky aktivní látky patří například bioflavonoidy, tj. látky vyskytující se v rostlinách (byliny, zelený čaj, šípek, lékořice atd.) a v jejich plodech (ostružiny, maliny, borůvky atd). Bioflavonoidy jsou heterocyklické sloučeniny (odvozené od pyranu) s navázaným benzenovým jádrem přes uhlíkový řetězec. Tyto látky mají významné antioxidační vlastnosti a pomáhají lidskému organismu lépe odbourávat volné radikály, které mohou mít karcinogenní, mutagenní, teratogenní a další negativní účinky pro lidský organismus. Některé bioflavonoidy (konkrétně anthokyany) se používají jako potravinářská barviva a jsou běžnou součástí rostlinného pigmentu. [32]

Další význam senzoricky aktivních látek vyskytujících se v potravinách je podrobněji rozepsán v následujících kapitolách.

Tabulka 3 – Přehled vybraných sensoricky aktivních látek [25]

Obchodní název	CAS	Popis vůně
2,3-Dimethylpyrazin	5910-89-4	nazelenalá, ořechová, kávová, karamelová, masová, vonící po nové kůži
2-Ethoxy-3-methylpyrazin	32737-14-7	lískooříšková, pražené mandle, zemité, lehce ananasová
4-Methylthiazol-5-ethanol	137-00-8	ořechová, po hovězím mase
Aldehyd C 14	104-67-6	ovocná, sladká, broskvová
Aldehyd C 18	104-61-0	mastná, kokosová, až anýzová
Pentyl-acetát	628-63-7	banánová, etherická, ovocná
Butyl-butyrylacetát	7492-70-8	mléčná, sýrová, máslovitá, smetanová
Cinamyl-butyrát	78761-39-4	ovocná, balzamičná, slabě květinová
Citral	5392-40-5	citronová
Citronellyl-formát	105-85-1	ovocná, květinová, meruňkovo broskvová, medová
Dekano-5-lakton	705-86-2	smetanová, kokosová, broskvová
Biacetyl	431-03-8	velmi silná, máslová
Dihydrokumarin	119-84-6	sladká, bylinná, dřevitá, vanilková
Methyl-2-(methylamino)benzoát	85-91-6	pomerančové květy, hroznové víno
Ethyl-acetát	141-78-6	ananasová, těkavá
Ethyl-butyrát	105-54-4	ovocná, sladká, difusivní, banánově ananasová
Ethyl-heptanoát	106-30-9	vinná, brandy, ovocná
Ethyl-hexanoát	123-66-0	silně ovocná, připomínající víno, jableková, banánová, brandy
Ethylmaltol	4940-11-8	karamelová, sladká
Ethylvanilin	121-32-4	silná, vanilková
Fenethylalkchol	60-12-8	růžová, medová, květinová
Fenethyl-fenylacetát	102-20-5	medová, květinová
Furaldehyd	98-01-1	sladká, dřevitá, mandlová, po pečeném chlebu
Heptanon	110-43-0	ovocná, kořenitá, skořicová
Isopentyl-butyrát	106-27-4	ovocná, meruňková, ananasová, banánová
Isoeugenol	97-54-1	hřebíčková, kořenitá, sladká, s dřevitými podtóny
Linalyl-acetát	115-95-7	příjemná, sladká, květinově ovocná
Maltol	118-71-8	sladová, po opečeném chlebu
Menthol	2216-51-5	mentolová
Methionin	59-51-5	masová, podobná droždí
Methyl-anthranilát	134-20-3	ovocná, vínová
Methyl-benzoát	93-58-3	ovocná
3-Methylcyklopentan-1,2-dion	765-70-8	ořechová, připálená, kávová, karamelová, podobná javorovému sirupu
Methyl(methylsulfanyl)pyrazin	67952-65-2	ořechová, vařené maso, připomínající zeleninu
Pyrolidin	123-75-1	animální, vaječná, aminová
Thiamin-hydrochlorid	67-03-8	nakyslá, trpká, nahořklá

5.1.1 Kontrola jakosti medu

Hodnocení botanického původu medů, obzvláště při dovozu ze zahraničí, je nezbytnou a důležitou součástí potravinářské kontroly. V současné době se oficiálně používané metody zaměřují převážně na pylovou analýzu. Cílem tohoto příspěvku je předložit SPME jako možnou analytickou techniku pro studium obsahu sensorických látek v medu. Vzorky medů (40) pocházely z různých regionů Itálie. Tyto vzorky se analyzovaly pomocí SPME. Zkoumané vzorky měly šest botanických původů: citrusy (5), kaštan (10), eukalyptus (8), lípa (11), tymián (2) a pampeliška (4). Identifikace těkavých sloučenin (charakterizující původ medu) byla provedena SPME/GC/FID metodou. Bylo zjištěno, že všechny vzorky se stejným botanickým původem měly pozoruhodně podobné GC profily. Některé těkavé látky byly nalezeny pouze ve vzorcích medu ze specifických květinových zdrojů. Tato vlastnost by mohla být využívána jako marker. [26]

5.1.2. Využití SPME/GC/FPD pro stanovení sirných látek v pivu

Některé těkavé sirné látky jsou běžnou součástí piva. Vznikají při výrobě piva ze sladu a chmele. Ovlivňují významně chuť piva (po česneku, zahnívajících rostliny, vařené zelí atd.) a jejich možná vysoká koncentrace v pivu je nežádoucí, a proto je velmi důležité sledovat jejich obsah během jednotlivých fází technologie piva. [27]

5.1.2.1. Sledované sirné látky v pivu

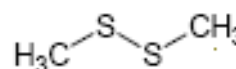
- **dimethylsulfid**

- nejdůležitější zdroj sensorických změn v pivu
- sensorická prahová koncentrace 50 µg/l
- chuť a pach vařené zeleniny (kapusta, zelí)



- **dimethyldisulfid**

- chuť připomínající vařený květák
- prahová hodnota 3 µg/l



- **dimethyltrisulfid**

- štiplavá vůně po čerstvé cibuli
- prahová koncentrace 0,1µg/l

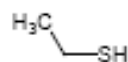


- **diethyldisulfid**

- vůně připomínající čerstvou cibuli



- **ethylsulfid**



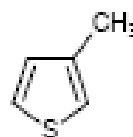
- **3-(methylthio)propanol (methionol)**

- chuť připomínající květák

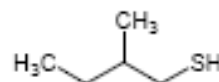
- prahová koncentrace 2 mg/l



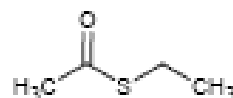
- **3-methylthiofen**



- **2-methyl-1-butanthiol**



- **ethyl thioacetát**



- **sirouhlík**



5.1.2.2. Optimalizace podmínek pro SPME

Extrakce byla prováděna metodou HS-SPME a použito bylo křemenné vlákno potažené 85 µm vrstvou CAR/PDMS (carboxen/polydimethylsiloxan). Doba extrakce byla 30 minut při teplotě 45 °C. Podmínky pro desorpci byly 3 minuty při teplotě 250 °C. [27]

5.1.2.3. Podmínky pro GC

- Kapilární kolona GS-Gaspro (30 m x 0,32 mm)
- Teplotní program 40 °C (1 min) → 110 °C (1 min)
rychlost ohřevu 7 °C.min⁻¹
110 °C (1 min) → 190 °C (1 min)
rychlost ohřevu 11 °C.min⁻¹
190 °C (1 min) → 235 °C (1 min)
rychlost ohřevu 7 °C.min⁻¹
- Průtok nosného plynu He 1,5 ml. min⁻¹
- PTV Injektor 250 °C, splitless (3 min)
- FPD detektor T detektor – 150 °C
T base – 250 °C
H₂ – 90 ml. min⁻¹
vzduch -105 ml.min.₁
make up N₂ – 20 ml.min⁻¹

5.1.2.4. Vyhodnocení obsahu sirných látek ve vzorcích piva

Na základě polohy píků (porovnání se standarty) lze snadno identifikovat danou látku. Z výšky píku se může vypočítat koncentrace látky ve vzorku piva. [27]

Tabulka 4 - Přehled výsledků, naměřených pomocí GC/FPD, pro čtyři různé druhy piv [27]

	Světlé výčepní pivo (n=6)	Světlý ležák (n=6)	Černé pivo (n=4)	Nealkoholické pivo(n=3)
sirouhlík (µg/l)	0,02 - 0,05	<0,01	<0,05	<0,01
methionol (µg/l)	4,30 - 6,20	2,0 - 3,34	2,03 - 4,01	<0,5
ethylsulfid (µg/l)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
dimethylsulfid (µg/l)	0,85 - 1,45	0,29 - 0,67	0,9 - 1,29	1
3-methylthiofen (µg/l)	0,10 - 0,16	<0,001	0,18	<0,001
dimethyldisulfid (µg/l)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
2-methyl-1-buthanthiol (µg/l)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
diethyldisulfid (µg/l)	0,08 - 0,20	0,08 - 0,25	0,12 - 0,19	0,36
dimethyltrisulfid (µg/l)	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
ethyl thioacetát (µg/l)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

5.1.3. Senzorická analýza vín typu Sauvignon

Pyrazíny patří mezi sensoricky významné dusíkaté heterocyklické látky. Kromě alkyipyrazínů, které se významnou měrou podílejí na chuti a vůni většiny tepelně upravených, především pak pečených a smažených potravin, patří mezi sensoricky nejvýznamnější alkoxyipyrazíny. Mezi nejvýznamnější zástupce alkoxyipyrazínů patří methoxyipyrazíny (MP). Methoxyipyrazíny se vyskytují ve zpracovaných potravinách, ale rovněž v syrové zelenině (v hrášku, řepě, zelené paprice, rajčatech) a ve vinných hroznech. MP lze dle hlediska vzniku zařadit mezi látky aromatické primární, tedy takové, které mají původ v hroznech a tvoří odrůdový charakter vína. K této skupině se řadí také prefermentační látky, které se tvoří v období mezi sběrem hroznů a začátkem alkoholové fermentace.

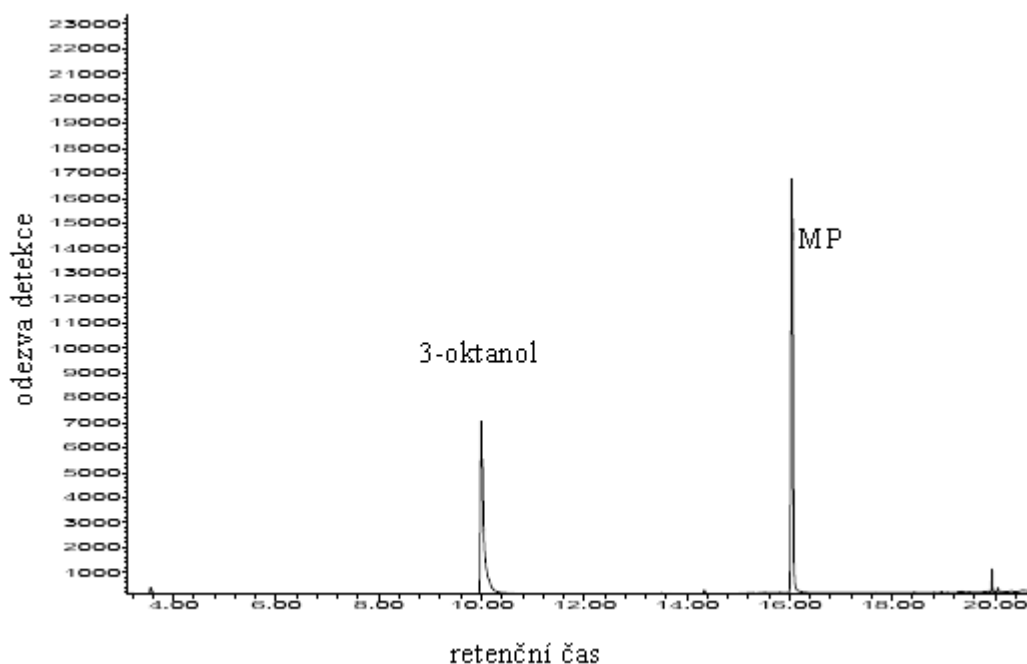
V odrůdách Cabernet sauvignon a Sauvignon je možné nalézt tři významné zástupce MP. Převládajícím pyrazínem je 3-isobutyl-2-methoxyipyrazín (IBMP), který se v této odrůdě vína nachází v koncentracích 5-50 ng/l a jehož aroma je popisováno jako „zelené“ a po paprice. Dále v odrůdě Cabernet sauvignon a Sauvignon nalezneme 3-sec-butyl-2-methoxyipyrazín (SBMP) a 2-methoxy-3-isopropylipyrazín (IPMP). Prahová hodnota detekovatelná čichem pro tyto pyrazíny je v rozmezí od 1 ng/l do 42 ng/l a aroma má charakter čerstvě posekané trávy. Ve stopových hladinách je přítomen 3-ethyl-2-methoxyipyrazín (ETMP). Obsah MP ve víně závisí hlavně na stupni dozrání hroznů, jejich obsah rapidně klesá v období, kdy se začínají vybarvovat hrozny. Dále obsah závisí na klimatu, takže vína z chladnějších oblastí obsahují více MP než stejné typy vín z teplejších oblastí. Vliv má také sluneční svit, protože hrozny dozrávající v temnu obsahují až třikrát vyšší koncentraci MP. Stanovení charakteristických aromatických profilů vína Sauvignon a identifikaci přídavku umělého aroma dostupného na trhu v České republice lze snadno prokázat metodou SPME/GC/MS. [28]

5.1.3.1. Optimalizace a výsledky použité metody

Kombinace SPME s plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem nabízí jednoduchý, rychlý a citlivý přístup vhodný pro charakterizaci sloučenin aroma vína bez složitějšího postupu přípravy vzorku. Sorpce aromatických látek byla prováděna za využití vláknů 100 µm Polydimethylsiloxan (PDMS). [28]

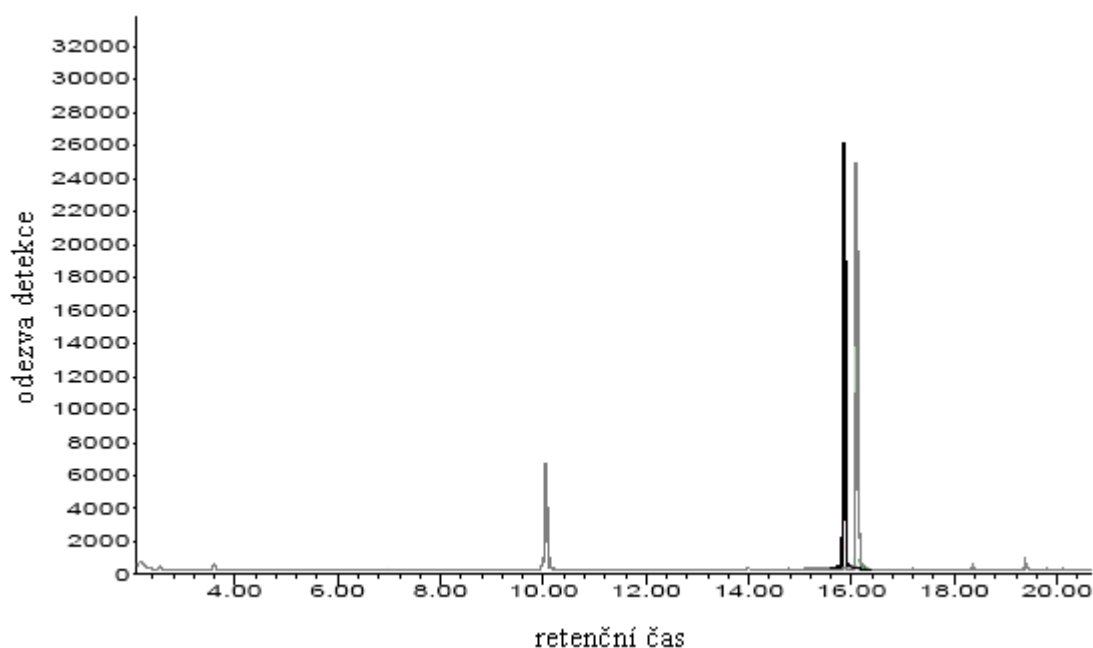
Veškeré analýzy byly prováděny s přidavkem soli (NaCl) a za míchání rychlostí 900 otáček/min. Čas sorpce činil 30 minut při teplotě 25 °C. Délka desorpce aromatických látek z SPME vlákna při analýze činila 2 minuty při teplotě 220 °C. Pro stanovení celkového profilu aromatických látek byl využit teplotní program 50 °C (5 minut), nárůst 5 °C/min do teploty 150 °C, nárůst 10 °C/min do 220 °C, výdrž při 220 °C 2 minuty, teplota MS detektoru: 220 °C, mobilní fáze: helium, průtok 1,2 ml/minutu), pro stanovení methoxypyrazinů byl použit zrychlený teplotní program 50°C (5 minut), nárůst 5 °C/min do teploty 110 °C, nárůst 30 °C/min do 220 °C, výdrž při 220 °C 2 minuty, teplota MS detektoru: 220 °C, mobilní fáze helium, průtok 1,2 ml/minutu), který umožnil zkrácení analýzy z 35 minut na 20 minut při zachování dobré separace píků methoxypyrazinů.

Kvantifikace byla provedena pomocí standardu IBMP (98 %, Sigma Aldrich). Jako vnitřní standard byl použit 3-oktanol. Ukázka chromatogramu standardu IBMP s vnitřním standardem 3-oktanolem je na obr.16. [28]



Obrázek 16 - Ukázkový chromatogram standardu IBMP s vnitřním standardem 3-oktanolem [28]

Ve vínech typu Sauvignon byl jako charakteristická látka určen IBMP jehož koncentrace se pohybovala v rozmezí 4,67-17,0 ng/l, průměrná hodnota byla 11,2 ng/l. Byla provedena analýza umělého aroma, Aroma fantasia S (imitující aroma Sauvignon), které je běžně dostupné na trhu v ČR. Bylo zjištěno, že umělé aroma neobsahuje hlavní pyrazín vína typu Sauvignon, a to 2-methoxy-3-(1-methylpropyl)-pyrazín, ale jeho isomer 2-methoxy-3-(2-ethylpropyl)-pyrazín, jehož sensorické vlastnosti jsou obdobné, ale chromatografické mírně odlišné (jiné charakteristické fragmenty a jejich zastoupení, jiný retenční čas). Chromatogram standardu s umělým aromatizujícím preparátem je na obr.17. [28]



Obrázek 17 – GC chromatogram standardu IBMP o koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$ (černá čára) a GC chromatogram modelového roztoku vína s přidavkem umělého aromatizujícího preparátu (šedá čára). [28]

Na českém trhu byla jako hlavní složka u sledovaných typů vín Sauvignon určena látka 3-isobutyl-2-methoxypyrazín (IBMP), jehož koncentrace se pohybovala v rozmezí 4,67-17,0 ng/l. Dále se prokázalo, že alespoň jedna nejmenovaná firma používá umělých aromatizujících preparátů, jako je isomer 2-methoxy-3-(2-methylpropyl)-pyrazín, který má obdobné sensorické vlastnosti jako IBMP. [28]

Úprava těchto druhů vín umělými aromatickými preparáty není potřebná, jelikož nejlepší hodnocená koncentrace methoxypyrazinů se pohybuje kolem 5–10 ng/l, což je množství, které se běžně vyskytuje u tohoto typu vína. Vyšší obsah těchto látek (methoxypyrazinů) je čichem i chutí považována za negativní. [28]

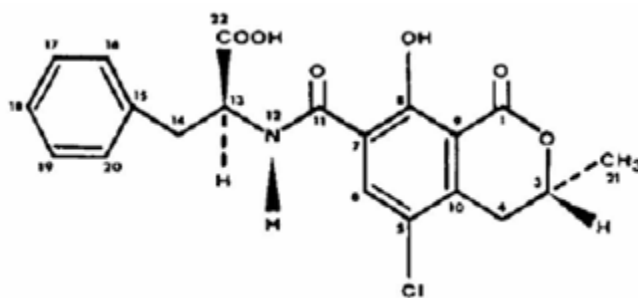
5.2. Mykotoxiny v potravinách

Mykotoxiny jsou chemické látky, které jsou produkovány některými zástupci říše hub (*Fungi*), nejčastěji to bývají plísňe (mikroskopické houby), které mají pro lidský organismus negativní účinky a mohou i vážně poškodit zdraví člověka. [30] Plísňe se rozmnožují spory, které jsou velmi malé (mikroskopicky pozorovatelné) a mohou být unášeny i slabým prouděním vzduchu. Plísňe, aby se mohly snadno rozmnožit, potřebují dostatek vlhkosti. Při nedokonalém skladování může snadno dojít ke kontaminaci samotné potraviny nebo různých komodit, které slouží pro jejich technologii. [29]

5.2.1. SPME/HPLC/FD pro stanovení Ochratoxin A ve vzorku piva

Ochratoxin A (dále už jen OTA) patří mezi významné mykotoxiny. Produkují jej některé druhy plísňí (např. *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*). OTA má na úrovni organismu mnoho negativních účinků, jako např. útlum imunity, postižení ledvin, riziko potratů u těhotných žen a karcinogenita. Novější práce zabývající se karcinogenitou OTA prokazují silný efekt promotoru karcinogenního procesu, ale nebyla prokázána schopnost iniciace. Z hlediska praktického přístupu ke kontaminaci potravin ochratoxinem A se tím nic nemění, protože v potravě i prostředí jsme atakováni karcinogeny se schopností iniciace z mnoha dalších zdrojů. Z chemického hlediska patří OTA do skupiny ochratoxinů, kam ještě řadíme další ochratoxiny (B, C, D a α). [30]

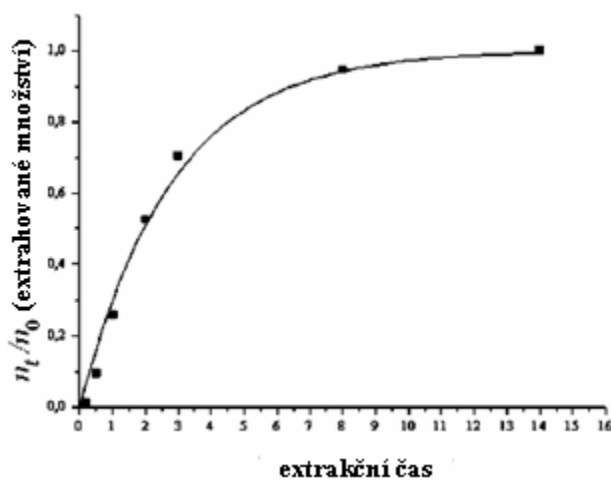
V této skupině má ochratoxin A dominantní postavení. Lze ho obecně charakterizovat jako derivát 7-izokumarinu vázaný na aminoskupinu L- β -fenylalaninu. Přesný název OTA je (R)-N-((5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-benzo(c)pyran-7-yl) karbonyl)-3-fenylalanin (CAS číslo 303-47-9). Strukturní vzorec OTA je uveden na obr. 18: [29]



Obrázek 18 – Strukturní vzorek ochratoxinu A [30]

OTA se vyskytuje v řadě komodit jak rostlinného, tak i živočišného původu. Za hlavní zdroje OTA v potravinovém řetězci jsou pokládány obiloviny, produkty z obilovin, vepřové maso, krev a vnitřnosti (játra, ledviny, výrobky z krve), dále se nachází v kávě, pivu, luštěninách, koření, zeleném čaji, sušeném ovoci, např. fíkách či rozinkách, lékořici a grapefruitové šťávě, aj. Z obilovin, konkrétně z ječmene, se sekundárně může OTA objevit v pivu. Obsah a množství OTA obsaženého ve vzorku piva lze stanovit pomocí SPME/LC/FD. Tato metoda je mikroextrakce na tuhé fázi a s využitím kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí, která se může aplikovat pro stanovení ochratoxinu A v distribuovaných vzorcích piva. [29]

Bylo použito 60 μm (PDMS/DVB) vlákno. Postup vyžadoval velmi jednoduchou přípravu vzorku, která zahrnuje selektivní extrakci. Mezi faktory ovlivňující sorpci na vlákno patří doba extrakce, teplota, pH a přídavek soli. Desorpci analytu ovlivňuje pouze teplota a doba tepelné desorpce. Zjištěný lineární rozsah v pivu byl 0,03-2 ng/ml. [29]



Obrázek 19 – Graf závislosti extrahovaného množství OTA na čase, bylo použito PDMS/DVB vlákno při teplotě $25 \pm 1^\circ\text{C}$ [29]

5.2.2. SPME/HPLC/ESI-MS/MS metoda pro stanovení OTA

V poslední době byla vyvinuta další metoda pro stanovení OTA ve vzorcích piva, ale i vína, takzvaná automatizovaná „on-line“ mikroextrakce na tuhé fázi s následným využitím kapalinové chromatografie - s tandemovou hmotnostní spektrometrií (SPE-HPLC-ESI-MS/MS). Tato metoda je velmi citlivá, poskytuje velmi přesné výsledky, ale náklady a složitost přístrojového vybavení jsou nevhodné pro běžné použití. [29]

5.3. Rezidua pesticidů v jahodách

Pesticidy se průmyslově vyrábějí, aby ničily přirozené škůdce zemědělsky obdělávaných plodin a tím zvýšily jejich produkci. Rezidua jsou stopová množství použitých pesticidů a jejich deriváty, které vznikly např. působením vzdušného kyslíku nebo slunečním zářením a mohou tak být potenciálními kontaminanty zemědělských plodin, tudíž se i sekundárně objevit v potravinách. [31]

Jako rychlá a originální metoda pro separaci látek ze složitých matic (homogenizované plody jahod) lze použít SPME nebo SBSE. Velmi vhodnou metodu je právě SBSE, kdy se magnetické míchadélko potažené PDMS fází o požadované tloušťce vloží do jahodového extraktu a nechá se po určitou dobu za konstantní teploty míchat. [31] Dále je možné použít DI- SPME, kdy se jahodový extrakt vloží do nádoby se septem a to se propíchne SPME jehlou, ve které je uloženo křemenné vlákno potažené PDMS-DVD fází. Extrakce trvá 30 minut od ponoření vlákna do jahodovém extraktu.

Po extrakci je jehla zavedena do nástřikového prostoru plynového chromatografu, kde může být analyt tepelně desorbován a unášen na GC kolonu nebo použitím SPME-HPLC adapteru je analyt eluován rozpouštědlem a je dále nesen na kolonu kapalinového chromatografu. [31]

6. Závěr

Mikroextrakční metody založené na využití tuhých sorbentů (PDMS, CAR, DVB, aj.), na kterých dochází k sorpci stanovovaného analytu, patří mezi rychlé a citlivé separační metody bez potřeby použití rozpouštědla. Velkou předností mikroextrakčních metod je práce s heterogenními matricemi, kterými mohou právě být potraviny, krev aj. SPME ve spojení s GC s různými typy detekce má svůj veliký význam při stanovování sensoricky aktivních látek, které mohou vypovídat o celkové kvalitě analyzované potraviny. Pomocí SBSE se dají docílit i citlivější výsledky, a tak je možné stanovit mnohonásobně menší koncentrace než metodou SPME. MEPS může mít velké uplatnění i na poli lékařství, kdy se pomocí této techniky dají stanovit různé organické sloučeniny v krvi či v krevní plazmě.

Mikroextrakční metody spojené s vhodnou chromatografickou technikou poskytují velmi dobré výsledky při analýze potravin a dají se stanovit skoro veškeré organické látky v potravinách, buď přirozené (například živočišné aminy, které vznikají přirozeným rozkladem masa a mohou mnoho povědět o stáří, kvalitě, skladování atd.) nebo uměle přidávané (různé sensoricky aktivní látky, které napodobují přirozenou chuť a vůni dané potraviny a naleznou tak uplatnění v potravinářské technologii), či látky, které mohou poukázat na možnou kontaminaci mikroorganismy (například stanovení mykotoxinů). Význam mikroextrakčních metod je nedoceníitelný a lze předpokládat, že se bez nich neobejdou moderní laboratoře zabývající se analýzou potravin.

Přehled použité literatury

1. C. Ross, A. Gilroy, M. Lawrence, R. Brian, M. Pherson, v knize: *Encyclopedia of Analytical Science* (P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, ed.), str. 608-616, Elsevier, Amsterdam 2005.
2. C. L. Arthur, J. Pawliszyn: *Anal. Chem.* 62, 2145-2148 (1990)
3. X. Yang, T. Peppard: *J. Agric. Food Chem.* 42, 1925-1930 (1994)
4. [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/11122.Par.0001.File temp/11122.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/11122.Par.0001.File%20temp/11122.pdf) [3. 4. 2009]
5. D. Procházková: *Chem. Listy* 96, 827–852 (2002)
6. <http://www.labicom.cz/default.aspx?section=21&article=32&highlighttext=SPME+dr%c5%be%c3%a1k> [6.4. 2009]
7. [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/Lookup.do?N5=Keyword%20\(fulltext\)&N3=mode+matchpartialmax&N4=SPME&D7=0&D10=SPME&N25=0&N1=S_ID&ST=RS&F=PR](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/Lookup.do?N5=Keyword%20(fulltext)&N3=mode+matchpartialmax&N4=SPME&D7=0&D10=SPME&N25=0&N1=S_ID&ST=RS&F=PR) [2.4. 2009]
8. <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4547.pdf> [28.3. 2009]
9. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/11.Par.0001.File.tmp/11.pdf [6.4. 2009]
10. <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/14880/051.pdf> [7.4. 2009]
11. <http://www.labicom.cz/default.aspx?section=24&article=356&highlighttext=SPME> [29.3. 2009]
12. <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/30720/071.pdf> [13.4. 2009]
13. http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM_SPME_1007.pdf [23.3. 2009]
14. M. Abdel-Rehim, Z. Altun, L. Blomberg: *Mass. Spectrom.* 39, 1488-1493 (2004)
15. M. Abdel-Rehim: *J. Chromatogr. B* 801, 317-321 (2004)
16. <http://chromservis.cz/product/129/on-line-spe/CZ> [28.3. 2009]
17. http://www.labhut.com/products/autosamplers/autosampler_ht300aplus.php [28.3. 2009]
18. <http://www.scisep.co.uk/sample-prep-meps-online.html> [23.3. 2009]
19. X. Huang, N. Qiu, B. Huang: *Talanta* 78, 101–106 (2009)
20. E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers: *J. Microcolumn Sep.* 11, 737-747 (1999)

21. C. Blasco, M. Fernández, Y. Picó, G. Font: *J. Chromatogr. A* 1030, 77–85 (2004)
22. F. David, P. Sandra: *J. Chromatogr. A* 1152, 54–69 (2007)
23. www.gerstelus.com/admin/prod_file.php?path='ramana'&file=an-2000-02_SBSE_Applied_to_Environmental_Samples.pdf [18.4. 2009]
24. <http://www.gerstel.com/en/twister-stir-bar-sorptive-extraction.htm> [20.4. 2009]
25. M. Mohelský: *Chem. Listy* 97, 579–592 (2003)
26. L. Piasenzotto, L. Gracco, L. Conte: *J. Sci. Food Agr.*: 83, 1037-1044 (2003)
27. <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/30720/071.pdf> [27.5. 2009]
28. <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sbor2008.pdf> [3.5. 2009]
29. A. Aresta, F. Palmisano, R. Vatinno: *J. Agric. Food Chem.* 54 (5), 1594-1598 (2006).
30. A. Visconti, M. Pascale, G. Centoze: *J. Chromatogr. A* 863, 89-101 (1999)
31. <http://www.fsb.rnu.tn/recherche/Revue/v1art02.pdf> [27.5. 2009]
32. A. Kumar, A. K. Malik, D. K. Tewary: *Anal. Chim. Acta* 631, 177-181 (2009)