

Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XX. (Ovčárna pod Pradědem, 25. – 27. 4. 2018), Sborník příspěvků ze semináře (J. Fischer, J. Kellner, K. Vytřas, Eds.), str. 00 – 00.
© Univerzita Pardubice, Pardubice 2018; ISBN 978-80-7560-xxx-y.

TESTOVÁNÍ DESORPČNÍCH PARAMETRŮ PŘI POUŽITÍ HS-SPME K ROZLIŠENÍ EVROPSKÉHO A SIBIŘSKÉHO MODŘÍNU

**Testing of Desorption Parameters Using HS-SPME to Distinguish
the European and Siberian Larchs**

Jakub Šulc, Tomáš Bajer a Petra Bajerová

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,

Studentská 573, 532 10 Pardubice

E-mail st38350@student.upce.cz

Souhrn

Dva desorpční parametry (desorpční teplota a desorpční čas) byly testovány při vývoji metody vhodné pro rozlišení dřeva evropského a sibiřského modřínu použitím plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Prvně byla testována desorpční teplota v rozsahu 125-250 °C za účelem objevení možného termálního rozkladu nestabilních těkavých terpenů. Dále byl testován desorpční čas v rozsahu 30-120 s. Tento experiment nahrazení vysoké desorpční teploty za nižší desorpční teplotu s delším desorpčním časem měl vést k eliminaci možného rizika rozkladu nestabilních sloučenin. Nakonec byly analyzovány dva testovací vzorky dřeva evropského a sibiřského modřínu pomocí GC-MS a výsledné chromatogramy byly vzájemně porovnány. Podstatné rozdíly v profilu těkavých organických látek (VOC) vytvořili hypotézu, že by tato metoda mohla být vhodná pro rozlišení dřeva evropského a sibiřského modřínu. Tato hypotéza potřebuje být ještě potvrzena analyzováním většího množství vzorků modřínů.

Abstract

Two desorption parameters (desorption temperature and desorption time) were tested during developing of a method for comparison European and Siberian larch wood using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Firstly, desorption temperature was tested in range of 125-250 °C in order to discover possible thermal decomposition of unstable volatile terpenes. Secondly, different desorption time was tested in range of 30-120 s. This experiment of substitution of high desorption temperature by lower temperature coupled with longer desorption time should lead to eliminate the risk of any decomposition of unstable compounds. Finally, two test samples of European and Siberian were analysed with GC-MS and the resulting chromatograms were compared to each other. Significant differences in profile of volatile organic compounds (VOC) create a hypothesis that this method might be suitable for resolution of European and Siberian larch wood. This hypothesis needs to be confirmed by analysing of multiple larch samples.

1. Úvod

Modřiny jsou dobře známé, jelikož se jedná stromy jehličnaté a zároveň opadavé. Dorůstají výšky 20 až 45 m a jedná se strom, který je v sibiřské a kanadské tajze dominantně zastoupen. Modřínové dřevo je ceněno pro svou voděodolnost, pevnost a trvanlivost. Kvalita a vlastnosti dřeva se liší v závislosti na místě původu. Sibiřský modřín je v dřevařském průmyslu ceněn více než modřín evropský [1].

Jsou známy případy, kdy bylo dřevo evropského modřínu vydáváno za sibiřské. Takto falešně označené dřevo sibiřského modřínu je pak prodáváno s cenou o 50 % vyšší, než je pravá hodnota tohoto materiálu. Dřevo ze sibiřského modřínu má pevnost podobnou dubu, specifický obsah dehtů a výrazný obsah pryskyřic. Zatímco dřevo evropského modřínu připomíná evropsky smrk a má nízký obsah pryskyřic. Tyto dva druhy dřeva je možné snadno od sebe rozeznat při přímém vzájemném porovnání. Nicméně objektivní určení druhu dřeva může být velmi obtížné i pro kvalifikovaného profesionála [2].

Je ale znám i opačný případ záměny. Většina jehličnanů, která má neevropský původ a je importována do Evropské unie, musí projít fyto-sanitární inspekcí a získat certifikát. Importovat neevropské dřevo bez certifikátu je ilegální. Tyto inspekce mají předejít zavlečení a rozšíření škodlivého hmyzu na území Evropské unie. Vzhledem k tomu, že jsou tyto inspekce nákladné, snaží se jim dovozci vyhnout tak, že vydávají sibiřský modřín za modřín evropský. Proto byla vyvinuta metoda analýzy stabilních izotopů k identifikování nesprávně označeného modřínového dřeva [3].

Těkavé organické látky (VOC) dávají většině dřev jeho příjemnou a charakteristickou vůni. Vyskytují se ve v různých koncentracích v zelených částech, v kůře, v bělovém i jádrovém dřevě. Některé VOC navíc způsobují větší odolnost dřeva proti hmyzu, houbám či bakteriálním infekcím. Množství a typ VOC se mohou lišit druh od druhu stromu nebo v závislosti na lokalitě růstu stromu. Dokonce se liší koncentrace v bělovém a jádrovém dřevě. Dále je chemické složení dřeva ovlivněno ještě podmínkami během růstu či místem růstu [4].

Jsou známy některé VOC, které jsou náchylné ke konverzím a degradačním reakcím. Existují různé způsoby degradace v závislosti na externích vlivech. Podstatný vliv mají například teplota, světlo či dostupnost kyslíku. Mnoho z těchto terpenů a terpenoidů bylo identifikováno v našich vzorcích. Vzhledem k tomu to faktu jsme se rozhodli otestovat dva desorpční parametry abychom zjistili, jestli nám některé látky neubývají či úplně nemizí [5].

Profily těkavých látek byly vybrány k porovnání dvou druhů modřínového dřeva. Pro izolaci VOC byla zvolena headspace mikroextrakce tuhou fází (HS-SPME). Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID) byla použita pro separaci a

detekci VOC v případě testování desorpčních parametrů. Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) byla použita při analýze vzorků a k identifikaci látek.

2. Experimentální část

2.1. Použité chemikálie a materiály

Vzorky ve formě pilin byly získány z České zemědělské univerzity v Praze, fakulty lesnické a dřevařské. Jednalo se vždy o vzorky jádrového dřeva. Před analýzou byly vzorky uchovány v tmavých lahvích při laboratorní teplotě.

Standardní roztoky *n*-alkanů (C8-C20 a C21-C40) v koncentraci 40 mg.l⁻¹, rozpuštěné v *n*-hexanu a toluenu, byly získány od Sigma-Aldrich Praha, Česká republika). SPME držák pro automatické dávkování a SPME vlákno divinylbenzen/carboxen/polydimetylsiloxan StableFlex (DVB/CAR/PDMS; 50/30 μm) byli pořízeny od Supelco (Bellefonte, PA, USA).

2.2. Přístrojové vybavení

Plynový chromatograf, model GC-2010 plus, ve spojení s hmotnostním spektrometrem TQ-8030 byl použit pro analýzy vzorků modřínového dřeva. Autosampler AOC-5000 Plus (vše od Shimadzu, Kyoto, Japonsko) vybavený vyhřívací a agitační jednotkou byl použit pro HS-SPME, včetně desorpce analytů z vlákna v nástřiku a čištění vlákna. Kapilární kolona SLB-5ms s délkou 30 m, 0,25 mm vnitřním průměrem a 0,25 μm tloušťkou filmu (Supelco, Bellefonte, PA, USA) byla použita pro separaci. Helium 5.0 (Linde Gas a.s., Praha, Česká republika) bylo použito jako nosný plyn při konstantní lineární rychlosti 30 cm.s⁻¹. Teplota nástřiku byla 200 °C. Po desorpci, která trvala 20 s, bylo vlákno vyčištěno při teplotě 250 °C po dobu 5 minut, aby se předešlo možnosti carry-over efektu. Teplota pece byla 40 °C po dobu 2 minut, poté byla navýšena na 250 °C rychlostí 4 °C/min a držena po dobu 5,5 min. Celková doba analýzy byla 60 min. Byla použita elektronová ionizace (EI; 70 eV), spektrometr pracoval ve skenovacím módu v rozmezí 33-500 m/z. Směs *n*-alkanů byla použita k vypočtení retenčních indexů (RI) pro každý pozorovaný pík. Identifikace sloučenin byla provedena porovnáním s knihovnami hmotnostních spekter NIST 11 (NIST, Gaithersburg, MD, USA) and FFNSC 2 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a ověřena porovnáním RI identifikovaných sloučenin s publikovanými daty.

Testování desorpčních parametrů bylo provedeno na GC2010 vybaveného plamenově ionizačním detektorem (FID). Teplota detektoru byla nastavena na 270 °C. Ostatní podmínky separace včetně typu a teploty kolony, teploty nástřiku, nosného plynu a lineární rychlosti byly stejné jako v případě výše zmíněné GC-MS analýzy.

2.3. Mikroextrakce tuhou fází

Před prvním použitím bylo extrakční vlákno kondicionováno podle návodu od výrobce při 270 °C po dobu 1 hodiny. 300 ± 10 mg pilin vzorku bylo naváženo do 20 ml vialek pro headspace analýzy, uzavřeny víčkem s teflonovým septem. Před samotnou extrakcí, byl vzorek inkubován po dobu 20 minut při teplotě extrakce. Samotná extrakce pomocí SPME vlákna proběhla při teplotě 105 °C po dobu 15 minut. Po každé analýze bylo vlákno zavedeno do zařízení na čištění vláken, kde bylo očištěno při teplotě 250 °C po dobu 5 minut, aby se předešlo možným carry-over efektům. Celá procedura včetně přenosu vialek, inkubace, extrakce, nástřiku a čistícího kroku byla automaticky provedena pomocí autosampleru AOC-5000 Plus.

2.4. Desorpční parametry

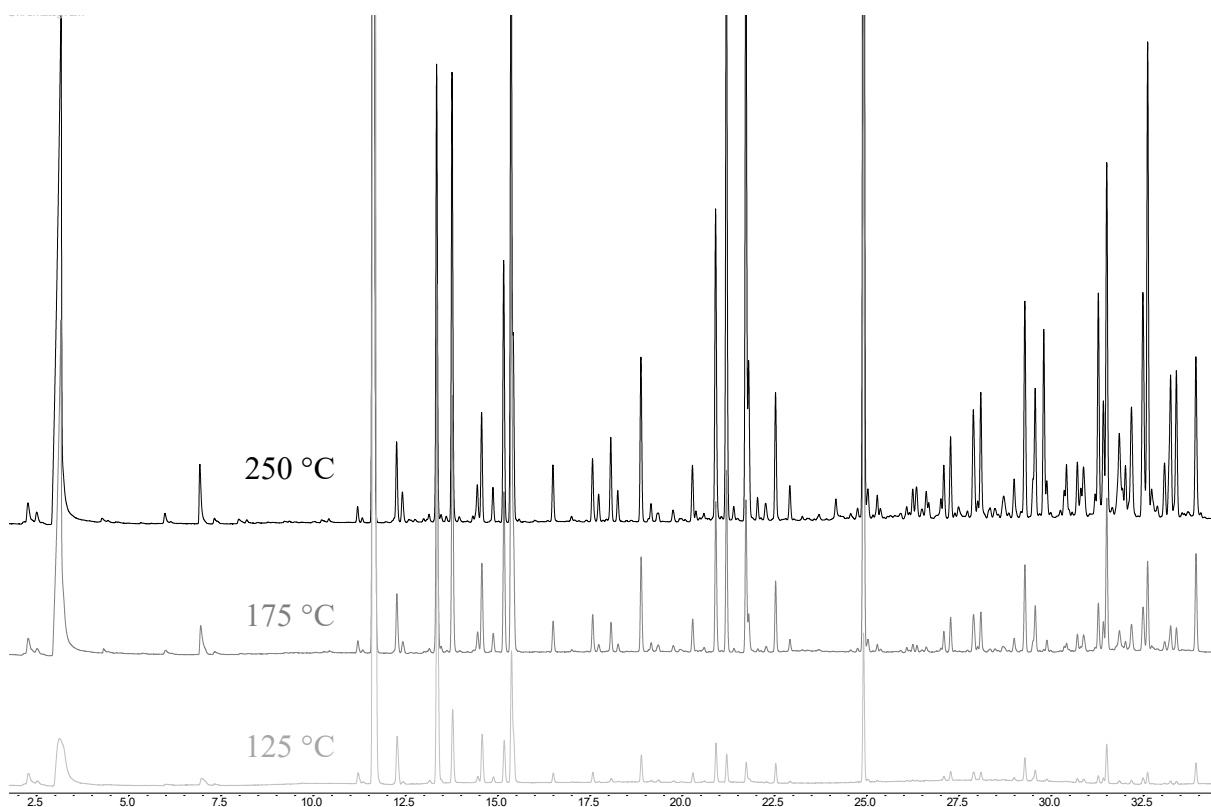
Vzhledem k podezření na možnost degradace některých nestabilních terpenů a terpenoidů během desorpce při vysokých teplotách byly testovány různé desorpční parametry. Pro testování byly vybrány desorpční teplota a doba desorpce. První zmíněný parametr byl testován v rozsahu 125-250 °C za účelem studia desorpční rychlosti a možnosti degradace některých těkavých látek. Druhý parametr, doba desorpce, byl testován v rozsahu 30-120 s za účelem pokusit se nahradit vysokou teplotu desorpce za nižší teplotu s delší dobou desorpce jako možnost vyhnoutí se riziku rozkladu.

3. Výsledky a diskuze

Protože má testovaná matrice velké množství těkavých látek s různou polaritou, bylo vybráno komerčně dostupné SPME vlákno s DVB/CAR/PDMS (50/30 μm) sorbentem. Extrakce proběhla při 60 °C po dobu 30 minut. Testování bylo provedeno na GC-FID.

3.1. Testování desorpčních teplot

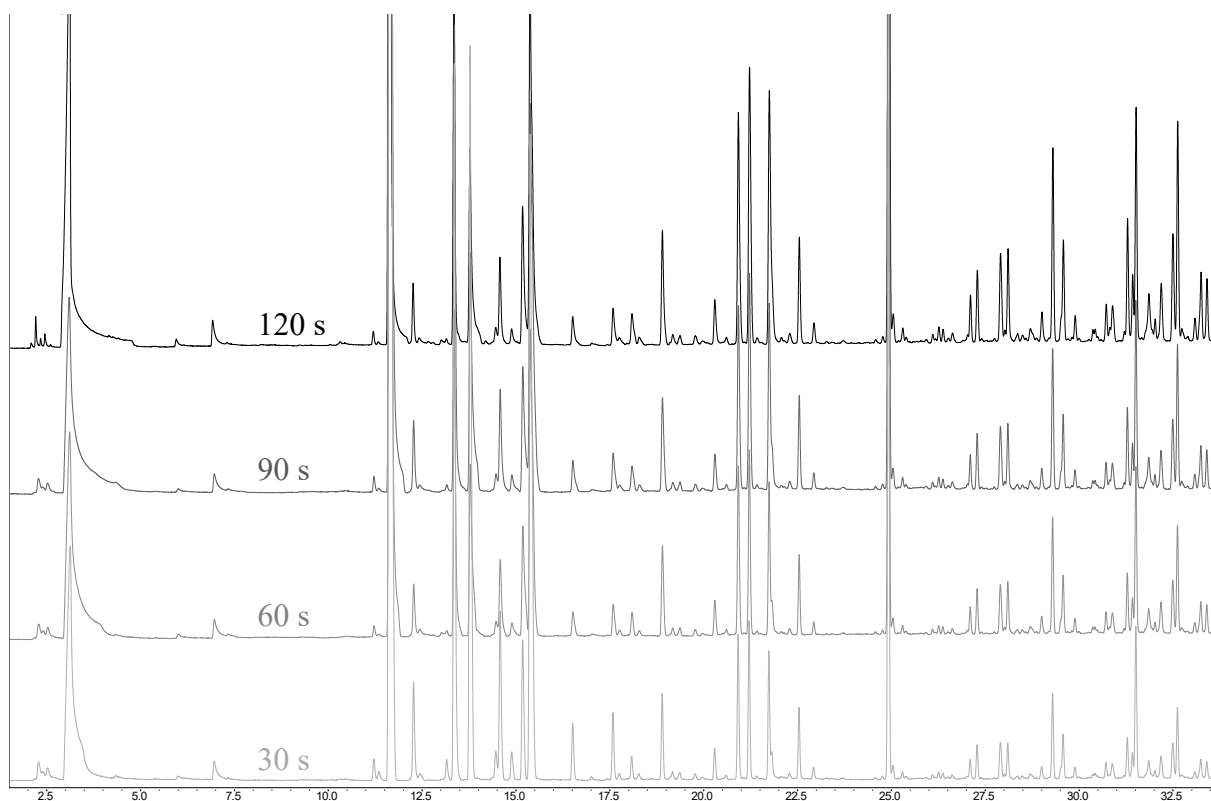
Bylo testováno šest desorpčních teplot (125, 150, 175, 200, 225 a 250 °C). Pro lepší přehlednost jsou na obrázku 1 zobrazeny pouze tři chromatogramy získané při třech různých teplotách (125, 175 a 250 °C). Bylo pozorováno, že vyšší teplota vede k desorpci většího množství látek. Nebyla pozorována žádná sloučenina s klesající intenzitou, tudíž nebyl nalezen žádný důkaz rozkladu některých sloučenin.



Obrázek 1 – Srovnání tří chromatogramů získaných při rozdílné teplotě desorpce (125, 175 a 250 °C)

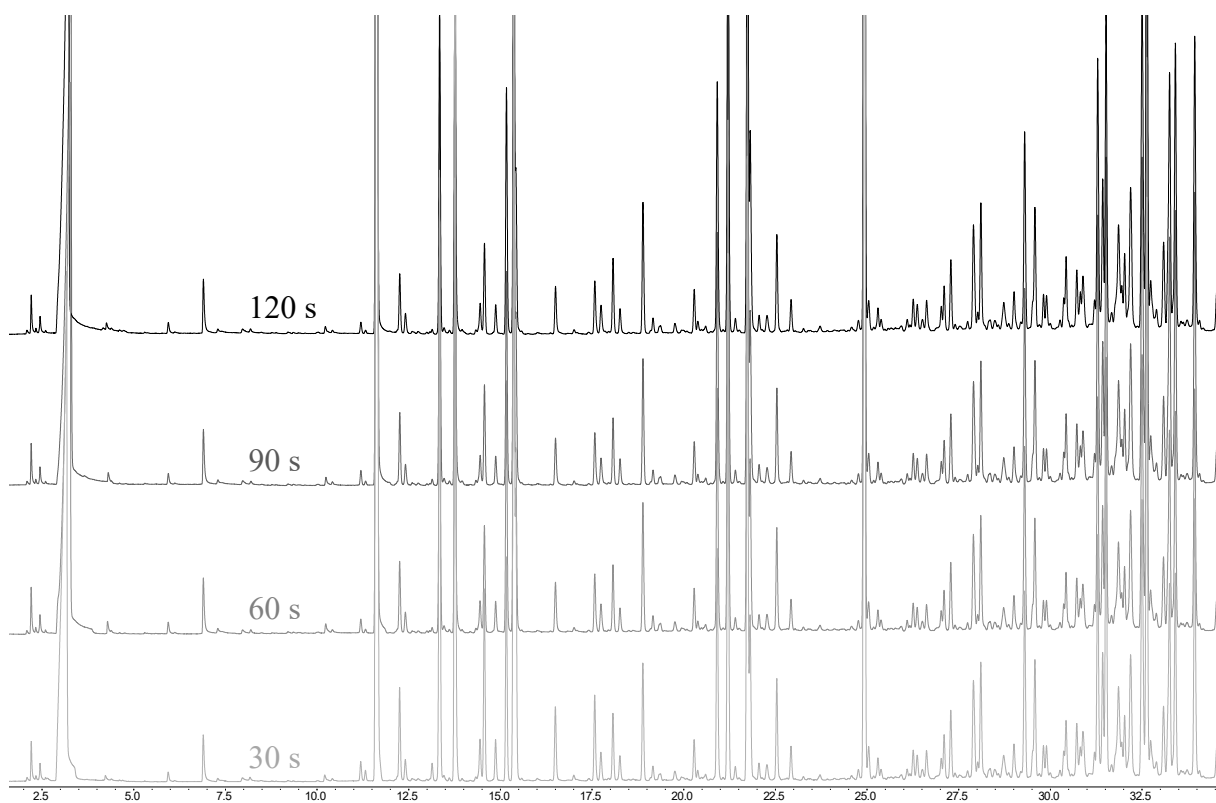
3.2. Testování doby desorpce

Čtyři doby desorpce (30, 60, 90 a 120 s) byly zkoumány při desorpční teplotě 150 °C. Monoterpeny byly eluovány v rozmezí 12-17 min, monoterpenoidy v rozmezí 17-24 min a seskviterpeny v rozmezí 24-35 min. Na obrázku 2 je patrné, že s delší dobou desorpce narůstá množství desorbovaných sloučenin, ale také že delší doba desorpce způsobuje chvostování píků. Tedy použití delší doby desorpce s nižší desorpční teplotou není přínosné.



Obrázek 2 - Srovnání čtyř chromatogramů získaných při desorpční teplotě 150 °C a různých dobách desorpce (30, 60, 90 a 120 s)

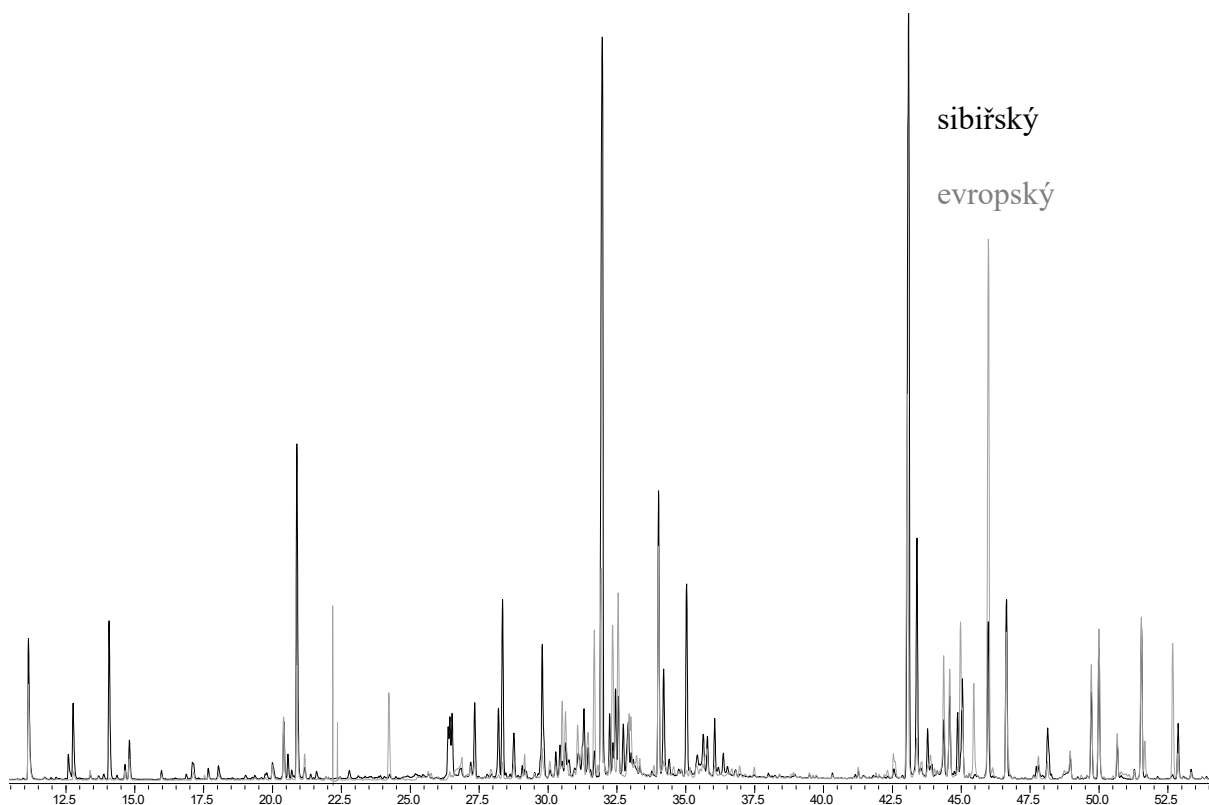
Při dalším souboru experimentů při desorpční teplotě 250 °C byly zkoumány čtyři doby desorpce (30, 60, 90 a 120 s). Jak můžeme vidět na obrázku 3, množství sloučenin uvolněných již během 30 s je přibližně stejné jako je při 120 s. Z toho se dá odvodit, že se většina látek desorbují již před uplynutím 30 s doby desorpce. Dokonce i při době desorpce 120 s nebyly nalezeny žádné chvostující píky. Tím se tedy potvrzuje, že použití vyšších desorpčních teplot je dobře odůvodněné a vliv doby desorpce na množství desorbovaných látek je nevýznamný v porovnání s teplotou desorpce.



Obrázek 3 - Srovnání čtyř chromatogramů získaných při desorpční teplotě 250 °C a různých dobách desorpce (30, 60, 90 a 120 s)

3.3. Analýza vzorků

HS-SPME metoda byla aplikována při analýze těkavých organických látek ve vzorcích dřeva evropského a sibiřského modřínu. SPME extrakty byly analyzovány pomocí GC-MS a některé látky byly identifikovány. V čase od 10 do 17 minuty se eluuje skupina monoterpenů, od 17 do 24 minuty je oblast oxidovaných monoterpenů a od 24 do 35 minuty je oblast seskviterpenů.



Obrázek 4 – Srovnání dvou chromatogramů získaných pomocí GC-MS. Černá linie označuje sibiřský modřín a šedá linie označuje evropský modřín.

Jak je patrné na obrázku 4, oba chromatogramy se od sebe výrazně liší. Tento fakt vytváří hypotézu, že by mohlo být možné použít profily těkavých látek, případně množství jednotlivých druhů terpenů, k rozlišení dřev evropského a sibiřského modřínu. Aby se tato hypotéza potvrdila, je naplánována analýza většího množství vzorků obou typů dřev z více stromů a lokalit. Dalším krokem bude statistické vyhodnocení získaných výsledků, jestli bude nalezena významná odlišnost.

4. Závěr

Tato práce se věnovala testování desorpčních parametrů při desorpci těkavých organických látek ze vzorků dřeva a následné aplikaci pro rozlišení dřev evropského a sibiřského modřínu. Pro tento účel byla použita metoda HS-SPME s vláknem DVB/CAR/PDMS v kombinaci s GC-MS pro separaci, detekci a identifikaci jednotlivých látek. Během testování desorpční teploty a doby desorpce nebyl nalezen žádný důkaz rozkladu nestabilních terpenů, což umožnilo vznik hypotézy o využití této metody k rozlišení dvou druhů dřev modřínu. Pro ověření této metody je zapotřebí analyzovat větší množství vzorků obou dřev a získané výsledky statisticky zpracovat.

Literatura

- [1] Rushford, K.: The pocket guide to trees. 1981, New York: Simon and Schuster.
- [2] <https://sibmodrin.cz/podlaha-na-terasu/>; May 31, 2018.
- [3] Horacek, M., M. Jakusch, and H. Krehan, Control of origin of larch wood: discrimination between European (Austrian) and Siberian origin by stable isotope analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009. **23**(23): p. 3688-92.
- [4] Roffael, E., Volatile organic compounds and formaldehyde in nature, wood and wood based panels. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 2006. **64**(2): p. 144-149.
- [5] Andersen, T., F. Cozzi, and H. Simonsen, Optimization of Biochemical Screening Methods for Volatile and Unstable Sesquiterpenoids Using HS-SPME-GC-MS. *Chromatography*, 2015. **2**(2): p. 277-292.