

U n i v e r z i t a P a l a c k é h o v O l o m o u c i

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Analýza těkavých sirných látek v cibulovinách

Diplomová práce

Autor:

David Lang

Školitel:

doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Studijní program:

N 1407 Chemie

Studijní obor:

Analytická chemie

Forma studia:

Prezenční

Olomouc 2016

P a l a c k y U n i v e r s i t y O l o m o u c

Faculty of Science

Department of Analytical Chemistry



Analysis of volatile sulphur compounds in bulb vegetables

Diploma thesis

Author:	David Lang
Supervisor:	doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
Study programme:	N 1407 Chemistry
Major:	Analytical chemistry
Study form:	Daily

Olomouc 2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a veškeré literální prameny použité v této práci jsme uvedl v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne:

David Lang

Poděkování

Rád bych poděkoval doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za umožnění vypracování této práce, její odborné vedení, za čas, který mi věnoval a rady které mi poskytl.

Bibliografická identifikace:

Autor:	David Lang
Název práce:	Analýza těkavých sirných látek v cibulovinách
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra analytické chemie, UP Olomouc
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2016
Shrnutí:	Diplomová práce se zabývá analýzou cibulovin. Je zde proveden screening pěti druhů zeleniny s využitím SPME extrakce a následnou analýzou na plynovém chromatografu ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Detegované látky byly identifikovány a byly také určeny poměry těchto látek v jednotlivých vzorcích. Dále byla provedena optimalizace derivatizace s využitím standardu propanthiolu s následnou aplikací na reálných vzorcích. Byly vypočteny retenční indexy derivátů a metodou standardního přídatku byla provedena kvantifikace propanthiolu ve vzorku česneku. Nakonec byla vypočtena koncentrace thiolů ve všech vzorcích.
Klíčová slova:	česnek, SPME, derivatizace, N-phenylmaleimid, thioly
Počet stran:	51
Jazyk:	čeština

Bibliographic identification:

Author: David Lang

Title: Analysis of volatile sulphur compounds in bulb vegetables

Type of thesis: Diploma

Department: Department of analytical chemistry, UP Olomouc

Supervisor: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

The Year of presentation: 2016

Summary: The present thesis deals with the analysis of bulb vegetables. Screening of five types of vegetables was conducted using SPME extraction and subsequent gas chromatography – mass spectrometry technology. Detected compounds were identified and the ration of these compounds in the analyzed samples was determined. Derivatization optimalization with the use of propanethiol was carried out with subsequent application to real samples. Retention indexes of derivatives were calculated and propanethiol in a sample of garlic was quantified using the standard-addition method. Finally, concentrations of the thiols in all samples were calculated.

Keywords: garlic, SPME, derivatization, N-phenylmaleiimide, thiols

Number of Pages: 51

Language: Czech

Obsah

1. Úvod	9
2. Teoretická část	10
2.1 Charakteristika rodu <i>Allium</i>	10
2.1.1 Druhy rodu <i>Allium</i>	10
2.1.1.1 Cibule kuchyňská (<i>A. cepa</i>).....	10
2.1.1.2 Pažitka (<i>A. schoenoprasum</i>)	11
2.1.1.3 Pór (<i>A. porrum</i>).....	11
2.1.1.4 Medvědí česnek (<i>A. ursinum</i>).....	11
2.1.2 Česnek (<i>A. sativum</i>).....	11
2.1.3 Látkové složení česneku.....	12
2.1.3.1 Sirné látky.....	12
2.1.3.2 Látky bez síry	13
2.2 Mikroextrakce pevnou fází (SPME)	14
2.2.1 Princip SPME	14
2.2.2 SPME zařízení	15
2.2.3 Proces SPME	16
2.2.4 Optimalizace SPME	16
2.2.4.1 Vliv míchání	17
2.2.4.2 Vliv teploty	17
2.2.4.3 Vliv délky doby sorpce	18
2.2.4.4 Vliv množství vzorku	18
2.2.4.5 Vliv pH	18
2.2.4.6 Derivatizace analytu	18
2.2.5 Rozhraní SPME-GC.....	19
2.3 Plynová chromatografie (GC).....	19
2.3.1 Derivatizace v GC	19
2.3.2 GC instrumentace.....	20

2.3.2.1	Nosný plyn.....	20
2.3.2.2	Regulační systém	21
2.3.2.3	Dávkovací systém	21
2.3.2.4	Chromatografické kolony.....	21
2.3.2.5	Vyhřívané zóny.....	22
2.3.2.6	Detektory	22
2.3.3	GC-MS	23
2.3.3.1	Iontové zdroje	24
2.3.3.2	Hmotnostní analyzátoři a detekce	24
3.	Experimentální část.....	26
3.1	Zařízení a pomůcky.....	26
3.2	Instrumentace	26
3.3	Chemikálie	26
3.4	Experimentální podmínky	27
3.5	Screening látek - SPME.....	27
3.5.1	Stanovení thiolů - derivatizace	27
3.6	Reálný vzorek	28
3.6.1	Kvantifikace.....	28
4.	Výsledky a diskuze	29
4.1	Screening látek.....	29
4.1.1	Optimalizace derivatizace.....	34
4.1.2	Reálný vzorek	40
5.	Závěr.....	46
6.	Literatura	47

1. Úvod

Zástupci rodu *Allium* jsou známi po celém světě. Tím nejnámějším je určitě česnek, který je oblíben jak pro své využití v kuchyni, tak i pro své kladné zdravotní účinky a používání v lidovém léčitelství.

Charakteristická vůně česneku souvisí s obsaženými sirnými sloučeninami, které jsou enzymaticky formovány při jeho krájení nebo drcení. [1][2][3][4] Konkrétně se jedná o allicin a různé sulfidy. Analýza česnekového aroma má význam z důvodu obsažených farmakologicky aktivních sloučenin, které mají příznivý účinek na zdraví. [4][5][6][7][8] Tradiční metody pro izolaci a extrakci sensoricky aktivních látek mají určité nevýhody: dlouhé extrakční časy, velké objemy rozpouštědel a také malá účinnost. Navíc je mnoho těchto látek tepelně nestabilních a mohou být degradovány. [9] Jako vhodná se jeví výrazně rychlejší metoda - mikroextrakce pevnou fází (SPME), kde je eliminována nutnost použití rozpouštědla. [10]

Biologicky aktivní a důležité sloučeniny v cibulovinách jsou thioly. [11] Jsou to látky těkavé, charakteristického zápachu, které mají význam také jako indikátory čerstvosti a kvality suroviny. [12] Thioly jsou složité analyty k extrakci a kvantifikaci, proto je potřebné vyvinout vhodnou techniku, která umožní jejich rozlišení, identifikaci a kvantifikaci. Často využívaná technika ve spojení s plynovou chromatografií je derivatizace. Derivatizace nabízí spousty výhod jako je tepelná stabilita, zlepšení rozlišení, zvýšení odezvy signálu derivátu. [13][14]

2. Teoretická část

2.1 Charakteristika rodu *Allium*

Podle taxonomického systému krytosemenných rostlin APG III, je rod *Allium* zařazen v rostlinném systému:

Kmen: Angiospermae (krytosemenné)

Řád: Asparagales

Čeleď: Amaryllidaceae

Rod: *Allium*

Druh: *A. sativum*, *A. ursinum*, *A. porrum*, *A. cepa*, ...

Převážná většina druhů rodu *Allium* se přirozeně vyskytuje v mírném pásu severní polokoule. Podle druhu může být vzrůst rostliny od pár centimetrů až po 2 m. Květ je tvořen okolíkem na lodyze, která je hranatá nebo kruhovitá a plná nebo dutá. Listy jsou trubkovité nebo ploché. Velikost cibulek kolísá mezi druhy od 2 mm po 10 cm. [15]

2.1.1 Druhy rodu *Allium*

Rod *Allium* zahrnuje zhruba 700 botanických druhů. Mezi kulturní druhy se například řadí cibule kuchyňská (*Allium cepa*), česnek kuchyňský (*Allium sativum*), pór (*Allium porrum*) a pažitka (*Allium schoenoprasum*). Využívají se jako cibulové a listové zeleniny. Nemalá část druhů tohoto rodu je pěstována jako okrasné rostliny.

2.1.1.1 Cibule kuchyňská (*A. cepa*)

Původem cibule kuchyňské je Asie, dnes je však v různých varietách rozšířena po celém světě. Čerstvá cibule obsahuje 87 % vody, 11,6 % sacharidů a 1,2 % proteinů. Cibule obsahuje vysoké množství fluoru a vitamíny A, B, C, kyselinu nikotinovou a pantotenovou.

Kromě využívání v kuchyni se cibule používá v kožním lékařství, dále jako prostředek k usnadnění odkašlávání, při zaživacích potížích a při potřebě zlepšení srdeční činnosti.

2.1.1.2 Pažitka (*A. schoenoprasum*)

U pažitky se využívá především listová část. Tento druh je bohatý na vitamín C. Oproti cibuli obsahuje větší množství silic, avšak léčivé účinky jsou pro výrazně menší konzumovatelné množství zanedbatelné.

2.1.1.3 Pór (*A. porrum*)

U póru je konzumována podlouhlá a zdužnatělá cibule. Zelená část cibule je zhruba dvakrát bohatší na vitamíny než bílá část. Chut' a aroma je výrazně jemnější než u cibule a česneku.

2.1.1.4 Medvědí česnek (*A. ursinum*)

Popularita této rostliny stoupá zejména v posledních letech. Je využívána jak při přípravě pokrmů, tak i v léčitelství. Má antioxidační účinky, používá se jako prevence chřipkového onemocnění a je doporučován pro snížení krevního tlaku. Tento druh se vyskytuje volně rostoucí v přírodě. [15][16][17][18]

2.1.2 Česnek (*A. sativum*)

Česnek je považován za rostlinu horskou, mrazuvzdornou, která je náročná na světlo. Česnek má výbornou schopnost přizpůsobovat se ekologickým podmínkám. Je ho možné pěstovat v tropických i severně položených oblastech. Snáší lehké, chudé půdy.

Hlavními orgány česneku jsou kořen, podpučí, pupen, listy, kolaterální pupeny, stonek a květenství.

Za nejdůležitější orgán rostliny česneku je nejspíše možné považovat pupen, pro který je u česneku zažitý termín puk. Je to útvar, který se nachází uvnitř stroužku, chráněn dužnatým zásobním listem. Vývoj pupene je možné pozorovat i po sklizni, kdy roste na úkor zásobního listu. Podpučí se dělí na primární a sekundární. Primární podpučí propojuje

svazčitý kořenový systém s lodyhou a zároveň se na něm tvoří listy a kolaterální pupeny, které se později vyvinou ve stroužky. Podle stop vzniklých na podpučí je možné identifikovat různé typy česneku. Sekundární podpučí spočívá na vrcholku lodyhy a jsou na něm pacibulky v okolíku. Podle odrůd česneku se počet listů pohybuje mezi 8 – 15. Plochy listů jsou čárkovité, žlábkovité nebo hladké. Jejich délka je v rozmezí 20 až 50 cm. Cibule česneku je charakteristicky dělená na vyvinuté stroužky, které jsou ve skupinách děleny šupinami listových pochev. Stroužky slouží jako zásobní a rozmnožovací orgány. Dužinu stroužku tvoří zásobní pletivo dužnatého listu. Celkový počet stroužků různých odrůd a typů je od dvou do dvaceti. Květonosná lodyha vyrůstá z centrálního hrbolku podpučí a je zakončena lichookolíkem.

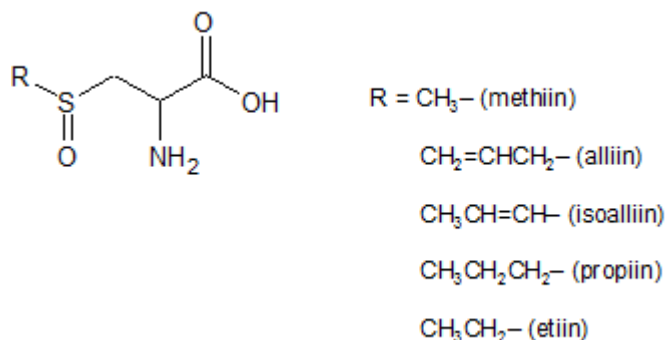
Česnek kuchyňský je dělen na tři typy. Typ H – paličák, typ U – širokolistý nepaličák a typ A – úzkolistý nepaličák. Dělení vzniklo na základě tvorby lodyhy a stavby cibule.

2.1.3 Látkové složení česneku

Česnek obsahuje necelých 70% vody. Obsah bílkovin se pohybuje kolem 6%, sacharidy tvoří zhruba 25 % a množství tuku je pod 1 %. Nejdůležitější látky s prospěšnými vlastnostmi obsahují síru. Dále jsou zastoupeny vitamíny, enzymy, hormonální látky, minerály a stopové prvky. Obsah těchto složek je v česneku velice proměnlivý a závisí na mnoha faktorech v závislosti na odrůdě, půdě, počasí, hnojení apod. Obsah síry může u jednotlivých odrůd kolísat v rozmezí až 1000 %.

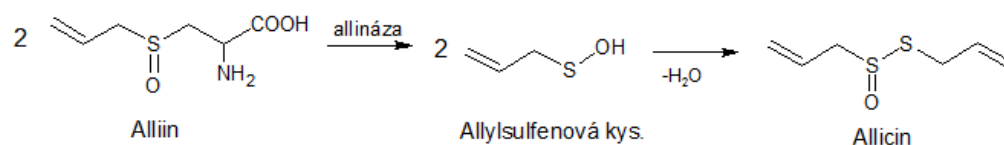
2.1.3.1 Sirné látky

Nejdůležitější skupinou látek obsahujících síru jsou S-alk(en)ylcystein sulfoxidy. Jedná se o deriváty aminokyseliny cysteinu, které jsou prekurzory výrazné chuti a vůně česneku. [19]



Obrázek 1: Různé formy S-alk(en)ylcystein sulfoxidu

V největším zastoupení těchto derivátů je alliin, neboli S-allylcysteinsulfoxid. Farmaceuticky je to neúčinná látka, tvořená jemnými, bílými jehličkami, které se dobře rozpouští ve vodě. Při porušení tkáně dojde k uvolnění enzymu allinázy z vakuol a vzniku Alicinu. [20]



Obrázek 2: Syntéza allicinu z alliinu

Allicin je olejovitá, slabě nažloutlá tekutina česnekového zápachu. Má antibiotické a další účinné vlastnosti. Isoalliin je izomerem alliinu, liší se polohou dvojně vazby. Při rozkladu isoalliinu vznikají látky, které způsobují slzení očí. V česneku je této látky výrazně méně než u cibule. Při přeměně alliinu v allicin vznikají také sulfidy. Největší podíl (60%) zastává diallyldisulfid, dále dipropyldisulfid a diallyltrisulfid. Další sirnou sloučeninou je ajoen, který vzniká z allicinu. Vyskytuje se ve dvou formách cis a trans a vzniká pravděpodobně kondenzací allicinu. Síru obsahují také scordininy a allilthiamin, což je forma vitamínu B₁.

2.1.3.2 Látky bez síry

Česnek je zdrojem důležitých vitamínů. Jejich účinek je navíc ještě zesílen přítomnými sirnými látkami. Obsahuje vitamín A, vitamíny skupiny B (B₁, B₃, B₅, B₆,

B7), dále vitamíny C a E. V česneku je velké množství adenosinu, což je nukleosid složený z molekuly nukleové báze adeninu a cukru ribózy a podílí se na tvorbě nukleových kyselin. Terapeuticky účinnou látkou v česneku je bezsírné antibiotikum allistatin. Je to vysoce účinná látka proti *Escherichia coli* a mléčným bakteriím. Flavonoidy obsažené v česneku, quercetin a antokyany, fungují jako přirozený ochranný faktor proti plísním. Z přítomných enzymů je v česneku již zmíněná allináza, která štěpí pouze alliin. Dále je přítomná například argináza, myrosináza, peroxidáza a deoxyribonukleáza. Fenylyalanin-ammoniaklyáza se s alliázou podílí na tvorbě aromatických látek. V celé rostlině je přítomen fytohormon giberelin. Zásobní látkou česneku je sinistrin. Česnek je bohatý na minerální látky. Nejzajímavější je vysoký obsah selenu a germania. Obsah těchto látek v česneku je více než desetkrát větší než u jiných běžných kultivarů. Ve značném množství se v česneku nalézá také jód, který dokáže česnek dobře kumulovat. Za zmínku stojí také vysoký obsah draslíku, mědi a molybdenu.

2.2 Mikroextrakce pevnou fází (SPME)

Solid Phase Microextraction, neboli mikroextrakce pevnou fází je adsorpčně-desorpční technika k zakoncentrování analytu, vyvinutá Pawliszinem v roce 1989. Jedná se o robustní metodu vhodnou pro rychlou extrakci nebo prekoncentraci těkavých a polotěkavých látek bez nutnosti použití rozpouštědla. Díky své snadnosti, rychlosti a jednoduché aparatuře lze tuto techniku lehce automatizovat. Nejběžnější spojení SPME je s plynovou chromatografií. SPME má široké spektrum využití při studiu životního prostředí, ve forenzní a klinické analýze, v toxikologii, botanice, mikrobiologii, v potravinářství, analýze vonných složek. [21][22] Kompletní seznam aplikací SPME byl vydán společností SUPELCO. [23]

2.2.1 Princip SPME

K extrakci těkavých analytů z matrice vzorku využívá SPME křemenné vlákno s tenkým filmem sorbentu na svém povrchu. Podle typu vlákna nastává na jeho povrchu buď adsorpce, nebo absorpce analytů. K tomuto jevu dochází, dokud není ustanovena rovnováha mezi koncentracemi analytu ve vzorku a v sorbentu. Distribuční konstanta analytu mezi sorbentem a matricí je dána rovnicí:

$$K_{fs}=c_f/c_s$$

Kde c_f a c_s jsou rovnovážné koncentrace analytů na vláknech a v matrici vzorku. Množství nasorbovaných analytů na povrchu vlákna lze vyjádřit rovnicí:

$$n=K_{fs}V_fV_sC_0/K_{fs}V_f+V_s$$

kde n je látkové množství extrahovaného analytu, V_f je objem sorbentu, V_s objem vzorku a C_0 je původní koncentrace analytu vzorku.

Množství extrahovaných látek závisí na mnoha faktorech, jako je rozdělovací koeficient mezi matricí vzorku a vláknem, těkavost, polarita, pH, teplota apod. [24]

2.2.2 SPME zařízení

U manuálních zařízení pro SPME se v podstatě jedná o upravenou stříkačku. Jehla slouží k propíchnutí septa a také k ochraně vlákna před mechanickým poškozením.

SPME vlákna jsou komerčně dostupná v několika tloušťkách, pokrytá nepolárními i polárními sorbenty. Tyto polymerní sorbenty jsou k dispozici kapalné (vyrobené z jednoho druhu sorbentu) nebo pevné (tvořené kombinací několika druhů polymerů). Mechanismus extrakce se zde liší: u kapalného sorbentu dochází k absorpci a u pevného k adsorpci. Kombinací různých sorbentů je možné dosáhnout extrakce specifických sloučenin. [25][26]

Nejběžnějším vláknem pro analýzu těkavých vonných látek bývá vlákno pokryté polydimethylsiloxanem (PDMS) o tloušťce 100 μm . Zhruba 80% prací s použitím SPME využívá právě toto univerzální vlákno, které je dostatečně selektivní pro většinu organických látek. [27]

Při potřebě rychlejšího ustanovení rovnováhy nebo pro méně těkavé sloučeniny, které mohou být obtížně termicky desorbovány, se volí vlákno s tenčí tloušťkou filmu. Obecně lze říci, že u vlákna pokrytého tlustším filmem trvá dosažení rovnováhy delší dobu, ale poskytuje vyšší citlivost díky většímu množství nasorbovaného analytu. [28]



Obrázek 3: SPME zařízení

2.2.3 Proces SPME

SPME analýza je tvořena dvěma hlavními kroky: extrakce analytu a jeho následná analýza. Před samotnou extrakcí je nutné přechistit fázi na vláknu. Propíchnutí septa obstará, jehla, pokud se jedná o kapalný vzorek, je vlákno vytaženo až do roztoku. U headspace analýzy se vlákno vytahuje do plynné fáze nad kapalinou nebo pevným vzorkem. Úkony k analýze jsou obdobné. Propíchnutí GC septa a vytažení vlákna z jehly. Desorpci analytu obstará nosný plyn ve vyhřátém nástřikovém prostoru. [29][30]

2.2.4 Optimalizace SPME

Po vybrání vhodného vlákna je nutné optimalizovat extrakční podmínky. Existují dva nejběžněji používané způsoby vzorkování: přímá extrakce a headspace extrakce.

- **Přímá extrakce (DI-SPME)**

V tomto režimu vzorkování dochází přímo k ponoření vlákna do matrice vzorku. DI-SPME je využívána především pro vzorky v kapalném skupenství. Při určitých analýzách je nutné odstranit vysokomolekulární a interferující látky z matrice, které mohou ovlivnit SPME. Lze využít například filtraci nebo odstředění. Přímá extrakce je vhodná pro sloučeniny s nízkou až střední těkavostí a vysokou až střední polaritou.

- **Headspace (HS-SPME)**

Tento způsob využívá extrakci těkavých analytů z prostoru nad vzorkem. Vzorek v uzavřené nádobě může být jak kapalný, tak pevný. Oproti DI-SPME je headspace rychlejší v ustanovení rovnovážného stavu. HS extrakce je vhodnější pro extrakci analytů s vysokou až střední těkavostí a nízkou až střední polaritou. [31][32]

2.2.4.1 Vliv míchání

Dobu potřebnou k ustanovení rovnováhy, tak i k množství extrahovaných analytů lze ovlivnit mícháním. Významného zlepšení lze dosáhnout u vzorku obsahujícím molekuly s vyšší molekulovou hmotností. U DI-SPME bývá obvykle míchání obstaráno magnetickým míchadlem. Míchání je možné obstarat také pohybem vlákna nebo vialkou se vzorkem. Jako další způsob lze použít sonifikaci či vortex. U HS-SPME se míchání běžně nepoužívá.

2.2.4.2 Vliv teploty

Optimalizace teploty je důležitá v případě, že nechceme snižovat citlivost. Se zvyšováním teploty dochází u HS-SPME ke zvyšování koncentrace analytů v headspace prostoru, čímž dochází ke zlepšení extrakce a také zkracování časů potřebných k dosažení rovnovážného stavu. Na druhou stranu nastává snižování distribuční konstanty mezi matricí vzorku a sorbentem, což vede ke snížení citlivosti SPME a výtěžku extrakce v rovnovážném stavu. Je tedy důležité najít dobrý poměr mezi rychlostí extrakce a její výtěžností.

2.2.4.3 Vliv délky doby sorpce

Ve většině případů je volena délka doby sorpce tak, aby byla zajištěna co možná největší extrakce analytu. Optimum se většinou zjišťuje proměřením standardů extrahovaných v určité škále extrakčních časů a následným porovnáním s plochami píků z GC. Významný rozdíl v délce doby sorpce je u HS a DI-SPME.

2.2.4.4 Vliv množství vzorku

Množství extrahovaných analytů vzrůstá s velikostí vzorku, což je ještě významnější pro sloučeniny s vyšší hodnotou K_{fs} . Objem vzorku lze odhadnout z tabelovaných hodnot K_{fs} , jeho množství je ovšem limitováno dostupnými vialkami pro SPME.

2.2.4.5 Vliv pH

Během SPME extrakce mohou být extrahovány pouze nedisociované formy analytů. Je tedy nezbytné převést analyty na neutrální formu, čehož lze dosáhnout právě změnou pH: nízké hodnoty pH umožňují efektivní extrakci kyselých látek a vyšší hodnoty pH látek bazických. Pro amfoterní sloučeniny je nutné pH poskytující optimální extrakci zjistit empiricky. [22][24][33][34]

2.2.4.6 Derivatizace analytu

Derivatizace se používá v případech, kdy je potřeba zlepšit extrakci, separaci nebo citlivost. Pokud jsou analyty při HS-SPME nedostatečně těkavé, je možné jejich převedení na více těkavé analogy. [35] Derivatizace se běžně využívá při SPME-GC, kde je dostupné velké množství derivatizačních činidel. Je více možností provedení derivatizace: před extrakcí, po extrakci a během extrakce. V prvním případě je derivatizační činidlo přidáno do vialky se vzorkem a následuje derivatizační reakce. Při derivatizaci po extrakci je vlákno s již nasorbovaným analytem vloženo do vialky s derivatizačním činidlem a samotná derivatizace extrahovaných látek probíhá na vláknech. Během simultánní extrakce/derivatizace je nejprve nanášeno derivatizační činidlo na vlákno, které je následně vystaveno působení matrice vzorku. [24]

2.2.5 Rozhraní SPME-GC

Nejčastější využití SPME bývá ve spojení s plynovou chromatografií. Je však možné i jiné spojení. [36][37][38] Běžně se vzorek zavádí do GC po SPME za splitless podmínek. Nízkoobjemové a úzké linery zajišťují vysoký průtok nosného plynu kolem vlákna, čímž je dosaženo efektivního odvádění extrahovaných analytů dále na kolonu. Použitím vysokých teplot v injektoru dojde ke snížení distribuční konstanty mezi povrchem vlákna a nosným plynem a zároveň růstu difuzního koeficientu. Takto je dosaženo velice rychlé desorpce analytů z vlákna. [39]

2.3 Plynová chromatografie (GC)

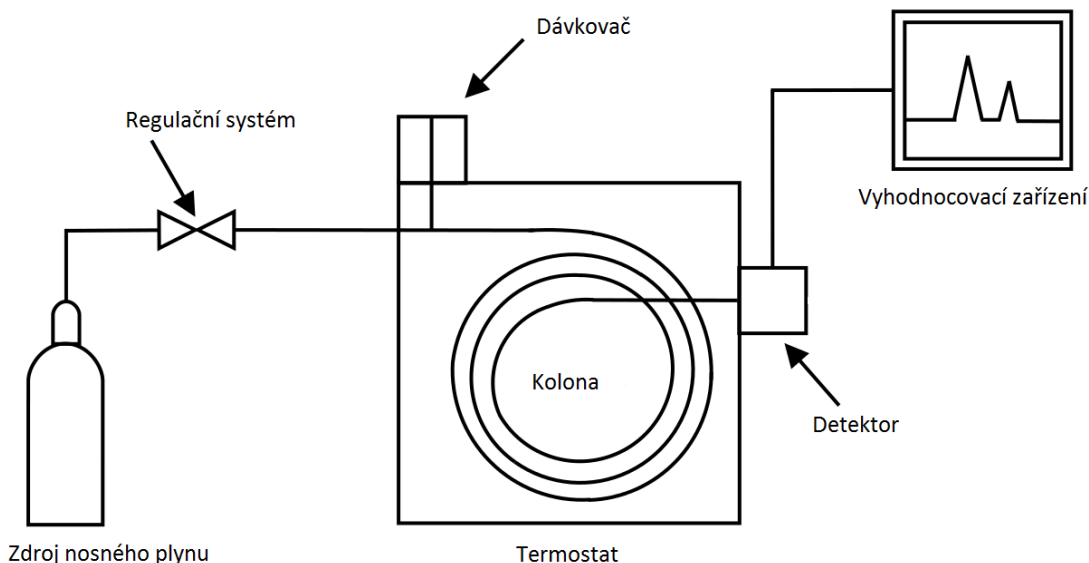
Plynová chromatografie je separační metoda, která rozděluje jednotlivé složky vzorku mezi dvě fáze. Jedná se o stacionární fázi s velkým povrchem a mobilní fázi – nosný plyn, který proudí kolem fáze stacionární. Vzorek je odpařen a unášen mobilní fází přes kolonu. Složky vzorku interagují se stacionární fází a jsou následně na základě odlišných afinit zadržovány ve fázi po různou dobu. Na detektor, který je na konci kolony, se tedy nejdříve dostanou složky, které jsou nejméně zadržovány. [40]

2.3.1 Derivatizace v GC

Tvorba derivátů pro analýzu plynovou chromatografií za účelem zlepšení chromatografických vlastností bývá mnohdy nezbytná. Je tak možné zlepšit těkavost analytů, zamezit nežádoucí sorpci nebo zlepšit selektivitu, citlivost a mez detekce. K chemické přeměně látek může docházet před vstupem vzorku na kolonu mimo chromatografický systém, dále reakce může proběhnout přímo na koloně nebo po separaci látek ještě před vstupem na detektor. Mezi nejčastější derivatizační reakce patří například silylace. Silylderiváty mohou být připraveny z látek, které obsahují ve své molekule aktivní vodík. Nejčastěji bývá tento vodík nahrazen trimethylsilylovou skupinou. Další reakcí může být alkylace, kdy je aktivní vodík nahrazen alifatickou nebo alicyklickou skupinou a vzniká méně polární derivát. Běžnou derivatizační reakcí je také acylace, kdy je aktivní vodík polární skupiny nahrazen acylovou skupinou. Acylace jsou často využívány i pro derivatizaci polárních a vícefunkčních sloučenin. [41][42]

2.3.2 GC instrumentace

Schéma GC systému je uvedeno na obrázku číslo 4. Hlavními komponentami je zdroj nosného plynu, regulační systém, dávkovač, kolona, termostat, detektor a vyhodnocovací zařízení.



Obrázek 4: Schéma plynového chromatografu

2.3.2.1 Nosný plyn

Nosný plyn, jako mobilní fáze musí být inertní a nesmí žádným způsobem chemicky interagovat se vzorkem. Hlavním účelem nosného plynu je unášet vzorek přes kolonu. Dalším účelem je poskytování vhodné matrice pro detektor při detekci složek vzorku. Je nezbytné, aby byl nosný plyn vysoce čistý, jinak může docházet k chemickému narušení stacionární fáze nebo se může objevit vysoké pozadí při detekci. Nejběžněji používané nosné plyny jsou dusík, helium nebo argon a bývají uchovávány v tlakových lahvích.

2.3.2.2 Regulační systém

Jedná se o elektronické zařízení, které slouží k ovládání průtoku a tlaku nosného plynu. Zajišťuje konstantní průtok na koloně i detektoru, tlak se potom nastaví automaticky podle druhu plynu, průměru a délky kolony. Průtok nosného plynu se může programově měnit během analýzy. Pro kvalitativní analýzu je nezbytné mít konstantní a reprodukovatelný průtok, aby mohly být reprodukovány retenční časy.

2.3.2.3 Dávkovací systém

Úlohou dávkovače je zajistit rychlé a reprodukovatelné nadávkování vzorku na kolonu. Během dávkování nesmí docházet ke změně složení vzorku a k tepelným a tlakovým změnám na koloně.

Plyny jsou dákovány pomocí injekčních mikrostřikaček nebo dávkovacích kohoutů. Kapalně vzorky se dávkuje injekčními stříkačkami do vyhřátého dávkovacího prostoru, kde dochází k odpaření vzorku a jeho přenesení nosným plynem na začátek kolony. U pevných vzorků je nejběžnější dávkování v kombinaci s těkavým rozpouštědlem injekční mikrostřikačkou.

Do plněných kolon je možné dávkovat podstatně větší množství vzorku než do kolon kapilárních. Při dávkování do kapilární kolony se v dávkovači běžně vzorek dělí na dvě části. Až 99% vzorku se nosným plynem vymyje a na kolonu se přivede pouze zbývající část. Při analýzách stopových množství je možné využít dávkování vzorku přímo na kolonu. [43]

2.3.2.4 Chromatografické kolony

V plynové chromatografii se používají dva druhy kolon – náplňové kolony a kolony kapilární. Materiálem používaným k výrobě náplňových kolon může být nerezová ocel, hliník, teflon nebo sklo. Délka těchto kolon je od pár desítek centimetrů až po 400 cm a jejich průměr je 2 - 4 mm. Náplň těchto kolon může být tuhý zrnitý adsorbent nebo kapalina zakotvená na nosiči. Kapilární kolony se dělí na tři skupiny. Kolony s kapalinou zakotvenou na vnitřní stěně kapilární trubice (typ WCOT), kolony s kapalinou zakotvenou

na nosiči zachyceném na vnitřní stěně kapiláry (typ SCOT) a kolony s absorbentem zachyceným na vnitřní stěně kapiláry (typ PLOT). Kapilární kolony se nejčastěji vyrábí ze skla, taveného křemene a nerezové oceli. Délka kolon je v rozmezí 10 - 200 m a vnitřní průměr je 50 μm až 1 mm. [40][44]

2.3.2.5 Vyhřívání zóny

U GC je nutné termostatování od dávkovacího prostoru, přes kolonu až po detektor. Dávkovací zóna musí být dostatečně vyhřátá, aby bylo dosaženo rychlého odpaření vzorku, ale na druhou stranu teplota musí být dostatečně nízká, aby nedošlo k tepelné dekompozici. Pro rychlé odpaření je nezbytné, aby teplota injektoru byla alespoň o 50 °C vyšší, než je bod varu vzorku. Teplota kolony musí být dostatečně vysoká, aby přes ni prošly složky vzorku za rozumnou dobu. Termostatování kolony je důležité z důvodu měření reprodukovatelných elučních dat. Detektory a jejich spoje s kolonou jsou vyhřívány z důvodu, aby nedocházelo ke kondenzaci vzorku. [45]

2.3.2.6 Detektory

Umístění detektorů je na konci kolony a jejich úkolem je zaznamenávání změn některých vlastností efluentu. Zaznamenávají tedy rozdíl při průchodu čisté mobilní fáze a mobilní fáze, která obsahuje eluované složky.

Jedna z možností dělení detektorů je podle dějů, které probíhají při detekci, na detektory nedestrukční a destruktivní. U nedestrukčního detektoru nedochází při průchodu látky k chemické změně. Patří zde například tepelně vodivostní detektor, detektor elektronového záchytu, argonový a heliový detektor. V destruktivních detektorech dochází k nevratným změnám analyzovaných látek. Mezi tento typ detektorů se řadí plamenový ionizační detektor, termoionizační detektor a hmotnostní spektrometr.

- **Tepelně vodivostní detektor (TCD)**

Principem TCD je měření tepelné vodivosti analytu v nosném plynu. Detektor je tvořen kovovou spirálou (odporovým vláknem) v termostatovaném bloku. Vlákno je žhaveno konstantním elektrickým proudem a je ochlazováno na určitou teplotu prouděním

nosného plynu. Za přítomnosti složky analytu dochází ke změně tepelné vodivosti prostředí kolem odporového vlákna a tím se mění teplota samotného vlákna. Důsledkem je změna elektrického odporu a jeho porovnání ve Wheatsonově můstku s odporem vlákna, přes které proudí čistý plyn. Tepelná vodivost nosného plynu se musí co nejvíce odlišovat od tepelné vodivosti analyzovaných složek, proto se nejčastěji používá helium a vodík, které mají nejvyšší tepelně – vodivostní hodnoty. TCD se nejčastěji využívá při analýzách anorganických plynů a nízkomolekulárních organických látek.

- **Detektor elektronového záchytu (ECD)**

Detekce je založena na zachycení elektronů elektronegativními funkčními skupinami a následném měření poklesu ionizačního proudu. V ionizační komůrce dochází k ionizaci nosného plynu radioaktivním zářičem (^{63}Ni), vzniku elektronů a je přítomen efluent se složkami s elektronegativní vlastností, dojde k jejich zachycení a vzniku aniontů. Důsledkem je pokles proudu úměrný koncentraci analytu. ECD je selektivní detektor hlavně ke sloučeninám obsahujících halogeny, síru, fosfor, olovo, nitrosloučeniny a aromatické uhlovodíky. Je hodně využíván při analýzách pesticidů.

- **Plamenový ionizační detektor (FID)**

FID je nejrozšířenější detektor speciálně vyvinutý pro GC. K ionizaci dochází v plazmě kyslíkovodíkového plamene. Organické látky jsou v plameni štěpeny na iontové a radikálové fragmenty. Tyto částice se na první elektrodě nabijí na určitý potenciál a jsou přitahovány k druhé elektrodě, kde odevzdají náboj. Měří se vzniklý ionizační proud, který je přímo úměrný počtu iontů. Už při stopových množstvích uhlovodíků rychle stoupá počet iontů obsažených v plameni. Signál je tedy závislý na obsahu uhlíku. [40][46][47]

2.3.3 GC-MS

Chromatografické parametry používané pro kvalitativní analýzu jsou nazývány retenční data. Tyto retenční parametry není možné samotné použít k identifikaci píků u všech typů analytů. Z tohoto důvodu se pro jejich identifikaci kombinuje GC

s hmotnostním analyzátozem. Při použití mikrogramů vzorku lze kvantitativně i kvalitativně identifikovat neznámou sloučeninu, určit její strukturu, elementární složení a molekulovou hmotnost. Získaná data jsou porovnávána s bohatou knihovnou hmotnostních spekter. [44]

GC a MS lze považovat za kompatibilní přístroje. Oba systémy jsou vyhřívané, pracují se sloučeninami v plynném stavu a vyžadují obdobně velké vzorky. Atmosférický tlak, při kterém pracuje GC, musí být na rozhraní GC a MS zredukován na vakuum.

2.3.3.1 Iontové zdroje

Aby na molekuly analytu působilo magnetické pole nebo elektrické pole, musí být nejprve ionizovány. Existuje několik používaných ionizačních technik:

Elektronová ionizace (EI) je nejběžněji využívaná technika ve spojení GC-MS. Látky při výstupu z GC kolony přechází do vyhřátého iontového zdroje se sníženým tlakem a jsou ionizovány proudem emitovaných elektronů. Jedná se o tvrdou ionizační techniku, kdy molekula získá velký přebytek vnitřní energie, což má za následek vznik kation radikálů, které intenzivně fragmentují. Standardní energie elektronů je volena na 70 eV, která je dostatečně vyšší, než je energie meziatomových vazeb. Při této ionizační energii jsou k dispozici rozsáhlé knihovny EI spekter.

Chemická ionizace (CI) ve srovnání s EI má navíc přívod reakčního plynu, který je v nadbytku oproti vzorku. Proudem elektronů je nejprve ionizován reakční plyn, který následně ionizuje molekuly analytu. Jedná se o měkkou ionizační techniku. Jako nejběžnější reakční plyny jsou používány methan, isobutan a amoniak. CI využívá pouze zhruba 5-10 % GC-MS systémů.

2.3.3.2 Hmotnostní analyzátory a detekce

V hmotnostním analyzátozem dochází ve vakuu k dělení iontů v plynném stavu na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Typické analyzátory pro GC-MS systémy jsou kvadrupólový analyzátozem, iontová past nebo analyzátozem doby letu.

Kvadrupólový analyzátor je složen ze čtyř stejných kovových tyčí kruhového nebo hyperbolického průřezu. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné a na druhé dvě protilehlé záporné stejnosměrné napětí ve formě radiofrekvenčního elektrického pole. Ionty přivedené do kvadrupólu oscilují a v určitý časový okamžik projdou na detektor pouze ionty o hodnotě m/z , které mají stabilní trajektorii pro určitý poměr stejnosměrného napětí a amplitudy frekvence napětí. Ostatní ionty mají nestabilní trajektorii, kolidují s tyčemi a jsou odsáty vakuem. Postupnou změnou napětí a amplitudy se na detektor dostanou všechny ionty.

Iontovou past tvoří prstencová elektroda a dvě koncové elektrody. Vstupním otvorem koncové elektrody jsou pomocí krátkých napěťových pulzů přiváděny ionty do pasti. Díky určitým poměrům napětí, vkládaných na kruhovou a obě koncové elektrody, jsou ionty zadrženy uvnitř pasti. Postupnou změnou napětí jsou ionty vypuzovány na detektor výstupním otvorem na základě jejich hodnot m/z .

Analyzátor doby letu (Time-of-Flight, TOF) měří čas, během kterého ionty se stejnou kinetickou energií urazí danou vzdálenost. Napěťovým pulsem dojde k urychlení iontů, které následně dopadají na detektor v různém čase. Ionty s menší hodnotou m/z mají větší rychlost, takže se na detektor dostanou dříve. Podle času potřebného k dosažení detektoru se určuje hodnota m/z .

Jako běžný detektor iontů slouží elektronový násobič. Elektronový násobič zesiluje iontový proud pomocí sekundární emise elektronů. První dynoda emituje množství elektronů, které odpovídá počtu dopadajících iontů. Takto dojde ke kaskádovému zesílení signálu a je vygenerováno hmotnostní spektrum. [48][49]

3. Experimentální část

3.1 Zařízení a pomůcky

- Analytické váhy Mettler Toledo XSE 205
- Odstředivka Eppendorf 5702
- Blokový termostat Stuart SBH 130
- Ultrazvuková lázeň Elma S 40 H Elmasonic
- Automatické mikropipety
- Laboratorní sklo, třecí miska, krimpovací kleště a krimpovací vialky

3.2 Instrumentace

- Plynový chromatograf Agilent 7890A
- Hmotnostní spektrometr Agilent 5973C Inert
- Kolona HP-5ms, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm
- Program MSD Chemstation E.02

3.3 Chemikálie

- N-phenylmaleimide (Sigma-Aldrich)
- Propanthiol (Sigma-Aldrich)
- Diethylether (Penta s.r.o.)
- Ethylacetát (Penta s.r.o.)
- Pentan (Penta s.r.o.)
- Chloroform (Penta s.r.o.)
- Dichlormethan (Penta s.r.o.)
- Tetrachlorethylen (Penta s.r.o.)
- Tetrahydrofuran (Sigma-Aldrich)
- Acetonitril (Penta s.r.o.)
- terc-Butylmethylether (Sigma-Aldrich)
- Chlorid sodný (Penta s.r.o.)
- Methanol (Penta s.r.o.)

3.4 Experimentální podmínky

Analýza všech vzorků byla provedena na plynovém chromatografu Agilent 7890A, ovládaném pomocí programu MSD Chemstation. Při analýzách za použití SPME byla teplota nástřiku nastavena na 270 °C. Teplotní program byl nastaven na 50 °C – 2 min 5 °C/min – 300 °C – 10 min. Hmotnostní spektra byla snímána v režimu celkového iontového proudu (TIC) v rozsahu 29 - 520 m/z. Při analýzách využívajících automatický dávkovač (analýza derivátů) byl odebírán 1 µl vzorku s dávkovacím pulsem 20 psi, 12 s. Teplota nástřiku byla nastavena na 280 °C. Teplotní program byl nastaven na 40 °C – 4 min – 10 °C/min – 300 °C – 15 min. Hmotnostní spektra byla snímána v TIC režimu v rozsahu 29 - 350 m/z a v režimu monitorování selektivních iontů (SIM) pro hodnoty 173 a 175 m/z. V obou případech, jak při použití SPME a automatického dávkovače byl nastaven průtok nosného plynu helia na 0,9 ml/min.

3.5 Screening látek - SPME

Při přípravě vzorků byly homogenizovány v třecí misce zvláště části česneku, medvědího česneku, cibule, pórku a pažitky. Na analytických vahách bylo postupně naváženo 3,5 g homogenizátu každého druhu a každá navážka byla zvláště převedena do vialky se septem. Po zavedení SPME vlákna byly při 60 °C po dobu jedné hodiny extrahovány analyty. Následovala analýza na GC/MS.

3.5.1 Stanovení thiolů - derivatizace

Při optimalizaci derivatizace byly zjišťovány nejvhodnější podmínky jako množství derivatizačního činidla, délka derivatizace, teplota a extrakční činidlo. Jako vzorek byl používán 1 ml standardu propanthiolu v MeOH o $c = 10 \text{ mg/ml}$, který byl 100x zředěn nasyceným roztokem NaCl. Do vialky bylo ke vzorku přidáno 100 µl derivatizačního činidla, které bylo připraveno rozpuštěním 100 mg N-phenylmaleimidu v 10 ml MeOH. Po skončení derivatizace byl do vialky přidán 1 ml EtAc jako extrakční činidlo, vzorek byl extrahován 5 minut a centrifugován po dobu tří minut při 3 500 ot/min. Po odstředění bylo odebráno 800 µl vrchní fáze do krimpovací vialky a analyzováno pomocí GC/MS.

3.6 Reálný vzorek

K přípravě vzorku byly v třecí misce homogenizovány stroužky česneku a na analytických vahách bylo naváženo 7 g takto rozetřených stroužků. Hmota byla rovnoměrně rozdělena do dvou zkumavek a ke každé bylo přidáno 8 ml nasyceného roztoku NaCl. Vzorky byly centrifugovány při 3 500 ot/min po dobu tří minut. Kapalná fáze byla odebrána a použita k přípravě vzorku: 1 ml byl smíchán se 2 ml derivatizačního činidla a inkubovalo se 1 hodinu při 40 °C. Po derivatizaci byly do vialky přidány 2 ml destilované vody a 2 ml EtAc. Vzorek byl extrahován 5 minut a následně centrifugován. Extrakt byl odebrán a analyzován na GC/MS. Tímto způsobem byly testovány i další druhy rodu allium: cibule, pórek a medvědí česnek.

3.6.1 Kvantifikace

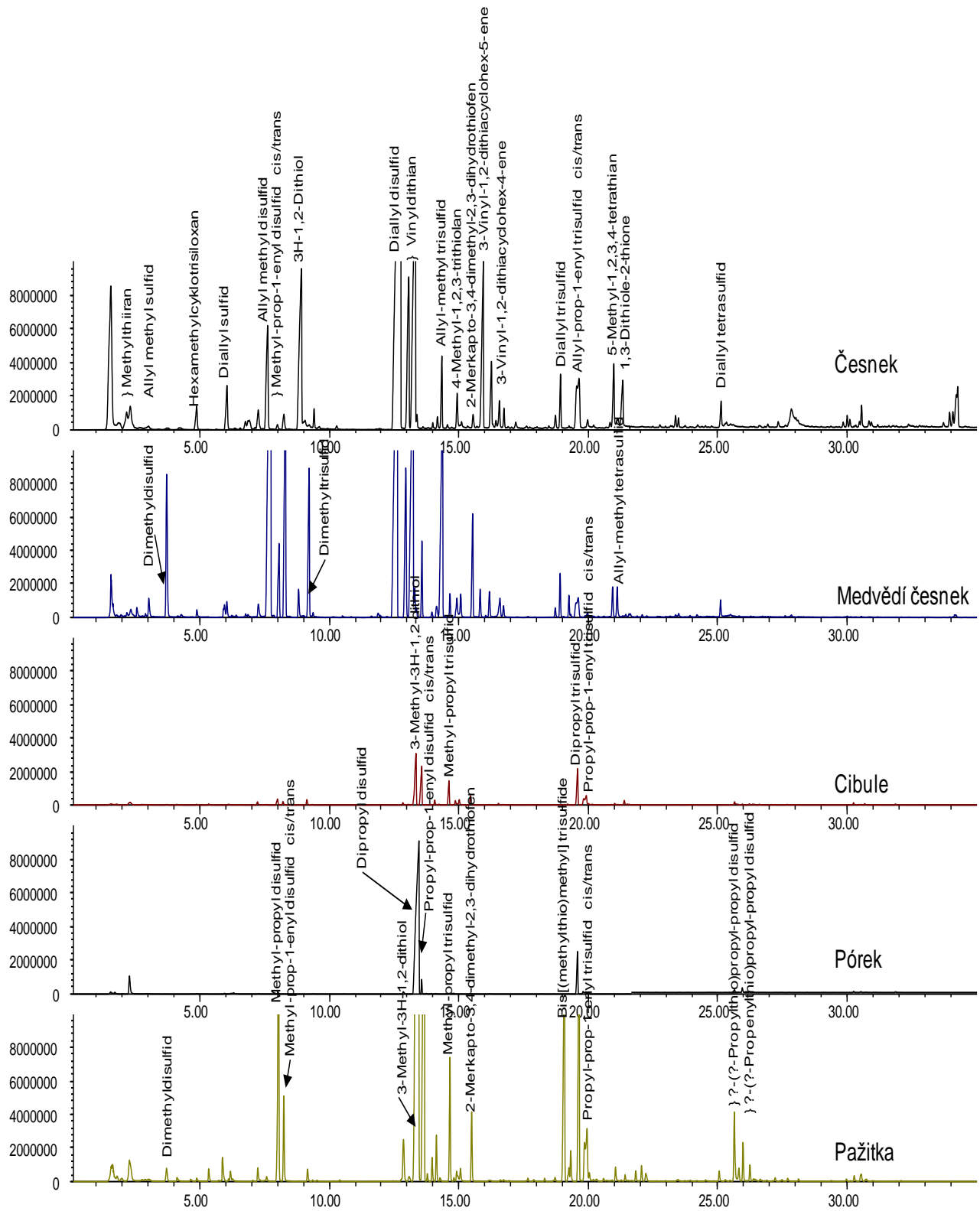
Obsah propanthiolu v česneku byl kvantifikován metodou standardního přídatku. Standard byl připraven zředěním 10 µl roztoku propanthiolu o $c = 10 \text{ mg/ml}$ v MeOH. Vzorky byly připraveny za stejných podmínek a stejným způsobem jako v kapitole 3.6. Přídatky činily 0, 2, 5 a 10 µl standardu propanthiolu.

4. Výsledky a diskuze

4.1 Screening látek

Látky obsažené v česneku, medvědí česneku, cibuli, pórku a pažitce jsou popsány u příslušných píků v chromatogramu na obrázku číslo 5. Poměry těchto látek se nachází v tabulce číslo 1. Nalezené sloučeniny byly z převážné části sulfidy. Jednalo se o mono-, di-, tri- a tetrasulfidy s navázanými alifatickými uhlovodíkovými řetězci s jedním nebo třemi atomy uhlíku. Volné thioly se za podmínek derivatizace nepodařilo detegovat z více důvodů. Množství těchto látek je malé, protože vznikají přechodně jako meziprodukty při syntéze sulfidů. Dalším důvodem je vysoká těkavost nízkomolekulárních thiolů a překrytí jim odpovídajících píků na začátku analýzy pod píky jiných látek. Z těchto příčin bylo nutné provést derivatizaci vzorků.

U medvědího česneku byl zkoumán poměr obsažených látek v jednotlivých částech rostliny (listy, poupata, květy, kořínky a cibulky). U pórku byla analyzována zvlášť bílá, část stonku, která je částečně pod zemí a zelená část.



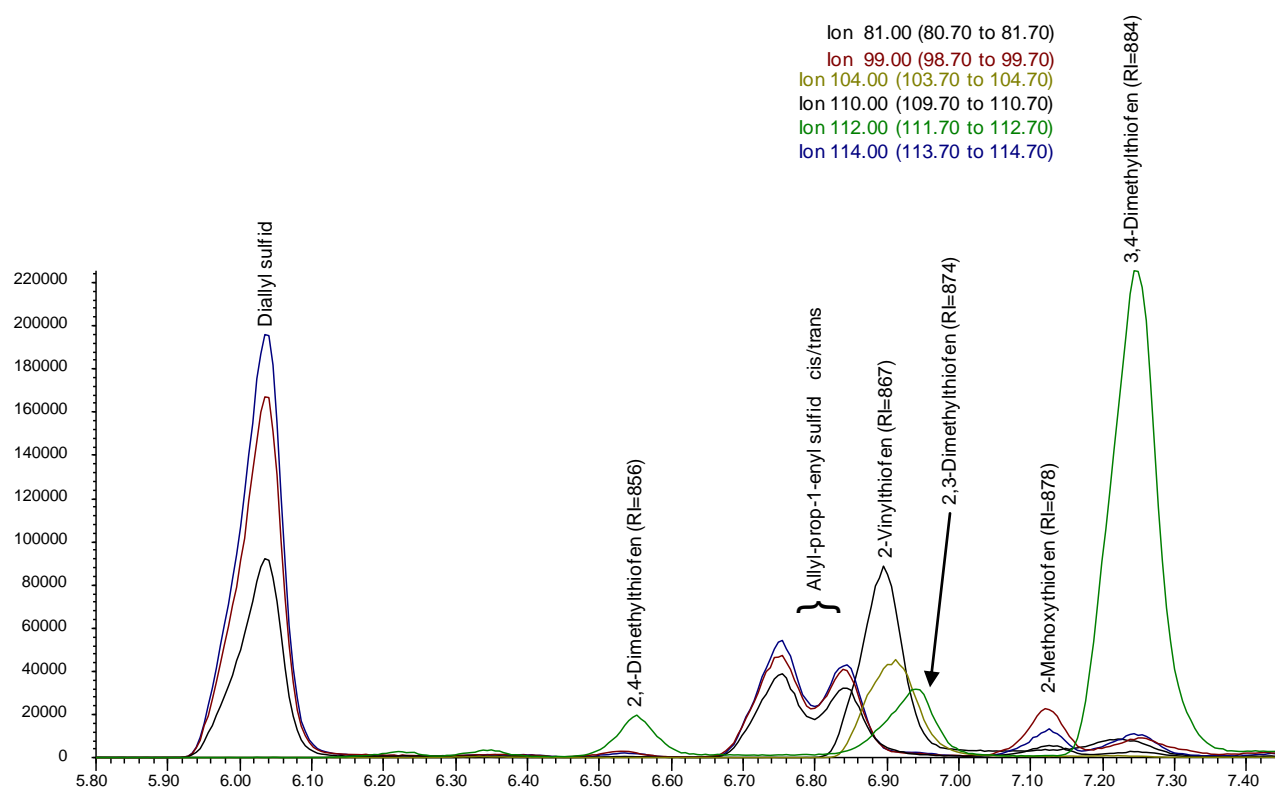
Obrázek 5: Porovnání chromatogramů analýz česneku, medvědího česneku, cibule, póru a pažitky.

Sloučenina	Česnek	Medvědí česnek	Cibule	Pórek	Pažitka
Methylthiiran	II	I		I	I
Allyl methyl sulfid		I			
Dimethyldisulfid		III			I
Hexamethylcyklotrisiloxan	III	I			I
Diallyl sulfid	III	I			I
Allyl methyl disulfid	II	III			
Methyl-prop-1-enyl disulfid cis/trans	I	III	I		III
Methyl-propyl disulfid					III
3H-1,2-Dithiol	III	I			
Dimethyltrisulfid	I	III			I
Diallyl disulfid	III	III			I
Vinyldithian	III	III			
3-Methyl-3H-1,2-dithiol			I		III
Dipropyl disulfid				III	
Propyl-prop-1-enyl disulfid cis/trans				I	
Allyl-methyl trisulfid	II	III			
Methyl-propyl trisulfid		I	I		III
4-Methyl-1,2,3-trithiolan	II	II	I		I
2-Merkapto-3,4-dimethyl-2,3-dihydrothiofen	I	III	I		III
3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene	III	I			
3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene	I	I			
Diallyl trisulfid	II	II			
Bis[(methylthio)methyl trisulfid					III
Allyl-prop-1-enyl trisulfid cis/trans	II	I			
Dipropyl trisulfid			I	I	III
Propyl-prop-1-enyl trisulfid cis/trans	I	I	I		III
5-Methyl-1,2,3,4-tetrathian	II	I			
Allyl-methyl tetrasulfid		II			I
1,3-Dithiole-2-thione	II				
Diallyl tetrasulfid	II	I			
?-(?-Propylthio)propyl-propyl disulfid					III
?-(?-Propenylthio)propyl-propyl disulfid					III

Tabulka 1: Porovnání zastoupení jednotlivých sloučenin u česneku, medvědího česneku, cibule, póruku a pažitky.

Z pěti zkoumaných druhů bylo největší zastoupení látek u česneku, medvědího česneku a v pažitce. Nejméně sloučenin bylo detegováno u póruku, ale pouze u něj byl nalezen dipropyl disulfid s nasycenými tříuhlíkatými řetězci, a to ve značném množství. Allyl methyl sulfid byl nalezen pouze v medvědího česneku. Čtyři sloučeniny: methyl-propyl disulfid, Bis[(methylthio)methyl] trisulfid, ?-(Propylthio)propyl-propyl disulfid a ?-

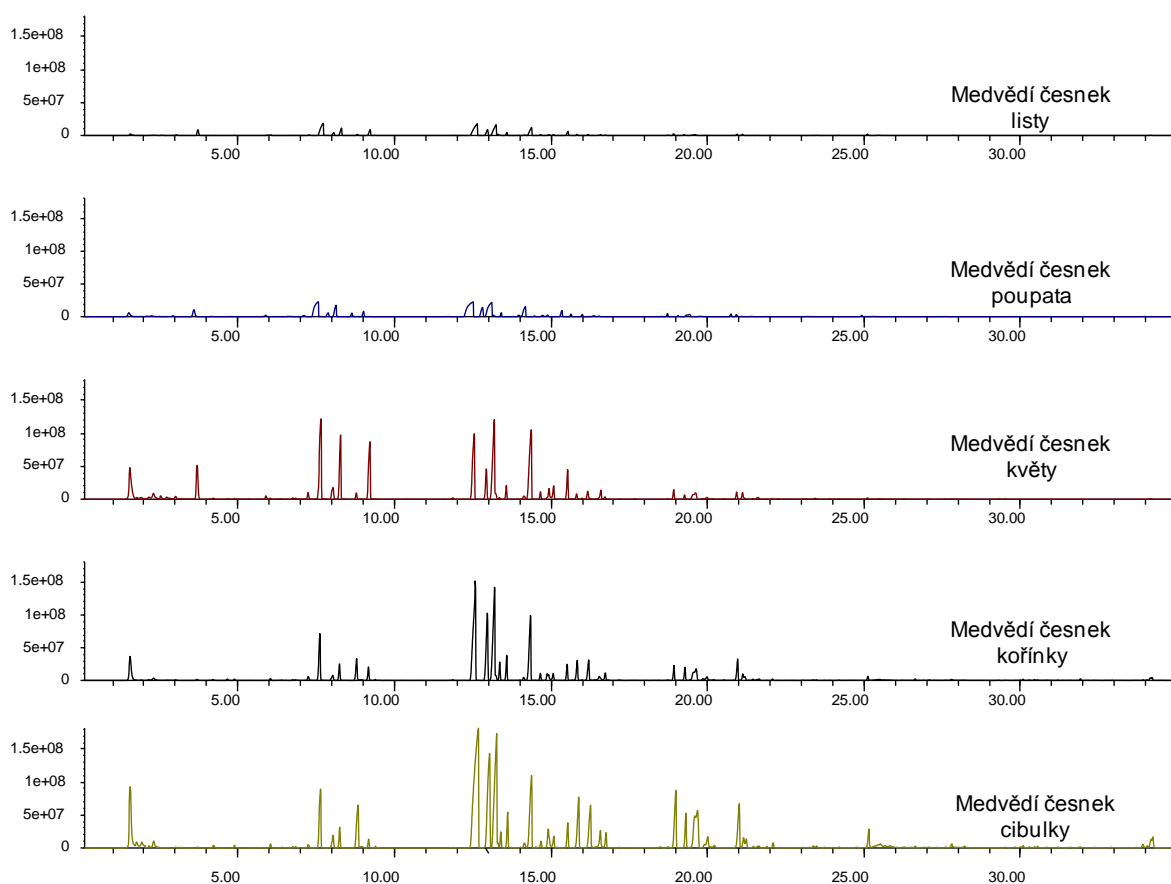
(?-Propenylthio)propyl-propyl disulfid byly detegovány pouze v pažitce. (Otazníky zastupují neznámé polohy lokantů, které nebylo možné na základě získaných spekter ani retenčních dat zjistit) Cis/trans izomery methyl-prop-1-enyl disulfidu a propyl-prop-1-enyl trisulfidu byly detegovány ve všech vzorcích kromě pórku, kde se dominantně vyskytují sulfidy s nasycenými tříuhlíkatými řetězci. S pozorovaným výskytem propylových derivátů koresponduje i obsah cis/trans propyl-prop-1-enyl disulfidu, který byl rovněž detegován pouze v pórku. Látka, která naopak byla pozorována pouze u česneku byl 1,3-dithiole-2-thione.



Obrázek 6: Chromatogram analýzy česneku v MS SIM módu pro různé hodnoty m/z.

Obrázek číslo 6 zobrazuje iontové chromatogramy rekonstruované pro různé hodnoty m/z odpovídající sulfidům a thiofenům obsaženým ve vzorku česneku. Dominantním sulfidem je zde dialyl sulfid, ke kterému patří izomery allyl-prop-1-enyl sulfid ve formě cis i trans. Z obrázku je zřejmá řada koelucí nedovolujících dostatečné rozlišení píků v chromatogramu při záznamu celkového iontového proudu. Teprve

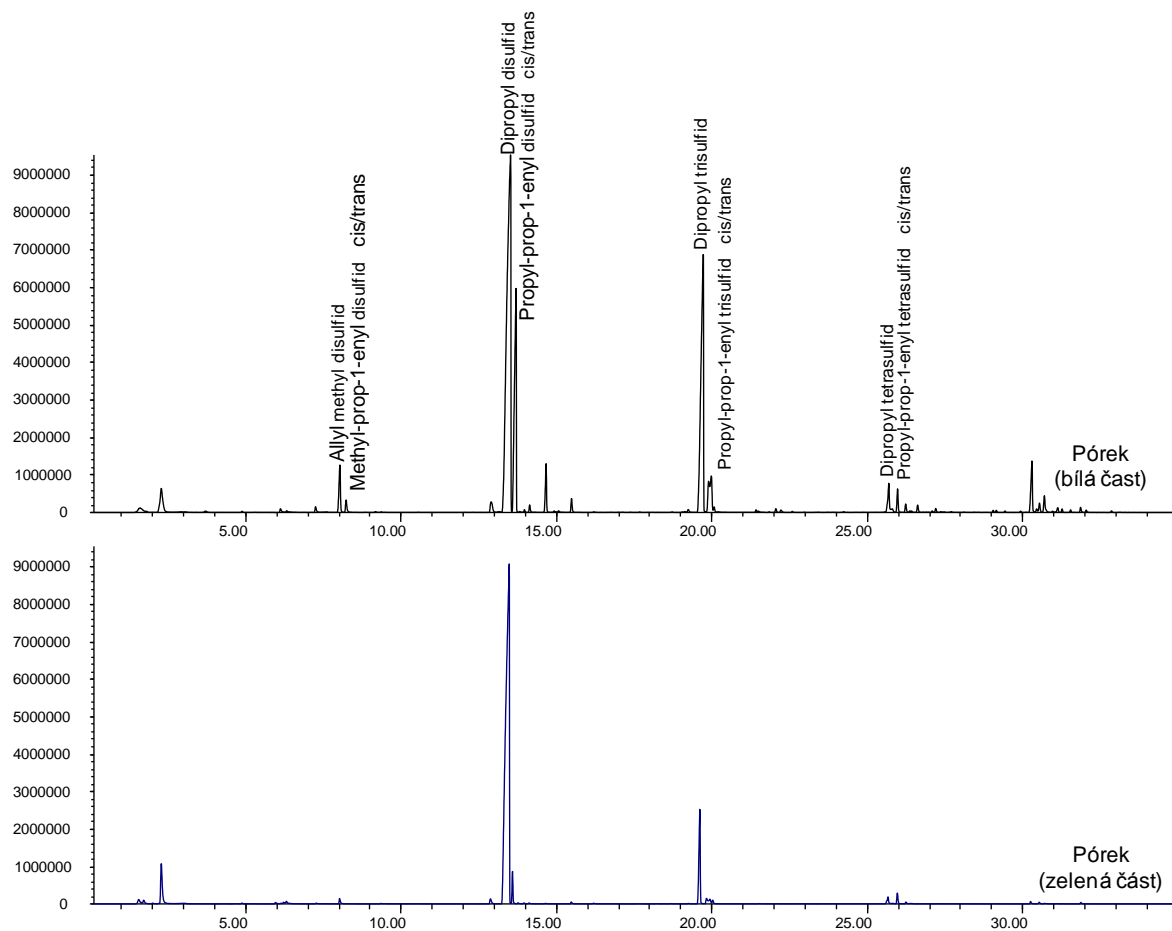
podrobnější analýza s využitím selektivních iontů dovoluje dostatečné odlišení jednotlivých látek, jejich identifikaci a případnou kvantifikaci. Identifikace těchto látek byla provedena na základě korigovaných hmotnostních spekter (odečtení pozadí) a známého elučního pořadí izomerů odvozeného z hodnot retenčních indexů. Hmotnostní spektra i hodnoty retenčních indexů byly vztaženy k referenčním hodnotám z databáze NIST 2014.



Obrázek 7: Chromatogramy znázorňující poměry látek v různých částech medvědího česneku.

V cibulkách medvědího česneku bylo detegováno největší množství látek. Tato skutečnost souvisí pravděpodobně s tím, že cibulky slouží jako zásobní orgány celé rostliny. Při srovnání chromatogramů je možné pozorovat určitý posun maxima distribuce detegovaných látek směrem k vyšším retenčním časům. V květech se nachází relativně větší množství více těkavých látek než v cibulkách a kořenech. (obr. 7) Větší množství

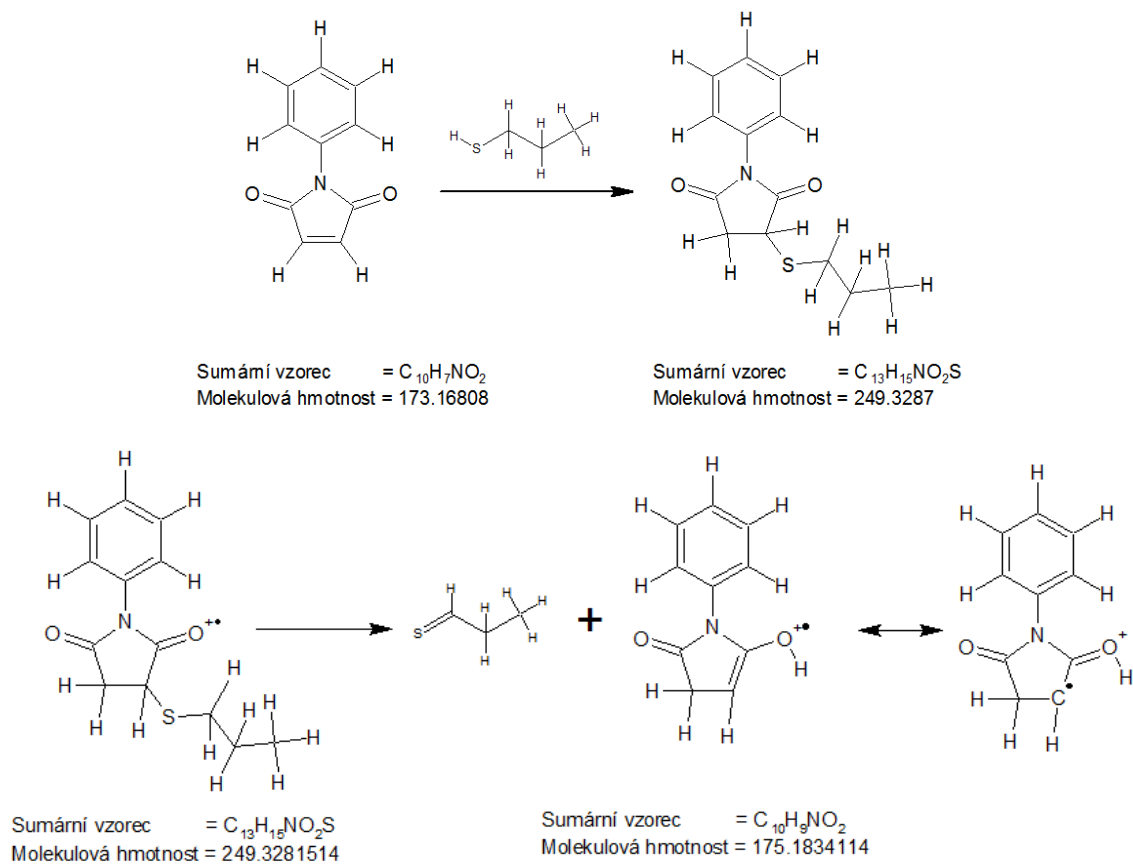
látek v podzemní části rostliny bylo pozorováno i u pórku, což je možné dobře vidět na obrázku číslo 8.



Obrázek 8: Chromatogramy znázorňující poměry látek v různých částech pórku.

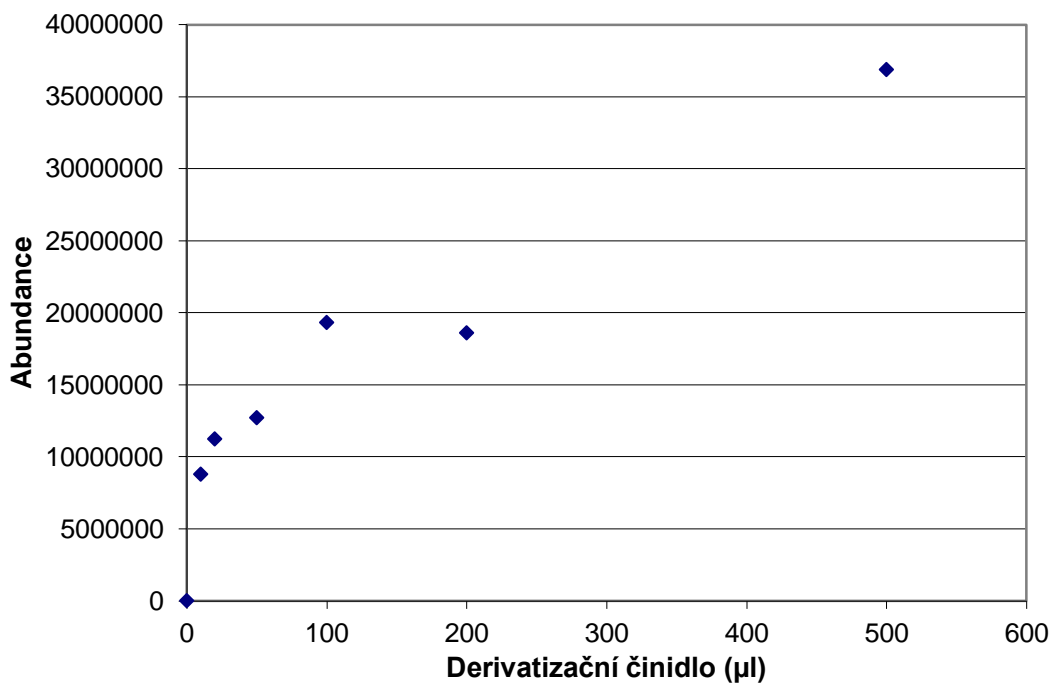
4.1.1 Optimalizace derivatizace

Před aplikací na reálný vzorek bylo nejprve nutno zajistit vhodné derivatizační podmínky. Byly zkoumány různé objemy derivatizačních činidel, teploty, extrakční rozpouštědla a inkubační časy. Jako standard byl vždy použit 1 ml zředěného roztoku propanthiolu v MeOH ($c_{\text{prop.}} = 0,1 \text{ mg/ml}$). L-L extrakce byla zvolena z toho důvodu, že je to metoda vhodnější ke kvantifikaci než SPME.



Obrázek 9: Znázornění průběhu derivatizace propanthiolu za použití N-phenylmaleimidu. V druhé části schématu je znázorněn McLaffertyho přesmyk, ke kterému dochází v iontovém zdroji.

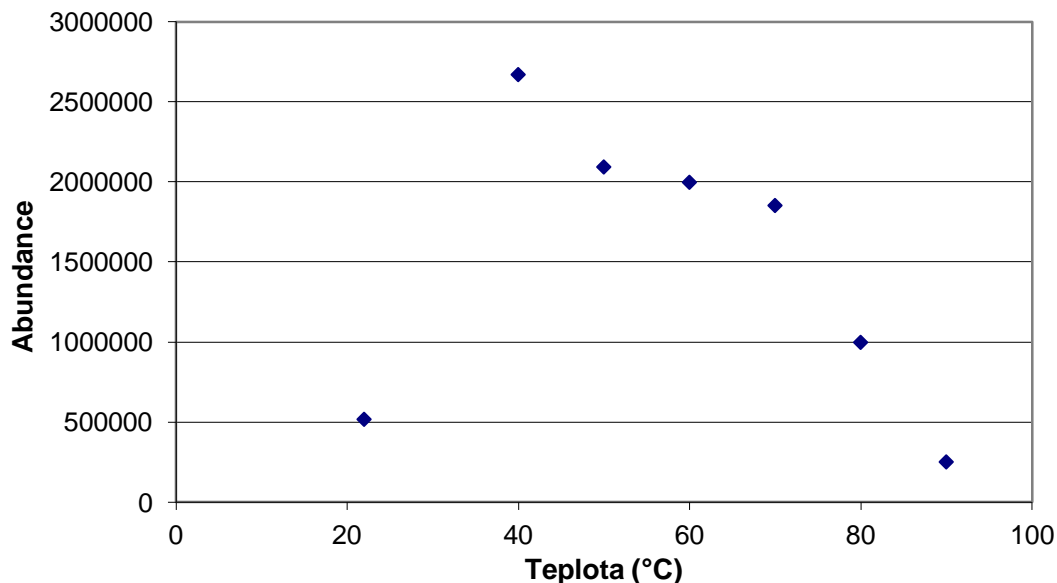
Jako první byly zkoušeny různé objemy derivatizačního činidla (0, 10, 20, 50, 100, 200 a 500 μ l). Na základě dostupné literatury byla inkubační doba derivatizace zvolena na 30 minut při 60 °C. K extrakci byl použit 1 ml diethyletheru. Vzorek byl odstředován po dobu tří minut při 3 500 ot/min. Po odstředění byla odebrána část vrchní fáze do krimpovací vialky a analyzována pomocí GC/MS. (obr. 10)



Obrázek 10: Závislost plochy píku derivátu na množství přidaného činidla.

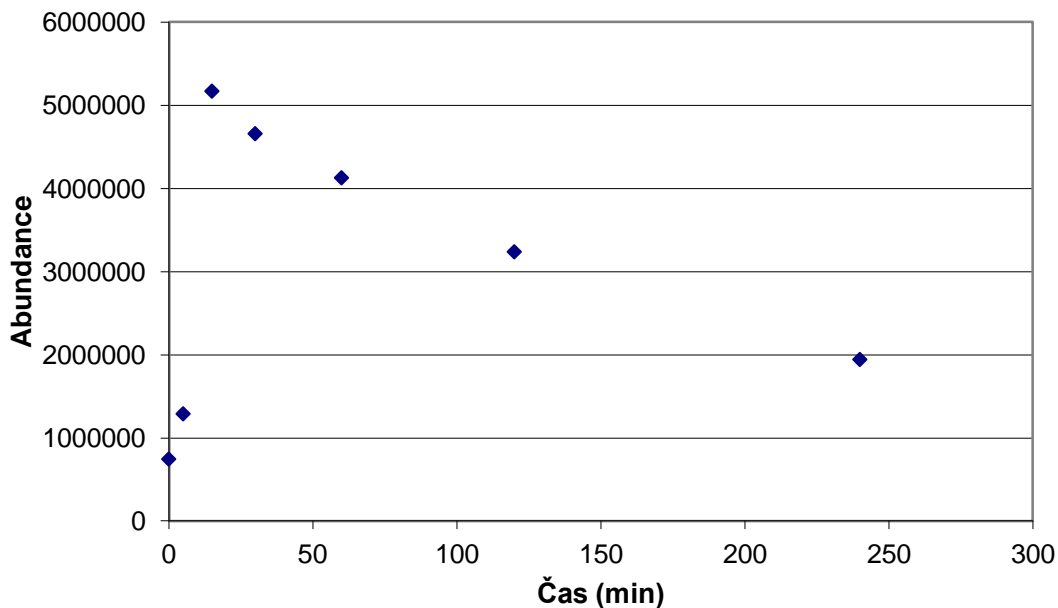
Pro optimalizaci metody bylo zvoleno množství 100 µl derivatizačního činidla jako nejvhodnější, protože při tomto objemu vznikalo dostatečné množství derivátu 3-methylthio-N-phenylsuccinimidu a zároveň nedocházelo k velkému ředění vzorku methanolem obsaženým v roztoku činidla.

V dalším kroku byly testovány různé teploty, při nichž probíhá derivatizace. V blokovém termostatu byly připraveny vzorky za teplot 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C a navíc byl přichystán jeden vzorek bez termostatování za laboratorní teploty 22 °C. K derivatizaci bylo použito 100 µl činidla. Doba termostatování byla 30 minut. Derivát byl po odstředění extrahován použitím 1 ml diethyletheru a analyzován na GC/MS. (obr. 11) Při teplotě 40 °C probíhala derivatizace nejlépe.



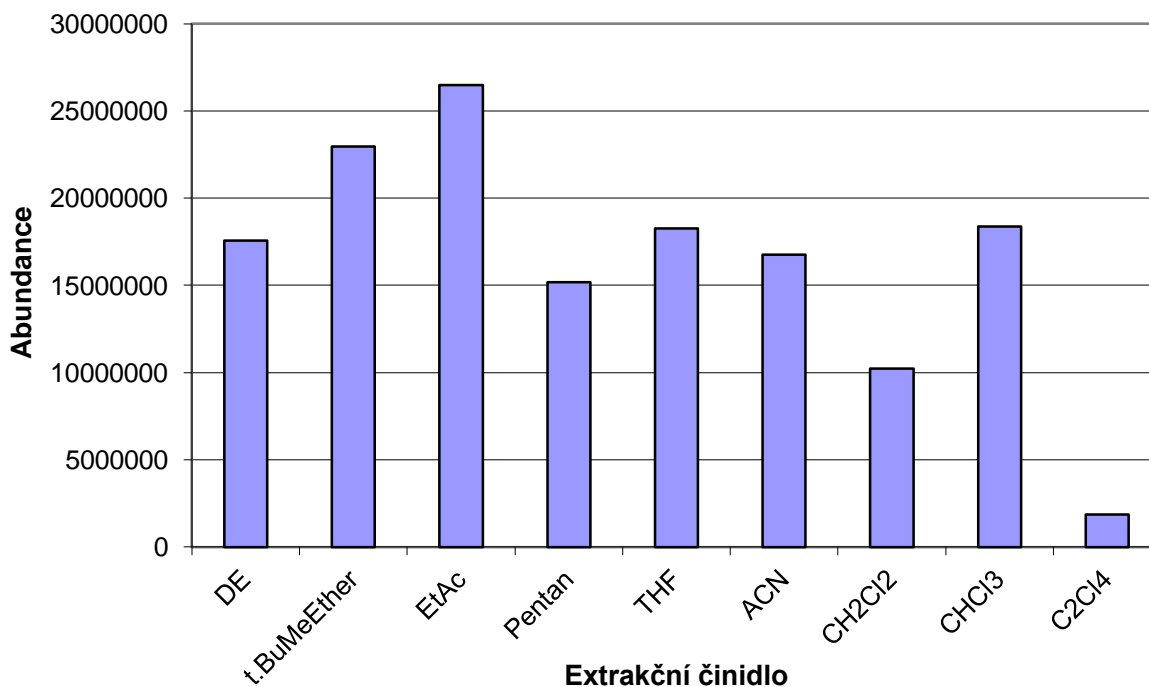
Obrázek 11: Závislost plochy píku derivátu na teplotě v průběhu derivatizace

Vhodná délka doby, po kterou probíhá derivatizace byla testována s časy 0, 5, 15, 30, 60, 90, 120 a 240 minut. Opět bylo použito 100 μ l derivatizačního činidla a teplota termostatu byla nastavena na 60 °C. Po uplynutí daných časů byly roztoky extrahovány diethyletherem, odstředěny a fáze s extraktem odebrány do krimpovacích vialek. Následovala analýza na GC/MS. (obr. 12) Nejvyššího výtěžku bylo za těchto podmínek dosaženo po 15 minutách. Na základě zhodnocení všech optimalizovaných parametrů a na základě analýzy reálných vzorků však byla nakonec zvolena nižší teplota a delší čas derivatizace (viz níže).



Obrázek 12: Závislost plochy píku derivátu na délce derivatizace.

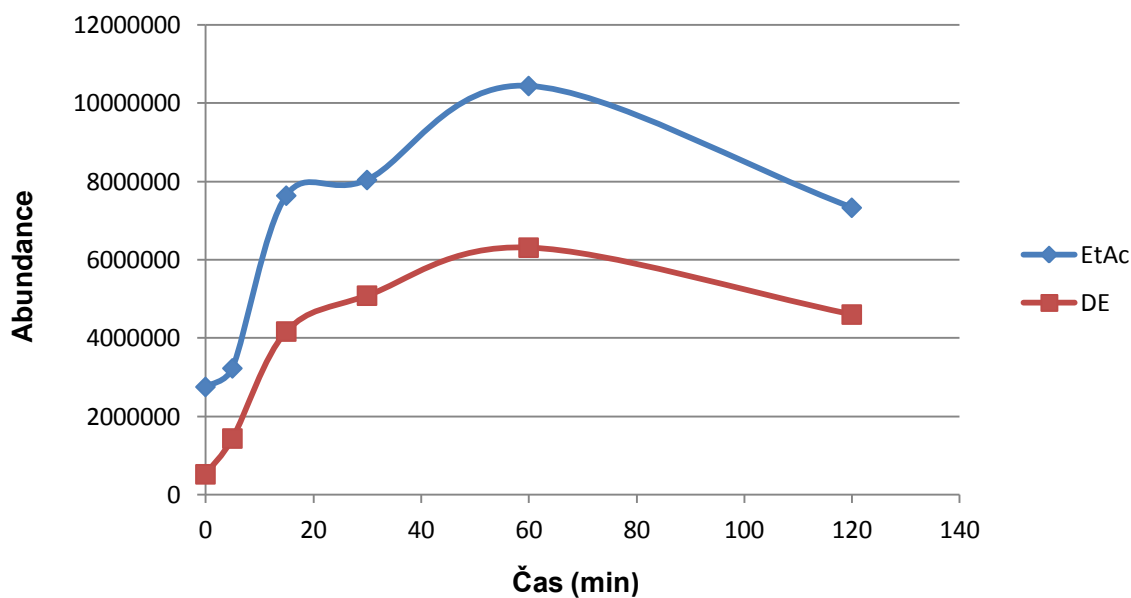
Pro optimální derivatizaci bylo nutno také zjistit, které rozpouštědlo bude poskytovat nejlepší podmínky pro výtěžek derivatizace. Byla testována tato rozpouštědla: diethylether, ethylacetát, pentan, chloroform, dichlormethan, tetrachlorethylen, tetrahydrofuran, acetonitril a terc-butylmethylether. Byla připravena sada vzorků, kde byl jako standard použit 1 ml připraveného roztoku propanthiolu v nasyceném roztoku NaCl a 100 μ l N-phenylmaleimidu rozpuštěného v MeOH ($c_{\text{činidla}} = 10 \text{ mg/ml}$). Inkubační doba byla 30 minut při 60 °C. Objemy jednotlivých rozpouštědel použitých k extrakci byly u každého vzorku 1 ml. Po centrifugaci byly všechny vzorky analyzovány na GC/MS. (obr. 13)



Obrázek 13: Závislost plochy píku derivátu propanthiolu na různých extrakčních činidlech.

Pro další kroky optimalizace derivatizace byl zvolen ethylacetát jako extrakční činidlo, protože derivát poskytoval nejlepší odezvu při použití tohoto rozpouštědla.

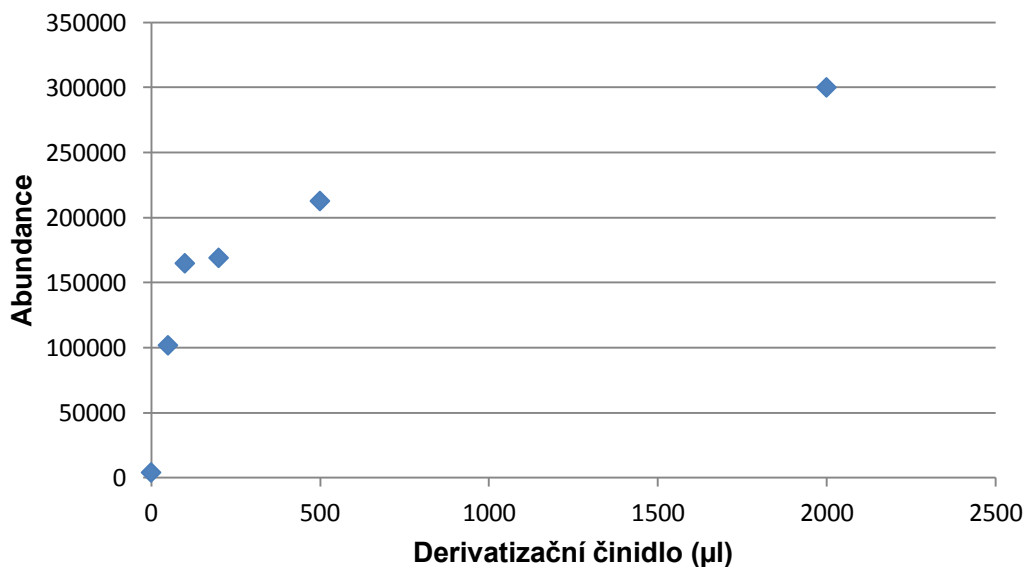
Na závěr optimalizace byl ověřen výtěžek derivatizace v závislosti na čase při zvolené optimální teplotě 40 °C a při použití ethylacetátu jako extrakčního činidla. Výtěžek extrakce byl porovnáván s extrakcí za použití DE. Inkubace probíhala 0, 5, 15, 30, 60 a 120 minut. Vzorek byl opět 1 ml propanthiolu v nasyceném roztoku NaCl se 100 µl derivatizačního činidla. Po analýze vzorků bylo potvrzeno, že ethylacetát je vhodnější extrakční činidlo. Nejlepší délka derivatizace za použití EtAc je 60 minut. (obr. 14)



Obrázek 14: Porovnání plochy píku produktu derivatizace v závislosti na délce derivatizace při extrakci dvěma různými rozpouštědly.

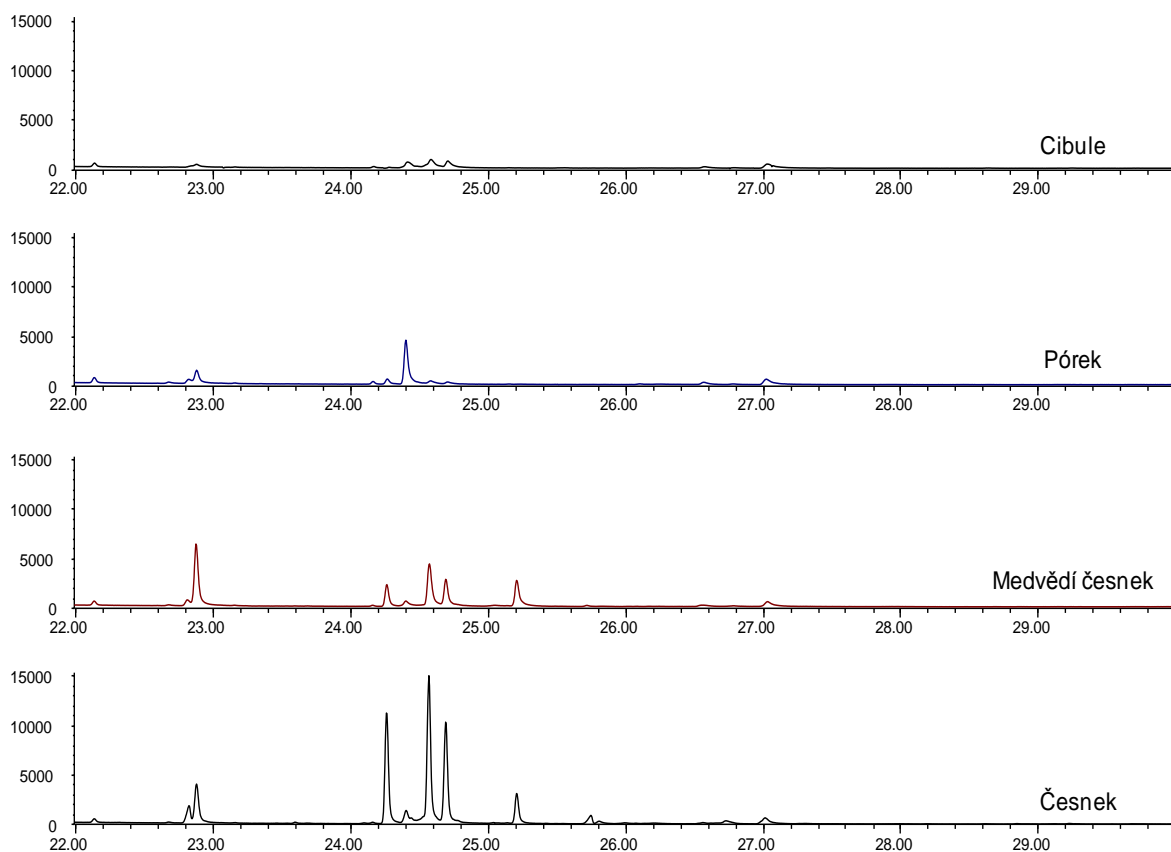
4.1.2 Reálný vzorek

U připravených vzorků byla inkubační doba 1 hodina při 40 °C s přidavkem 0, 50, 100, 200 a 2000 μl derivatizačního činidla (přídavek 1000 μl byl vyloučen z důvodu vzniku sraženiny). K extrakci byl použit EtAc. Z grafu v obrázku 15 vyplývá, že v reálném vzorku se přídavek 2000 μl derivatizačního činidla jeví jako nejvhodnější a proto byl používán při dalších aplikacích na reálné vzorky.



Obrázek 15: Závislost plochy píku derivátu ve vzorku česneku na množství přidaného derivatizačního činidla.

Kromě česneku byly testovány i další druhy rodu *Allium*: cibule, pórek a medvědí česnek. Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako při předchozí aplikaci na česnek. K extrakci bylo použito 2000 µl EtAc. Derivatizované vzorky byly analyzovány při záznamu celkového iontového proudu i v režimu monitorování selektivních iontů 173 a 175 m/z. Ion 175 m/z vniká jako dominantní fragmentační ion připravených derivátů při McLaffertyho přesmyku a je společný všem sledovaným derivátům alkylthiolů (viz obr. 9). Ion 173 představuje dominantní ion použitého derivatizačního činidla a byl použit pro kontrolu chromatografické separace derivátů a nadbytečného činidla.



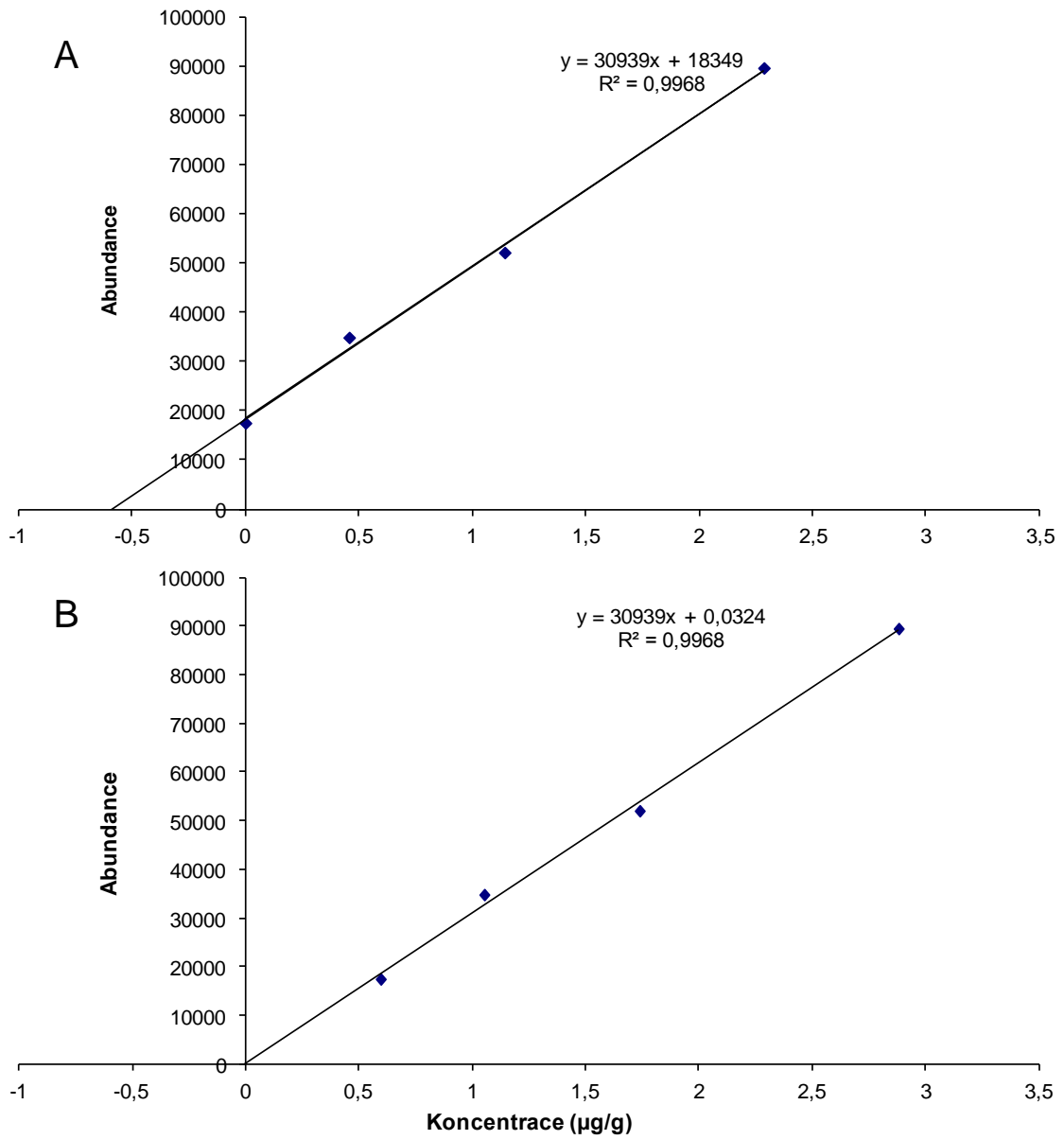
Obrázek 16: Porovnání chromatogramů po derivatizaci N-phenylmaleimidem vzorků cibule, pórků, medvědího česneku a česneku v MS SIM módu ($m/z = 175$)

Při analýze reálných vzorků bylo v rozmezí retenčních časů 22 - 26 minut při záznamu celkového iontového proudu detegováno celkem pět píků, jejichž hmotnostní spektra odpovídají očekávaným derivátům nízkomolekulárních thiolů. První z uvedených píků (22,87 min) byl identifikován jako derivát methanthiolu (molekulární ion 221 m/z). další čtyři látky byly postupně v pořadí podle retenčních časů identifikovány jako deriváty 2-propanthiolu, 1-propanthiolu, 2-propenthionu a cyklopropanthiolu. Zejména v případě nasycených derivátů byly signály odpovídající molekulárním iontům (249 m/z) při záznamu celkových iontových proudů jen obtížně odlišitelné od šumu. Jednotlivé látky byly identifikovány na základě elučního pořadí odvozeného od známých hodnot retenčních indexů respektive teplot varů výchozích thiolů. Nejpravděpodobnější identifikace spolu s tabelovanými hodnotami retenčních indexů, teplot varů a experimentálně určenými hodnotami retenčních indexů připravených derivátů jsou uvedeny v tabulce číslo 2.

Sloučenina	Retenční index (NIST)	Experimentální t.v.	Vypočtená t.v.	Retenční čas derivátu	Retenční index derivátu
Methanthiol	396, 400	5,9°C	-1,4°C	22,87 min	1952
2-propanthiol	559, 566	57-60°C	55,8°C	24,26 min	2096
Propanthiol	600, 603	67-68°C	67,8°C	24,40 min	2110
2-Propenthiol	603, 613	67-68°C	68,4°C	24,57 min	2130
Cyklopropanthiol			73,0°C	24,69 min	2144

Tabulka 2: Produkty derivatizace s retenčními daty.

Obsah propanthiolu v česneku byl určen metodou standardního přídatku. Pro kvantifikaci byl využit McLaffertyho ion 175 m/z, který je společný pro všechny sledované deriváty (obr. 17 A). Zjištěná koncentrace propanthiolu v česneku je 0,5931 µg/g. Nalezená koncentrace propanthiolu v česneku a odezvy odpovídající jednotlivým standardním přídatkům byly použity pro sestavení kalibrační závislosti (obr. 17 B). Získaná rovnice lineární regrese byla použita pro kvantifikaci všech sledovaných látek ve všech vzorcích (tab. 3)



Obrázek 17: Graf kalibrační křivky zobrazující závislost odezvy množství propanthiolu na koncentraci standardních přídavek.

Největší koncentraci methanthiolu má medvědí česnek, který obsahuje téměř dvojnásobné množství této látky než česnek. Nejméně methanthiolu se nalézá v cibuli, kde je koncentrace zhruba 20x menší. Nejvíce 2-propanthiolu bylo zjištěno u česneku, který obsahuje 5x více této látky než medvědí česnek. Nejméně 2-propanthiolu bylo v cibuli. Největší koncentraci propanthiolu má pórek a nejmenší medvědí česnek, kde je koncentrace téměř 8x menší. Koncentrace 2-propenthionu je největší u česneku a více jak 40x menší u póрку. Podobné to je i u cyklopropanthiolu, který se nalézá v největším množství v česneku a 50x menším v póрку.

Druh	methanthiol (µg/g)	2-propanthiol (µg/g)	propanthiol (µg/g)	2-propenthionol (µg/g)	cyklopropanthiol (µg/g)
Cibule	0,2213	0,0397	0,6940	0,8380	0,5725
Pórek	0,6976	0,3294	2,9923	0,2074	0,1186
Medvědí česnek	4,0250	1,4064	0,3881	3,0796	1,5881
Česnek	2,2567	6,7598	0,5622	8,7218	5,9827

Tabulka 3: Zjištěné koncentrace thiolů v cibuli, póрку, medvědí česneku a česneku.

5. Závěr

Cílem této práce bylo analyzovat dostupné cibuloviny (česnek, medvědí česnek, cibule, pór a pažitka) s využitím GC-MS, zjistit obsažené látky a v případě potřeby navrhnout vhodnou metodu pro derivatizaci.

Byl proveden screening látek obsažených ve vzorcích s využitím SPME extrakce. Výsledkem je identifikace jednotlivých látek a jejich přiřazení k příslušným píkům v chromatogramu. Dále bylo provedeno porovnání obsahů těchto látek mezi druhy cibulovin na základě ploch jednotlivých píků. Byly také zkoumány poměry obsažených látek v jednotlivých částech rostlinky medvědího česneku a póru. Z důvodů nedetegovaných thiolů při použití SPME bylo nutné provést derivatizaci vzorků. Jako činidlo byl k tomuto účelu zvolen N-phenylmaleimide. Po derivatizaci byly deriváty extrahovány kapalinovou extrakcí. Metoda byla optimalizována (teplota, množství derivatizačního činidla, druh a množství extrakčního činidla, délka derivatizace) pro nejvyšší výtěžek derivatizace a následně aplikována na reálné vzorky. Podařilo se detegovat pět různých derivátů thiolů (deriváty methanthiolu, 2-propanthiolu, 1-propanthiolu, 2-propenthiolu a cyklopropanthiolu), které nebyly objeveny během screeningu látek. Thioly byly identifikovány a k jednotlivým derivátům byly vypočteny retenční indexy. Metodou standardního přídávku byla určena koncentrace propanthiolu v česneku a ze získané rovnice lineární regrese byla vypočítána koncentrace thiolů v česneku, medvědí česneku, cibuli a póru.

6. Literatur

- [1] B. Iberl, G. Winkler, B. Muller, and B. Knobloch, "Quantitative-determination of allicin and alliin from garlic by HPLC," *Planta Med.*, vol. 56, no. 3, pp. 320–326, 1990.
- [2] J. E. Lancaster, E. M. Dommissie, and M. L. Shaw, "Production of flavour precursors S-alk(en)ylcysteine sulphoxides in photomixotrophic callus of garlic," vol. 27, no. 7, pp. 2123–2124, 1988.
- [3] J. Han, L. Lawson, G. Han, and P. Han, "A spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates," *Analytical biochemistry*, vol. 225, pp. 157–160, 1995.
- [4] M. Keusgen, H. Schulz, J. Glodek, I. Krest, H. Krüger, N. Herchert, and J. Keller, "Characterization of some *Allium* hybrids by aroma precursors, aroma profiles, and alliinase activity," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 10, pp. 2884–2890, 2002.
- [5] C. Teyssier, M. J. Amiot, N. Mondy, J. Auger, R. Kahane, and M. H. Siess, "Effect of onion consumption by rats on hepatic drug-metabolizing enzymes," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 39, no. 10, pp. 981–987, 2001.
- [6] S. Ankri and D. Mirelman, "Antimicrobial properties of allicin from garlic," *Microbes Infect.*, vol. 1, no. 2, pp. 125–129, 1999.
- [7] K. I. YOSHIDA H, Hirotaka K, Rie O, "An organosulfur compound isolated from oil-macerated garlic extract and its antimicrobial effect.pdf," *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 63, no. 3, pp. 588–590, 1999.
- [8] E. Dorant, P. A. Van den Brandt, R. A. Goldbohm, and F. Sturmans, "Consumption of onions and a reduced risk of stomach carcinoma," *Gastroenterology*, vol. 110, no. 1, pp. 12–20, 1996.
- [9] A. C. Kimbaris, N. G. Siatis, D. J. Daferera, P. A. Tarantilis, C. S. Pappas, and M. G. Polissiou, "Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*)," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 13, no. 1, pp. 54–60, 2006.

- [10] N. Mondy, D. Duplat, J. P. Christides, I. Arnault, and J. Auger, "Aroma analysis of fresh and preserved onions and leek by dual solid-phase microextraction-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 963, no. 1–2, pp. 89–93, 2002.
- [11] O. Demirkol, C. Adams, and N. Ercal, "Biologically important thiols in various vegetables and fruits.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 26, pp. 8151–8154, 2004.
- [12] Y. Ytakura, M. Ichikawa, Y. Mori, R. Okino, M. Udayama, and T. Morita, "How to distinguish garlic from the other *Allium* vegetables," *J. Nutr.*, vol. 131, no. 3, pp. 963–967, 2001.
- [13] J. M. Warren, D. R. Parkinson, and J. Pawliszyn, "Assessment of thiol compounds from garlic by automated headspace derivatized in-needle-NTD-GC-MS and derivatized in-fiber-SPME-GC-MS," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 3, pp. 492–500, 2013.
- [14] K. Shimada and K. Mitamura, "Derivatization of thiol-containing compounds," *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 659, no. 1–2, pp. 227–241, 1994.
- [15] O. Konvička, *Česnek*, 1st ed. Olomouc, 1998.
- [16] J. Čihař, *Příroda v ČSSR*, 2nd ed. Praha: PRÁCE, 1978.
- [17] J. Dostál, *Nová květena v ČSSR 1,2*, 1st ed. Praha: Academia, 1989.
- [18] B. Schmitt, H. Schulz, J. Storsberg, and M. Keusgen, "Chemical characterization of *Allium ursinum* L. depending on harvesting time," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 18, pp. 7288–7294, 2005.
- [19] S. Ferary and J. Auger, "What is the true odour of cut *Allium*? Complementarity of various hyphenated methods: Gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with particle beam and atmospheric pressure ionization interfaces in sulphenic acids rearrangement components discrimination," *J. Chromatogr. A*, vol. 750, no. 1–2, pp. 63–74, 1996.
- [20] V. D. Nikolic, "Mechanism and kinetics of synthesis of allicin," *Pharmazie*, vol. 59, pp. 10–14, 2004.
- [21] C. L. Arthur and J. Pawliszyn, "Solid phase microextraction with thermal desorption

- using fused silica optical fibers,” *Anal. Chem.*, vol. 62, no. 19, pp. 2145–2148, 1990.
- [22] J. Pawliszyn, *Handbook of Solid Phase Microextraction*, 1st ed. Waterloo: Elsevier, 2012.
- [23] U. T. Guide, *Bulletin 925F*, vol. 6628, no. 800. Bellefonte.
- [24] J. Pawliszyn, *Handbook of sample preparation*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.
- [25] T. Górecki, X. Yu, and J. Pawliszyn, “Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres†,” *Analyst*, vol. 124, no. 5, pp. 643–649, 1999.
- [26] I. Valor, M. Perez, and C. Cortada, “SPME of 52 pesticides and polychlorinated biphenyls: extraction efficiencies of the SPME coatings poly (dimethylsiloxane), polyacrylate, poly (dimethylsiloxane)- ,” *J. Sep.*, pp. 39–48, 2001.
- [27] C. Goncalves and M. Alpendurada, “Comparison of three different poly (dimethylsiloxane)– divinylbenzene fibres for the analysis of pesticide multiresidues in water samples : structure and efficiency,” *J. Chromatogr. A*, vol. 963, pp. 19–26, 2002.
- [28] C. Tsoutsis, I. Konstantinou, D. Hela, and T. Albanis, “Screening method for organophosphorus insecticides and their metabolites in olive oil samples based on headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 573–574, pp. 216–222, 2006.
- [29] H. Lord and J. Pawliszyn, *Evolution of solid-phase microextraction technology*, vol. 885, no. 1–2. 2000.
- [30] R. Marsili, *Flavor, fragrance, and odor analysis*. New York: Marcel Dekker, 2002.
- [31] H. Kataoka, H. L. Lord, and J. Pawliszyn, “Applications of solid-phase microextraction in food analysis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 880, no. 1–2, pp. 35–62, 2000.
- [32] Z. Zhang and J. Pawliszyn, “Headspace Solid-Phase Microextraction,” *Anal. Chem.*, vol. 1, no. 2, pp. 1843–1852, 1993.
- [33] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory & Practice*. New York: Wiley-VCH, 1997.

- [34] H. Prosen and L. Zupančič-Kralj, "Solid-phase microextraction," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 18, no. 4, pp. 272–282, 1999.
- [35] G. A. Mills and V. Walker, "Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials," *J. Chromatogr. A*, vol. 902, no. 1, pp. 267–287, 2000.
- [36] G. Vas and K. Vékey, "Solid-phase microextraction: A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis," *J. Mass Spectrom.*, vol. 39, no. 3, pp. 233–254, 2004.
- [37] C. Whang and J. Pawliszyn, "Solid phase microextraction coupled to capillary electrophoresis," pp. 353–356, 1998.
- [38] J. Chen and J. Pawliszyn, "Solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 67, no. 7, pp. 2530–2533, 1995.
- [39] S. Mitra, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2003.
- [40] J. Churáček, *Analytická separace látek*, 1st ed. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990.
- [41] D. Knapp, *Handbook of analytical derivatization reactions*, 1st ed. New York: John Wiley & Sons, 1979.
- [42] K. Blau and J. Halket, *Handbook of derivatives for chromatography*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1993.
- [43] E. Smolková, *Plynová chromatografie*, 1st ed. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 1976.
- [44] H. M. McNair and J. M. Miller, *Basic gas chromatography*, 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009.
- [45] R. P. W. Scott, *Introduction to Analytical Gas Chromatography*. New York: Marcel Dekker, 1998.
- [46] C. Poole, *Gas chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2012.
- [47] D. O. Sparkman, Z. E. Penton, and F. G. Kitson, *Gas chromatography and mass*

- spectrometry*, 2nd ed. Boston: Elsevier, 2011.
- [48] E. de Hoffmann and V. Stroobant, *Mass spectrometry: Principles and applications*, 3rd ed. Chichester: Wiley-VCH, 2007.
- [49] I. Němcová, *Spektrometrické analytické metody II*. Praha: Karolinum - nakladatelství Univerzity Karlovy, 1998.