

VYUŽITÍ SORPČNÍ EXTRAKCE Z HEADSPACE PŘI ANALÝZE TĚKAVÝCH SÍRNÝCH SLOUČENIN V ČESNEKU

ŠUHAJOVÁ DOMINIKA, ADÁMKOVÁ KAROLÍNA, EISNER ALEŠ a ADAM MARTIN*

Katedra analytické chemie

* *Garant*

ÚVOD

Česnek, cibule, pažitka a další druhy zeleniny mají charakteristickou chuť a vůni. Toto výrazné aroma je způsobené především těkavými látkami, které se z dané rostliny uvolňují po jejich desintegraci. Po mechanickém poškození buňky se spouští enzymatická reakce a vznikají organické sloučeniny, které se v nepoškozené buňce nevyskytují. Tyto metabolity, zodpovědné za charakteristický zápach, je možné analyzovat. U rostlin čeledi *Alliaceae* (česnekovité) mají největší význam organické sloučeniny obsahující síru. Z této čeledi je známých asi 30 rodů a asi 600 druhů, které jsou rozšířeny po celém světě. V ČR rostou pouze zástupci jediného rodu, a to česnek (*Allium*). Česnek kuchyňský (*Allium sativum* L.) obsahuje celou řadu těkavých organických sloučenin. Na výsledném aromaprofilu a chuti se pak podílejí především senné sloučeniny. Česnek má antimikrobiální, protinádorové, protizánětlivé, kardiovaskulární a další pozitivní účinky^{1,2}.

Pro izolaci nebo zakoncentrování těkavých sloučenin z rostlin je možné využít širokou škálu moderních extrakčních metod, které nahrazují dříve používanou metodu založenou na destilaci s vodní parou. Mezi tyto moderní metody patří například extrakce nadkritickou tekutinou (SFE - Supercritical Fluid Extraction), vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PFE - Pressurised Fluid Extraction) nebo extrakce přehřátou vodou (PHWE - Pressurised Hot Water Extraction). V posledních letech se však stále častěji uplatňují metody mikroextrakční, jako jsou mikroextrakce tuhou fází (SPME - Solid Phase Microextraction) nebo sorpční extrakce na míchadélku (SBSE - Stir Bar Sorptive Extraction)³.

SBSE je založena na sorpci analytů ze vzorku na polymerní sorbent pokrývající magnetické míchadélko. Tuto sorpční tyčinku lze vložit jak do kapalného vzorku, čímž je současně zajištěno i jeho míchání během extrakce, tak i do prostoru nad vzorkem (tzv. headspace). V tomto případě je metoda známější pod názvem HSSE - Headspace Sorptive Extraction. Zachycené sloučeniny lze z míchadélka uvolnit buď tepelnou desorpcí ve speciální termodesorpční jednotce nebo lze provést desorpci rozpouštědlem. Ve srovnání s metodou SPME má tato metoda mnohem vyšší sorpční kapacitu vzhledem k většímu objemu polymerní stacionární fáze a díky tomu je i významně citlivější.

Cílem práce byla optimalizace parametrů metody HSSE s ohledem na následnou GC analýzu získaných extraktů. Pro tuto optimalizaci bylo cílem na základě Plackett-Burmanova návrhu experimentu určit, které z testovaných parametrů mají statistický vliv na extrakční účinnost a tyto parametry poté podrobněji optimalizovat na základě principů centrálně kompozitního plánování experimentu. Záměrem bylo nalézt takové extrakční podmínky, aby

bylo možné v extraktech následně pomocí vhodné metody identifikovat co nejvíce sloučenin podílejících se na celkovém aromaprofilu česneku a také porovnat vhodnost navržené metody s dříve publikovanou metodou založenou na využití headspace mikroextrakce tuhou fází⁴.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro extrakci těkavých látek ze vzorků česneku bylo použito míchadélko Twister o délce 10 mm a tloušťce sorpční vrstvy PDMS (Polydimethylsiloxan) 0,5 mm (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Německo). Míchadélko bylo aktivováno po dobu 60 minut při teplotě 250 °C.

Analyzován byl česnek z oblasti Vysočina sklizený v roce 2015. Před analýzou byl vzorek očištěn, zbaven slupky, rozmělněn a pro potřeby optimalizace zhomogenizován.

Do 20ml skleněné vzorkovací nádoby (Supelco, Bellefonte, PA, USA) bylo naváženo 0,5 g vzorku česneku a do prostoru nad vzorkem umístěna sorpční tyčinka. Pro její uchycení byl využit drátek procházející skrz septum ve víčku vzorkovací nádoby. Celá nádoba byla vložena do vodní lázně (Julabo F12, Schwabach, Německo) vyhřáté na extrakční teplotu 80 °C tak, aby celá navážka česneku byla pod hladinou. Po 15 min extrakci byla míchací tyčinka vyjmuta a přemístěna do desorpční nádoby, kde byly zachycené sloučeniny desorbovány do 1,5 ml diethyletheru p. a. (Penta, Chrudim, ČR) po dobu 1 minuty při 25 °C v termobloku (IKA Dry Block Heater 1, IKA-Werke, Staufen, Německo). Následně byl extrakt proudem dusíku odpařen, odparek převrstven 20 µl n-hexanu (Sigma Aldrich, Praha, ČR) a po promíchání podroben GC-ECD analýze.

Do plynového chromatografu GC 17A s detektorem elektronového záchytu ECD-17 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) byl dávkován 1 µl. Pro separaci byla použita kapilární kolona HP-5 o rozměrech 30 m x 0,32 mm s tloušťkou filmu 1 µm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Nosným plynem byl dusík při konstantním přetlaku 30 kPa. Teploty nástřiku i detektoru byly udržovány na 250 °C. Teplotní program byl následující: počáteční teplota 55 °C po dobu 3 min, následoval lineární nárůst teploty rychlostí 6 °C/min do 250 °C, která byla udržována 10 min.

Při aplikaci metody SPME bylo do 20ml vzorkovací nádoby umístěno 0,5 g vzorku a do prostoru nad vzorkem umístěno vlákno 50/30 µm DVB/CAR/PDMS (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Extrakce byly prováděny při 75 °C po dobu 55 min, poté bylo SPME vlákno podrobeno tepelné desorpci přímo v nástřikovém prostoru plynového chromatografu při 250 °C po dobu 1 min. Před další sorpcí bylo SPME vlákno přečištěno v čističi stříkaček Hamilton Syringe Cleaner (Reno, NV, USA) po dobu 5 min kvůli eliminaci možného „carry-over” efektu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Při optimalizaci podmínek extrakce je třeba nejprve vyhodnotit, které parametry mají statisticky významný vliv na účinnost extrakce a které mají vliv nevýznamný. Pro tento účel se dobře hodí třídící plán dle Plackett-Burmana, kdy lze o statistickém významu jednotlivých parametrů rozhodnout za pomoci relativně malého počtu experimentů. Mezi testované parametry patřily: navážka vzorku, teplota a doba extrakce, úprava iontové síly přidavkem

NaCl, teplota a doba desorpce rozpouštědlem a objem desorpčního rozpouštědla. Pro těchto sedmero parametrů lze použít Plackett-Burmanův návrh sestávající z celkem 8 experimentů (viz tab. 1), avšak kvůli vyhodnocení statistické významnosti na úrovni $p=0,05$ je třeba alespoň jeden z experimentů zopakovat. V tomto případě byl ještě 2x zopakován experiment vykazující největší odezvu při GC-ECD analýze.

Tabulka 1: Plackett-Burmanův návrh.

Pokus číslo	Navážka vzorku (g)	Hmotnost NaCl (g)	Teplota extrakce (°C)	Doba extrakce (min)	Teplota desorpce (°C)	Doba desorpce (min)	Objem rozpouštědla (ml)
1	0,5 (-1)	0 (-1)	30 (-1)	30 (+1)	25 (+1)	10 (+1)	1 (-1)
2	1,5 (+1)	0 (-1)	30 (-1)	5 (-1)	10 (-1)	10 (+1)	3 (+1)
3	0,5 (-1)	0,5 (+1)	30 (-1)	5 (-1)	25 (+1)	1 (-1)	3 (+1)
4	1,5 (+1)	0,5 (+1)	30 (-1)	30 (+1)	10 (-1)	1 (-1)	1 (-1)
5	0,5 (-1)	0 (-1)	80 (+1)	30 (+1)	10 (-1)	1 (-1)	3 (+1)
6	1,5 (+1)	0 (-1)	80 (+1)	5 (-1)	25 (+1)	1 (-1)	1 (-1)
7	0,5 (-1)	0,5 (+1)	80 (+1)	5 (-1)	10 (-1)	10 (+1)	1 (-1)
8	1,5 (+1)	0,5 (+1)	80 (+1)	30 (+1)	25 (+1)	10 (+1)	3 (+1)

Pozn.: Čísla v závorkách představují hodnoty kódované matice návrhu

Před optimalizací bylo třeba ještě pomocí tzv. předběžných experimentů zvolit systém rozpouštědel. Pro desorpci látek z míchadélka byl z testovaných rozpouštědel zvolen diethylether, který vykazoval dostatečnou rozpouštěcí kapacitu vůči studovaným látkám, čímž byla zajištěna účinná desorpce, a současně je dostatečně těkavý, aby mohlo dojít k jeho odpaření bez významné ztráty cílových sloučenin. Pro následnou GC-ECD analýzu se však tato těkavost ukázala být problematickou vzhledem k případné prodlevě mezi desorpcí a GC analýzou. Tento problém byl eliminován tím, že byl diethylether po desorpci zcela odpařen a odparek převrstven n-hexanem, který není tak těkavý jako diethylether. Navíc tato sloučenina není aktivní při použití ECD detektoru a neruší tak odezvu sledovaných sloučenin.

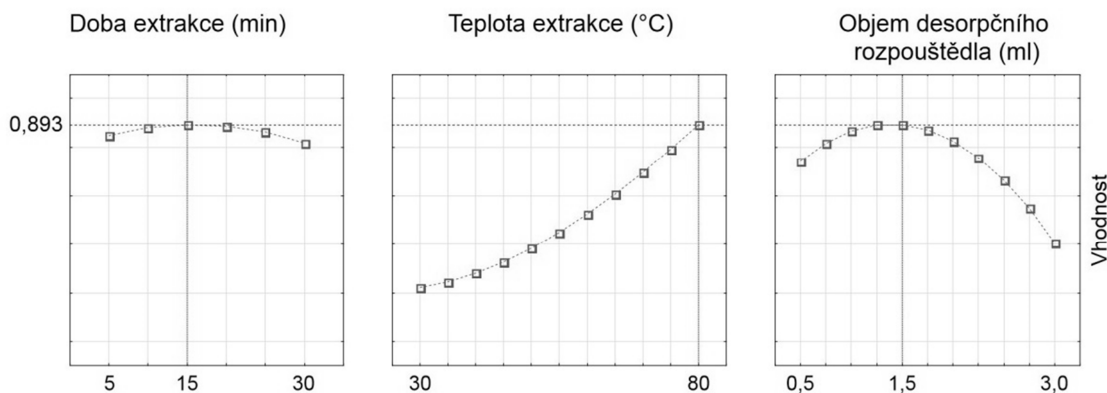
Na základě výsledků analýzy ve statistickém programu STATISTICA 12Cz (Dell Software, Praha, ČR) byly jako významné parametry určeny teplota extrakce, doba extrakce a objem desorpčního rozpouštědla. Tyto parametry byly dále optimalizovány dle principů centrálně kompozitního plánování experimentu (viz tab. 2), který umožňuje lépe vyhodnotit vzájemnou korelaci testovaných parametrů. Ostatní parametry byly zvoleny následovně: navážka vzorku 0,5 g bez přídavku NaCl, desorpce diethyletherem při 25 °C po dobu 1 minuty. Po provedení všech 20 experimentů v náhodném pořadí byly počty píků a jejich celková plocha opět statisticky zpracovány.

Tabulka 2: Centrálně kompozitní plán (pokusy označené tučně se shodují).

Pokus číslo	Doba extrakce (°C)	Teplota extrakce (min)	Objem rozpouštědla (ml)
1	10,0 (-1)	40 (-1)	1,00 (-1)
2	10,0 (-1)	70 (+1)	2,50 (+1)
3	25,0 (+1)	40 (-1)	2,50 (+1)
4	25,0 (+1)	70 (+1)	1,00 (-1)
5	17,5 (0)	55 (0)	1,75 (0)
6	17,5 (0)	55 (0)	1,75 (0)
7	10,0 (-1)	40 (-1)	2,50 (+1)
8	10,0 (-1)	70 (+1)	1,00 (-1)
9	25,0 (+1)	40 (-1)	1,00 (-1)
10	25,0 (+1)	70 (+1)	2,50 (+1)
11	17,5 (0)	55 (0)	1,75 (0)
12	17,5 (0)	55 (0)	1,75 (0)
13	5,0 (- α)	55 (0)	1,75 (0)
14	30,0 (+ α)	55 (0)	1,75 (0)
15	17,5 (0)	30 (- α)	1,75 (0)
16	17,5 (0)	80 (+ α)	1,75 (0)
17	17,5 (0)	55 (0)	0,50 (- α)
18	17,5 (0)	55 (0)	3,00 (+ α)
19	17,5 (0)	55 (0)	1,75 (0)
20	17,5 (0)	55 (0)	1,75 (0)

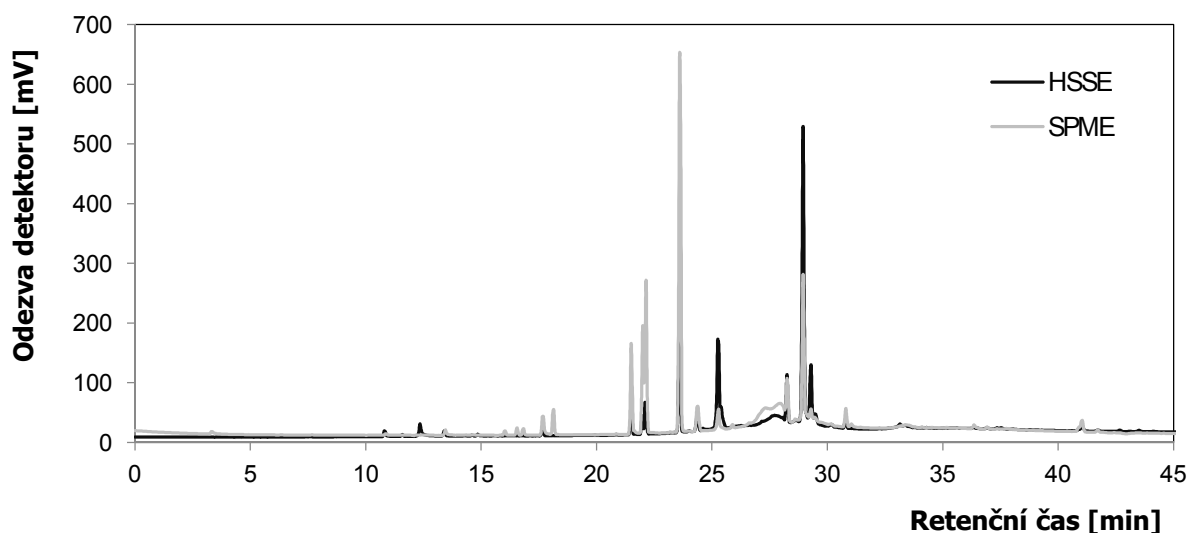
Pozn.: Čísla v závorkách představují hodnoty kódované matice návrhu

Na základě odezvových profilů pro jednotlivé parametry (obr. 1) byly vyhodnoceny optimální podmínky pro aplikaci metody HSSE pro analýzu celkového aromaprofilu česneku.

**Obrázek 1:** Odezvové profily optimalizovaných parametrů.

Jako vhodná teplota extrakce byla určena teplota 80 °C. Je to nejvyšší testovaná teplota, avšak její další navýšení není vhodné s ohledem na zvyšující se riziko tepelné degradace. Při hodnocení doby extrakce bylo zjištěno, že při kratší době bylo zaznamenáno více píků, ale při delší době měly píky větší plochu. Bylo tedy vybráno 15 minut, což představuje vhodný kompromis. Objem desorpčního rozpouštědla je 1,5 ml. Při vyšším množství je extrakt zbytečně zředěn, což představuje vyšší riziko ztráty analytů během odpařování diethyletheru. Při nižším objemu není míchací tyčinka zcela ponořena, čímž dochází k nedokonalé desorpci.

Při porovnání obou mikroextrakčních postupů, tj. HSSE a SPME byl použit stejný vzorek česneku, který byl ve stejnou dobu podroben oběma metodám při jejich optimalizovaných podmínkách. Získané chromatogramy jsou porovnány na obrázku 2.



Obrázek 2: Porovnání chromatogramů získaných po aplikaci metod HSSE a SPME.

Z obrázku 2 je patrné, že u metody SPME lze pozorovat více píků těkavějších složek, zatímco u HSSE metody je možné nalézt větší počet píků látek méně těkavých, tj. těch, které jsou z kolony eluovány po 25 minutě. Je to s největší pravděpodobností způsobené způsobem desorpce při HSSE, kdy bylo nutné po desorpci diethyletherem toto rozpouštědlo odpařit, čímž došlo současně i ke ztrátám těkavějších složek extraktu. Tomuto efektu by bylo možné zabránit použitím tepelné desorpce i v případě HSSE metody, což však vyžaduje použití termodesorpčního zařízení.

ZÁVĚR

Na základě principů plánování experimentu byly optimalizovány podmínky pro aplikaci metody HSSE při analýze aromaprofilu česneku, kde hrají významnou roli sirné sloučeniny. Vzhledem k tomu bylo možné pro analýzu těchto především sirných sloučenin s výhodou využít GC analýzu s detektorem elektronového záchytu, který je v tomto případě ještě citlivější než detektor hmotnostní.

Optimalizované podmínky byly aplikovány na extrakce reálných rostlinných vzorků česneku kuchyňského, přičemž v chromatogramu bylo nalezeno 50 píků, z toho se prozatím pouze dle retenčních indexů a literatury podařilo identifikovat 25 látek. Největší zastoupení měly dimetyl tetrasulfid, benzothiazol, propenyl propyl trisulfid a 2 fenetylisothiokyanát. Pro potvrzení správnosti identifikace a případně pro identifikaci další složek by bylo třeba metodu HSSE spojit s GC-MS analýzou, avšak v tomto případě je třeba eliminovat rušící vliv n-hexanu. Pro identifikaci látek s nižšími retenčními časy by bylo vhodné např. opakování experimentu za stejných podmínek s rozpouštědlem, jež poskytuje píky s vyšším retenčním časem a následné porovnání záznamů. Nabízí se také možnost využití termické desorpce, kde by byl vliv rozpouštědla na výslednou analýzu zcela eliminován.

LITERATURA

1. Block E.: *Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 2010.
2. Yang C., Wang J., Li D.: *Anal. Chem. Acta* 799, 8 (2013).
3. Laaks J., Jochmann M.A., Schmidt T.C.: *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 565 (2012).
4. Kremr D., Bajeroová P., Bajer T., Eisner A., Adam M. Ventura K.: *J. Food Sci. Technol.* 52, 5727 (2015).