

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2012

Petra Šilarová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

SPME vonných látek

Petra Šilarová

Bakalářská práce

2012

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

SPME of fragrance

Petra Šilarová

Bachelor thesis

2012

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petra Šilarová**  
Osobní číslo: **C09157**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **SPME vonných látek**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Proveďte literární rešerši zabývající se extrakcí vonných látek z různých přírodních a syntetických matric. Zaměřte se na mikroextrakční techniky především na SPME.
2. Závěry kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Aleš Eisner, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce:

**Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**20. února 2012**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**22. června 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2012

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena 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 22. 6. 2012

Petra Šilarová

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu své bakalářské práce Ing. Alešovi Eisnerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky v průběhu celé práce. Dále bych chtěla poděkovat mojí rodině a všem svým blízkým přátelům, především Tomášovi Klementovi, kteří mně byli v průběhu studia oporou.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá extrakcí vonných látek. Nejprve jsou popisovány vlastnosti vonných látek rostlinného a syntetického původu. Dále se věnuje jednotlivým extrakčním technikám a hlavní část je zaměřena na mikroextrakci tuhou fází SPME vonných látek.

**Klíčová slova:** vonné látky; silice; extrakce; mikroextrakce tuhou fází (SPME).



## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with the extraction of fragrances. Firstly, it describes properties of fragrances of vegetable and synthetic origin. Secondly, it discusses various extraction techniques. The main part of the thesis is devoted to the solid phase microextraction (SPME) of fragrances.

**Keywords:** fragrances; essential oils; extraction; solid phase microextraction (SPME).

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>CHARAKTERISTIKA VONNÝCH LÁTEK.....</b>	<b>14</b>
2.1	VONNÉ LÁTKY ROSTLINNÉHO A ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU.....	16
2.1.1	Silice .....	16
2.2	SYNTETICKÉ VONNÉ LÁTKY.....	18
2.2.1	Uhlovodíky .....	18
2.2.2	Terpenové uhlovodíky .....	19
2.2.3	Monoterpeny .....	19
2.2.4	Alkoholy .....	20
2.2.5	Karbonylové sloučeniny .....	21
2.2.6	Karboxylové kyseliny .....	22
2.2.7	Ethery.....	22
2.2.8	Estery .....	23
<b>3</b>	<b>TECHNIKY POUŽÍVANÉ K EXTRAKCI VONNÝCH LÁTEK .....</b>	<b>24</b>
3.1	EXTRAKCE TUHOU FÁZÍ (SPE).....	24
3.2	MIKROEXTRAKCE TUHOU FÁZÍ (SPME) .....	25
3.2.1	Optimalizace extrakce u SPME .....	29
3.2.1.1	Výběr vlákna.....	29
3.2.1.2	Míchání .....	30
3.2.1.3	Teplota a doba extrakce .....	30
3.2.1.4	Změna pH a přídavek soli.....	31
3.2.2	Přímé ponoření vlákna do roztoku („Direct sampling“ S P M E) .....	31
3.2.3	Extrakce z prostoru plynné fáze („headspace" SPME).....	32
3.3	MIKROEXTRAKCE NA JEDNÉ KAPCE (SDME) .....	34
3.4	EXTRAKCE NADKRITICKOU TEKUTINOU (SFE) .....	36
<b>4</b>	<b>APLIKACE SPME .....</b>	<b>38</b>
4.1	ROSTLINNÉ MATRICE .....	39
4.1.1	Analýza rostlinných silic .....	39
4.1.2	Analýza květinových vůní .....	42
4.2	MOŠUSOVÉ LÁTKY.....	47

4.2.1	Analýza syntetických mošusových látek v ovzduší.....	47
4.2.2	Analýza nitro mošusových látek ve vodě .....	50
4.3	ALKOHOLICKÉ NÁPOJE .....	52
4.3.1	Analýza pomerančové pálenky .....	52
4.3.2	Analýza aromatických látek v alkoholických nápojích .....	54
4.4	POTRAVINY .....	56
4.4.1	Analýza vonné íránské rýže .....	56
4.4.2	Analýza kimchi .....	59
4.4.3	Analýza stinky tofu .....	62
4.5	ANALÝZA MÝDLA .....	64
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>67</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2-AP	2-Acetyl-1-pyrrolin
AAS	atomová absorpční spektroskopie
CAR	Carboxen
CF	studené vlákno
CF-HS-SPME	mikroextrakce tuhou fází v prostoru plynné fáze za použití studeného vlákna
CW	Carbowax
DI-SDME	mikroextrakce na jedné kapce s extrakcí v přímém ponoření vzorku
DI-SPME	mikroextrakce pevnou fází v přímém ponoření vzorku
DVB	Divinylbenzen
FST	fermentované stinky tofu
GC	plynová chromatografie
GC-FID	plynová chromatografie ve spojení s plamenově ionizačním detektorem
GC-IT-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s detektorem iontové pasti
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektroskopem
GC-MS-TOF	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s analyzátozem doby letu
GC- $\mu$ ECD	plynová chromatografie s mikrodetektozem elektronového záchytu
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HS-SDME	mikroextrakce na jedné kapce s extrakcí v prostoru plynné fáze
HS-SPME	mikroextrakce pevnou fází s extrakcí v prostoru plynné fáze
I.D.	vnitřní průměr
LC	kapalinová chromatografie
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MA	musk ambrette
MK	musk keton

MM	musk mosken
MS-TOF	hmotnostní spektrometrie s analyzátozem doby letu
MT	musk tibeten
MX	musk xylen
PA	Polyakrylát
PDMS	Polydimethylsiloxan
PTFE	Polytetrafluorethylen
PV	analýza čtyř vzorků jedné stanovované látky
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDME	mikroextrakce na jedné kapce
SFC	chromatografie nadkritickou tekutinou
SFE	extrakce nadkritickou tekutinou
SPE	extrakce pevnou fází
SPME	mikroextrakce pevnou fází
SV	čtyřikrát opakovaná analýza jednoho vzorku
TPR	pryskyřice
USA	Spojené státy americké

# 1 Úvod

Vonné látky jsou směsi přírodního nebo syntetického charakteru, a projevují se většinou příjemnou vůní. Vůně je organoleptická vlastnost aromatických látek a vnímáme ji čichovými smyslovými buňkami. Přírodními látkami vonného charakteru jsou zejména rostliny. Květy a ostatní části rostlinných organismů obsahují silice, které se dají průmyslově využít. Přírodními vonnými látkami jsou i živočišné vonné látky, převážně ze zvířecích žláz a orgánů. Snahou syntetických vonných látek je napodobit přírodní vonné látky. Buď jsou syntetizovány identické látky s látkami, které jsou přítomny v přírodních materiálech. Případně jsou to umělé látky, které nejsou identické rostlinným ani živočišným látkám nebo v nich nebyly identifikovány [1].

V dnešní době je známo několik tisíc sloučenin, které mají určitou vůni nebo chuť, například celkový počet vonných látek identifikovaný v potravinách se odhaduje na téměř 10 tisíc [2]. Některé mohou v surovém stavu nepříjemně zapáchat, avšak v kombinaci s vhodně vybranými látkami lze vytvořit příjemně vonící esence. Vonné látky se využívají v parfémtech, kosmetice a k aromatizaci potravin a nápojů. Produkty k nimž se při výrobě přidávají také vonné látky, jsou vonné svíčky, pěny do koupele, aviváže, čisticí prostředky, osvěžovače vzduchu, atd. Výrobky obsahující vonné látky, mohou vyvolat u citlivých lidí alergie, kožní vyrážky, ekzémy, dýchací potíže a bolesti hlavy.

K izolaci vonných látek se používají především extrakční techniky jako je mikroextrakce tuhou fází (SPME) a její různé modifikace. Jejich výhodou ve srovnání s klasickými extrakčními technikami (Soxhletova extrakce, destilace s vodní parou) je používání menšího množství vzorku a extrakčního činidla (případně žádného organického rozpouštědla). Další výhodou je výrazné zkrácení doby extrakce.

## 2 Charakteristika vonných látek

Vonné látky jsou látky, které působí na čichové receptory a vyvolávají dojem vůně. Mohou také současně působit na chuťové receptory a jsou potom zároveň chuťovými látkami. Jedná se převážně o málo polární nebo nepolární a ve vodě málo rozpustné (až nerozpustné) těkavé látky vyvolávající širokou škálu nejrůznějších sensorických vjemů. Komplexní sensorický vjem vůně a chuti, vyvolaný současně vonnými i chuťovými látkami, se dnes často označuje anglickým termínem flavour. Vonné látky lze nalézt prakticky v každé skupině organických sloučenin. Většina vonných látek obsahuje v molekule kyslík (alkoholy, ethery, aldehydy, ketony, kyseliny, estery, aj.), dusík (aminy, dusíkaté heterocykly) a síru (thioly, sulfidy, sirné heterocykly). Zatímco v dřívějších dobách byly zdrojem vonných látek výhradně přírodní materiály (jako jsou silice, extrakty květů, některé živočišné produkty, atd.), dnes se již moderní průmysl v oblasti vonných látek neobejde bez látek vyrobených synteticky. Při aplikacích jde vždy o pestré směsi často několika desítek látek a to ryze přírodního, ryze syntetického nebo kombinovaného původu. Velmi často je požadavek přírodního původu, který je běžný především u chuťových komplexů, pouze komerční záležitostí, neboť kvalita resp. čistota syntetických složek je mnohdy vyšší než složek přírodních [2,3].

Výsledný vjem vůně bývá jen výjimečně určován přítomností jediné látky nebo několika málo látek. Obvykle jde o složité směsi několika sloučenin. Typickým příkladem je třeba vůně pomerančů nebo pražené kávy, která je výsledným vjemem několika desítek různých sloučenin. Pouze v omezeném počtu případů lze typickou vůni spojovat s vůní jedné nebo několika málo sloučenin, tzv. klíčových složek vůně. Příklady takových sloučenin jsou uvedeny v tabulce 1. Intenzita a kvalita vůně však závisí nejen na přítomnosti vonných látek, ale také na dalších složkách, s kterými vonné látky interagují [2].

**Tab. 1.:** Příklady typických vonných složek v potravinách [2].

Sloučenina	Vůně	Výskyt
<b>Anethol</b>	Anýzová	Anýz
<b>Skořicový aldehyd</b>	Skořicová	Skořice
<b>Vanilin</b>	Vanilková	Vanilka
<b>Citral</b>	Citronová	Citron
<b>Maltol a isomaltol</b>	Karamelová	Karamel a pečivo

Vonášek a kol. [3] uvádějí následující hlavní typy vůní: aldehydické, animální, balzamické, bylinné, citrusové, cyklámen, dřevité, Fougére, fialka, gardénie, heliotrop, hloh, hrachor, hyacint, chypre, jasmín, jehličnaté, juchta, karafiát, kassie, konvalinka, kořenité, květinové, levandule, lilie, lípa, magnólie, mimóza, narcis, neroli, orchidej, ovocné, peprnomátové, růže, seno, šeřík, ševrefej, tabák, tuberóza, vůně mořské vody, zeleně a ylang-ylang.

Podle původu lze vonné látky rozlišit do dvou základních skupin na primární a sekundární. Primární vonné látky jsou sekundární metabolity produkované vnitrobuněčnými procesy. Jejich kvalita a kvantita závisí hlavně na genetických dispozicích daného organismu. U rostlin, živočichů i jiných organismů existuje v určitých mezích jistá variabilita způsobená některými zevními faktory. U rostlin se například uplatňuje lokalita, odrůda, stáří, stupeň zralosti, doba sklizně, různé environmentální faktory (množství vláhy, živin, teplota, světlo) a podmínky během posklizňového skladování [2,5].

Řada sekundárních vonných látek je přítomna ve vázané formě, především jako glykosidy nebo estery. Z těchto sloučenin se sekundární vonné látky uvolňují působením enzymů. Vznikají také během skladování a zpracování jako produkty enzymových a neenzymových reakcí bílkovin, sacharidů, lipidů (produkty primárního metabolismu), případně dalších chemických složek jako jsou vitamíny, různé pigmenty, atd. Fermentační pochody a tepelné zpracování látek s vonnými složkami (vaření, pečení, smažení, uzení, sušení) jsou hlavními procesy, při kterých vznikají sekundární vonné látky ze svých prekurzorů (jako jsou polyfenoly, vitamíny, nukleotidy, pigmenty nebo i polyterpenické sloučeniny). Z chemických reakcí se při jejich vzniku uplatňují především autooxidační reakce, Millardova reakce (resp. reakce neenzymového hnědnutí) a reakce enzymového hnědnutí [2,5].



## 2.1 Vonné látky rostlinného a živočišného původu

Přírodní vonné látky jsou získávány z odlišných částí rostlin, jako jsou květy, ovoce, kořeny, listy, dřevo, kůra stromů, pryskyřice, semena nebo z celých rostlin [4]. Sklizení (tj. oddělení požadovaného materiálu z rostliny) rostlinných materiálů vyžaduje velkou zkušenost odběratele, protože dochází k rychlým metabolickým změnám, které mohou podstatně ovlivnit výsledky. Při sklizení listů rostlin je třeba brát v úvahu pozici listu, jeho stáří, vystavení slunečnímu svitu a dešti, stejně jako čas sbírání a počasí [5,6]. K dalším metabolickým změnám, ke kterým dochází v rostlinných organismech a je jim třeba věnovat pozornost, je napadení rostlin (například škůdci), jejichž výsledkem je vyšší produkce obranných látek nebo změna jejich složení [7].

Vonné látky živočišného původu jsou získávány ze zvířecích žláz a orgánů (např. Bobr Evropský – kastoreum, Cibetka – cibetu, Kabar Pižmový – mošus, Vorvaň – ambra). Při zpracování vonných kompozic se obvykle nepoužívají živočišné produkty přímo, ale jen resinoidy nebo tinktury z nich vyrobené. Aromatické látky však v přírodě produkují zejména rostliny [4]. V dřívějších dobách se výrobci omezovali na izolaci vonných složek pouze z přírodních zdrojů. Tyto látky pak používali jako ingredience pro přípravu konečných produktů. Znalost struktury těchto látek byla popudem k syntéze analogů [8]. V současné době existuje v analýze vonných látek mohutná výzkumná a průmyslová základna, obvykle jako součást velkých chemických a farmaceutických podniků. Součástí všech rostlinných materiálů jsou silice.

### 2.1.1 Silice

Silice jsou velmi rozmanitou skupinou látek. Někdy též nazývané jako „etherické oleje“ nebo „esenciální oleje“. Silicí nazýváme komplex vonných a těkavých přírodních sloučenin olejovité konzistence a lipofilního charakteru přítomných v rostlinách. Zpravidla jsou bezbarvé, zvláště v čerstvém stavu, delším uchováváním snadno oxidují, pryskyřičnatí a tmavnou. Přírodně žlutohnědá je hřebíčková silice, zeleně nebo modře jsou zbarveny silice obsahující azulen. Za obyčejné teploty jsou zpravidla tekuté, výjimkou jsou například silice růžová nebo anýzová, které částečně tuhnou. Hustota silic je většinou menší než  $1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Výjimkou jsou silice s vysokým obsahem aromatických a síru obsahujících sloučenin (silice skořicová, hřebíčková,

hořčičná). Vyznačují se optickou aktivitou a vysokým indexem lomu, daným přítomností nenasycených látek s dvojnými a trojnými vazbami [9].

V rostlinách se hromadí v listech, buňkách a zásobních kanálcích. Rostliny obsahující větší množství silic nazýváme aromatickými. Silice obsahují vždy uhlovodíky a kyslíkaté látky. Jsou v nich zastoupeny sloučeniny snad všech chemických skupin. Hlavními nositeli vonných vlastností silic jsou jejich komponenty obsahující v molekule kyslík. Nežádoucí chemické změny probíhají zejména na světle, ve vlhku, za tepla a přítomnosti vzdušného kyslíku. Nejvíce náchylné k oxidacím jsou silice bohaté na nenasycené uhlovodíky (např. citrusové silice). Při průmyslové izolaci jsou většinou odstraňovány ze silic terpenické uhlovodíky, neboť se na charakteristické vůni silic nepodílejí a tím se zvýší jejich stabilita, trvanlivost a zjemní se i vůně. Silice s vysokým obsahem esterů mohou po čase obsahovat volné kyseliny vzniklé zmýdelněním esterů. Rovněž silice s obsahem aldehydů a fenolů se mohou měnit. Zatímco silice, kde převládají alkoholy, jsou relativně stabilní. V silicích většinou převládá obsah jednoho typu sloučenin (např. terpenické uhlovodíky). Případ, že dominantní je jedna jediná sloučenina, je vzácný, např. v silici izolované ze semen hořčice černé (*Oleum sinapis*) převládá allylisothiokyanát.

Největšími odběrateli silic jsou potravinářský průmysl a kosmetika, dále farmaceutický a chemický průmysl. Potravinářský průmysl využívá izolované látky ze silic například v nápojích nebo jako koření. Ve farmacii se používají pro přípravu léčiv a doplňků stravy. Působí-li rostlinné silice svou biologickou aktivitou na živý organismus, jedná se o aromaterapii [8,10].

Důležitým tématem je také falšování silic. Drahé éterické oleje se falšují levnějšími (mastnými oleji, voskem, parafinem, aj.), které mají podobnou vůni. Například růžová silice se nahrazuje silicí geraninovou, a tato opět silicí růžového dřeva. Rozpoznání padělků chemickou cestou je obtížné, v praxi se tudíž řídíme fyzikálními vlastnostmi (zvláště hustotou, bodem varu a bodem tuhnutí silic). Právě silice od falšovaných lze rozeznat i čichem, porovnáním vůní se vzorky čistých silic [9].

## 2.2 Syntetické vonné látky

Výroba syntetických vonných látek vychází ze znalosti chemického složení vonných látek izolovaných z přírodních matric, ať už rostlinného nebo živočišného původu. Můžeme tedy říci, že se jedná o "přírodní vonné látky", ovšem vyrobené chemickými syntézami. Případně mohou být vyrobeny vonné látky, které v přírodě nejsou nebo jen dosud nebyly identifikovány. Počet a sortiment vonných látek stále roste a zdokonalováním technologických procesů se zlepšuje i jejich kvalita. Kromě vysoké čistoty z chemického hlediska musí mít také vyhraněnou typickou vůni. Syntetické vonné látky mohou tedy nahradit nedostatek přírodních vonných látek, ale je třeba mít na paměti, že u některých složitějších přírodních vonných látek je obtížné napodobit požadovanou vůni. Základními chemikáliemi pro výrobu syntetických vonných látek jsou toluen, styren, fenol, isopren, terpentýn, ricinový olej [4,8].

Syntetické vonné látky lze nalézt téměř ve všech hlavních skupinách organických sloučenin, ať jsou to uhlovodíky, halogenderiváty, alkoholy a fenoly, thioly, ethery, sulfidy, dusíkaté deriváty, aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny a jejich deriváty - především estery a laktony, heterocyklické sloučeniny a další [3].

### 2.2.1 Uhlovodíky

Uhlovodíky jsou běžnou složkou potravin. Nejčastěji bývají přítomny jako složky silic. Jsou buď přirozenou složkou potravin, nebo vznikají během skladování a zpracování potravin enzymovými a chemickými reakcemi jako sekundární látky. Pro aromatizaci se uhlovodíky používají poměrně málo, využívají se však jako výchozí suroviny pro syntézu jiných vonných látek.

Uhlovodíky vyskytující se ve vonných látkách lze podle struktury rozdělit do tří skupin:

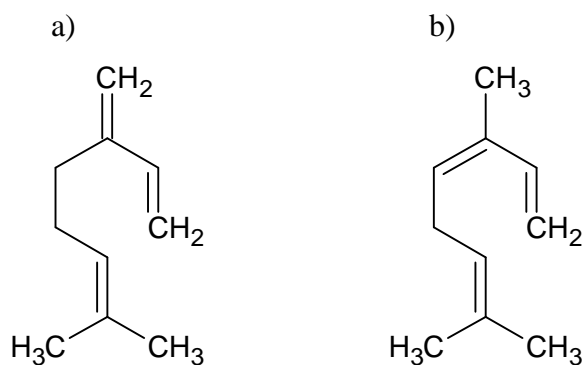
- alifatické,
- alicyklické,
- aromatické. [2,8]

## 2.2.2 Terpenové uhlovodíky

Jako vonné látky mají největší význam terpenové uhlovodíky. Jsou to sloučeniny obecného vzorce  $(C_5H_8)_n$ , které tvoří složky aroma prakticky všech druhů ovoce (např. pomeranč obsahuje 90–99 % vonných látek), zeleniny a koření. Vyšší terpenové uhlovodíky, jako jsou diterpeny ( $C_{20}H_{32}$ ), triterpeny ( $C_{30}H_{48}$ ) jsou sensoricky indiferentní. Bývají přítomny v olejoprskyřicích získaných z kořenů. Olejoprskyřice jsou extrakty získané z kořenů zeleniny extrakcí těkavými rozpouštědly (hexan, ether, dichlormethan, aj.) a následujícím odpařením rozpouštědla. Terpenové uhlovodíky mají obecně slabší vůni a používají se hlavně jako suroviny pro výrobu parfémů [2,8,11].

## 2.2.3 Monoterpeny

Z alifatických monoterpenových uhlovodíků je nejběžnější mycen a ocimen, který se vyskytuje jako cis- a trans-izomer (obr. 1).



**Obr. 1:** Mycen (a), ocimen (b).

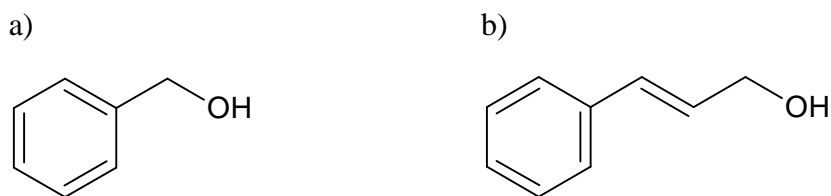
Monocyklické monoterpeny jsou odvozeny většinou od *p*-menthanu. Běžným uhlovodíkem je limonem, terpinol a fellandren. Základem bicyklických monoterpenových uhlovodíků je 7 nenasycených uhlovodíků, např. karan, kamfor, fenchan, atd. Méně často se jako vonné látky používají seskviterpeny a vyšší uhlovodíky, ty bývají obsaženy v přírodních balzámech a fixátorech [2,8].

## 2.2.4 Alkoholy

Alkoholy patří k nejvýznamnějším vonným látkám, poměrně stabilním a stále hojněji používaným. Používají se pouze velmi čisté. Jako aromatické látky se uplatňují hlavně volné primární alkoholy a jejich estery, zejména u ovoce a alkoholických nápojů. Přírodními vonnými látkami jsou nižší alifatické nasycené a nenasycené alkoholy. Pro aromatizaci se používají alkoholy, které mají nejvýše 15-18 atomů uhlíku v molekule. Použití alkoholů s vyšším počtem atomů uhlíku se používají velice málo [2,8].

Málo těkavé vyšší alifatické alkoholy se jako vonné látky uplatňují nepatrně nebo vůbec (například mastné alkoholy, které jsou složkou vosků). Neuplatňují se také polární alifatické a alicyklické dioly a aminoalkoholy. Některé nenasycené alkoholy jsou významnými aromatickými látkami čerstvého ovoce, zeleniny a hub. Jejich prekurzory jsou esenciální mastné kyseliny. Nositeli příjemné bylinné vůně, tzv. zelené vůně, mnoha druhů čerstvé zeleniny a ovoce (listových zelenin, rajčat, paprik aj.) jsou oba geometrické isomery 3-hexen-1-olu, (Z)-3-hexen-1-ol se nazývá triviálně listový alkohol.

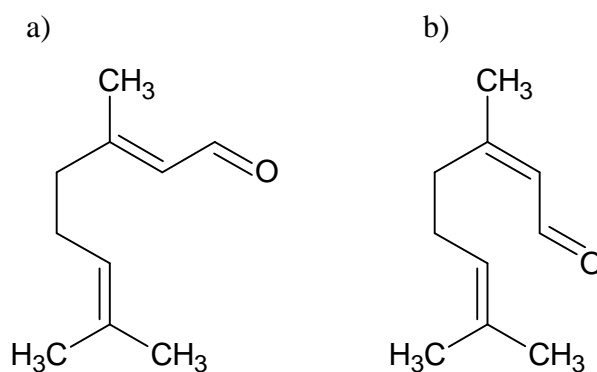
Acyklické monoterpenové alkoholy (volné nebo přítomné jako estery) jsou charakteristickými složkami různých silic. Vykazují sladké, těžké, květinové aroma. Monoterpenové alkoholy se v ovoci a dalších rostlinných materiálech vyskytují převážně jako glykosidy. Aromatické alkoholy bývají přirozenými složkami silic. Vznikají také jako sekundární látky při fermentačních a terminačních procesech. Nejdůležitějším alkoholem je benzylalkohol (obr. 2a). Složkou například skořicové silice a také ovocných brandy, aj. materiálů je skořicový alkohol (obr. 2b) [2].



**Obr. 2:** Benzylalkohol (a), skořicový alkohol (b).

## 2.2.5 Karbonylové sloučeniny

Karbonylové sloučeniny obsahují ve své molekule aldehydovou skupinu  $-\text{CH}=\text{O}$  nebo kotoskupinu  $-\text{C}(\text{O})-$  a dělí se proto na aldehydy a ketony. Aldehydy patří k nejdůležitějším vonným látkám. Obvykle mají velmi intenzivní vůni vyhraněného charakteru, často připomínají příslušný alkohol. V přírodě jsou převážně zastoupeny v silicích. Během skladování se aldehydy snadno oxidují vzdušným kyslíkem a polymerují (tím se znehodnocují). V parfumerii se používají aldehydy  $\text{C}_7$  až  $\text{C}_{15}$ . Zvláštní význam mají terpenické aldehydy ( $\text{C}_{10}$ ), které jsou také nejrozšířenější v přírodě. Všechny aldehydy mimo to slouží jako vynikající suroviny k přípravě mnoha dalších vonných látek. K nejčastěji se vyskytujícím terpenovým aldehydům patří citral. Jedním z izomerů je citral *a*, který se nazývá geranial (obr. 3a) a citral *b*, který se nazývá neral (obr. 3b). Rozšířeným aromatickým aldehydem je benzaldehyd, který bývá přítomen volný nebo vázaný v některých kyanogenních glykosidech [2,8,12].



**Obr. 3:** Geranial (a), neral (b).

Ketony na rozdíl od aldehydů mají obě volné vazby uhlíku v karbonylové skupině obsazeny radikály, které mohou být buď stejné nebo různé. Většina ketonů s počtem uhlíku do  $\text{C}_{18}$ , mezi nimiž jsou četné vonné látky, má intenzivní charakteristickou vůni. Také mezi přírodními vonnými látkami je velké množství oxosloučenin a patří často k charakteristickým vůním příslušné přírodní suroviny. Monocyklické ketony jsou výraznými aromatiky například karvon je klíčovou složkou kmínové a mátové silice. Také menthon se vyskytuje v mátových silicích [2,8,12].

Těkavé aldehydy a ketony se vyskytují v potravinách jako primární látky a vznikají rovněž enzymovými a chemickými reakcemi z různých prekurzorů jako sekundární látky. Často jsou žádoucími složkami aroma potravin, ale v některých

případech jsou také nositeli nežádoucí vůně. Slouží potom jako indikátory nežádoucích změn senzorické či výživové hodnoty potravin [2].

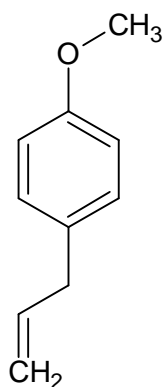
### **2.2.6 Karboxylové kyseliny**

Jsou významnou složkou především produktů rostlinného původu. Ovlivňují průběh enzymových a chemických reakcí, mikrobiologickou stabilitu potravin během skladování a zpracování, organoleptické i technologické vlastnosti. V potravinách se vyskytují jako alifatické, alicyklické a aromatické nebo heterocyklické. Řada karboxylových kyselin obsahuje současně další funkční skupiny, například hydroxylovou skupinu (hydroxykyseliny), karbonylovou skupinu (oxokyseliny, respektive aldehydokyseliny nebo ketokyseliny), aminoskupinu (aminokyseliny), aj. Oxokyseliny jsou hlavně produkty metabolismu, degradací sacharidů (levulová).

Jako vonné látky se uplatňují hlavně nižší mastné kyseliny a některé aromatické kyseliny. Jistý význam jako vonné látky však mají také mastné kyseliny se středně dlouhým uhlovodíkovým řetězcem, které jsou zejména ve formě triacylglycerolů složkami tuků. Řada karboxylových kyselin je prekurzorem dalších vonných látek, jako jsou například příslušné estery a laktony [2,12].

### **2.2.7 Etery**

Etery jsou deriváty sloučenin s hydroxylovou funkční skupinou (alkoholů, fenolů, naftolů, atd.), které mají vodík hydroxylové skupiny substituovaný radikálem. V potravinách se vyskytují symetrické, asymetrické, alifatické, alicyklické, aromatické a etery s atomem kyslíku vázaným v cyklu. Jako vonné látky se etery uplatňují poměrně málo. Těžké dialkyletery se v potravinách prakticky nevyskytují. Některé se však syntetizují pro kosmetické účely. V potravinách se jako složky silic různých druhů koření vyskytují některé alkylaryletery. Nejčastěji jde o sloučeniny odvozené od anizolu nebo veratrolu. Významným etherem je estragol (obr. 4) vyskytující se v estragonové silici [2,8].



**Obr. 4.:** Estragol.

### 2.2.8 Estery

Jsou to sloučeniny karboxylových kyselin a alkoholů. Mají v molekule esterovou vazbu. V potravinách patří estery k nejrozšířenějším skupinám sloučenin. Často doprovázejí příslušné karboxylové kyseliny a alkoholy. Estery nižších mastných kyselin a nižších aromatických kyselin s nižšími alifatickými a aromatickými alkoholy jsou obvykle významnými vonnými látkami. Jsou důležitou složkou aromatu ovoce, zeleniny a různých nápojů a také koření. Estery aromatických kyselin a aromatických alkoholů mají zpravidla těžké balzámové vůně. Vyskytují se však méně často. Estery terpenických alkoholů s nízkomolekulárními kyselinami mají většinou květinovou vůni. Přirozeně se vyskytující estery je obtížné oddělit od ostatních těkavých látek [2,8,13].

V průmyslu vonných látek se používá několik set nejrozmanitějších esterů. Neexistuje však typ vůně, který by se nenašel také mezi estery. Absolutní většina vonných a aromatických komplexů obsahuje estery jako důležité komponenty. Jsou tam dodávány buď v čistém stavu, nebo jako přirozené složky přírodních vonných látek [8].



### 3 Techniky používané k extrakci vonných látek

Kvalita přípravy vzorku je důležitým faktorem pro úspěch každého analytického postupu. Extrakční postup slouží k izolaci a zakoncentrování určité skupiny sloučenin. Z tohoto důvodu je extrakce po odběru vzorku dalším z rozhodujících kroků před vlastním stanovení vonných látek. Vonné látky se skládají z širokého okruhu různých druhů sloučenin, velmi rozmanitých úrovní a různých polarit. Rychlost extrakce lze zvýšit prodloužením délky extrakce nebo za použití konvečních rozpouštědel při teplotách nad jejich atmosférickým bodem varu (extrakce nadkritickou tekutinou, SFE). Extrakce je komplikovaná ve fyzikálních a chemických vzájemných vztazích stanovené látky a její matricí [5,14].

#### 3.1 Extrakce tuhou fází (SPE)

Extrakce tuhou fází je technika používaná k zakoncentrování sledovaných látek a k přečištění vzorku před analýzou. Metoda je založena na sorpci stanovené látky ze vzorku na povrchu vhodné stacionární fáze (tuhý sorbent). Molekuly jsou v důsledku mezimolekulových interakcí zachycovány různou silou na povrchu sorbentu. Následně jsou stanovené látky desorbovány z kolonky vhodným rozpouštědlem [15,16].

Sorbenty pro SPE se hodnotí podle různých hledisek. Mezi základní patří zrnění, specifický povrch, hydrofilní či hydrofobní charakter, polarita a schopnost zpětného uvolnění stanovených látek pomocí rozpouštědla [16]. Jako sorbent se téměř výlučně používá chemicky modifikovaný silikagel ( $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ ), nejčastěji alkyl-substituovanými vazbami C18 a C8, nebo modifikovaný skupinami kyano ( $-\text{CN}$ ) a amino ( $-\text{NH}_2$ ). K iontové výměně se používá skupin amino ( $-\text{NH}_2$ ), kvarterního aminu ( $\text{N}^+$ ), karboxylové skupiny ( $-\text{COOH}$ ), aromatické sulfonové kyseliny ( $\text{ArSO}_2\text{OH}$ ) nebo polyethyleniminu  $[-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})-]_n$ .

Před analýzou je nutné SPE kolonku nejprve kondicionovat. Poté se kolonkou prosaje vzorek rychlostí několika  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Pak se kolonka propláchne několika mililitry vody, vysuší se jemným proudem dusíku za laboratorní teploty. Nakonec jsou sorbované stanovené látky desorbovány malým množstvím organického rozpouštědla a analyzovány pomocí plynového chromatografu nebo po převedení do vhodného rozpouštědla (jako mobilní fáze) nastříknuty na kolonu kapalinového chromatografu.

Celý proces SPE lze automatizovat a přímo propojit s dávkovačem vzorků na plynovém nebo kapalinovém chromatografu.

Jednoduchost techniky a snadné použití SPE vedlo, ke komerčnímu používání jednorázových minikolonek. Tyto kolonky jsou plněny různými sorbenty o různé velikosti částic. K průchodu vzorku a promývacího roztoku skrze stacionární fázi kolonky v závislosti na velikosti částic, je možné použít podtlaku. Velmi důležitým kritériem umožňujícím vysokou reprodukovatelnost analytických výsledků je zajištění konstantní kvality různých šarží jednorázových SPE kolonek. K tomuto účelu se jako charakteristika SPE kolonky používá kapacita kolonky. Kapacita se vyjadřuje jako poměr mg stanovované látky ku g sorbentu [15].

### 3.2 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

Mikroextrakce tuhou fází je modifikací extrakce na tuhé fázi (SPE). Je to sorpčně/desorpční technika vyvinutá v roce 1990 prof. Pawliszynem a patentována firmou Supelco. SPME je poměrně nová technika pro analýzu vonných látek v květinách. Podstatou metody je vlákno (obr. 5) z taveného křemene umístěného v duté jehle, které je pokryto malým množstvím sorbentu. Přehled používaných stacionárních fází je uveden v tabulce 2.



Obr. 5.: SPME zařízení vyrobené firmou Supelco [17].

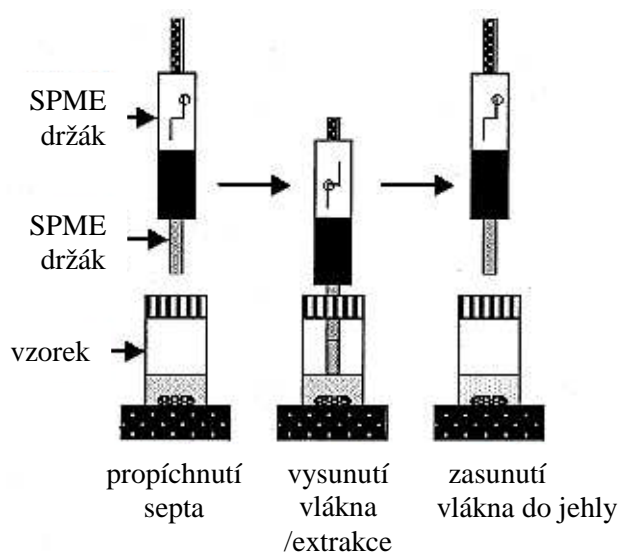
Principem je ustavení rovnováhy mezi stanovovanou látkou a sorbentem zakotveným na křemenném vláknu, a následnou desorpčí stanovované látky po přenesení vlákna do dávkovacího zařízení chromatografického systému pro separaci a klasifikaci cílových stanovovaných látek. Na rozdíl od běžných extrakčních metod není stanovovaná látka extrahována ze vzorku v co nejvyšší koncentraci, ale jen do ustálení rovnovážného stavu [18,19,20].

**Tab. 2.:** Přehled vláken pro SPME [21].

<b>Stacionární fáze /tloušťka vrstvy</b>	<b>Zkratka názvu stacionární fáze</b>	<b>Určeno pro chromatografii</b>	<b>Doporučeno pro analýzu</b>
Polydimethylsiloxan <b>100 μm</b> <b>30 μm</b>  <b>7 μm</b>	PDMS	GC, HPLC	Těkavé látky Nepolární středně těkavé látky Slabě polární až nepolární středně těkavé látky
Polydimethylsiloxan /divinylbenzen <b>65 μm</b>	PDMS/DVB	GC, HPLC	Polární těkavé látky
<b>60 μm</b>		HPLC	Obecné užití (pouze pro HPLC)
Polyakrylát <b>85 μm</b>	PA	GC, HPLC	Polární středně těkavé látky
Carboxen /polydemethylsiloxan <b>75 μm</b>	CAR/PDMS	GC	Stopové koncentrace těkavých látek
Carbowax /divinylbenzen <b>65 μm</b>	CW/DVB	GC	Polární látky
Carbowax/pryskyřice <b>50 μm</b>	CW/TPR	HPLC	Povrchově aktivní látky

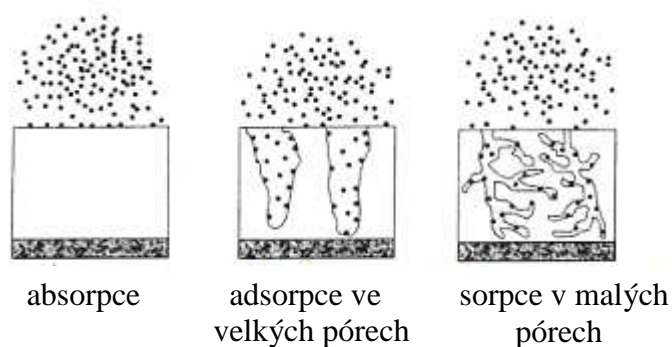
Vlákno je spojeno s ocelovým pístem a umístěno v duté ocelové jehle, která chrání vlákno před mechanickým poškozením. Vlákno je zataženo dovnitř jehly, která propíchně septum v zátce nádobky. Posunutím pístu se vlákno vysune do vzorku,

případně do prostoru nad jeho hladinou (obvykle se k extrakci používá 2–5 ml vzorku). Stanovovaná látka se sorbuje do vrstvy pokrývající vlákno. Po dosažení sorpční rovnováhy (obvykle 2–30 min) se vlákno opět zasune dovnitř jehly a spolu s ní je vytaženo z nádoby se vzorkem. Postup je znázorněn na obr. 6. Nakonec je jehla zavedena do injektoru plynového chromatografu, kde je stanovovaná látka tepelně desorbována a nosným plynem nesena na kolonu. V případě HPLC se používá pro desorpci z SPME vlákna do mobilní fáze speciální nástavec [22].

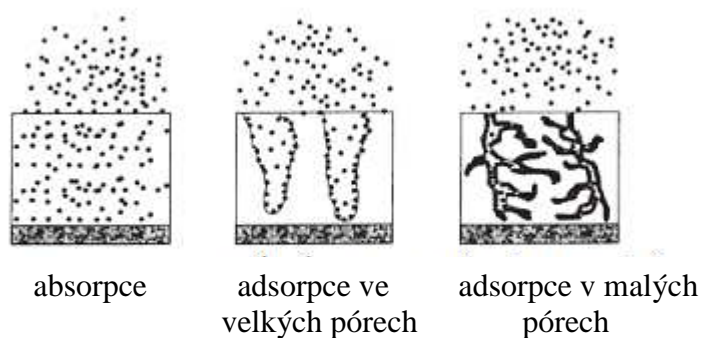


**Obr. 6.:** Extrakce SPME [17].

Stanovovaná látka je na vlákne zachycena na základě absorpce v případě čistých polymerů anebo adsorpce v případě fází s porézními suspendovanými částicemi, mechanismus je znázorněn na obrázcích 7 a 8. Stanovovaná látka může být sorbována z prostoru plynné fáze („headspace“ technika) nebo ponořením vlákna do roztoku vzorku (přímé vzorkování). V některých případech bývá vzorkování ukončeno ještě před dosažením rovnovážného stavu, a to z důvodu úspory času.



**Obr. 7.:** Schéma extrakčních mechanismů – počátek sorpce [23].



**Obr. 8.:** Schéma extrakčních mechanismů – rovnovážný stav [23].

Pro stanovení pomocí SPME, je třeba nejprve zvolit vhodný typ vlákna a metodu vzorkování. Výtěžek je ovlivněn řadou faktorů, jako např. tloušťkou sorpční vrstvy, mícháním vzorku, vysolováním, hodnotou pH atd. Silnější vrstva je schopna extrahovat větší množství stanovované látky a naopak. Míchání vzorku extrakci zlepšuje a zkracuje, obzvláště u molekul s vyšší molekulovou hmotností a s vysokým difúzním koeficientem. Proměnlivé míchání je nežádoucí, protože způsobuje nižší přesnost stanovení. Získání shodných výsledků vyžaduje zároveň optimalizaci desorpčních parametrů jednotlivých stanovovaných látek, tj. teploty nástřiku a hloubky vsunutí vlákna do nástřiku.

Těkavé stanovované látky, které jsou schopné odpařování, mohou být extrahovány ponořením vlákna do vzorku nebo vzorkováním v prostoru plynné fáze. Netěkavé stanovované látky musí být extrahovány pouze ponořením vlákna do roztoku. Přidání maximálně 10% roztoku chloridu sodného (vyšší koncentrace poškozují vlákno) do vzorku nebo úprava pH vzorku před vlastní extrakcí zvyšuje iontovou sílu roztoku. Dále se tím snižuje rozpustnost stanovované látky v roztoku. Zvýšením iontové síly roztoku (přídavkem soli do vzorků) se zvýší účinnost extrakce pro řadu stanovovaných

látek, zvláště polárních a těkavých. To platí i pro stopovou analýzu. Změna pH také ovlivňuje rozpustnost některých stanovovaných látek. Kyselé a bazické složky jsou mnohem účinněji extrahovány v kyselém, respektive bazickém prostředí. Vhodnou kombinací vlivu iontové síly a hodnoty pH se zlepší extrakce stanovované látky z prostoru plynné fáze.

Metoda SPME se používá jak pro kvalitativní tak i pro kvantitativní stanovení. Pro získání správných výsledků kvantitativní analýzy jsou doporučovány tyto postupy – metoda vnitřního standardu anebo metoda standardního přídávku. Metoda je použitelná ve spojení s plynovou i kapalinovou chromatografií. SPME se používá pro analýzy vonných látek ze vzorků životního prostředí, vůní v potravinách a v biomedicíně [18,21,24].

Výhodou SPME je malá spotřeba vzorku a rozpouštědel, oproti SPE [25,26].

### **3.2.1 Optimalizace extrakce u SPME**

Před správným použitím metody SPME je nutné optimalizovat parametry, jako jsou výběr vlákna, vliv míchání, teplota, doba extrakce, změna pH a přídavek soli.

#### **3.2.1.1 Výběr vlákna**

Mohou být použita vlákna z jednoho nebo ze dvou polymerů. Například PDMS, PA, dále pak Carbowax/PDMS, PDMS-polydivinylbenzen a další. DVB je porézní část, která je kombinovaná s PDMS nebo Carbowax. V poslední době jsou dostupné vlákna se třemi polymery, například DVB/Carbowax/PDMS. Další zmínky o vláknech byly uvedeny výše v tabulce 2.

Existují dvě pravidla pro správný výběr vlákna. Zaprvé polarita vlákna by měla odpovídat polaritě stanovované látky. Řídíme se podle pravidla: podobné se rozpouští v podobném. Druhé pravidlo je, aby vlákno bylo odolné vůči extrémním chemickým (pH, přídavek soli) a fyzikálním vlivům (vysoká teplota). Nejvíce tyto podmínky splňuje vlákno PDMS. PA vlákno je o něco lepší v případě použití polárnějších stanovovaných látek. Kromě toho vlákno PA se snadněji poškodí než PDMS. Další výběr vláken je zcela empirický. Tloušťka vrstvy se vybírá s ohledem na citlivost a dobu extrakce. Při použití tloušťky vrstvy 10  $\mu\text{m}$  je metoda citlivější a při tloušťce

7  $\mu\text{m}$  je metoda rychlejší. Nakonec by se mělo vzít v úvahu, že se zvyšující se tloušťkou vrstvy se prodlužuje doba desorpce [27].

### **3.2.1.2 Míchání**

Míchání přispívá k ustanovení rovnováhy mezi vláknem a vzorkem, především u molekul s velkou molekulovou hmotností a vysokým difúzním koeficientem. Pro míchání může být použito magnetické míchadlo (rychlost míchání musí být při extrakci konstantní) nebo ultrazvuk. Dále může být uskutečněno pohybem nádoby nebo vlákna. Nevýhodou magnetického míchadla je špatné udržení konstantních otáček. V HS-SPME je nepraktické použít míchání pohybem nádoby a pohybem vlákna. Použití ultrazvuku nemusí být vždy výhodné, protože se vzorek zahřívá. Magnetické míchadlo se používá pro HS-SPME, ale také pro DI-SPME. Navíc míchání pohybem vlákna může být použito pro DI-SPME [27].

### **3.2.1.3 Teplota a doba extrakce**

Teplota při extrakci je kritickým parametrem pro přesnou kvantifikaci vzorku. Při všech extrakcích se musí vždy použít konstantní teplota. Doba extrakce je závislá na době ustavení rovnováhy mezi stacionární fází a stanovovanou látkou. V době od začátku sorpce až do dosažení rovnovážného stavu se bude sorbovat maximální množství stanovované látky. Rychlost extrakce (a tím doba extrakce) je závislá na míchání, rozdělovacím koeficientu a teplotě. Optimální dobu získáme z grafu v závislosti plochy píku na době extrakce. Tam, kde je plocha píku největší, volíme optimální čas extrakce. Při HS-SPME je extrakční čas obvykle kratší než u DI-SPME, protože se využívá zvýšené teploty. Tím lze urychlit přechod stanovované látky do plynné fáze a zkrátit tak celkovou dobu potřebnou pro extrakci [26,27,28].

### 3.2.1.4 Změna pH a přidavek soli

Rozpustnost stanovované látky je dána velikostí pH. Pokud vzorek obsahuje kyselou sloučeninu, extrahuje se lépe z kyselého prostředí. Bazické sloučeniny se lépe extrahují z bazického prostředí. Vhodnou úpravou pH anebo přidavkem soli (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) před extrakcí lze zvýšit iontovou sílu roztoku a tím zvýšit účinnost extrakce málo polárních látek a látek těkavých. [27,28].

### 3.2.2 Přímé ponoření vlákna do roztoku („Direct sampling“ S P M E)

Metoda SPME označená jako „direct sampling“ se používá na všechny druhy kapalných vzorků, které obsahují organické látky. Množství stanovované látky sorbované na vlákno je závislé na různých faktorech a to je: čas, teplota, typ vlákna, druhu sloučeniny atd. Po dosažení rovnováhy mezi matricí a vzorkem platí vztah (1):

$$n_s = K \cdot V_1 \cdot c_2^0 \quad (1)$$

$n_s$ .....množství stanovované látky nasorbované na stacionární fázi,

$K$ .....rozdělovací konstanta stanovované látky rozdělené mezi polymerní vrstvu a vzorek,

$V_1$ .....objem polymerní vrstvy,

$c_2^0$ .....počáteční koncentrace stanovované látky ve vzorku.

Množství stanovované látky sorbované na polymerní vrstvu z malého objemu vzorku vyjadřuje následující vztah (2).

$$n_s = \frac{K \cdot V_1 \cdot c_2^0 \cdot V_2}{K \cdot V_1 + V_2} \quad (2)$$

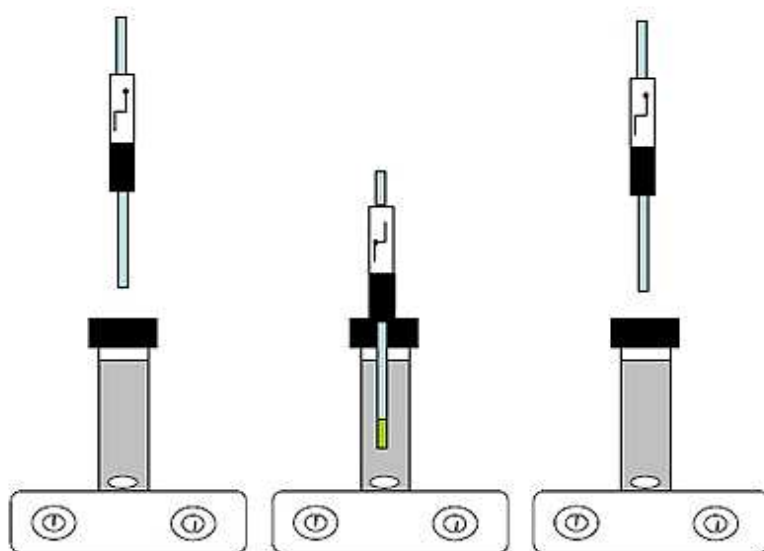
$V_2$ .....objem vzorku. [22,28]

Z uvedené rovnice vyplývá lineární vztah mezi počáteční koncentrací stanovované látky ve vzorku a množstvím stanovované látky, která se sorbuje na vlákno. Materiály používané na pokrytí vlákna se vybírají s ohledem na co nejvyšší hodnoty  $K$ , což způsobuje vysokou sorpční schopnost vlákna se selektivním efektem. Hodnota  $K$  obvykle není dost vysoká na to, aby se stanovovaná látka úplně extrahovala z matrice a proto je metoda SPME metodou rovnovážnou (kapacita vlákna je též nízká).



Když je objem vzorku  $V_2$  dostatečně velký, množství stanovované látky extrahované na vlákne nezávisí na objemu vzorku. Proto je SPME vlákno ideální na odběr vzorků v terénu, expozici na vzduchu, ponoření do jezera, řeky, či studně. Významně se zkracují časy potřebné na přípravu vzorku k analýze. Kombinují se totiž operace vzorkování, extrakce, zakoncentrování a dávkování do jednoho kroku [18].

Při použití SPME jako „direct sampling“, které je znázorněno na obrázku 9., jehla propíchně septum a vysune se vlákno přímo do vzorku, kde dochází k extrakci stanovované látky. Až je dosaženo rovnováhy, vlákno se zasune do jehly a poté je vytaženo se stanovovanou látkou z nádobky. Nakonec je vlákno zavedeno do GC nebo LC chromatografu [29].



**Obr. 9.:** Přímé ponoření vlákna do vzorku [29].

### 3.2.3 Extrakce z prostoru plynné fáze („headspace“ SPME)

Pro postupy uvažující extrakci analyzovaného materiálu plynem a následující chromatografickou analýzu plynného extraktu je užíván název - „headspace“ analýza. Jde v podstatě o plynově chromatografickou analýzu těkavých složek obsažených v plynné fázi, která je ve styku, zpravidla i v rovnováze s analyzovanou kondenzovanou fází. Jedná se o nepřímou metodu analýzy, při níž je obsah dané složky v kondenzované fázi určován podle výsledku analýzy plynné fáze v systému. Při identifikaci složek se nesetkáváme s problémy, avšak pro kvantitativní analýzu je nutno brát v úvahu

vlastnosti analyzovaného systému jako celku, především vlastnosti, jež charakterizují systémy plyn/kapalina a plyn/tuhá fáze [30].

„Headspace“ SPME technika může být použita na analýzu organických složek z různých matric vzorků. Vrstva stacionární fáze může být chemicky vázaná kapalina, případně tuhá látka „Headspace“ SPME je trojfázový systém složený z:

- vrstvy polymerní fáze
- „headspace“ (plynné fáze)
- matrice vzorku

Organické složky jsou rozdělovány mezi všechny tři fáze podle afinity ke každé z nich. Headspace SPME zahrnuje dva stavy rovnováhy: mezi plynem a kapalinou a mezi sorbentem a plynem. Tento režim chrání vlákno před poškozením vlákna [22,28].

Protože polymerní vrstvy vlákna jsou velmi podobné stacionárním fázím v GC kolonách, je dosaženo rovnovážného rozdělení mezi polymerní vrstvou a plynem. Pokud je ustálená rovnováha mezi všemi třemi fázemi, množství stanovovaných látek sorbovaných na polymerní vrstvu je určena následujícím vztahem (3):

$$n = \frac{c_0 V_1 V_2 K_1 K_2}{K_1 K_2 V_1 + K_2 V_3 + V_2} \quad (3)$$

$c_0$ ..... počáteční koncentrace stanovované látky v matrici vzorku,

$K_1$ .....rozdělovací konstanta mezi sorbentem a plynem,

$K_2$ ..... rozdělovací konstanta mezi plynem a matricí,

Rozdělovací konstanty se vztahují na objemy

$V_1$ ..... objem polymerní vrstvy,

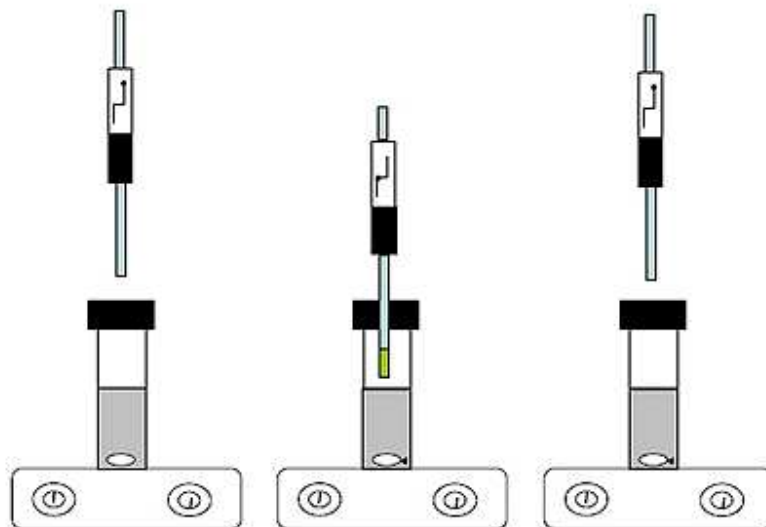
$V_2$ .....objem matrice,

$V_3$ .....objem plynné fáze.

Technika „headspace“ SPME je založená na rovnováze stanovované látky mezi uvedenými fázemi. Podle vztahu (3) můžeme vypočítat množství stanovované látky nasorbované na polymerní vrstvu po ustálení rovnováhy. Čas vzorkování pro „headspace“ SPME je relativně krátký [22].

Metoda označena jako „headspace“ SPME využívá extrakci stanovované látky z prostoru plynné fáze (obr. 10). Jehla propíchně septum a po vytažení vlákna nad

hladinu stanovované látky dochází k sorpci na vrstvy pokrývající vlákno až do ustanovení rovnováhy. Poté se vlákno zasune do jehly a je vytaženo i se stanovovanou látkou z nádoby. Nakonec je jehla zavedena do LC nebo GC [29].

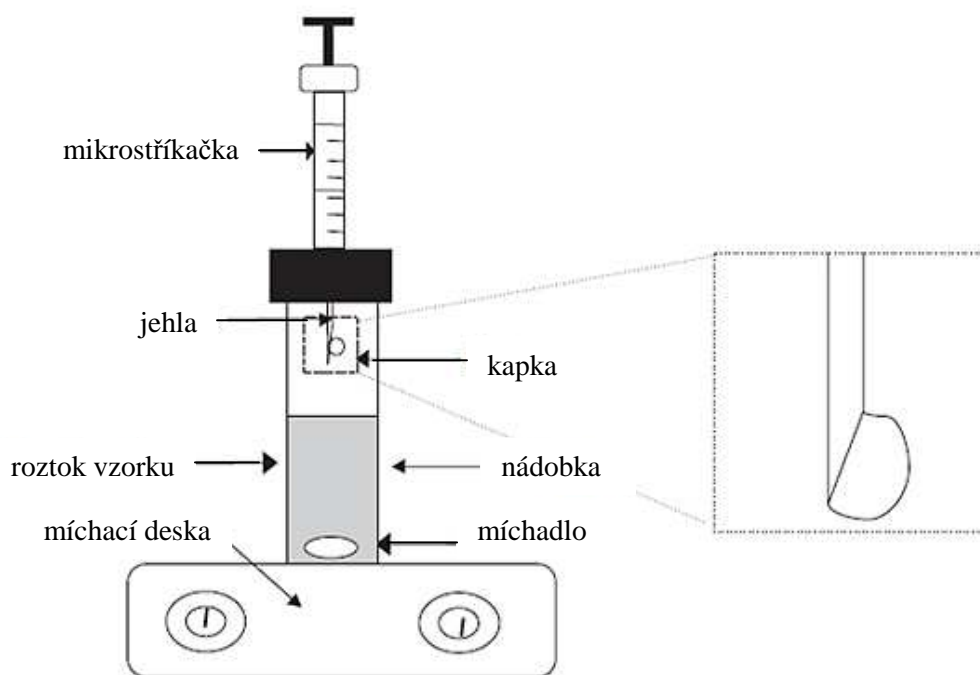


**Obr. 10.:** „Headspace“ SPME [29].

### 3.3 Mikroextrakce na jedné kapce (SDME)

SDME byla jako první navržena Michaelem A. Jeannotem a Frederickem F. Cantwellem v druhé polovině devadesátých let dvacátého století, byla původně ve spojení s plynovou chromatografií. Metoda je nenáročná, jednoduchá, nevyžaduje použití organických rozpouštědel a na její použití nejsou potřeba velké náklady. V současné době se stala používanou metodou pro analýzu různých skupin látek. Podobně jako SPME tak i SDME může být prováděna způsobem přímého ponoření do roztoku nebo „headspace“ extrakce z prostoru plynné fáze.

SDME je založena na principu rozdělení stanovované látky mezi organickou fází a vodnou fází. Metoda je vybavena mikrostríkačkou s jehlou. Jehla slouží k propíchnutí septa uzavřené nádoby. Po umístění jehly do požadované polohy je vytvořena kapka. Schéma SDME je zobrazeno na obr. 11. Vodný vzorek se míchá a po dokončení extrakce se kapka natáhne zpět do mikrostríkačky. Poté se nadávkuje do chromatografu. Obvykle se používá plynová chromatografie (GC), ale v současné době lze kombinovat SDME i s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a atomovou absorpční spektroskopií (AAS) [29,31,32].



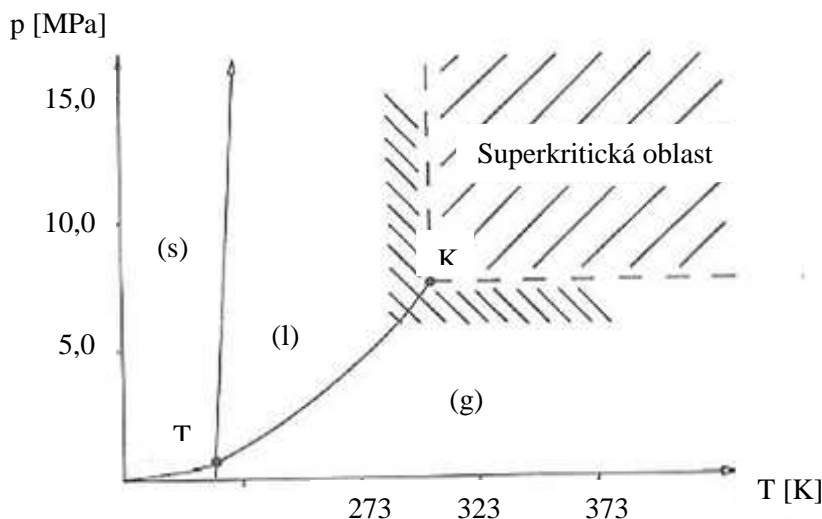
**Obr. 11.:** Schéma SDME [29].

V případě DI-SDME je mikrokapka vytvořená na konci jehly a ponořena přímo do vzorku. Aplikace DI-SDME je omezena na použití středně polárních a nepolárních stanovovaných látek. Kromě toho musí být použita rozpouštědla nemísitelná s vodou [33]. V HS-SDME je mikrokapka vytvořená na konci jehly ponechána nad roztokem vzorku. Nabízí snadné ovládání, široké použití rozpouštědel, dobrou opakovatelnost a automatizaci [34]. Výhodou HS-SDME je větší možnost výběru vláken oproti metodě HS-SPME. Náklady na použitá vlákna u HS-SDME jsou zanedbatelné v porovnání s náklady na HS-SPME vlákna [33].

### 3.4 Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE)

Extrakce nadkritickými tekutinami je technika, která využívá specifických vlastností nadkritických tekutin. Z hlediska fyzikálně-chemických vlastností tvoří nadkritické tekutiny přechod mezi plynem a kapalinou a vykazují zajímavé vlastnosti, jako jsou zejména vysoká hustota a vysoká extrakční rozpustnost. Nízká viskozita bezprostředně souvisí s vysokými hodnotami difuzních koeficientů, které příznivě ovlivňují kinetiku extrakce [35].

Při teplotách vyšších než kritická teplota nelze páry látky zkapalnit při žádném tlaku (obr. 12). Při teplotách a tlacích větších než přísluší kritickému bodu, se látka nachází v nadkritické (superkritické) oblasti. Zde již nelze rozlišit kapalnou a plynnou fázi. Zkapalnění za těchto podmínek není možné ani vysokým tlakem [16,30].



**Obr. 12.:** Fázový diagram CO<sub>2</sub> [36].

Nejčastěji se jako extrakční činidlo pro SFE používá oxid uhličitý. Mezi jeho hlavní výhody patří relativně snadné dosažení nadkritické teploty a tlaku (31,1 °C, 7,43 MPa), je netoxický a nehořlavý, snadno dostupný v přijatelné čistotě i ceně, málo reaktivní, jeho polarita a extrakční síla je srovnatelná s hexanem. Problém klesající extrakční účinnosti CO<sub>2</sub> s rostoucí polaritou stanovované látky se řeší přidávkem vhodné polární látky (methanol, acetonitril, apod.) [35].

Z hlediska provedení lze extrakci rozdělit na statickou a dynamickou. Při statické extrakci je extrakční cela se vzorkem naplněna tekutinou a systém je ponechán v klidu (ustavení rovnováhy). Po určité době je extrakt vypuštěn do sběrné

nádoby a celý postup opakován. Při dynamické extrakci je rozpouštědlo čerpáno kontinuálně skrze extrakční celu se vzorkem. Výhodou dynamické SFE je, že vzorek je neustále v kontaktu s čerstvým fluidem. Tento způsob provedení je mnohem častější [30]. Vzorek je vložen do extrakční nádoby. Po naplnění nádoby oxidem uhličitým probíhá extrakce. Z nádoby je oxid uhličitý s rozpuštěnými složkami převeden do separátorů, kde se změnou teploty a tlaku, odděluje vzorek od extrakčního média [37].

Původem zájmu o SFE byla především snaha odstranit nebo alespoň minimalizovat nevýhody konvenčních extrakčních metod. Možnosti SFE jsou dále umocněny možností přímého (on-line) spojení s některými analytickými metodami (GC, SFC) [30].

## 4 Aplikace SPME

Vůně a chuť jsou jedním z nejdůležitějších kritérií kvality čerstvých a zpracovávaných potravin. Kvalitativní i kvantitativní informace slouží pro charakterizaci sloučenin produkujících aroma. Aroma, které produkují určité sloučeniny, se vyskytuje převážně ve velmi malých koncentracích a skládají se ze široké škály organických sloučenin, které mají různou polaritu a reaktivitu. Běžně používané metody odběru vzorků, například parní destilace nebo extrakce organickými rozpouštědly, jsou časově náročné. Kromě toho mohou vzniknout artefakty z nečistot, které jsou obsaženy v rozpouštědlech. SPME je vhodná technika aplikovatelná na analýzu pevných, kapalných a plynných látek. Mohou to být polymery, pudy, korkové zátky, listy rostlin, pevné rostlinné extrakty nebo různé vonné látky v potravinách. SPME metody v kombinaci s GC-FID a GC-MS se používají pro analýzy různých těkavých látek v zelenině a ovoci. Autoři článku [17] uvádějí detekci těkavých sirných organických sloučenin (např. dimethyltrisulfidu) v lanýži. Dále, že nejvhodnějším vláknem pro extrakci mentolu analyzovaného technikou HS-SPME-GC-MS je CAR/PDMS. V článku také uvádějí aplikaci techniky HS-SPME-GC-FID pro analýzu aromatických látek v ovocných šťávách. Nejvhodnějším vláknem pro extrakci těchto aromatických látek je PA vlákno. Vybrané příklady látek způsobujících aroma, které byly analyzovány, jsou uvedeny v tabulce 3 [17,38].

**Tab. 3.:** SPME pro analýzu potravin [17].

Látky způsobující aroma	Potravina	Vlákno	Extrakce	Teplota extrakce [°C]	Čas [min]	Teplota desorpce [°C]	Detekce
Sírné aroma	Lanýž	95 $\mu$ m PDMS	HS	80	30	220	GC-IT-MS
Mentol	Byliny	65 $\mu$ m CAR-PDMS	HS	50	10	250	GC-MS
Pomerančové aroma	Pomerančový džus	100 $\mu$ m PDMS	HS	40, 60	30, 20	220	GC-MS
Vinné aroma	Víno	85 $\mu$ m PA	HS	60	15	220	GC-FID
Mastné kyseliny	Sýr	85 $\mu$ m PA	HS	60	30	250	GC-FID

## 4.1 Rostlinné matrice

### 4.1.1 Analýza rostlinných silic

Ke stanovení obsahu silic pomocí plynové chromatografie lze využít i mikroextrakční metody. Jde především o mikroextrakci tuhou fází (SPME) a mikroextrakci na jedné kapce (SDME) [39].

Autoři článku Adam a kol. [40] k analýzám použili rostliny zakoupené z Botanicus s.r.o. (Ostrá, Česká republika). Jednalo se o mátu peprnou (*Mentha piperita* L.), levanduli lékařskou (*Lavandula augustifolia* L.) a šalvěj lékařskou (*Salvia officinalis* L.). Všechny rostliny byly nasbírány v průběhu období od května do července 2007. Listy byly odděleny od zbytku rostliny, sušené při laboratorní teplotě a pak uloženy v tmavých prachovnicích při 4 °C. Před rozbořem byly vzorky rozmělněny v třecí misce.

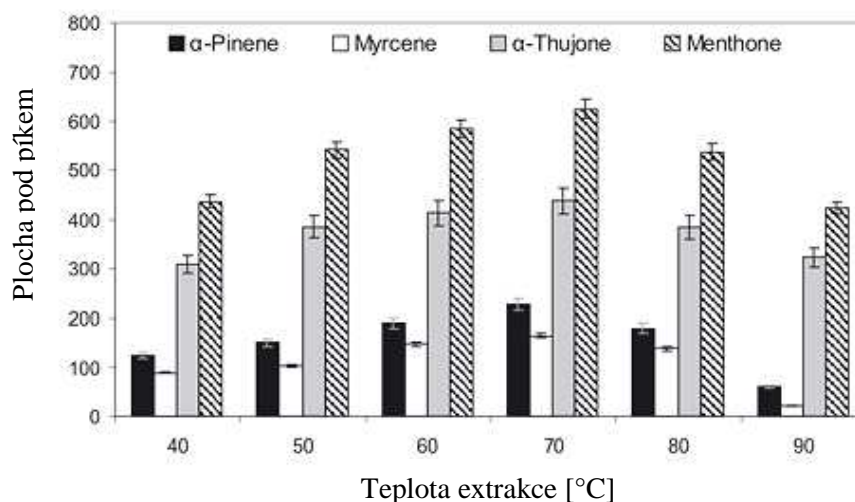
Mikroextrakce na jedné kapce byla provedena v 10ml skleněných nádobkách s PTFE septem. Před extrakcí byl vzorek převeden do nádobky předeřáté na extrakční teplotu po dobu 10 minut. Před každou extrakcí byla mikrostríkačka promyta rozpouštědlem, aby se odstranily přebytečné bublinky. Po propíchnutí septa stríkačka dosahovala 0,5 cm nad povrch vzorku a na špičce jehly byla vytvořena kapka o 2  $\mu$ l. Vzorek byl udržován při teplotě 70 °C. Po 90 sekundách byla stríkačka vložena do nástřikového prostoru plynového chromatografu [40].

Před prvním provedení SPME byla vlákna vložena do nástřikového prostoru plynového chromatografu, aby se odstranily případné nečistoty (kondicionace vlákna, při teplotě 220 °C po dobu 30 minut. Všechny extrakce byly provedeny v 10ml nádobkách s PTFE septem. Analyzované vzorky (0,5 g) byly vloženy do nádobek a předeřátý na teplotu extrakce po dobu 10 minut. Vlákno SPME (50/30  $\mu$ m DVB/ CAR/PDMS) bylo vloženo do prostoru plynné fáze nad vysušený vzorek. Jako optimální podmínky byly zjištěny: doba extrakce 25 minut a teplota 70 °C. Vlákno bylo desorbováno v nástřikovém prostoru plynového chromatografu, kde proběhla desorpce při 220 °C [40].

Všechny vzorky byly analyzovány pomocí GC-FID systém HP5890 (Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA) vybavený kapilární kolonou Ultra 2 (25 m  $\times$  0,32 mm I.D. s tloušťkou filmu 0,52  $\mu$ m z PDMS) [40].

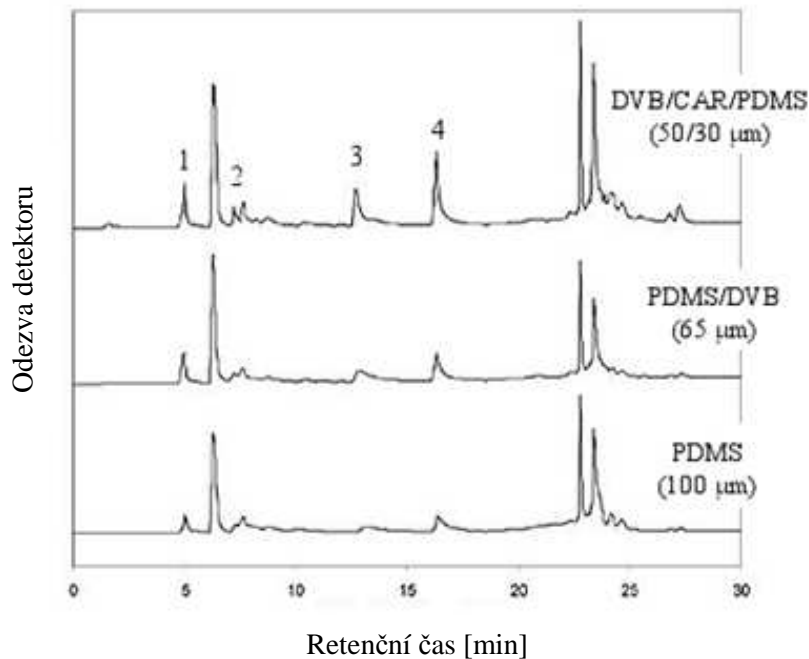


Při optimalizaci určitých veličin pro SPME bylo nutné, aby se dosáhlo maximální účinnosti extrakce. Jako optimální hmotnost sušeného vzorku byla stanovena na 0,5 g do 10ml nádoby. Optimální teplota byla vybrána 70 °C. Výsledky analýzy jsou uvedeny na obrázku 13. Na obrázku 14 jsou uvedeny výsledky analýzy pro optimální čas. Z grafu je zřejmé, že pro tři různé typy vlákna je optimální čas 25 minut [40].



**Obr. 13.:** Optimální teplota pro HS-SPME [41]

Faktory, které ovlivňují proces SDME, mohou být vhodný výběr rozpouštědla, objem rozpouštědla, teplota a čas. Jako optimální podmínky byly zjištěny 2 µl p-xylynu při teplotě 70 °C po dobu 90 sekund s použitím 0,5 g vzorku v 10ml nádobkách.



**Obr. 14.:** Chromatogram pro různá SPME vlákna [40].

Ve studii byly metody hodnoceny v rámci meze stanovitelnosti (LOQ) a meze detekce (LOD). Přesnost byla uvedena jako relativní směrodatná odchylka (RSD). Analýza byla provedena na dvanácti vzorcích.

Pro SPME u dvanácti vzorků se LOD pohybovala v rozmezí 57,0 až 139,8  $\mu\text{g}$  na 100 g vzorku. LOQ se pohybovala v rozmezí 189,8 až 466,1  $\mu\text{g}$  na 100 g vzorku.

Pro SDME u stejných vzorků se LOD pohybovala v rozmezí 2,5 až 20,5  $\mu\text{g}$  na 100 g vzorku. LOQ se pohybovala v rozmezí 8,4 až 68,4  $\mu\text{g}$  na 100 g vzorku [40].

Na základě hodnot LOD a LOQ bylo zjištěno, že metoda SDME je citlivější. Nicméně metoda SPME vykazuje nižší hodnoty RSD, je tedy přesnější. Pro kvalitativní analýzu silic ve vzorcích, jsou obě metody srovnatelné [40].

#### 4.1.2 Analýza květinových vůní

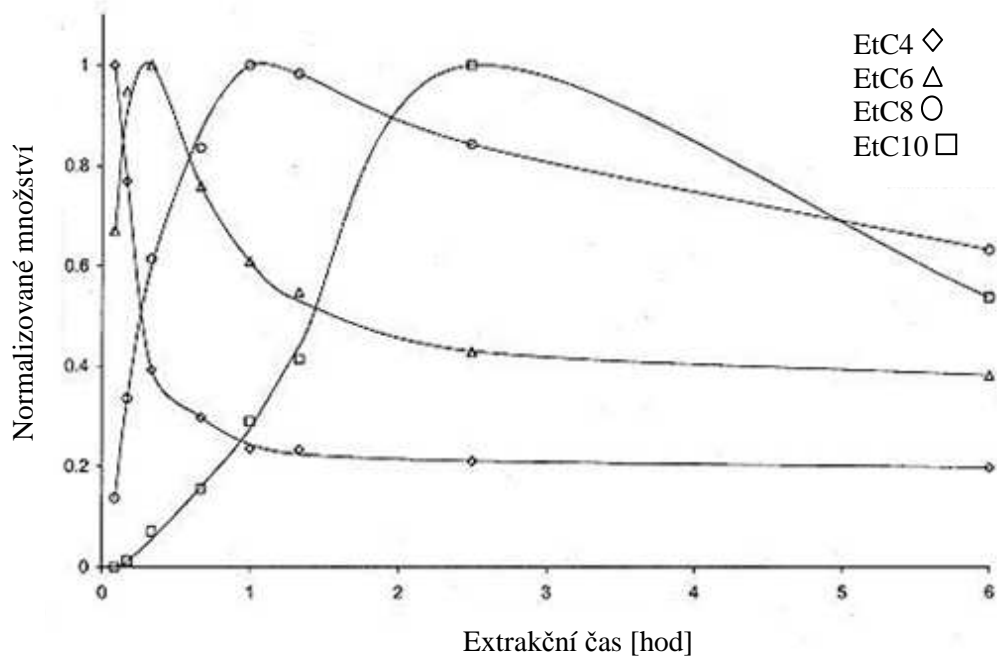
Autoři článku Barták a kol. [41] analyzovali vzorky rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis L.*), vína, hrachoru jarního (*Lathyrus vernus L.*) a vstavače bledého (*Orchis pallens L.*). Rostliny byly sbírány v Bílých Karpatech (Česká republika) v dubnu 2002 a zasazeny do skleníku.

Všechny vzorky byly analyzovány pomocí GC-MS v systému HP 6890 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) vybavený HP-5MS kolonou (30 m x 0,25 mm I.D. s tloušťkou filmu 0,25  $\mu\text{m}$ ).

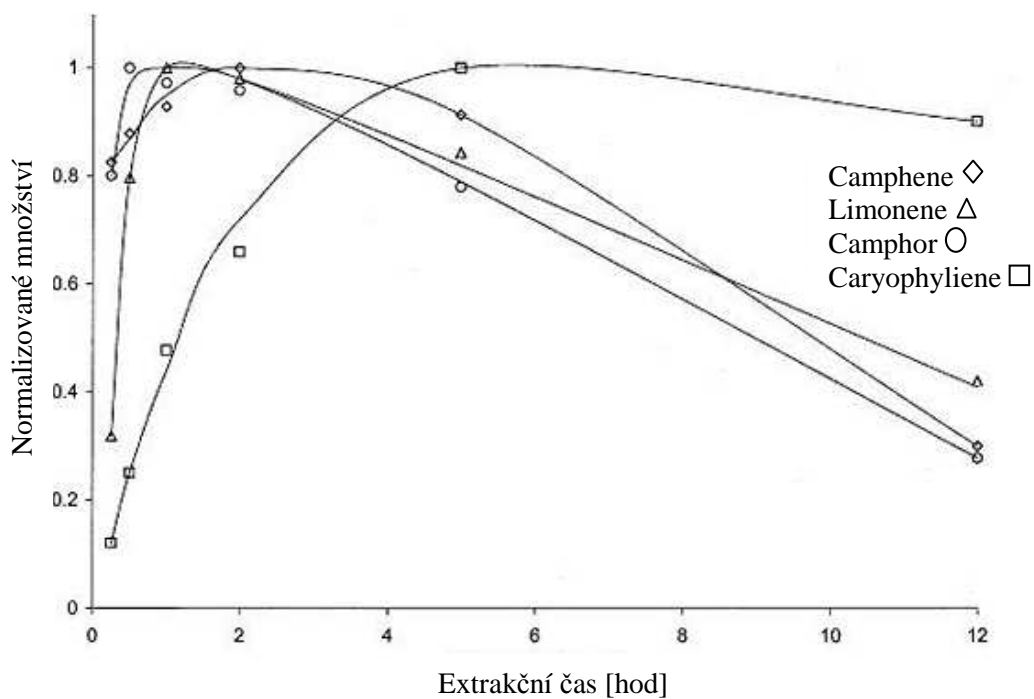
Před každou analýzou byla vlákna čištěna 10 minut při 250 °C. Vzorky rozmarýnu (jeden květ nebo 0,4 g sušených a natrhaných listů) byly umístěny do 300ml skleněné baňky (dnem vzhůru) s otvorem ve dně, sloužící k zavedení vlákna. Kapalné vzorky byly umístěny do 40ml nádobek uzavřených silikonovým septem. Ve všech případech byla použita technika headspace. Sorbce probíhala na vlákno Carboxen<sup>TM</sup>/PDMS StableFlex<sup>TM</sup> (85  $\mu\text{m}$ ). Sorpce byla provedena po dobu 1 hodiny. Stanovované látky byly desorbovány 5 minut při 250 °C v plynovém chromatografu. Další pořadí analýzy probíhalo v cyklu: slepý vzorek, vstavač I, hrachor I, slepý vzorek, vstavač II, slepý vzorek. Celá sekvence se opakovala následující den v opačném pořadí. Jako další vzorek bylo analyzováno bílé víno (Rulanské Bílé, 1997, Velké Bílovice). Třicet mililitrů vína bylo odpipetováno do 40ml nádoby a extrakce byla provedena v prostoru plynné fáze. Vzorek byl desorbován při 250 °C po dobu 5 minut v plynovém chromatografu [41].

SPME z malého objemu plynné fáze nad vzorkem vede ke konkurenční sorpci stanovovaných látek. Obrázek 15 popisuje vliv konkurenční adsorpce ethylesteru kyseliny máselné, kyseliny kapronové, kaprylové a dekanové kyseliny jako funkce času ve vzorku vína. Na obrázku 15 je vidět, že s rostoucím časem se zvyšuje sorpce jednotlivých sloučenin, následně projde maximem a pomalu klesá s dalším prodloužením extrakce. Proto těkavé látky s nízkou molekulovou hmotností se rychle odpaří do plynného prostoru a mohou být rychle extrahovány. Látky s vyšší molekulovou hmotností se získávají z prostoru plynné fáze stejně dobře, ale jeho koncentrace v tomto prostoru je nízká, vzhledem ke své nízké těkavosti. Proto extrakce takovéto látky trvá mnohem déle.

Stejný jev byl pozorován při extrakci rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis L.*). Z poznatků obrázků 15 a 16 byl určen čas extrakce na 60 minut.



**Obr. 15.:** Časová závislost účinnosti HS-SPME pro ethylestery mastných kyselin ve vzorku vína.



**Obr. 16.:** Časová závislost účinnosti HS-SPME pro vybrané terpeny rozmarýny lékařského (*Rosmarinus officinalis L.*)

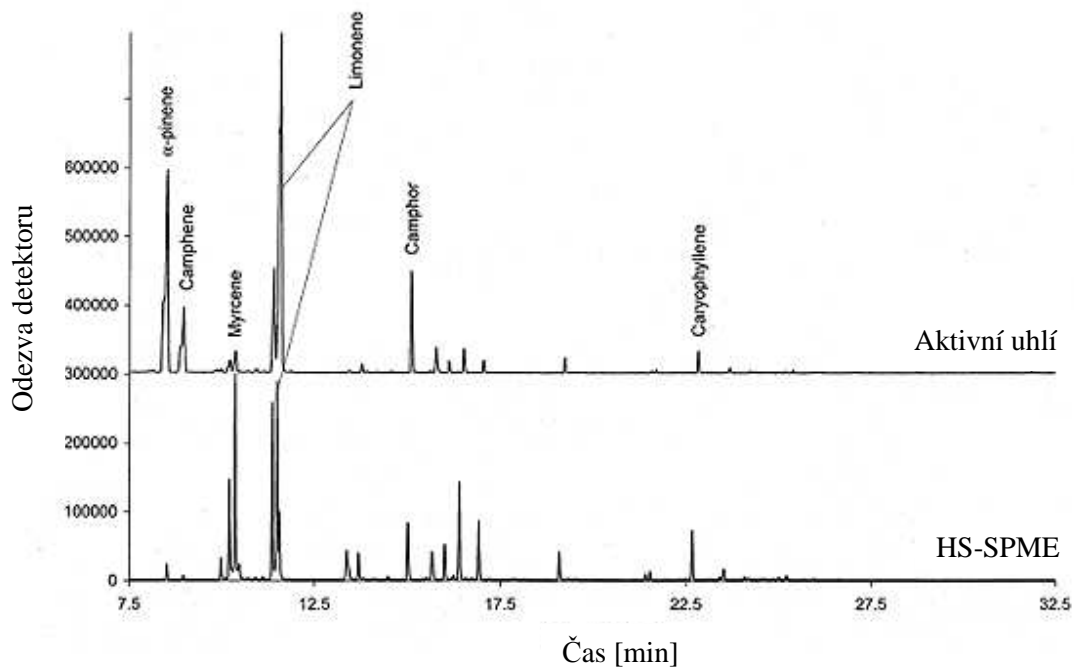
Dále byly studovány relativní směrodatné odchylky (RSD) čtyř vzorků jedné stanovované látky (PV) a čtyřikrát opakované analýzy vzorku jedné stanovované látky (SV) u vína a rozmarýnu. V tabulce 4 jsou uvedeny RSD zmíněných vzorků.

**Tab. 4.:** Relativní směrodatné odchylky zmíněných vzorků [41].

Vino			Rozmarýn lékařský		
sloučenina	RSD [%]		sloučenina	RSD [%]	
	PV	SV		PV	SV
ethylester kyseliny máslé	1,35	2,79	$\alpha$ -pinen	26,34	14,04
ethylester kyseliny kapronové	2,27	6,94	camphen	34,33	10,04
ethylester kyseliny kaprylové	2,75	8,59	myrcen	8,7	7,56
ethylester kyseliny dekanové	3,47	44,51	limonen	10,91	7,26
myrcen	2,85	5,76	camfor	38,84	6,21
limonen	2,25	4,72	caryofilen	20,04	7,13
<b>průměr</b>	<b>2,49</b>	<b>12,22</b>	<b>průměr</b>	<b>23,19</b>	<b>8,71</b>

Vstavač bledý a hrachor v jarní přírodě takzvaně soutěží o opylení hmyzem. HS-SPME metoda byla určena jako optimální metoda pro studium chemického složení vůní obou rostlin [41].

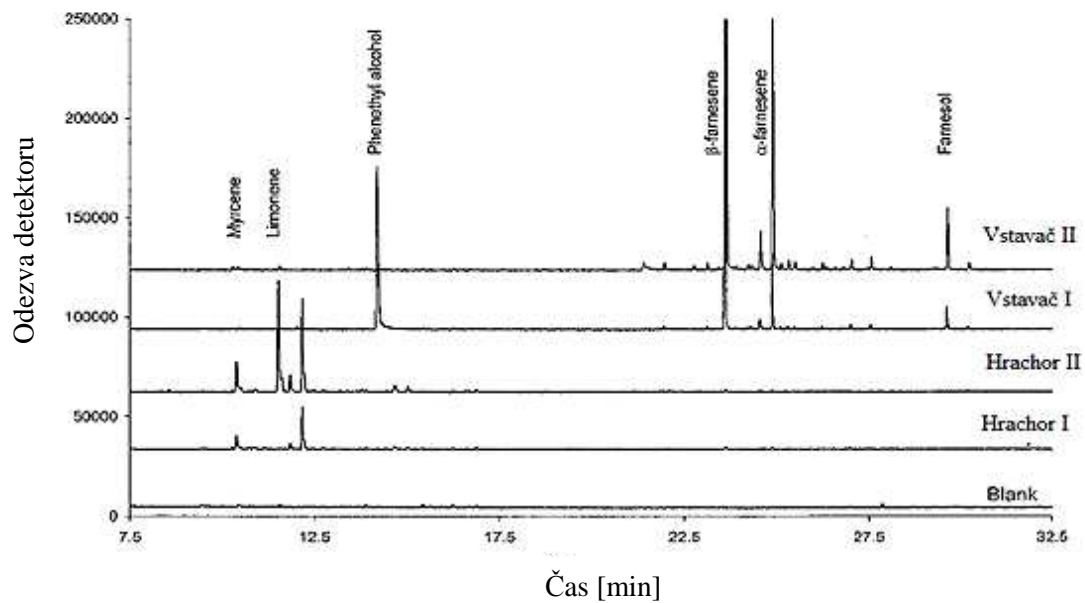
Metoda HS-SPME byla porovnána s adsorpcí vonných látek na aktivní uhlí a následnou extrakcí organickým rozpouštědlem. Chromatogramy obou metod jsou uvedeny na obrázku 17. Obrázek ukazuje, že všechny důležité sloučeniny jsou detekovány v obou metodách s výjimkou  $\alpha$ -pinenu, camfenu a sloučeniny v okolí myrcenu.



**Obr. 17.:** Porovnání metody HS-SPME a extrakci na aktivní uhlí pro rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis L.*) [41].

HS-SPME je schopna registrovat mezidruhové změny chemického složení vůní různých rostlin. Metoda je schopna zaznamenat kvantitativní i kvalitativní rozdíly ve složení látek způsobujících vůni rostlin. Kvantitativní rozdíly, zobrazeny na obrázku 18, jsou ilustrovány menšími píky u hrachoru I a hrachoru II.

Metodou HS-SPME se dokáží rozeznat rozdíly mezi vstavačem bledým a hrachorem jarním a prokázat chemické rozdíly vůní obou rostlin. Jako hlavní vonné složky hrachoru jarního byly zjištěny  $C_{10}$  sloučeniny (myrcen a limoneny). U vstavače bledého byly zjištěny jako hlavní složky vůní  $C_{15}$  sloučeniny (farnesol a farnesen) [41].



**Obr. 18.:** HS-SPME analýza hrachoru jarního (*Lathyrus vernus L.*) a vstavače bledého (*Orchis pallens L.*) pro porovnání mezidruhových změn chemického složení vůní různých rostlin [41].

## 4.2 Mošusové látky

### 4.2.1 Analýza syntetických mošusových látek v ovzduší

Syntetické mošusové látky jsou široce používané vůně do čisticích prostředků, mýdel, kosmetiky, šampónů, krémů, osvěžovačů vzduchu a dalších. Syntetické mošusové látky obsahují dvě struktury: nitro mošusové struktury a polycyklické mošusové struktury. V posledních letech se výroba nitro mošusových látek značně omezuje, kvůli jejich perzistentním, bioakumulačním a toxickým účinkům. Tato studie ukazuje aplikaci SPME na analýzu syntetických mošusových látek v ovzduší.

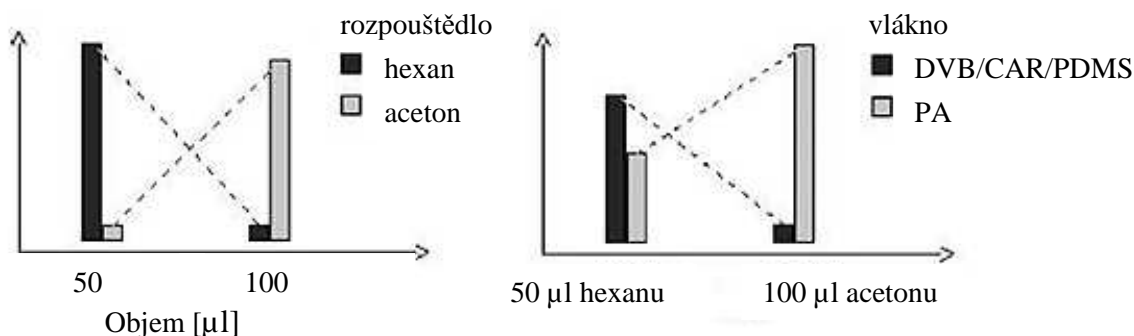
Autoři článku Regueiro a kolektiv [42] nechali různé objemy vzduchu čerpat rychlostí  $100 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$  přes skleněný mikrofiltr obsahující 25 mg Tenax TA (porézní polymerní pryskyřice založená na 2,6-difenyloxidu). Tenax TA byl vybrán jako sorbent vzhledem k rychlé desorpci stanovovaných látek. Sorbent se zachyceným vzorkem byl umístěn do 10ml nádoby, která byla utěsněna PTFE septem. Vzorek byl umístěn do čistého prostoru s laminárním prouděním, aby se zabránilo kontaminaci.

Nádoby, v nichž byl sorbent se vzorkem, byly umístěny do termostatu až po hrdlo, aby byla zajištěna opakovatelnost metody. Vzorek byl ze sorbentu extrahován na SPME vlákno v prostoru plynné fáze. Pro podporu desorpce vzorku z Tenaxu, bylo před ustálením teploty přidáno organické rozpouštědlo k sorbentu. Po dokončení extrakce bylo vlákno vloženo do nástřikového prostoru GC a 5 minut desorbováno [42].

Všechny vzorky byly analyzovány pomocí GC-MS systém Varian 3800, která byla vybavena kapilární kolonou (30 m x 0,25 mm I.D. s tloušťkou filmu 0,25  $\mu\text{m}$ ).

Prvním krokem bylo najít nejvhodnější vlákno pro extrakci. Porovnány byly vlákna PDMS, PDMS/DVB, PA, CAR/PDMS and DVB/CAR/PDMS. Jako nejvhodnější vlákna byly vyhodnoceny PA a DVB/CAR/PDMS. Dále se hledal optimální objem a druh rozpouštědla pro vybraná vlákna. Graf je zobrazen na obrázku 18. Pro PA bylo vybráno 50  $\mu\text{l}$  hexanu a pro DVB/CAR/PDMS bylo vybráno 100  $\mu\text{l}$  acetonu. Jako optimální byl zvolen extrakční čas 20 minut. Optimální objem vzduchu byl vybrán 5  $\text{m}^3$  [42].

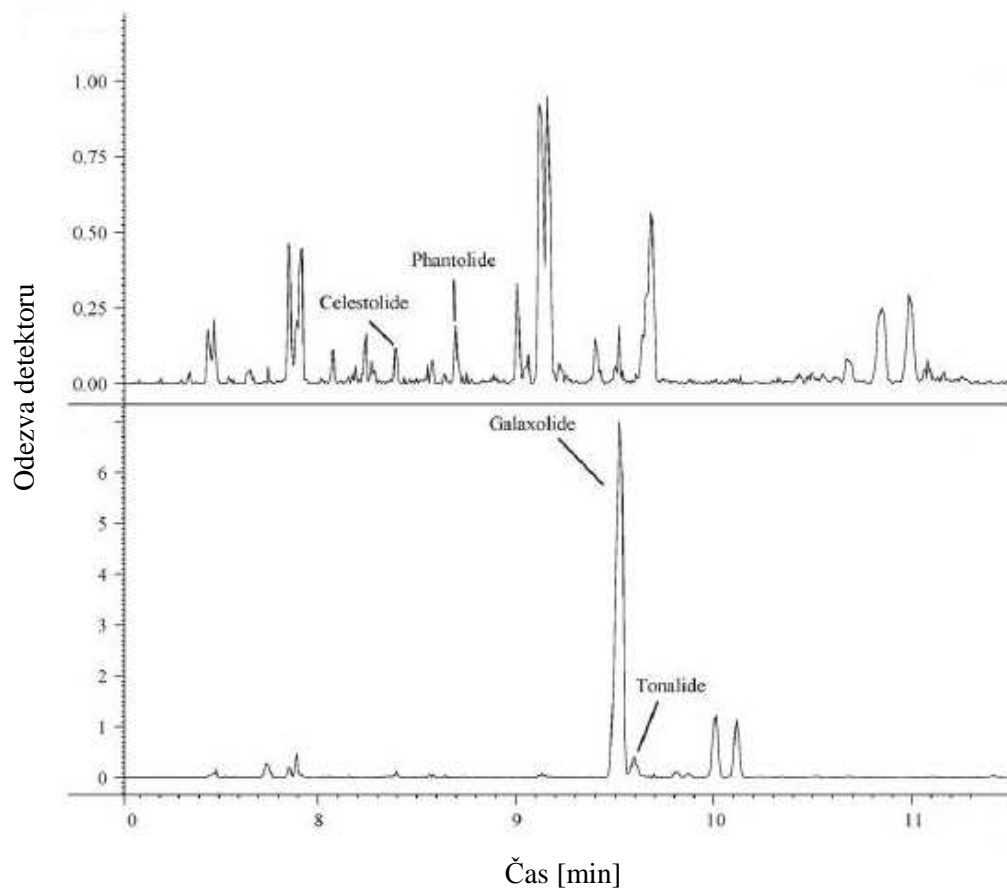




**Obr. 18.:** Optimální objem a druh rozpouštědla pro vybraná vlákna [42].

Aby bylo možné odhadnout LOD, bylo nutné provést analýzu v čistém vzorku vzduchu. Přesto se ve vzorku stanovily galaxolid a tonalid. Hodnoty LOD se pohybovaly od 0,029 do 0,171 ng na 5 m<sup>3</sup> vzduchu. Přesnost metody byla posuzována na základě RSD, která se pohybovala od 3,1 do 14,9 %. Na základě zjištěných RSD a LOD bylo zjištěno, že metoda je přesná a citlivá. Metoda HS-SPME pro stanovení mošusových látek v ovzduší je jednoduchá, rychlá a vysoce výkonná. [42]

Nakonec metoda byla použita k analýze vzduchu v jedné domácnosti ve Španělsku. Galaxolid a tonalid byl nalezen ve všech vzorcích v koncentračních úrovních od 143 do 1129 ng.m<sup>-3</sup> (galaxolid) a od 21 do 77 ng.m<sup>-3</sup> (tonalid). Oba mošusy byly rovněž nalezeny ve vzorku odebraném v laboratoři, které ukazují hodnoty koncentrace 57 ng.m<sup>-3</sup> pro galaxolid a 21 ng.m<sup>-3</sup> pro tonalid. V jednom vzorku odebraného v domácnosti byl zjištěn celestolid v koncentraci 2,6 ng.m<sup>-3</sup> a phantolid v koncentraci 8,5 ng.m<sup>-3</sup>. Chromatogramy vzorků vzduchu odebrané v domácnosti jsou uvedeny na obrázku 19. [42].



**Obr. 19.:** Chromatogramy vzorků vzduchu odebrané v domácnosti ve Španělsku [42].

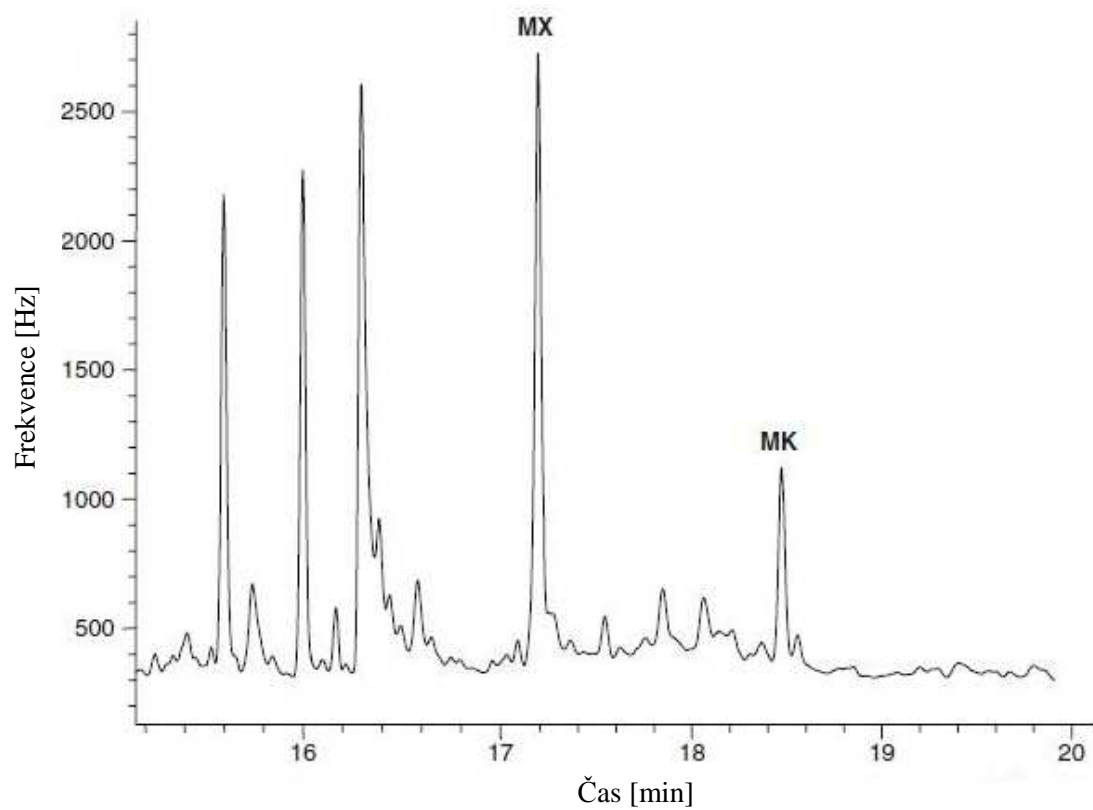
#### 4.2.2 Analýza nitro mošusových látek ve vodě

Tři skupiny mošusových látek byly vyvinuty jako náhrada za extrémně drahé přírodní mošusy. Nitro mošusové látky, polycyklické mošusové látky a makrocyclické mošusové látky. Mezi nitro mošusové látky patří musk xylen (MX), musk ambrette (MA), musk mosken (MM), musk tibeten (MT) a musk keton (MK). Zejména MX a MK jsou nejpoužívanější nitro mošusové látky, hlavně v detergentech a kosmetice. Tyto látky se do životního prostředí dostávají vypouštěním odpadních vod z domácností. Tato studie [48] se zabývá optimalizací SPME pro stanovení nitro mošusových látek v odpadních vodách.

Maria Polo a kolektiv [48] odebrali vzorky odpadní vody z městské kanalizace (město se 125 000 obyvateli). Pro analýzu bylo použito pět vláken 85  $\mu\text{m}$  polyakrylát (PA), 100  $\mu\text{m}$  polydimethylsiloxan (PDMS), 75  $\mu\text{m}$  Carboxen/PDMS (CAR/PDMS), 65  $\mu\text{m}$  PDMS/divinylbenzen (PDMS/DVB) a 65  $\mu\text{m}$  Carbowax/DVB (CW/DVB). Vzorky vody byly umístěny do 22ml nádobek, uzavřeny hliníkovým septem a ponořeny do vodní lázně po dobu 5 minut. Extrakce byla provedena v prostoru plynné fáze po dobu 25 minut. Desorpce byla provedena pomocí plynového chromatografu. Teploty desorpce byly pro CW/DVB 260  $^{\circ}\text{C}$ , PDMS a PDMS/DVB 270  $^{\circ}\text{C}$  a pro PA a CAR/PDMS 300  $^{\circ}\text{C}$ . Jako optimální teplota pro extrakci nitro mošusových látek byla vybrána 100  $^{\circ}\text{C}$ . Zlepšení účinnosti extrakce bylo pozorováno při míchání vzorku, proto byl vzorek při extrakci míchán. Vlákná PDMS/DVB a CAR/PDMS byly zvoleny jako vhodné pro extrakci nitro mošusových látek. Kromě MT a MK pro které bylo zvoleno vlákno CAR/PDMS. Optimální čas extrakce byl zvolen na 25 minut.

Stanovení nitro mošusových látek bylo provedeno nejprve metodou GC- $\mu\text{ECD}$ , protože je citlivá a selektivní pro struktury obsahující dusíkaté skupiny. GC-MS byla použita pro zajištění správné identifikace nitro mošusových látek a k potvrzení GC- $\mu\text{ECD}$  výsledků na základě hmotnostních spekter.

Analýzou bylo zjištěno, že ve vodě odebrané z vodovodu nejsou žádné z hledaných sloučenin. Stopové množství MX a MK byly nalezeny v odpadních vodách. Koncentrace MX a MK se pohybovaly v rozmezí od 2,4 do 15 ng v litru. Obrázek 28 ukazuje chromatogram odpadní vody, kde byly nalezeny sledované látky. [48].



**Obr. 28.:** GC-  $\mu$ ECD chromatogram odpadní vody odebrané v městské kanalizaci [48].

## 4.3 Alkoholické nápoje

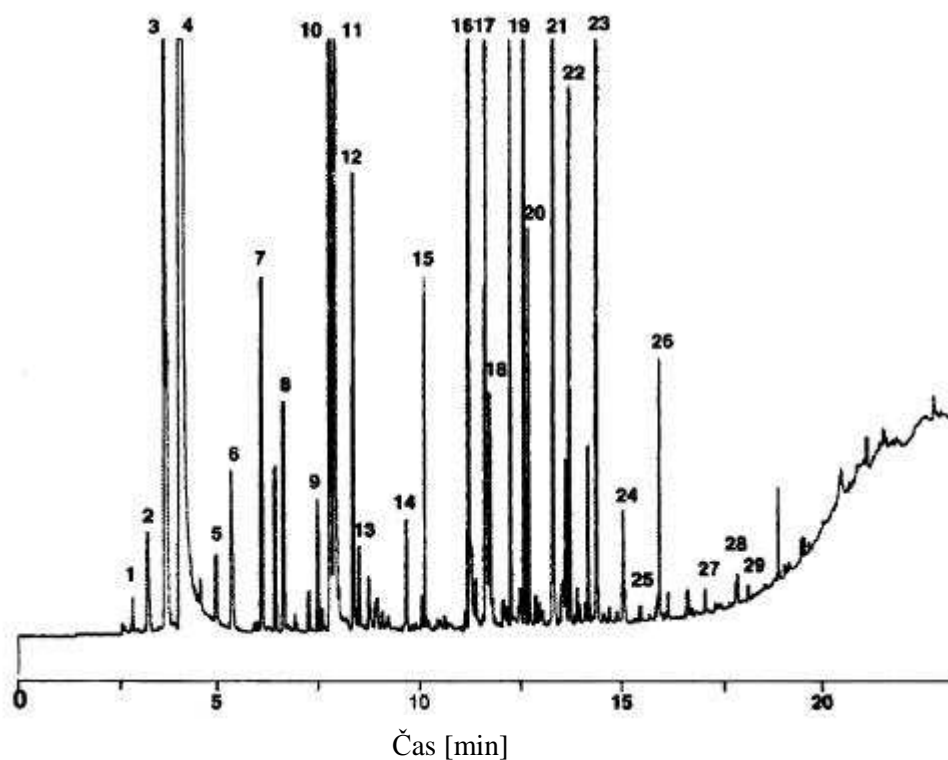
### 4.3.1 Analýza pomerančové pálenky

Pomerančová pálenka je nový ovocný destilát. Získává se destilací za sníženého tlaku (40-47 kPa) z fermentované pomerančové šťávy. Tato studie [45] se zaměřuje na analýzu chuťových a vonných látek v této páence a porovnání metody SPME-GC-FID s SPME-GC-MS.

Carla Da Porto a kol. [45] pro analýzu použili 80% a 40% pálenku zakoupenou z lihovaru Veneto (Itálie). Pět mililitrů pomerančové pálenky bylo smícháno se 100  $\mu$ l *n*-dodekanolu (3,94 g.l<sup>-1</sup> roztoku v ethanolu), který byl použit jako vnitřní standard. Analýza byla provedena pomocí GC-FID ThermoQuest 8000 Top a GC-MS Varian 3400.

Půl mililitru vzorku pomerančové pálenky bylo odpipetováno do 10ml nádobek. K 80% páence bylo přidáno 0,80 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a k 40% páence bylo přidáno 2,36 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nádobky byly uzavřeny a vloženy do vodní lázně (40 °C) po dobu 10 minut. SPME vlákno bylo vloženo do prostoru plynné fáze a vzorek byl extrahován po dobu 5 minut. Po ustálení rovnováhy byl vzorek desorbován pomocí GC-FID. Další vzorek byl desorbován pomocí GC-MS při 250 °C po dobu 2 minut. Pro stanovení byly použity vlákna 100  $\mu$ m PDMS, 65  $\mu$ m DVB, 75  $\mu$ m Carboxen/PDMS a 30/50  $\mu$ m DVB/Carboxen/PDMS. Bylo zjištěno, že optimální vlákno pro analýzu je 30/50  $\mu$ m DVB/Carboxen/PDMS.

Analýzou bylo zjištěno, že při použití SPME-GC-MS se dají stanovit polární a méně polární látky jako jsou složky pomerančové kůry. Naopak analýza SPME-GC-FID je citlivější pro polární látky jako jsou metanol, butanol a iso-amylalkoholy. Na obrázku 25 je znázorněn chromatogram 40% pálenky za použití SPME-GC-FID [45].



**Obr. 25.:** HS-SPME-GC-FID 40% pomerančové pálenky

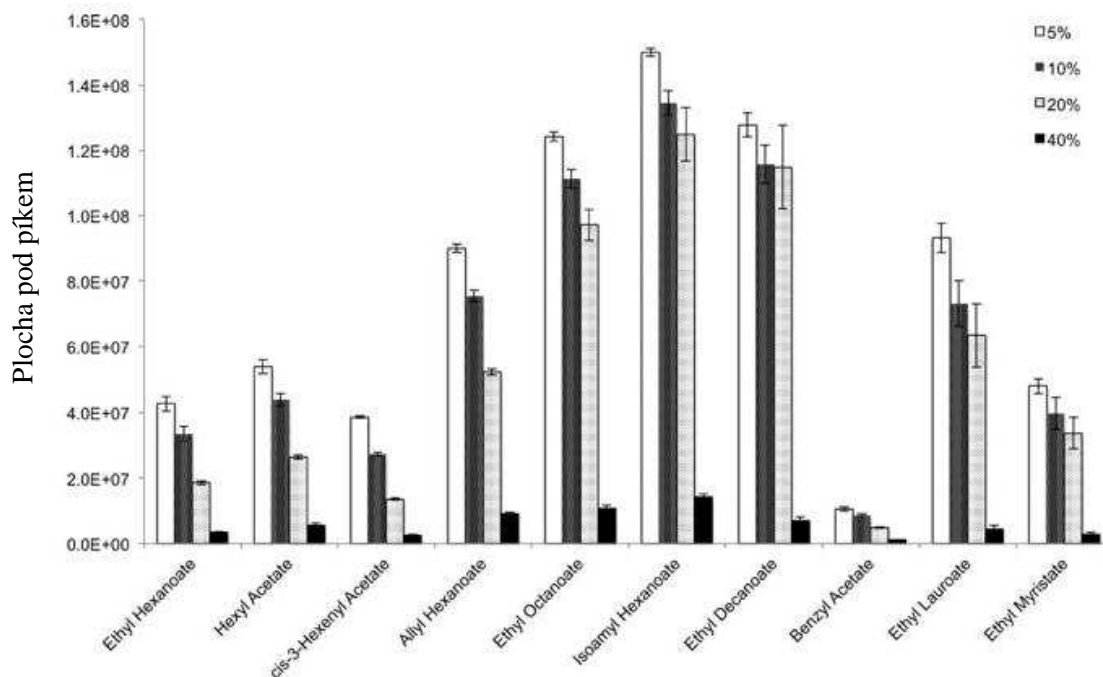
- (1) acetaldehyd, (2) methylacetát, (3) methanol, (4) ethanol, (5) tricyclen,  
 (6) *n*-propanol + ethylbutyrát, (7) iso-butanol, (8) iso-amyl-acetát, (9) 1,4-cineol,  
 (10) limonen, (11) isoamyl alkohol, (12) ethylcaproát (13)  $\gamma$ -Terpinen, (14) monoterpen,  
 (15) ethyllaktát, (16) ethyloktanoát, (17) furfural, (18) *n*-octyl acetát, (19) linalool,  
 (20) oktanol, (21) 4-terpineol, (22) ethylcaprát, (23)  $\alpha$ -terpineol, (24) citronello +  
 sekviterpene (25) nerol, (26) geraniol + ethyllaurát + kapronová kyselina,  
 (27) vnitřní standard, (28) ethylmyristát, (29) kaprylová kyselina [45].

### 4.3.2 Analýza aromatických látek v alkoholických nápojích

Alkoholické nápoje jsou běžně konzumovány po celém světě. Většina výrobků, které jsou dostupné na trhu, jsou pivo, víno a destilované lihoviny. Liší se množstvím alkoholu (zejména ethanolu). Ačkoli ethanol a voda jsou hlavní složky alkoholických nápojů, obsahují také organické sloučeniny, jako jsou estery, alkoholy, přiboudlina, organické kyseliny, karbonylové sloučeniny, aldehydy, laktony a sloučeniny síry, které přispívají k jejich aroma a chuti. Cílem této práce je charakterizovat uvolňování látek určených k aromatizaci alkoholických nápojů.

Shuh-Wen Khio a kolektiv [47] vybrali 10 esterů (ethylhexanoát, hexylacetát, cis-3-hexenylacetát, allylhexanoát, ethyloktanoát, isoamylhexanoát, ethyldekanoát, benzylacetát, ethyllauroát a ethylmyristát), které byly rozpuštěny v 5; 10; 20 a 40 % ethanolu.

SPME analýza byla provedena pomocí carboxen/PDMS vlákna. Deset mililitrů vzorku v 20ml nádobce bylo temperováno při 40 °C po dobu 30 minut. Po extrakci v prostoru plynné fáze byla stanovovaná látka desorbována na plynovém chromatografu po dobu 5 minut při 250 °C. Analýza byla provedena pomocí GC-FID Agilent 6890N, vybavená kapilární kolonou (50 m × 0,25 mm, I.D. s tloušťkou filmu 0,25 μm).



**Obr. 27.:** Vliv množství ethanolu na vybrané látky určené k aromatizaci. Extrakce byly provedeny při 40 °C po dobu 30 minut [47].

Na obrázku 27 je znázorněn vliv obsahu ethanolu na estery, které byly rozpuštěny v 5; 10; 20 a 40 % ethanolu. Z obrázku je patrné, že vyšší obsah alkoholu způsobuje pokles účinnosti extrakce. Shuh-Wen Khio a kolektiv [47] uvádějí, že to zřejmě bylo způsobeno konkurenční sorpcí látek určených k aromatizaci na vlákne. Rozpustnost látek určených k aromatizaci roste se zvyšujícím se obsahem alkoholu. Když je menší množství těchto látek v prostoru plynné fáze, tak je účinnost extrakce nižší. Dále autoři článku zjistili, že rychlost uvolňování více polárních látek ze vzorku (ethylhexanoát, hexylacetát a cis-3-hexenylacetát) je nižší na rozdíl od polárních látek (isoamylhexanoát, ethyldekanoát, ethyllauroát a ethylmyristát) [47].



## 4.4 Potraviny

### 4.4.1 Analýza vonné íránské rýže

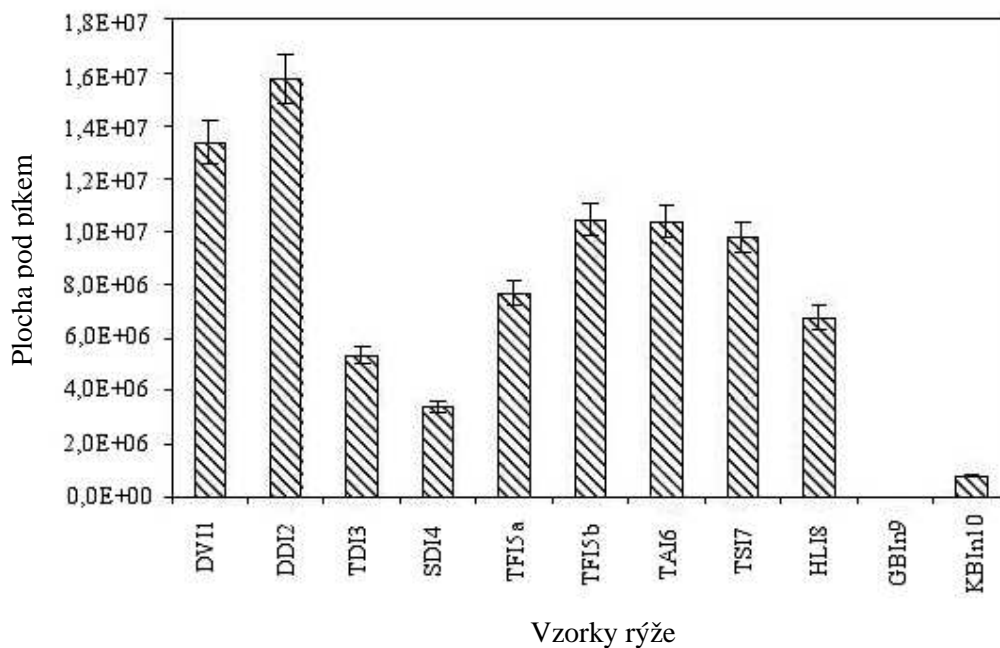
V Iránu a sousedních zemích existuje mnoho vonných rýží, které jsou pěstovány a konzumovány, ale jejich přesné složení není známo. Proto se tato studie zaměřila na analýzu íránské rýže a porovnání s indickou rýží, která je široce spotřebovaná v Severní Americe. Účelem této studie je využití CF-HS-SPME (použití tzv. studeného vlákna v prostoru plynné fáze).

Autoři článku Ghiasvand a kol. použili [43] 9 různých rýží, které jsou konzumovány v Iránu. Čtyři vzorky byly ze západních provincií (DVI1, DDI2, TDI3 a SDI4) a pět vzorků ze severních provincií (TFI5a, TFI5b, TAI6, TSI7 a HLI8). Dále byly analyzovány dvě indické rýže (GBIn9, KBIn10) zakoupeny ve Waterloo (Ontario, Kanada). Vzorky rýže byly rozdrceny a vloženy v nylonových sáčcích do lednice.

CF-HS-SPME byla spojena s autosamplerm (CTC CombiPAL). Jehla CF byla upevněna do držáku na 100  $\mu$ l stříkačku a umístěna do dávkovače. Jehla v dávkovači a v GC byla rozšířena, aby se přizpůsobila pro CF jehlu.

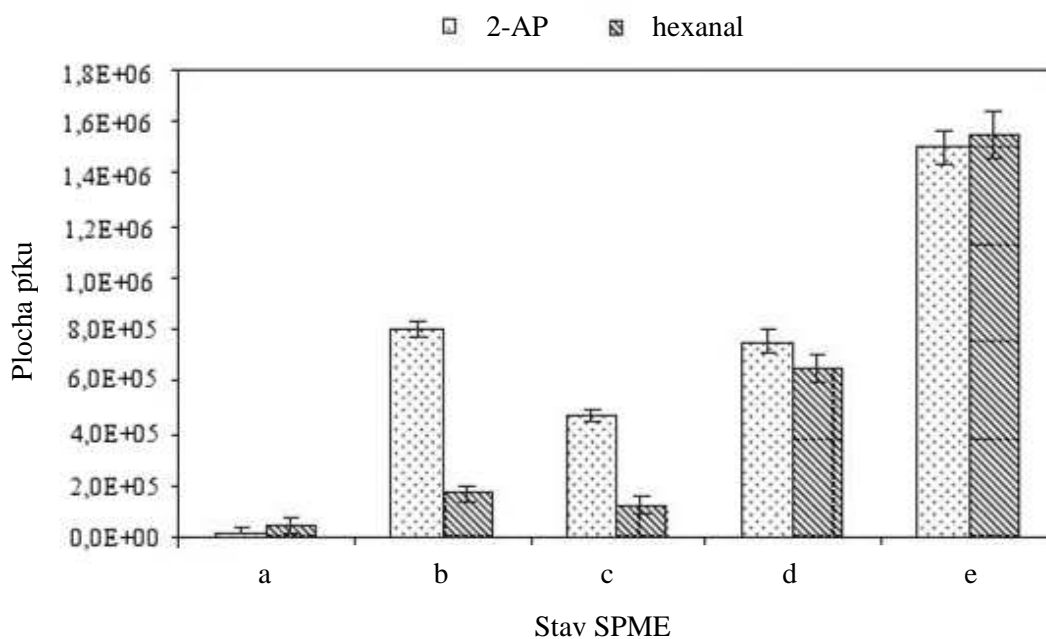
Pro analýzu byl použit plynový chromatograf Agilent 6890N (10 m  $\times$  0,18 mm I.D. s tloušťkou filmu 0,18  $\mu$ m) ve spojení s MS-TOF. Pro stanovení byly použity 2 g rýže. Vzorky byly vloženy do 10ml nádobek a bylo přidáno 200  $\mu$ l čisté vody. Nádobka byla umístěna do míchacího zařízení a mícháno 10 minut. Poté byla provedena extrakce HS-SPME při 60  $^{\circ}$ C po dobu 30 minut. Pro extrakci bylo použito vlákno CF s PDMS a pro porovnání výsledků byly použity další SPME vlákna PDMS (100  $\mu$ m), CAR/PDMS (75  $\mu$ m) a CAR/PDMS (50/30  $\mu$ m). DVB/CAR/PDMS bylo určeno jako nejúčinnější pro extrakci tří cílových sloučenin (hexanal, D-limonen, tetradekan). Na obrázku 20 je znázorněna plocha píku 2-acetyl-1-pyrrolinu (2-AP) ve vzorcích rýže za použití vlákna DVB/CAR/PDMS.

Na obrázku 21 je znázorněno množství hexanalů a 2-AP, který je klíčovou vonnou složkou v rýži. DVI1 a DDI2 rýže obsahuje nejvyšší množství 2-AP a nejnižší množství 2-AP byly získány ze vzorků GBIn9 a KBIn10. Vzorky rýže DVI1 a DDI2 jsou známé pro výbornou chuť a vynikající vůni, na rozdíl od vzorků GBIn9 a KBIn10, které mají špatné chuťové vlastnosti i po uvaření.



**Obr. 20.:** Plocha píků 2-AP ve vzorcích rýže za použití vlákna DVB/CAR/PDMS [43].

Experiment s použitím CF-SPME odhalil, že vonné složky vzorků DDI2 a DV11 a TFI5b a TAI6 jsou bohatší než aromatické složky další vzorků. TFI5b a TAI6 vzorky rýže jsou dobře známé a velmi populární na íránských trzích. Avšak rýže DDI2 je velmi vonná, venkovská odrůda, známá pouze úzkou skupinu spotřebitelů. Proto, další analýzy jsou zaměřené na využití CF-HS-SPME z DDI2 vzorku analyzovaného pomocí GC-MS-TOF. Studie byly provedeny s uvažováním 2-AP jako klíčovou složkou aroma a hexanalů jako důležitých indikátorů oxidačního stavu v rýži. Na obrázku 21 je znázorněn obsah těchto sloučenin za různých podmínek extrakce.



**Obr. 21.:** Srovnání extrakce 2-AP a hexanalu

*a) rozdrčený suchý vzorek za použití PDMS, b) rozdrčený vzorek s přidáním vody za použití PDMS, c) celá zrna s přidáním vody za použití PDMS, d) celá zrna s přidáním vody za použití CF-SPME, e) rozdrčený vzorek s přídavkem vody za použití CF-SPME [43].*

Výsledky ukázaly, že použití CF-HS-SPME/GC-TOF-MS systému (extrakční teplota 100 °C a ochlazení vlákna na teplotu 5 °C) umožnila rychlou a efektivní analýzu těkavých látek ve vzorku. Více než 50 sloučenin s vyhovující citlivostí bylo identifikováno s využitím tohoto systému. [43]

#### 4.4.2 Analýza kimchi

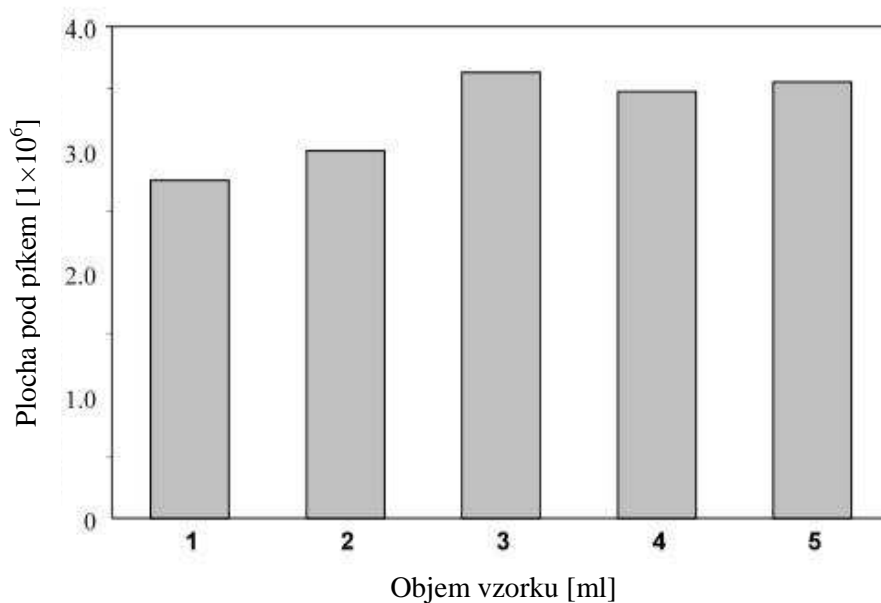
Kimchi je tradiční korejský pokrm z kysané zeleniny. Jeho hlavní složkou je čínské zelí s jinými složkami, jako je pepř, zázvor, česnek a další. Kimchi je oblíbené pro svou charakteristickou vůni a chuť. Různou kombinací ingrediencí se odvíjí jeho kvalita. Bylo zjištěno, že v Kimchi jsou obsaženy organické kyseliny, oxid uhličitý a také sloučeniny obsahující síru jako je dimethylsulfid.

J.H. Lee a kolektiv [44] pro analýzu použili kimchi zakoupené v Koreji. Vzorek byl nejdříve přefiltrován přes filtr s velikostí pórů 250  $\mu\text{m}$ . Pro zjištění vhodného množství vzorku se přefiltrovaný vzorek rozdělil po 1; 2; 3; 4 a 5 ml do 10ml nádoby. Stanovované látky byly extrahovány za použití 100  $\mu\text{m}$  PDMS při 40 °C po dobu 30 minut. Dále byla hledána optimální vlákna pro izolaci. Tři mililitry vzorku byly odpipetovány do 10ml nádobek. Ke studiu byly použity 100  $\mu\text{m}$  nebo 7  $\mu\text{m}$  PDMS, 65  $\mu\text{m}$  PDMS/DVB, 85  $\mu\text{m}$  PA, 65  $\mu\text{m}$  CW/DVB a 75  $\mu\text{m}$  CAR/PDMS. SPME byla provedena při 40 °C po dobu 30 minut. Pro hledání optimální teploty a času byly tři mililitry kimchi odpipetovány do 10ml nádobek. Vzorky byly udržovány při 25; 40; 55 a 70 °C po dobu 5; 15; 30; 45 a 60 minut. Izolace byla provedena za použití 100  $\mu\text{m}$  PDMS. Pro hledání účinnosti ultrazvukové extrakce byly použity tři mililitry vzorku kimchi v 10ml nádobkách. Vzorky byly vloženy do ultrazvukové lázně po dobu 30 minut při 40 °C. Kontrolní vzorky byly umístěny do vodní lázně bez působení ultrazvukových vln a bez míchání při 40 °C po dobu 30 minut. Stanovovaná látka byla izolována pomocí 100  $\mu\text{m}$  PDMS po dobu 30 minut při 40 °C. Kvantifikace dimethylsulfidu na citlivost SPME byla provedena na koncentrační řadě 0; 5; 15; 25; 50; 70 a 100  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  v 10ml nádobkách. Dimethylsulfid ve vzorcích byl izolován pomocí 100  $\mu\text{m}$  PDMS a analyzován na GC [44].

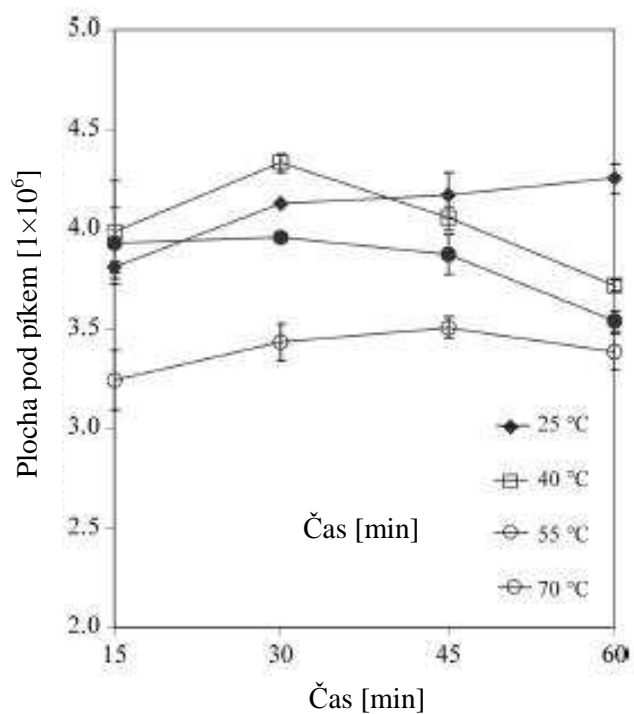
HS-SPME byla provedena při 40 °C po dobu 30 minut za použití 100  $\mu\text{m}$  PDMS. Těkavé látky byly izolovány pomocí GC-FID Hewlett-Packard 5890, teplota desorpce byla 250 °C [44].

Výsledky vlivu velikosti vzorku jsou uvedeny na obrázku 22. Z obrázku je viditelné, že optimální objem vzorku je 3 ml v 10ml nádobkách. Optimální vlákno pro analýzu kimchi bylo vybráno 100  $\mu\text{m}$  PDMS. Výsledky vlivu teploty a času na analýzu jsou uvedeny na obrázku 23. Z obrázku je patrné, že optimální teplota a čas pro HS-SPME je 40 °C a 30 minut. Magnetické míchání zvýšilo plochy píků o 68 %

v porovnání se vzorky bez míchání. Ultrazvukové vlny zvýšily plochy píků o 16 % v porovnání se vzorky bez ultrazvukových vln [44].



**Obr. 22.:** Graf vlivu objemu vzorku kimchi na HS-SPME [44].



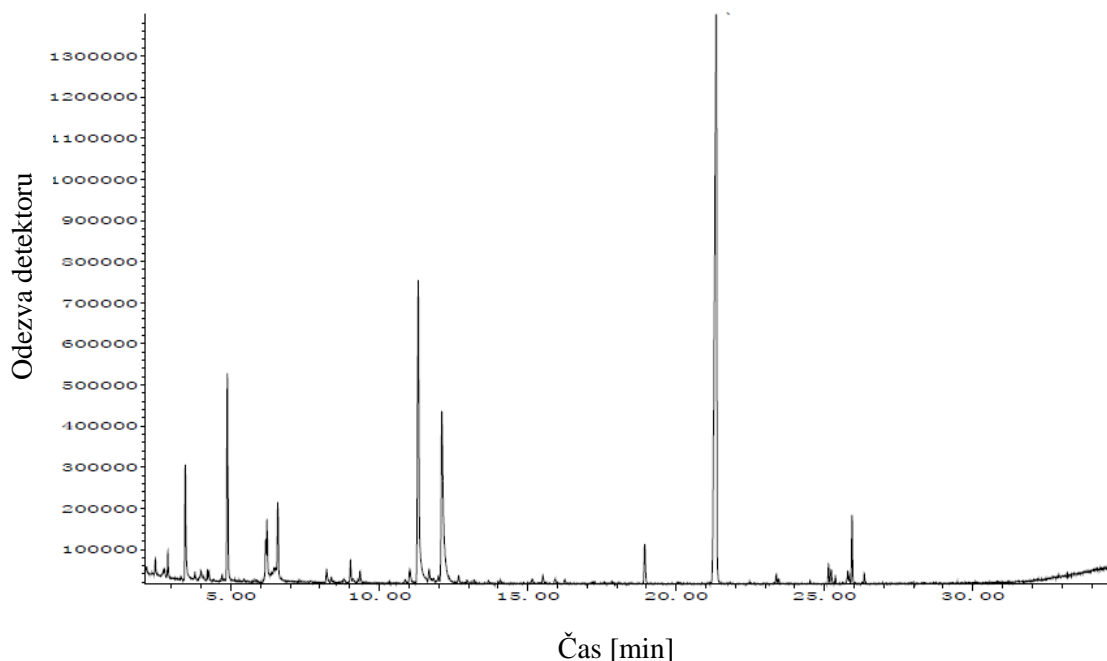
**Obr. 23.:** Vliv teploty a času na HS-SPME ve vzorku kimchi [44].

Ve vzorku kimchi bylo nalezeno více než 200 těkavých látek. Koncentrace dimethylsulfidu ve vzorku byla  $400 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Dimethylsufid je jednou z látek, která určuje chuť a vůni kimchi. Tato studie ukázala, že HS-SPME je dostatečně citlivá pro analýzu dimethylsulfidu v kimchi [44]. V článku je uvedena pouze analýza dimethylsulfidu.

### 4.4.3 Analýza stinky tofu

Stinky tofu je tradiční čínský pokrm ze sóji. Stejně jako některé druhy sýra má stinky tofu nepříjemný zápach. Proto se také nazývá jako čínský sýr. Podle procesní technologie existují dva druhy stinky tofu: nefermentovaný stinky tofu a fermentovaný stinky tofu (FST). Vyrábějí se různými postupy, proto mají i různé aroma. Cílem této práce je analyzovat těkavé složky FST a najít optimální vlákno pro extrakci.

Yuping Liu a kolektiv [46] se snažili najít optimální vlákno pro analýzu. Těkavé látky ve FST byly izolovány pomocí Carboxen/PDMS (75  $\mu\text{m}$ ), PDMS/DVB (65  $\mu\text{m}$ ), DVB/CAR/PDMS (50/30  $\mu\text{m}$ ) a PDMS (100  $\mu\text{m}$ ). Extrakce probíhala v časových intervalech 15; 30; 45; 60 a 75 minut při 50 °C. Bylo zjištěno, že nejvhodnější čas pro dosažení rovnováhy na vláknu Carboxen/PDMS je 60 minut, kde bylo nalezeno 38 složek ve vzorku. Dále výsledky ukazují, že 30 minut je nejvhodnější pro extrakci pomocí PDMS/DVB. Pro vlákno DVB/CAR/PDMS byl nalezen nejvhodnější čas extrakce 60 minut a pro PDMS 75 minut. Chromatogram těkavých látek v FST je zobrazen na obrázku 26. Z hlediska počtu stanovených látek je pro extrakci nejvhodnější Carboxen/PDMS.



**Obr. 26.:** Chromatogram FST pro Carboxen/PDMS [46].

Pro analýzu bylo použito 20 g FST, které bylo vloženo do 50ml nádoby. Nádobka byla vložena do vodní lázně (50 °C) po dobu 20 minut. Poté byla provedena extrakce z prostoru plynné fáze. Stanovení těkavých látek bylo provedeno pomocí GC-MS Agilent 6890, která byla vybavená kapilární kolonou (30 m x 250 µm I.D. s tloušťkou filmu 0,25 µm).

Bylo zjištěno, že v FST se nachází 39 složek – 9 esterů, 7 alkoholů, 5 alkenů, 4 sulfidy, 3 heterocykly, 3 karboxylové kyseliny, 3 ketony, 2 aldehydy, 1 fenol, 1 amin a 1 ether. Převládající složkou v FST je indol, který dává FST nepříjemný zápach, následuje dimethyltrisulfid, fenol, dimethyldisulfid a dimethyltetrasulfid. Dále byly zjištěny estery, jako jsou acetát, propanoát a butanoát. Tyto estery dávají FST aroma. Pro extrakci těchto esterů byly použity vlákna Carboxen/PDMS a PDMS/DVB. Estery, alkoholy, aldehydy a ketony mohou dát FST ovocné a sladké aroma, ale aromatická intenzita indolu a sulfidů přesáhnou jejich aromatickou intenzitu [46].



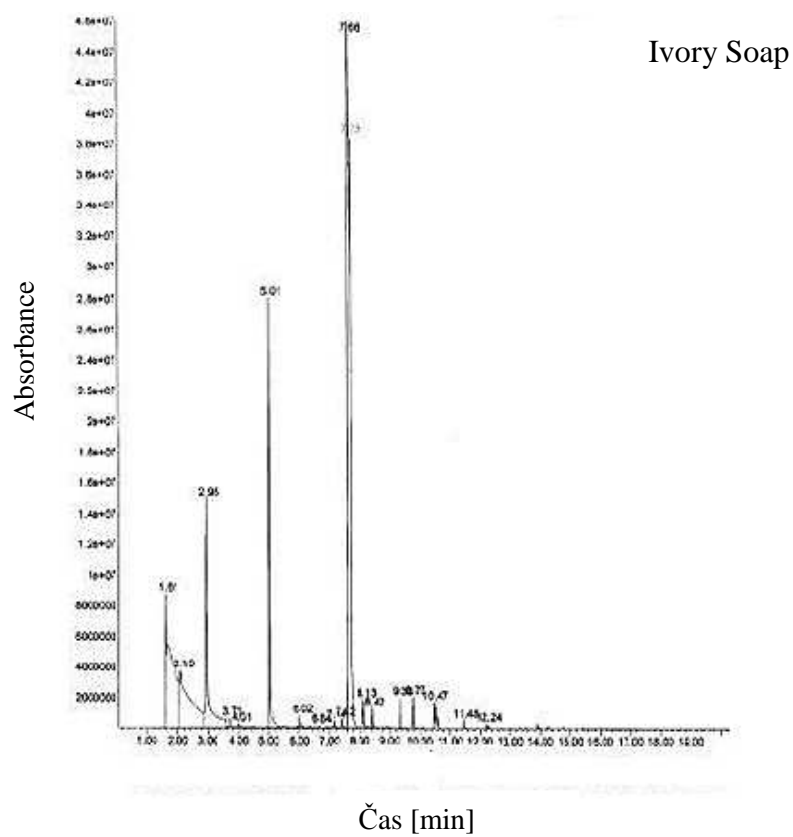
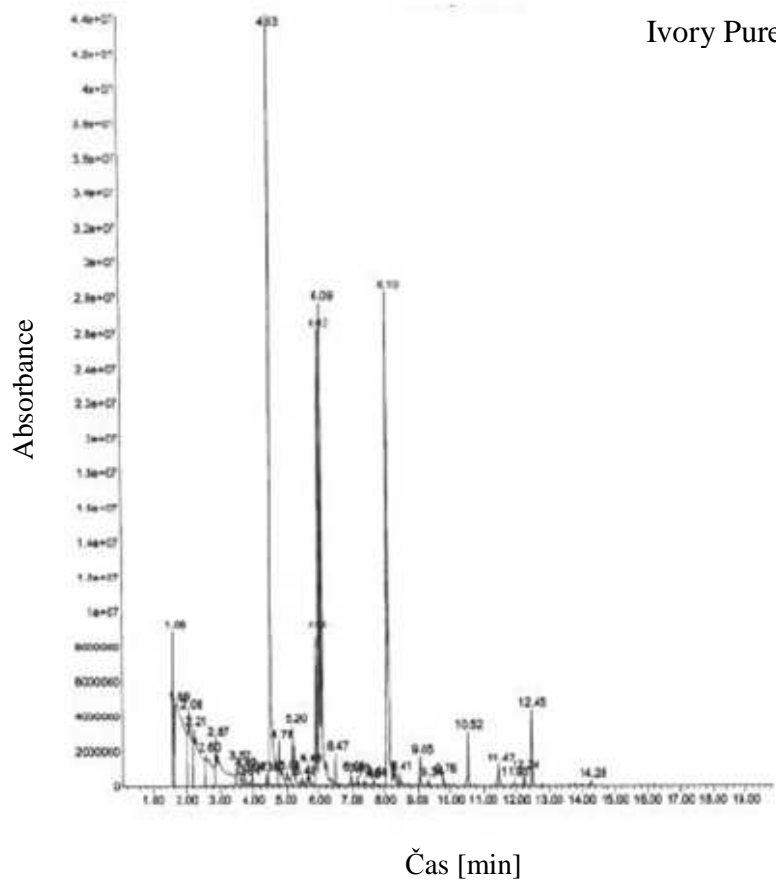
## 4.5 Analýza mýdla

Tato studie [49] je zaměřena na rozlišení různých druhů mýdel než na analýzu celkového chemického složení. SPME-GC-MS analýza byla provedena na 68 vzorcích mýdla. Extrakce byla provedena podle postupu uvedeného v katalogu Supelco™ 2003/2004 za použití 30/50 µm DVB/Carboxen/PDMS po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po skončení extrakce byly stanovované látky desorbovány (při 250 °C) a analyzovány pomocí GC/MS Agilent 6890N.

Na obrázku 29 jsou zobrazeny chromatogramy dvou vybraných mýdel (Ivory Pure a Ivory Soap). Chromatogramy jsou odlišné, což ukazuje na rozdílné složení obou mýdel, i když tyto mýdla byla vyrobena stejným výrobcem. Porovnání chromatogramů bylo relativně bezproblémové k interpretaci výsledků. Ve většině případů byl dominantní pík nejprve identifikován a porovnán s jinými chromatogramy, které obsahovali tentýž pík s podobnými retenčními časy. [49]

Autoři článku [49] měli obavy o reprodukovatelnost výsledků, když by byly vzorky mýdla ponechány delší dobu na vzduchu. Proto náhodné vzorky byly analyzovány vícekrát pomocí SPME-GC-MS a výsledky byly vyhodnoceny jako reprodukovatelné. Některé plochy píků byly menší, ale tento problém byl vyřešen rozdrčením vzorku. Dále byl řešen problém unikání těkavých látek z mýdla během skladování. Proto byly vzorky umístěny do skleněných nádobek a uzavřeny. Byly pozorovány dva efekty: z průhledných mýdel unikaly těkavé látky snadněji než z barevných mýdel. Voňavá mýdla měla významně odlišné chromatogramy v porovnání s ostatními.

Analýzou bylo zjištěno, že chromatogramy mýdel mohou být změněny v případě, že mýdlo je směsí dvou nebo více mýdel. Z poznatků této studie vyplývá, že metoda SPME-GC-MS může být použita pro porovnání sloučenin obsažených v mýdlech [49]. V této studii metodou SPME nebyly identifikovány žádné konkrétní látky.



**Obr. 29.:** Chromatogramy dvou mýdel od stejného výrobce Ivory Pure a Ivory Soap [49].

## 5 Závěr

Cílem této práce bylo vypracování literární rešerše týkající se extrakce vonných látek z různých přírodních a syntetických matric. Nejprve je uvedena charakteristika vonných látek, které dělíme podle původu na přírodní (rostlinné a živočišné) a syntetické. Vonné látky jsou nedílnou součástí našeho každodenního života, neboť jsou obsaženy v parfémeh, potravinách, nápojích, čisticích prostředcích, atd. Dále jsou zde uvedeny mikroextrakční techniky sloužící k izolaci vonných látek z pevných vzorků před jejich vlastní analýzou. Důraz je kladen především na mikroextrakci tuhou fází (SPME), která je nejčastěji používanou extrakční technikou pro vonné látky. Výhodou SPME je její jednoduchost, rychlost, nenáročnost na přípravu vzorku, není zapotřebí přítomnost rozpouštědel a technicky nenáročné přímé spojení s analytickými separačními metodami.

Další část je zaměřena na aplikaci mikroextrakčních technik v izolaci vonných látek z rostlinných matric, alkoholických nápojů, potravin, na analýzu mošusových látek a mýdla.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SURBURG, Horst, PANTEN Johannes. *Common Frangrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*, 5. přepracované vydání. 2006, 318.
- [2] VELÍŠEK Jan. *Chemie potravin 2*, 2. vydání. Tábor: Osis, 2002, 331.
- [3] ČERVENÝ Libor. Syntetické vonné a chuťové látky. *Chem. Listy*. **93**, 1999, 412-420.
- [4] TREPKOVÁ, Emílie, VONÁŠEK František. *Vůně a parfémy: Tajemství přitažlivosti*, Praha: Maxdorf, 1997, s. 173.
- [5] KIM, Hye Kyong, VERPOORTE Rob. Sample Preparation for Plant Metabolomics, *Phytochemical Analysis*. 2010; **21**, 4-13.
- [6] SCHRIPSEMA Jan. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. *Phytochemical Analysis*. 2010, **21** (1), 14-21.
- [7] DVOŘÁKOVÁ, Marcela, VALTEROVÁ Irena, VANĚK Tomáš. Monoterpeny v rostlinách, *Chem. Listy*. 2011; **105**, 839-845.
- [8] VONÁŠEK, František, TREPKOVÁ Emílie, NOVOTNÝ Ladislav. *Látky vonné a chuťové*. Praha: SNTL; 1987, str. 440.
- [9] BACÍLKOVÁ, Bronislava, PAULUSOVÁ Hana. *Vliv silic a jejich hlavních účinných látek na mikroorganismy a na archivní materiál*. Praha; 2012, 28.
- [10] KORBELÁŘ, Endris. *Naše rostliny v lékařství*, Praha: AVICENUM; 1981, 503.
- [11] SELL Charles. *Chemistry of fragrance*. The Royal Society of Chemistry. 2006, 348.
- [12] DAVÍDEK Jiří. *Chemie potravin*. Praha: Ediční středisko VŠCHT; 1991, 142.
- [13] DAVÍDEK Jiří, a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: SNTL; 1977, 720.
- [14] RYAN, Danielle, ROBARDS Kevin. Analytical Chemistry Considerations in Plant Metabolomics. *Separation and Purification Reviews*. 2006; **35**(4), 319-356.
- [15] KONING, H.D., JANSEN H. G., BRINKMAN U.A.T. Modern methods of sample preparation for GC analysis. *Chromatographia*. 2009; **69**, 33-78.
- [16] CHURÁČEK J. a kol.: *Analytická separace látek*, SNTL, Praha 1990, 384.
- [17] HIROYUKI, Kataoka, LORD Heather L., PAWLISZYN Janusz. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A*. 2000, **880**(1-2), 35-62.

- [18] ARTHUR, C. L., PAWLISZYN J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*. 1990; **62**(19), 2145–2148.
- [19] Technické dokumenty Sigma – Aldrich. SPME teorie. [pdf dokument]. [cit.20.2.2009]  
Dostupné z: <[http://sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/General\\_Information/spme\\_teorie.Par.0001.File.tmp/spme\\_teorie.pdf](http://sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/spme_teorie.Par.0001.File.tmp/spme_teorie.pdf) >
- [20] ROUT, Prasant Kumar; RAO, Y. Ramachandra; NAIK, Satyanarayan: Analysis of Floral Volatiles by Using Headspace-Solid Phase Microextraction, *Asian Journal of Chemistry* 2012; **24**(3), 945-956.
- [21] PROCHÁZKOVÁ Dana. Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analyt. *Chem.listy*. 2002; **96**, 827–852.
- [22] SEDLÁKOVÁ, Jana, MATISOVÁ Eva, SLEZÁČKOVÁ Martina. Mikroextrakcia na tuhej fáze a jej využitie v environmentálnej analýze. *Chem. listy*. 1998; **92**, 633-642.
- [23] LORD, H., PAWLISZYN J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A*. 2000; **885**(1-2), 153-193.
- [24] AUGUSTO, F., VALENTE, A. L. P. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological symplex. *Trends. Analytical Chemistry*. 2002; **21**, 428–438.
- [25] CHEN, Y., GUO Z., XIAOYU W., CHANGGUI Q. Sample preparation, *J. Chromatogr. A*. 2008, **1184**, 191-219.
- [26] MLEJOVÁ, V., PAVLÍKOVÁ P., DOBIÁŠ P., ADAM M., VENTURA K. Aplikace mikroextrakce tuhými fázemi pro analýzu bylinných silic. *Chem. listy*. 2010; **104**, 166-171.
- [27] ULRICH S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J. Chromatogr. A*. 2000, **902**(1), 167-194.
- [28] BALASUBRAMANIAN, Sundar, PANIGRAHI Suranjan. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products. *Food Bioprocess Technol*. 2011; **4**(1), 1-26.
- [29] MESTER, Zoltán, STURGEON Ralph. Trace element speciation using solid phase microextraction. *Spectrochimica Acta Part B*. 2005; **60**, 1243-1269.

- [30] VENTURA K.: *Příprava vzorku ve stopové analýze organických látek. Extrakce kapalinou, plynem, sorbentem, superkritická fluidní extrakce a chromatografie*, Univerzita Pardubice, 1995, 122.
- [31] PINHEIRO, Anselmo de Souza , da ROCHA Gisele Olimpio, de ANDRAD J. B. A SDME/GC–MS methodology for determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Microchemical Journal*. 2011, **99**(2), 303-308
- [32] ANDRUCH, Vasil, KOCÚROVÁ Livia, BALOGH Ioseph, ŠKRLÍKOVÁ Jana. Recent advances in coupling single-drop and dispersive liquid–liquid microextraction with UV–vis spectrophotometry and related detection techniques. *Microchemical Journal*. 2012, **102**, 1-10
- [33] SARAFRAZ-YAZDI, Ali, AMIRI Amirhassan, Liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 2010, **1**, s. 1-14
- [34] LI Hongyang, ZAND Ali R., SIKORSKI Yuri a kol., Simple and effective method to measure the diffusion coefficient of organic vapors in porous media. *Anal. Methods*. 2011, **3**(12), 2809-2814
- [35] KUREČKOVÁ, K., VENTURA K., EISNER A., ADAM M. Laboratorní přístroje a postupy. *Chem. listy*. 2001, **95**, 415-419.
- [36] WENCLAWIAK, Bernd. Analysis with supercritical fluids. *Extraction and chromatography*. 1992, 213, 663.
- [37] ŠTĚRBA, K., DOSTÁLEK P., KARABÍN M. Moderní postupy využívané při přípravě vzorků pro stanovení alkoholů, esterů a kyselin v pivu. *Chem. listy*. 2011, **105**, 603-610,
- [38] TENA, Maria Teresa, CARRILLO José David. Multiple solid-phase microextraction: Theory and applications. *Trends in Analytical Chemistry*. 2007, **26**(3), 206-214.
- [39] ČÍŽKOVÁ, Lenka, ADAM Martin, DOBIÁŠ Petr, VENTURA Karel. Aplikace vybraných mikroextrakčních technic na headspace analyze silic In: *vscht.cz* [online] [cit. 2.5.2012]  
Dostupné z WWW: <<https://www.vscht.cz/anl/soutez2007/abstrakt-Cizkova.pdf>>
- [40] ADAM, Martin, DOBIÁŠ Petr, PAVLÍKOVÁ Petra, VENTURA Karel. Comparison of solid-phase and single-drop microextractions for headspace analysis of herbal essential oils. *Cent. Eur. J. Chem*. 2009, **7**(3), 303-311

- [41] BARTÁK, Petr, BEDNÁŘ Petr, ČÁP Lubomír, ONDRÁKOVÁ Lenka, STRÁNSKÝ Zdeněk. SPME – A valuable tool for investigation of flower Scent. *J. Sep. Sci.* 2003, **26**(8), 715–721
- [42] REGUEIRO, Jorge, GARCIA-JARES Carmen., LLOMPART Maria, LAMAS J. Pablo, CELA Rafael. Development of a method based on sorbent trapping followed by solid-phase microextraction for the determination of synthetic musks in indoor air. *J. Chromatogr. A.* 2009, **1216**(14), 2805–2815
- [43] GHIASVAND, Ali Reza, SETKOVA Lucie, PAWLISZYN Janusz. Determination of flavour profile in Iranian fragrant rice samples using cold-fibre SPME–GC–TOF–MS. *Flavour Fragr. J.* 2007; **22**: 377–391
- [44] LEE, J.H, KANG J.H., MIN D.B. Optimization of Solid-Phase Microextraction for the Analysis of the Headspace Volatile Compounds in Kimchi, a Traditional Korean Fermented Vegetable Product. *Journal of food science.* 2003, **68** (3), 844-848
- [45] Da PORTO, Carla, PIZZALE Lorena, BRAVIN Michel, CONTE S. Lanfranco. Analyses of orange spirit flavour by direct-injection gas chromatography–mass spectrometry and headspace solid-phase microextraction/GC–MC. *Flavour Fragr. J.* 2003; **18**, 66–72
- [46] LIU, Yuping, MIAO Zhiwei, GUAN Wei, SUN Baoguo. Analysis of Organic Volatile Flavor Compounds in Fermented Stinky Tofu Using SPME with Different Fiber Coatings. *Molecules.* 2012, **17**, 3708-3722
- [47] KHIO, Shuh-Wen, CHEONG Mun-Wai, ZHOU Weibiao, CURRAN Philip, YU Bin. Characterization of the Volatility of Flavor Compounds in Alcoholic Beverages through Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) and Mathematical Modeling. *Journal of Food Science.* 2012, **71**(1), 61-70.
- [48] POLO, Maria, GARCIA-JARES Carmen, LLOMPART Maria, CELA Rafael. Optimization of a sensitive method for the determination of nitro musk fragrances in waters by solid-phase microextraction and gas chromatography with micro electron capture detection using factorial experimental design. *Anal Bioanal Chem.* 2007, **388**, 1789–1798.
- [49] ARREDONDO, Marlo, LaPORTE Gerald M., WILSON Jeffrey D., McCONNELL Tyra, SHAFFER Douglas K., STAM Marianne. Analytical Methods Used for the Discrimination of Substances Suspected to be Bar Soap: A Preliminary Study. *J Forensic Sci.* 2006, **51**(6), 1334-1343.