

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ TECHNIKY PSE (EXTRAKCE ROZPOUŠTĚDLEM ZA
ZVÝŠENÉHO TLAKU A TEPLoty)
V ANALÝZE POTRAVIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

HANA GRULICHOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ TECHNIKY PSE (EXTRAKCE ROZPOUŠTĚDLEM ZA ZVÝŠENÉHO TLAKU A TEPLOTY) V ANALÝZE POTRAVIN

UTILIZE OF INSTRUMENTALITY PSE (PRESSURIZED SOLVENT EXTRACTION)
IN FOOD ANALYSIS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

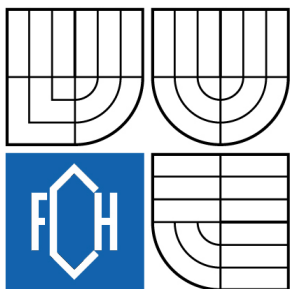
HANA GRULICHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce	FCH-BAK0058/2006	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	Gulichová Hana	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí bakalářské práce	RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.	
Konzultanti bakalářské práce		

Název bakalářské práce:

Využití techniky PSE (extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty)
v analýze potravin

Zadání bakalářské práce:

- Popis extrakční techniky (princip, přístroj, vybavení)
- Příklady využití PSE zejména pro potravinářské účely

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2007

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Hana Grulichová
student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2006

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

SOUHRN

Tato bakalářská práce se zabývá moderní metodou extrakce PSE (extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty). Existují dva druhy tohoto přístroje One PSE a Fast PSE.

V práci je popsán vlastní přístroj a jeho fungování. Dále je zde uvedena extrakce antrachinonů, strychninu, berberinu, glycyrrhizinu, ligustilidů z léčivých rostlin. Tyto látky jsou používány hlavně pro léčbu různých onemocnění. Práce si všímá i stopových prvků, tokoferolů, alkylbenzen sulfonátů, izoflavonů, dioxinů, betakarotenu, vitamínu E, polyfenolů extrahovaných z biologických vzorků. Využití látek získaných z biologických materiálu je velmi rozmanité. Některé snižují rizika například osteoporózy, kardiovaskulárního onemocnění, rakoviny a jiné jsou naopak zdraví škodlivé toxiny. Značná pozornost je věnována především látkám obsaženým v potravinách jako například polychlorované bifenoly, různé pesticidy, lipidy, oxysteroly. Tyto látky jsou v potravinách spíše nežádoucí a proto se zjišťuje jejich množství, aby tyto potraviny nebyli zdraví škodlivé.

SUMMARY

This bachelor thesis is engaged in the modern method of extraction PSE (pressurized solvent extraction). There have been two types of this apparatus, One PSE and Fast PSE.

In this thesis, the apparatus and its behavior is described. Extraction of anthraquinones, strychnine, berberine, glycyrrhizin, ligustilides from medical plants is presented below. These substances are used mainly in treatment for various diseases. In this work is noticed trace elements, tocopherols, alkylbenzene sulphonate, isoflavone, dionine, betacarotene, vitamin E, polyphenol extracted from biological samples. Utilization of the substances from biological samples is very different. Some one decreased risk of osteoporosis, cardiovascular disease, cancer and other is by contrast deleterious toxin. High attention is devoted to substances presented in food such as polychlorinated biphenyls, various pesticides, lipids, oxysterols. These substances are in food rather undesirable than is why their amount is determined to the food isn't deleterious.

KLÍČOVÁ SLOVA

PSE, extrakce, teplota, tlak, potraviny, léčivé rostliny, biologické vzorky, analýza

KEYWORDS

PSE, extraction, temperature, pressurize, food, medical plant, biological samples, analysis

GRULICHOVÁ, H. *Využití techniky PSE (extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty) v analýze potravin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 47 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí bakalářské práce RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D za vstřícný přístup a všestrannou pomoc při realizaci této bakalářské práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. EXTRAKCE.....	8
3. CO JE TO PSE.....	9
3.1. One PSE.....	9
3.2. Fast PSE.....	11
3.3. Princip PSE.....	12
4. EPA METODA 3545.....	16
4.1. Princip metody.....	16
4.2. Aparatury a materiály.....	17
4.3. Reagenty.....	17
4.4. Extrakční rozpouštědla.....	18
4.5. Postup.....	18
4.6. Kontrola kvality.....	20
4.7. Provedení metody.....	20
4.7.1. Chlorované pesticidy a částečně těkavá organika.....	20
4.7.2. Organofosforové pesticidy a chlorované herbicidy.....	21
4.7.3. PCBs.....	21
4.7.4. Bezpečnost.....	22
5. PSE PŘI EXTRAKCI LÁTEK Z LÉČIVÝCH ROSTLIN.....	23
5.1. Stanovení anthrachinonů v rebarboře.....	23
5.2. Určování ginsenosidů.....	23
5.3. Určování sedmi sloučenin v <i>Cortex Dictamni</i>	24
5.4. Analýza ligustilidů.....	24
5.5. Extrakce strychninu a berberinu.....	25
5.6. Glycyrrhizin v kořenu lékořice pomocí PSE a CZE.....	26
6. EXTRAKCE POMOCÍ PSE Z BIOLOGICKÝCH VZORKŮ.....	28
6.1. Získávání stopových prvků v mořských materiálech.....	28
6.2. Extrakce látek z <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth.....	28
6.3. Analýza tokoferolů ze semen a ořechů.....	29
6.4. Získávání izoflavonů ze sojových bobů.....	29
6.5. Stanovení proanthokyanidů extrahované ze sladu.....	30
6.6. Betakaroteny a vitamín E ve zbytcích oleje.....	31
6.7. Určování polyfenolů v jablcích Golden Delicious.....	32
6.8. Stanovování alkybenzensulfonátů (LAS) z mořských organismů.....	33
6.9. Extrakce ZON z pšenice a kukuřice.....	34
6.10. Extrakce polychlorovaných bifenyly (PCBs) z biovzorků.....	34
6.11. Analýza dioxinů získaných z biologických maticí.....	35
6.12. Stanovování pesticidů v ovoci.....	35
7. POTRAVINY.....	37
7.1. Bisfenol diglycidyl éterové zbytky.....	37

7.2.	Určení pesticidů v potravinářském zboží	37
7.3.	Analýza PCB v rybím mase a v krmení pro drůbež	38
7.4.	Látky určované v rybích vzorcích	38
7.5.	PCB v potravinových a krmivových vzorcích.....	39
7.6.	Extrakce oxysterolů z vaječného prášku	40
7.7.	Lipidy určované v drůbežím mase.....	41
7.8.	Určování mastných kyselin v masových produktech.....	41
8.	ZÁVĚR.....	43
9.	ODKAZY	44
10.	VYSVĚTLIVKY	47

1. ÚVOD

První zmínka o PSE je z roku 1996, kdy se začala používat v různých oblastech výzkumu. Byla vyvinuta ke snížení času extrakce a také aby se snížila spotřeba rozpouštědla. Při extrakci se používají se organická rozpouštědla, která mají škodlivé účinky na životní prostředí, proto je důležité snižovat jejich používané množství.

Princip fungování PSE je vysvětlován na trojfázovém diagramu, kde vidíme, že při různých kombinacích tlaků a teploty je látka v plynném, kapalném nebo pevném stavu. Abychom dosáhli nejúčinnější extrakce, potřebujeme udržet rozpouštědlo v kapalném stavu a zároveň při co nejvyšší teplotě (s výjimkou tepelně nestálých sloučenin), proto úměrně teplotě musíme zvyšovat i tlak.

Při aplikaci PSE na vyluhování různých látek se vždy musí stanovit optimální podmínky. Zkoumaly se různé parametry jako teplota, tlak, množství vzorku, druh rozpouštědla a jeho proudový objem, počet extrakčních cyklů a doba trvání cyklu. U některých látek ovlivňoval extrahované množství pouze jeden parametr. Potom se ostatní podmínky stanovily tak, aby byl proces extrakce co nejefektivnější.

Důležitý je i druh používané matrice vzorku. Musí být dostatečně homogenní a vysušená. Po vložení matrice vzorku do extrakční nádoby nesmí vznikat mrtvé objemy. V případě větší vlhkosti matrice se vzorek smíchá se sušícím činidlem. Pokud má látka tendenci se shlukovat smíchá se například s pískem, aby se dosáhlo lepšího rozptýlení matrice vzorku.

V léčivých rostlinách se PSE využívalo k vyluhování různých látek například antrachinonů, strychninu, berberinu, glycyrhizinu, ligustiludů a dalších. V biologických maticích šlo o extrakci stopových prvků, tokoferolů, alkylbenzensulfonátů, izoflavonů, dioxinů, betakarotenu, vitamínu E, polyfenolů a další. V potravinách se určovaly hodně polychlorované bifenoly, různé pesticidy, lipidy, oxysteroly a další.

2. EXTRAKCE

Extrakce je jednou z možností přípravy vzorku. Z hlediska fyzikální chemie je proces extrakce přechod složky fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. V širším analytickém pohledu jsou extrakcí nazývány i mnohé další metody, při nichž je složka směsi převáděna fázovým rozhraním z jedné fáze (plynné, kapalné, pevné) do druhé fáze (kapalné, pevné), i když principiálně jde např. o absorpci a adsorpci. Extrakční soustavy můžeme rozdělit podle skupenství fází, mezi kterými složka přechází.

Při přechodu požadované látky z pevné fáze do kapaliny se tato složka rozpouští ve vhodném rozpouštědle, ostatní složky jsou zde nerozpustné. Tohoto se využívá při zpracování analytických vzorků. Příkladem je použití Soxhletova extraktoru.

Extrakce z kapaliny do kapaliny je založena na rozdělovací rovnováze v soustavě dvou nemísitelných kapalin. Složka z větší části přechází do rozpouštědla, ve kterém je lépe rozpustná. Tento typ klasické extrakce můžeme rozdělit buď podle druhu extrahované látky nebo podle způsobu provedení (jednostupňová, mnohastupňová nebo kontinuální extrakce).

Další možností je přechod z kapaliny na pevnou fázi. Pevná fáze selektivně zachycuje požadované složky z roztoku.

Při extrakci z kapaliny nebo plynu na pevnou fázi se jedná o mikroextrakci pevnou fází. Je modifikací extrakce pevnou fází, ve které nastává zkoncentrování analytu adsorpcí na polymer pokrývající křemenné vlákno.

Všeobecným trendem vývoje extrakčních metod je náhrada zdoluhavých postupů s velkou spotřebou rozpouštědel novými technikami. Mezi nové techniky se řadí zejména extrakce a mikroextrakce na pevnou fázi a nadkritická fluidní extrakce.

Mezi nejnovější techniky patří i extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty nebo- li PSE (pressurized solvent extraction), které se budeme věnovat dále. První zmínka o PSE jsou z roku 1996. Nahrazuje extrakci pomocí Soxhletova extraktoru, protože se používají stejná rozpouštědla, je s ní často srovnávána. V porovnání se Soxhletovým extraktorem šetří spotřebu rozpouštědla a samozřejmě je i časově mnohem výhodnější. [1]

3. CO JE TO PSE

Tlaková extrakce rozpouštědlem (PSE), také známá jako zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE), kapalinová extrakce za zvýšeného tlaku (PFE), tlaková kapalinová extrakce (PLE), tlaková extrakce horkým rozpouštědlem (PHSE), extrakce rozpouštědlem za vysokého tlaku (HPSE), extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty (HPHTSE) a subkritická extrakce rozpouštědlem (SSE). [2] Tato technika užívá rozpouštědla při zvýšené teplotě a tlaku na zrychlení extrakčního procesu. Vyšší teplota zvyšuje extrakční kinetiku, zatímco zvýšený tlak udržuje rozpouštědlo v kapalném stavu a ve varu. PSE je nová technika, která šetří spotřebu rozpouštědla a čas preparace vzorku, proto se upřednostňuje před tradičními extrakčními metodami.

Rozpouštědlo je napumpováno do extrakčních nádob naplněných vzorkem, je zahřáté a udržované pod tlakem a tím urychluje extrakční proces a zvyšuje rozpustnost analytu v rozpouštědle. Dochází k lepšímu pronikání rozpouštědla do matrice vzorku a tím se také zvyšuje kinetická rychlost desorpce analytu z matrice vzorku.

Praktický separační PSE proces využívá nejvíce rozpouštědla již používaná u tradičních metod.

Existují dva automatizované systémy One PSE, které nabízí dvě rychlosti a přizpůsobivost za ekonomickou cenu. Druhým systémem je Fast PSE, který byl vyvinut na objednávku, aby se proces zrychlené extrakce posunul o krok dál. [3]

3.1. One PSE

One PSE je extraktor navržený pro extrakci v laboratoři s nižší výkonností. Výhodou je rychlý obrat vzorku a možnost rozvoje metod. Je vytrvalý a odolný, jedná se o úsporný systém.

Rozměry One PSE (viz obr.1) jsou šířka 31,75 cm, výška 48,90 cm a tloušťka 45,09 cm. [4]



Obrázek 1. Přístroj One PSE

Extrakční chování:

- Typický extrakční čas: 10 minut
- Množství vzorku: 11, 22, 33 ml
- Extrakce: 1 – 99 minut
- Proplachování: 1 – 99 minut
- Natlakovaný a očištěný plyn: N₂

Vysoká účinnost pumpy:

- Kapalinový výtlač: max. 15 MPa
- Proudová rychlost: 10 ml/min

Extrakční modul:

- Teplota pece: 50 – 200 °C
- Velikost komůrky na vzorek: 11, 22, 33 ml
- Sada lahvíček: 40 – 60 ml

Operátorové propojení:

- LCD grafický displeje
- Paměť extrakčních metod [4]

3.2. Fast PSE

Fast PSE vykonává 6 paralelních extrakcí rozpouštědlem, což je maximální výkonnost paralelní extrakce. Do topného bloku se vloží 6 nerezových ocelových nádob naplněných vzorkem a zpracují se všechny vzorky naráz. Extrakční nádoby jsou ve čtyřech velikostech 11, 22, 33 a 40 ml. Vlastností nádoby je velký vnitřní průměr pro snadné naplnění.

Přístroj je automatizovaný, proto je velkou výhodou, že člověk může vykonávat jinou práci, zatímco přístroj běží. Výběr metody probíhá přímo ze systémové nabídky nebo připojeného počítače. Funguje z počítače tak snadno jako z hlavního panelu, je schopný zaznamenávat data a ukládat metody. Šetří čas a zvyšuje produkci. Neplýtvá čas přípravou vzorku a vytvářením nebo vyvíjením metod. Okamžitě zvyšuje výkon 6x.

Fast PSE je přizpůsobivý, protože se může použít rozpouštědlo, se kterým se už pracovalo v tradičních metodách extrakce a přizpůsobí US EPA extrakční techniku (EPA Metoda 3545 – vysvětlení dále).

Přístroj je vybavený i slyšitelným alarmem a automatickým zastavením, stejně jako zabudovaným senzorem na zjištění děravého příslušenství, nepřítomnosti extrakční nádoby nebo souboru lahvíček.

Rozměry fast PSE (viz obr. 2): šířka 63,5 cm, výška 67,3 cm a tloušťka 43,2 cm.



Obrázek 2. Přístroj fast PSE

Extrakční rychlost:

- Extrakční čas: 6 vzorků za 15 minut [5]
- Velikost vzorku: 11, 22, 33 a 40 ml
- Extrakcí: 6
- Extrakce: 1 – 99 minut
- Vyplachování: 1 – 99 minut
- Výběr rozpouštědla: 1 – 4
- Natlakovaný a čistící plyn: N₂

Systémová kontrolní pumpa:

- Kapalinový výtlač: maximálně 15 MPa

- Průtoková rychlost: 50 ml/min

Extrakční modul:

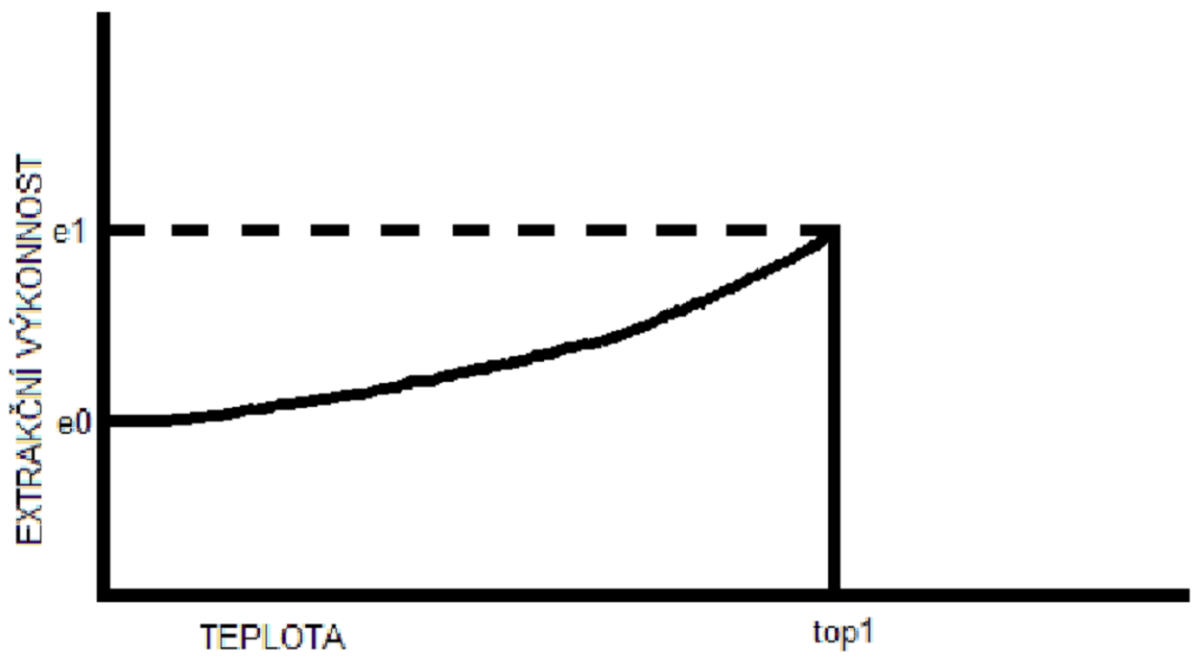
- Teplota pece: 50 – 200 °C
- Velikost vzorkových buněk: 11, 22, 33 a 40 ml
- Kolekce ampulek
- Operátorové propojení
- LCD grafický displej
- Paměť extrakčních metod
- RS – 232 propojení

Fast PSE příslušenství

- Nádoby – nejméně 18 nádob je potřeba k zajištění větší efektivity průběhu práce. Kapacita extrakčních nádob je 11, 22, 33 nebo 40 ml.
- Police – police na nádoby je konstruovaná k držení preparovaných nádob a na přenesení nádob do laboratoře.
- Ampulky (vialky) – velikost vzorkových ampulek je 60 ml.
- Automatický dávkovač rozpouštědla – díky dávkovači můžeme naprogramovat až 4 rozpouštědla, aby se automaticky rozdělovaly do extrakčních nádob. Pořadí a množství rozpouštědla se stane součástí aplikace, která se uloží do mikroprocesoru nebo do počítače.
- Software (programové vybavení) – mezi počítačem a fast PSE mohou být spolu s přenosem metod a přístrojovými stavovými programy přeneseny i data dvěma způsoby. Stavový display s diagramem dovolí sledovat v reálném čase operace pumpy, stav každé pozice ventilu, teplotu zahřátých nádob a individuální tlak v každé ze 6 nádob. [5]

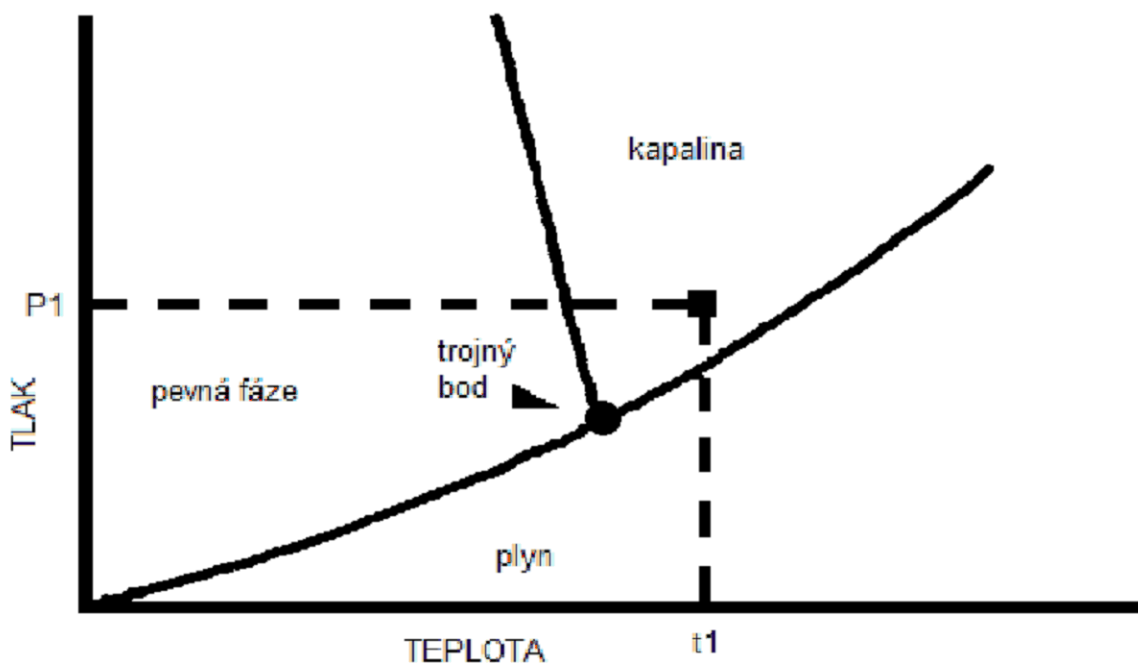
3.3. Princip PSE

Ohřáté rozpouštědlo zvyšuje solubilizaci (rozpustnost), to znamená, že extrakční výkonnost stoupá. Když rozpouštědlo dosáhne bodu varu a mění se v plyn, který není dlouho schopný rozpouštět sloučeninu, tak se výkonnost snižuje na nulu. Proto je potřeba udržet rozpouštědlo v kapalném stavu pomocí zvýšeného tlaku. Na obrázku 3 je zobrazena křivka extrakční účinnosti bez použití PSE.



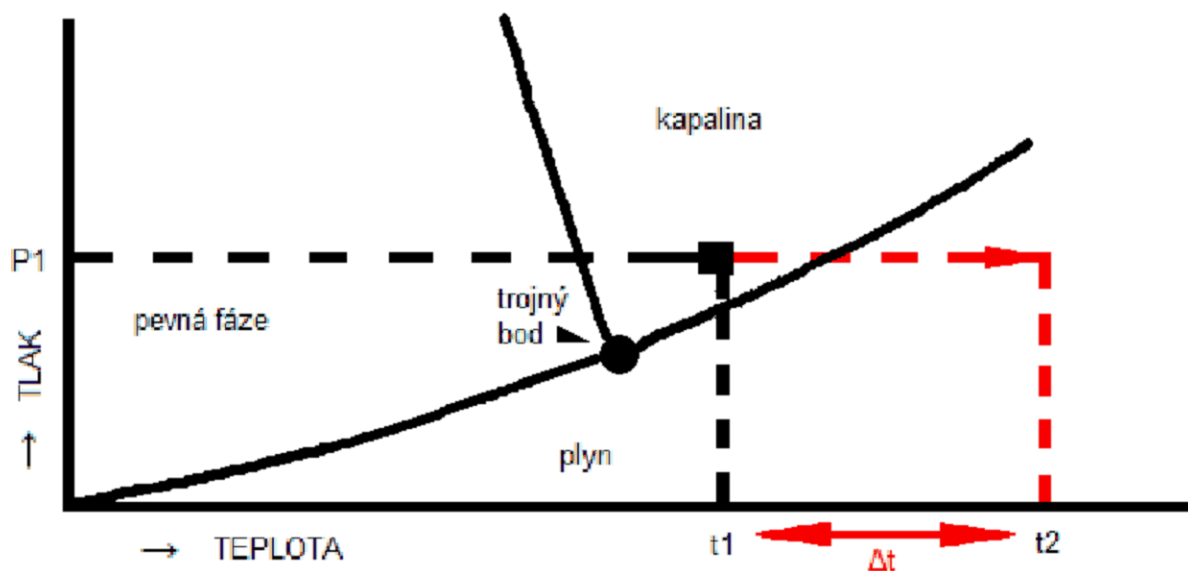
Obrázek 3. Závislost extrakční výkonnosti na teplotě, křivka extrakční výkonnosti bez použití PSE

Rozpouštědlo je kapalina o teplotě T_1 a tlaku p_1 , což je zakresleno v trojfázovém diagramu (viz obr. 4). [6]



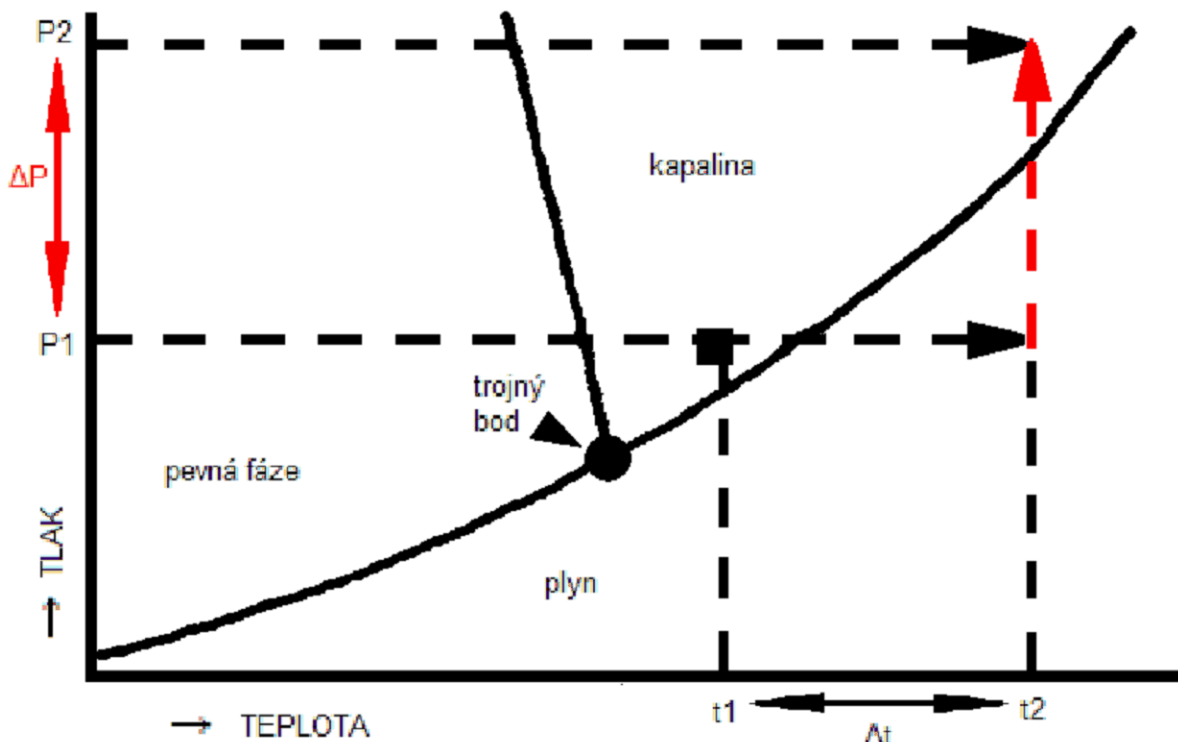
Obrázek 4. Trojfázový diagram

Pokud se teplota zvýší z hodnoty T_1 na hodnotu T_2 začne se rozpouštědlo měnit z kapalně fáze na fázi plynou (viz obr. 5). Což má za následek snížení extrakční účinnosti na nulu, protože plyn není schopný účinně rozpouštět požadovanou látku. [6]



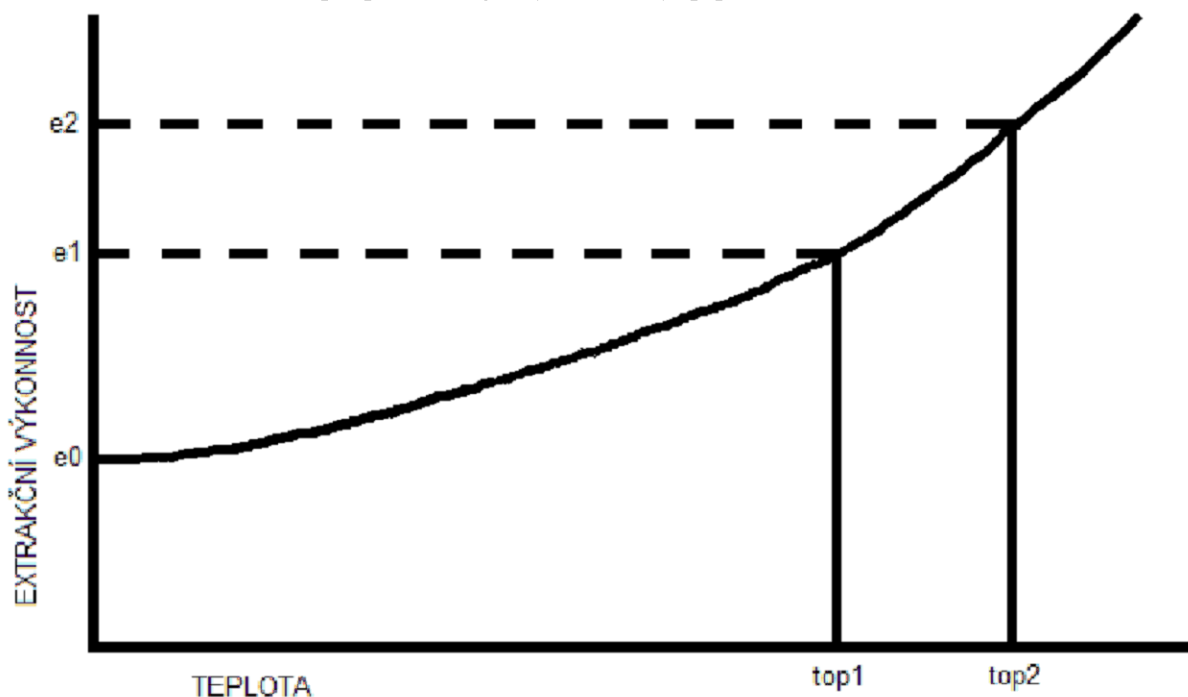
Obrázek 5. trojfázový diagram, kapalina se mění na plyn

Proto je potřeba, aby rozpouštědlo bylo v kapalném stavu. Toho se dosáhne tím, že zvýšíme tlak z hodnoty p_1 na hodnotu p_2 , aby se rozpouštědlo vrátilo zpět do kapalného stavu (viz obr. 6). Při vyšším tlaku má rozpouštědlo vyšší teplotu T_2 , proto se značně zlepší solvatační účinnost (rozpouštěcí účinnost).



Obrázek 6. Trojfázový diagram, plyn se mění na kapalinu

PSE technologie zvyšuje teplotu rozpouštědla, ale zachovává ji v kapalném stavu zvyšujícím se tlakem, proto velmi zlepšuje solvatační výkon a extrakční efektivnost. Což můžeme pozorovat při porovnání křivky extrakční účinnosti bez použití PSE (viz obr. 3) a potom křivku, kde PSE technologie použita byla (viz obr. 7). [6]



Obrázek 7. Závislost extrakční výkonnosti na teplotě, extrakční výkonnost s použitím PSE [6]

4. EPA METODA 3545

„Této metodě se věnuji tak rozsáhle, protože EPA metody jsou mezinárodně uznávané. Jsou stanovované společností EPA, což pochází z anglického výrazu Environmental Protection Agency nebo-li agentura pro ochranu životního prostředí.

EPA pracuje na vyvinutí a prosazení předpisů, které realizují ekologické zákony nařízené Kongresem. Je zodpovědná za zkoumání a nastavování mezinárodních standardů pro různé environmentální programy.“

EPA metoda 3545 je používána na extrakci látek nerozpustných nebo částečně rozpustných ve vodě jako jsou některé těkavé organické sloučeniny solí, jílu, sedimentů, bláta a pevných nečistot. Pro dosažení stejné analytické hodnoty jako s metodou Soxhlet používá zvýšenou teplotu a tlak. Tato procedura byla vyvinuta a potvrzena jako využitelný, automatický extrakční systém. Je použitelná na extrakci částečně těkavých organických sloučenin, organofosforových pesticidů, organochloridových pesticidů, chlorovaných herbicidů a polychlorované bifenyly (PCB), které mohou být potom analyzovány různými chromatografickými procedurami.

Tato metoda byla potvrzena na získávání vzorků z pevných matric. Mez detekce analytu v matici vzorku byla specifikována pro částečně těkavé organické sloučeniny na 250-12500 µg/kg, 250 – 2500 µg/kg pro organofosforové pesticidy, 5 – 250 µg/kg pro organochloridové pesticidy, 50 – 5000 µg/kg u chlorovaných herbicidů a 1 – 1400 µg/kg pro PCBs. Může být aplikována na vzorky obsahující analyty ve vysoké koncentraci a může být použita k adekvátní výkonnosti.

Je aplikována pouze na pevný vzorek. Nejvíce efektivní je na suchých materiálech s malou velikostí částic. U vzorků se proto provádí fázové rozdělení, protože pouze materiál v pevné fázi se dá použít pro extrakci touto procedurou. Podle možností by měly být půdní/sedlinové vzorky před extrakcí přirozeně vysušené a rozemleté na prášek. Případně pokud během sušení vzorku dochází ke ztrátám, může být smíchaný s bezvodým síranem sodným nebo rozsivkovou zeminou vytvarovanou do tvaru kuliček. Celkové množství materiálu pro použití závisí na specifikaci vymezenou metodou a potřebnou citlivostí analýzy, ale 10–30 g materiálu je obvykle nezbytné a může být umístěno do této extrakční procedury.

Metoda musí být používána pouze pod dozorem vyškoleného analytika. Každý analytik musí prezentovat přijatelné výsledky získané pomocí této metody. [7]

4.1. Princip metody

Po vysušení vzorků nebo po smíchání vzorku s bezvodým sulfidem sodným nebo rozsivkovou zeminou lisovanou do tvaru kuliček se rozemelou na velikost 150µm až 75µm a vloží se do extrakční nádoby.

Nádoba obsahující vzorek je zahřátá na extrakční teplotu, natlakovaná pomocí systému s vhodným rozpouštědlem a extrahovaná po dobu 5 minut (nebo jak je doporučeno výrobcem). Systémy rozpouštědel používaných pro tuto proceduru se různě mění.

Rozpouštědlo je vypuštěné z horké extrakční nádoby a nechá se vychladnout.

Může dojít k ovlivnění procesu, proto je potřeba upozornit na metodu 3500¹.

Extrakt může být koncentrovaný, bude-li to nezbytné, bývá výměna rozpouštědla slučitelná s čistícím nebo determinujícím(určujícím) krokem. Mohou být použité čisticí procedury využívající florisil nebo síru. V takových případech pokračujeme metodou 3620² nebo metodou 3660³ [7]

4.2. Aparatury a materiály

PSE zařízení Dionex zrychlený rozpouštědlový extraktor nebo Supelco s vhodnou velikostí extrakčních nádob. Běžně jsou nádoby vhodné pro vzorky hmotnosti 10 g, 20 g a 30 g. Nádoby by měly být vyrobené z nerezové oceli nebo jiných materiálů schopných odolávat tlakovým podmínkám (13800 kPa) nutných pro tuto metodu.

Může být používán jiné systémové provedení, za předpokladu, že dosáhne postačující výkonnosti pro analyty a matrice.

Pro určení procenta hmotnosti sušiny se používá sušící trouba, exsikátor a porcelánový nebo použitelný hliníkový kelímek. Pro mletí se používají aparáty schopné redukovat částičky hmotnosti na části menší než 1mm. Na vážení vzorku je potřeba použít analytické váhy, schopné vážení do 0,01 g. Na sbírání extraktu se používají tzv. vialky (nebo-li ampulky) o velikosti 40 ml nebo 60 ml. Extrakty jsou přefiltrovány a jsou uzavřené volným šroubovacím uzávěrem s lemovaný silikonovou přepážkou. Pro filtraci je použita filtrační destička – 1,91 cm. Jako membrána uzavírající nádobu se používá také typ Dionex. [7]

4.3. Reagenty

Není-li uvedeno jinak, tak všechny reagenty musí vyhovovat specifikacím Komise Analytických Reagentů z Americké Chemické Společnosti. Další funkce mohou být použité a prováděné až po zjištění, že je reagent dostatečně vysoce vyčištěný pro povolení jeho použití bez zmenšování preciznosti stanovení.

Všechny zmínky o vodě v těchto metodách se odvolávají na volný organický vodní reagent.

Jako sušící činidlo se používají bezvodý granulovaný síran sodný (Na_2SO_4) nebo rozsivková zemina lisovaná do kuliček. Sušící činidlo by měly být čištěné pomocí zahřívání na 400°C po dobu 4 hodin v povrchních rýhách, nebo pomocí extrakce s methylchloridem. Když je použita extrakce s methylchloridem potom by měl být připravovaný blank k demonstrování, že sušící činidlo je schopný volného vměšování. [7]

¹ Organická extrakce a preparace vzorku

² Florisilové čištění – magnezium silikát se zásaditými vlastnosti

³ Čištění sírou

4.4. Extrakční rozpouštědla

Jsou použita různá extrakční rozpouštědla což závisí na extrahovaných analytech. Všechna rozpouštědla by měla být pesticidní kvality nebo ekvivalentem a měla by být před použitím odplyněna.

Organochloridové pesticidy můžou být extrahovány pomocí směsi acetonu s hexanem v poměru 1:1 ($\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{C}_6\text{H}_{14}$) nebo směsi acetonu s methylen chloridem v poměru 1:1 ($\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Částečně těkavá organika se mohou extrahovat směsí acetonu s methylen chloridem v poměru 1:1 ($\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) nebo acetonu s hexanem v poměru 1:1 ($\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{C}_6\text{H}_{14}$).

PCB (polychlorované bifenoly) můžou být extrahovány směsí acetonu s hexanem v poměru 1:1 ($\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{C}_6\text{H}_{14}$) nebo acetonu s methylen chloridem v poměru 1:1 ($\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) nebo hexan (C_6H_{14}).

Organofosforové pesticidy se mohou extrahovat pomocí methylen chloridu (CH_2Cl_2) nebo směsí acetonu s methylen chloridem v poměru 11:1 ($\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Chlorované herbicidy můžou být extrahovány pomocí směsi acetonu s methylen chloridem a roztokem kyseliny fosforečné v poměru 250:125:15 ($\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_3\text{PO}_4$) nebo acetonu s methylen chloridem a roztokem kyseliny trifluoroctové v poměru 250:125:1 ($\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CF}_3\text{COOH}$). Pokud je použita druhá varianta, roztok kyseliny trifluoroctové by měl být připravený smícháním 1% kyseliny trifluoroctové s acetonitrilem. Je potřeba připravit čerstvé rozpouštědlo před každou řadou extrakcí.

Další systém rozpouštědel může být použitý, za předpokladu, že analytik může ukázat adekvátní výkonnost pro významné analyty v matrici vzorku (viděné u metody 3500⁴).

Varování: pro nejlepší výsledky s velmi mokřými vzorky (např. $\geq 30\%$ vlhkosti), se sníží nebo odstraní množství použitého hydrofilního rozpouštědla.

Vysoce čistící plyny jako například dusík, oxid uhličitý nebo helium jsou použité k čištění a nebo tlaku v extrakčních nádobách. Je potřeba dodržovat doporučení výrobce na prostředky pro volbu plynů. [7]

4.5. Postup

Při přípravě vzorku se nejdříve odstraní nahromaděná a navrstvená voda nad sedlinou vzorku. Pak se vzorek důkladně promíchá, obzvláště směsi vzorků. Vyřadí se cizí objekty jako například klacíky, listy a kamínky. Vzorek se suší na vzduchu při pokojové teplotě po dobu 48 hodin ve skleněné misce nebo na hexanem opláchnuté hliníkové fólii. Eventuálně, se směs vzorku se smíchá se srovnatelným množstvím bezvodého síranu sodného nebo rozsivkovou zemínou lisovanou do tvaru kuliček, dokud není získáný volný tok prachu.

Vzorek se takto upraví, protože sušená, jemně mletá zemina/sedlina dovolí nejlepší extrakční výkonnost pro netěkavé, nepolární organika, např. 4,4'-DDT, PCBs. Sušení vzduchem nemůže být vhodné k analýze více těkavých organochlorovaných pesticidů (např.

⁴ Organická extrakce a preparace vzorku

BHCs) nebo více těkavých nebo částečně těkavých organik, protože dochází ke ztrátám během sušícího procesu. Použití síranu sodného jako sušícího činidla může vést k zanesení frity v nádobce s překrytým síranem sodným.

Odpad vzorku – vícefázový odpad vzorků musí být přístupný mletí nebo-li snížení velikosti částic odpadu tak, aby každý prošel 1mm sítím nebo může být protlačený přes 1mm díry. Rozložený drtič se vloží mezi vzorky podle pokynů výrobce a dekontaminace se provádí mýdlem a vodou, následně je omytý acetonem a hexanem.

Gumové, vláknité nebo olejnaté materiály nejsou poddajné mletí, měly by být nařezané, roztrhané nebo jinak by měla být snížena velikost před smícháním, aby byl povrch vzorku optimálně vystaven extrakci. Analytik může přidat bezvodý sulfid sodný, rozsivkovou zeminu lisovanou do kuliček, písek nebo další čistící a sušící činidla na vzorek pro vyrobení více poddajného materiálu po mletí. [7]

Procenta hmotnosti sušiny se určují, když vzorkové výsledky jsou spočítány na základ hmotnosti sušiny a druhý podíl vzorku by měl být vážen v tom stejném čase jako podíl použitý pro analytické stanovení.

Varování: sušárna by měla obsahovat odsávání nebo ventilování. Podstatné laboratorní znečištění může vyplývat ze sušení silně kontaminovaných vzorků.

Do vážícího kelímku se naváží 5 – 10 g vzorku pro extrakci. Tento poměr se suší přes noc při 105 °C. Je dovoleno zchlazení v exikátoru před vážením. Počítání % hmotnosti sušiny je pomocí vzorku:

$$\%sušiny = \frac{g_{suchého\ vzorku}}{g_{vzorku}} \cdot 100$$

Mletí a dostatečná hmotnost suchého vzorku přináší potřebnou hmotnost vzorku pro vymezující metodu (obvykle 10-30 g). Vzorek se mele dokud neprojde skrz 100ky síta.

Mletý vzorek se přemístil do extrakčních nádob přiměřené velikosti. Obecně 11 ml nádoby obsahují asi 10 g materiálu, 22 ml nádoby asi 20 g materiálu, 33 ml asi 30 g materiálu. Hmotnost zvláštního vzorku, který nádoba bude obsahovat závisí na objemové hmotnosti vzorku a množství sušícího činidla, které musí být přidáno do vzorku. Při postupu je potřeba vytvořit vzorek vyhovující pro extrakci. Analytici by měli zajistit, aby poměrný extrahovaný vzorek byl dost velký k poskytnutí nezbytné citlivosti a podle toho i velikosti extrakčních nádob. Použití jednoúčelové celulózy nebo filtru ze skleněného vlákna v odbytí nádob. Čistý písek může být použitý k vyplnění volných objemů v extrakčních nádobách.

Je potřeba doplnit náhražky uvedené ve vymezující metodě ke každému vzorku. Přidá se obohacená matrice/dvakrát obohacená matrice sloučeniny uvedené ve vymezující metodě ke dvěma doplňkovým alikvotním částem vzorku vybraných pro obohacený.

Extrakční nádoba se umístila do měřícího přístroje nebo automatického vzorkovače, jako je popsáno výrobcem pro měřící přístroj.

Přečištěná kolekce nádob se umístila do měřícího přístroje pro každý vzorek, jako je popsáno u měřícího přístroje výrobcem. Celkový objem sebraného extraktu bude záviset na specifickém vybavení a doporučené extrakční procedury výrobce. Může být v rozsahu od 0,5 do 1,4 násobku velikosti extrakční nádoby. Je nutné zajistit, aby kolekce nádob byla dostatečně velká pro obsah extraktu.

Doporučené extrakční podmínky:

- Teplota trouby: 100 °C
- Tlak: 10350-13800 kPa [7]
- Klidový čas: 5 min (po 5 minutách vyrovnání přehřátí)

- Vyrovnaný objem: 60 % z objemu nádoby
- Očištěný dusík: 60 s při 1035 kPa (čistící čas může být prodloužený podle velikosti nádoby)
- Stálý cyklus: 1

Je potřeba optimalizace podmínek podle instrukcí výrobce. Všeobecně tlak není kritickým parametrem. Účelem tlakování extrakčních nádob je udržení rozpouštědla ve varu při extrakční teplotě a zajištění aby rozpouštědlo zůstalo v blízkém kontaktu se vzorkem. Tlak v rozpětí od 10350 – 13800 kPa by měl postačit.

Jednou ustanovený, stejný tlak by měl být použitý pro všechny extrahované vzorky pro stejný typ analýzy.

Začít extrakci podle pokynů výrobce. Sesbírat každý extrakt do čistých vialek. Zchlazené extrakty po extrakci jsou zkompletované.

Extrakt je připravený pro koncentraci, vyčištění nebo analýzu, v závislosti na rozšíření a využití rozhodující metody. Odkaz na metodu 3600⁵ pro podstatu vedení na zvolení vhodné čistící metody. Nadměrná voda zastoupena v extraktu může být odstraněna pomocí filtrace extraktu skrz řečiště z bezvodého síranu sodného. Čištění a/nebo určující metody můžou požadovat změnu předchozího rozpouštědla k čištění a/nebo vzorkové analýze.

Jestliže roztok kyseliny fosforečné je použitý pro extrakci chlorovaných herbicidů, potom by měl být extraktor vypláchnutý pomocí pumpování acetonu skrz všechny trubky systému. Použití jiných rozpouštědel pro tuto analýzu nemusí požadovat tento vyplachovací krok. [7]

4.6. Kontrola kvality

Odkaz na metodu 8000⁶ pro podstatu procedury kontroly kvality. Odkaz na metodu 3500⁷ pro specifickou podstatu extrakce a procedura preparace vzorků.

Před zpracováním některých vzorků by měl analytik zkontrolovat všechny části zařízení, které jsou v kontaktu se vzorkem a reaktanty. Toto je ustálené přes analýzu pevné matrice metodou blank (čištěný písek). Pokaždé, když jsou vzorky extrahované, a když dochází ke změně v reagentu, metody blank potřebují být extrahované a analyzované pro zajímavé sloučeniny. Metoda blank by měla být dána skrz všechny stádia separace vzorku a měření. [7]

4.7. Provedení metody

4.7.1. Chlorované pesticidy a částečně těkavá organika

Jednoduché laboratorní přesnosti dat bylo získáno pro chlorované pesticidy a částečně těkavé organika v třech obohacených koncentracích ve třech různých půdních typech. Obohacená koncentrace byla řazená od 5 do 250 µg/kg pro chlorované pesticidy a od 250

⁵ Metoda poskytující hlavní směrnice při výběru metod čištění

⁶ Určující chromatografickou separaci – užití je ve spojení všech SW-846 určujících chromatografickou metodu

⁷ Organická extrakce a preparace vzorku

do 12 500 µg/kg pro částečně těkavé. obohacené vzorky byly extrahovány oba pomocí Dionex systémem zrychlené extrakce rozpouštědlem a pomocí Perstorp životní prostředí Soxtec (automatizovaný Soxhlet). Extrakty budou analyzovány buď pomocí metody 8270⁸ nebo metody 8081⁹. Metoda blank, obohacený a duplikát obohacený byly zahrnuty pro nízkou koncentraci obohacený. obohacené matrice byly zahrnuty pro všechny další koncentrace. Data jsou představována sedmi opakovanými extrakcemi a analýzami pro každý vzorek. Tabulky se souhrnem dat jsou zahrnuty v metodě 8270 a metodě 8081. [7]

4.7.2. Organofosforové pesticidy a chlorované herbicidy

Jednoduché laboratorní přesnosti dat bylo získáno pro organofosforové pesticidy (OPPs) a chlorované herbicidy ve dvou různých obohacených koncentracích ve třech různých půdních typech. obohacená koncentrace byla v rozsahu od 250 do 2500 µg/kg pro OPPs a od 50 do 5000 µg/kg pro chlorované herbicidy. Chlorované herbicidy byly zahrnuté ve směsi z volné kyseliny a esteru (1:1). obohacené vzorky byly extrahované oba pomocí Dionex zrychleného extraktoru rozpouštědlem a pomocí Soxhletu pro OPPs. Extrakty byly analyzované pomocí metody 8141¹⁰. Obohacené chlorované herbicidy byly extrahovány pomocí Dionex zrychleného extraktoru rozpouštědlem a pomocí metody protřepání popsané v metodě 8151¹¹. Extrakty byly analyzované pomocí metody 8151. Metoda blank, obohacený a duplikát obohacený byly zahrnuté pro nízký koncentrační obohacený. obohacená matrice byla zahrnuta pro všechny další koncentrace. Data jsou představována sedmi opakovanými extrakcemi a analýzami pro další vzorek. Tabulky se souhrnem dat jsou zahrnuté v metodách 8141¹⁰ a 8151¹¹. [7]

4.7.3. PCBs

Jednoduché laboratorní přesnosti dat bylo získáno pro PCBs (polychlorované bifenoly) z půdních vzorků s PCB podílem ověřený pomocí NIST (standardní odkazovaný materiál byl říční sediment). PCB-kontaminovaná půda byla získaná ze standardního zdroje. obohacené a kvalifikované koncentrace jsou v rozsahu od 1 do 1400 µg/kg. Vzorky byly extrahované pomocí Dionex zrychleného extraktoru rozpouštědla a pomocí Soxhlet metody (perstorp environmentální). Extrakty byly analyzovány použitím metody 8082¹², do níž byla zahrnuta metoda blank, obohacený a duplikát obohacený. Data jsou představována sedmi opakovanými extrakcemi a analýzami pro každý vzorek. Tabulky s kompletními daty jsou zahrnuty v metodě 8082¹². [7]

⁸ Určení částečně těkavých sloučenin pomocí GC/MS(plynová chromatografie a hmotnostním spektrometrem)

⁹ Určení organochlorových pesticidů pomocí GC (plynová chromatografie)

¹⁰ Určení organofosforových sloučenin pomocí GC (plynová chromatografie)

¹¹Kapilární plynová chromatografie

¹²Určení polychlorovaných bifenylů pomocí GC (plynová chromatografie)

4.7.4. Bezpečnost

Použití organických rozpouštědel, zvýšené teploty a vysokých tlaky v metodě 3545 představuje potenciální riziko v laboratoři. Obecný smysl laboratorní praxe může být použitý k minimalizaci tohoto rizika. Nicméně, v následující části jsou popsány doplňkové kroky, které by měly být přijaté.

Extrakční nádoby v peci jsou dostatečně žhavé na popálení nechráněné kůže. Před vyjmutím nádob z pece je nutné je nechat zchladnout nebo použít vhodného ochranného zařízení (e.g., izolační rukavice nebo kleště), jak je doporučeno výrobcem.

Během plynem čistícího kroku, některé rozpouštědla se vypařují a můžou procházet skrz větrací otvor v měřicím přístroji. Je nutné uposlechnout nařízení výrobce týkající se spojení tohoto otvoru s digestoří nebo dalšími prostředky k zabránění propouštění par rozpouštědla do laboratorní atmosféry.

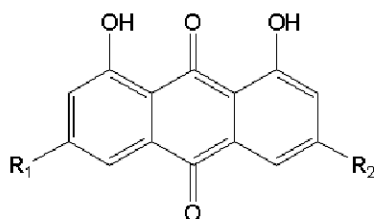
Měřicí přístroj může obsahovat senzory pro identifikaci úniku hořlavé páry. Když je takto vybavený, je důležité uposlechnutí nařízení výrobce týkající se nahrazení utěsnění extrakčních nádob, když je zjištěno časté unikání páry. [7]

5. PSE PŘI EXTRAKCI LÁTEK Z LÉČIVÝCH ROSTLIN

5.1. Stanovení anthrachinonů v rebarboře

Chrysophanol, emodin, physcion, aloe-emodin a rhein (viz obr. 8) jsou látky stanovované v dobře známé léčivé rostlině rebarbora. Anthrachinonové deriváty jsou významné aktivní komponenty. Byly extrahované z rebarbory pomocí PSE a separace byla provedena kapilární zónovou elektroforézou (CZE). Experimentální proměnné u PSE i CZE byly optimalizované. Jedná se o proměnné jako extrakční rozpouštědlo, velikost částic, teplota, stálý extrakční čas a tlak. Extrakční účinnost byla určena opakováním několika PSE extrakcí za sebou na stejném vzorku při optimalizovaných podmínkách a jejich zprůměrováním.

Výtěžek jednofázové extrakce u všech analytů byl vyšší než 99,6 %. Optimální podmínky užívaly methanol jako extrakční rozpouštědlo, teplotu 140 °C, velikost částic od 0,13 do 0,2 mm, tlak 10 350 kPa a jeden extrakční cyklus. Dobou trvání cyklu byla 5 minut. 5 hledaných anthrachinonů z rebarbory bylo kvantifikováno za využití CZE. Získané píky byly identifikované třemi prostředky – (1) porovnáním migračních časů neznámých píků se standardy vyluhovanými za stejných podmínek. (2) porovnáním UV spektra se standardy získanými za stejných podmínek a (3) pomocí vzorku rebarbory obohaceného známým množstvím standardního roztoku anthrachinonů. [8]



	R1	R2
Chrysophanol	CH3	H
Emodin	CH3	OH
Physcion	CH3	OCH3
Aloe-emodin	H	CH2OH
Rhein	H	COOH

Obrázek 8. Struktura stanovovaných anthrachinonů

5.2. Určování ginsenosidů

Stanovení v léčivých rostlinách a zdravotních doplňcích se provádělo pomocí PSE a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s obrácenou fází. Vzorky byly extrahovány z důležitých léčivých rostlin, které jsou používány v čínské medicíně (jedná se o *Panax ginseng* a *americký ginseng*) a doplňků stravy. Jako extrakční rozpouštědlo byl použit

methanol. Objem požadovaného rozpouštědla se stanovil porovnáním množství ginsenosidů ve frakcích, které se získaly každých 10 min po dobu 110 minut.

Významné frakce cílové analýzy byly extrahovány 20 – 25 ml methanolu. Pro zjištění nejlepších optimalizovaných podmínek pro PSE extrakci se zkoumal účinek při teplotách od 80 do 140 °C. Nad 120°C se množství extrahovaných ginsenosidů významně neměnilo. Čas potřebný pro extrakci byl nastaven na 20 minut. Extrakční účinnost byla zjišťována porovnáním PSE s klasickou Soxhletovou extrakcí. Jedním z problémů v analýzách ginsenosidů jsou malonylové formy, protože jsou mnohem méně stabilní než neutrální ginsenosidy a dochází k jejich degradaci.

Celková doba extrakce při využití Soxhletova extraktoru byla minimálně 20 hodin. Bylo zjištěno, že pokud se různé ginsenosidy zahřívají krátkou dobu, jsou poměrně stabilní. Technika PSE vykazuje srovnatelnou nebo vyšší extrakční výkonnost než Soxhlet pro berberiny, kyselinu aristolochinovou a strychnin v léčivých rostlinách a dalších bylinných preparátech. Vyšší extrakční výkonnost souvisí s vyšší teplotou, která zvyšuje kapacitu rozpouštědla, aby rozpustilo cílové analyty a narušilo povrch matrice vzorku. Následně pro identifikaci ginsenosidů byla použita HPLC, protože jednoduchý extrakční krok PSE s HPLC poskytuje rychlou metodu k určení těchto sloučenin. Teplota je zde důležitým parametrem, který významně ovlivňuje koncentrační výkonnost. [9]

5.3. Určování sedmi sloučenin v *Cortex Dictamni*

PSE následovaná citlivou a specifickou analýzou HPLC s detektorem diodového pole (DAD) byla vyvinuta pro stanovení sedmi sloučenin v *Cortex Dictamni*, což je kořenová kůra z *Dictamnus dasycarpus* (Třemdava huňatoplodá). Může být používána pro léčbu různých onemocnění jako například kožního zanícení, ekzémů, zarděnek, plísňe, svrabu, akutní revmatické artritidy a žloutenky v Číně. Většina chemických studií v těchto léčivých rostlinách našla rozmanité sloučeniny jako například limonoidy, furanoquinolinové alkaloidy, sesterpenoidy a flavonoidy. Mezi nimi alkaloidy a limonoidy byly hlavní bioaktivní složky.

Optimalizovaná procedura používá methanol jako extrakční rozpouštědlo, 150°C extrakční teplotu, tlak 10350 kPa, 5 minut extrakční čas, 60% proudový objem. Extrakční výtěžky sloučenin byly téměř 100% pouze pro jeden extrakční cyklus. Následovala analýza kapalinovou chromatografií na obrácené fázi se směsí methanolu a vody jako mobilní fází. Identifikace zkoumaných sloučenin byla provedena porovnáním retenčního času a jejich UV spektra (při 236 nm a 218 nm) se standardy při stejných podmínkách nebo s obohacenými vzorky. Tato technika může být použita pro *Cortex Dictamni* a další podobné léčivé rostliny. [10]

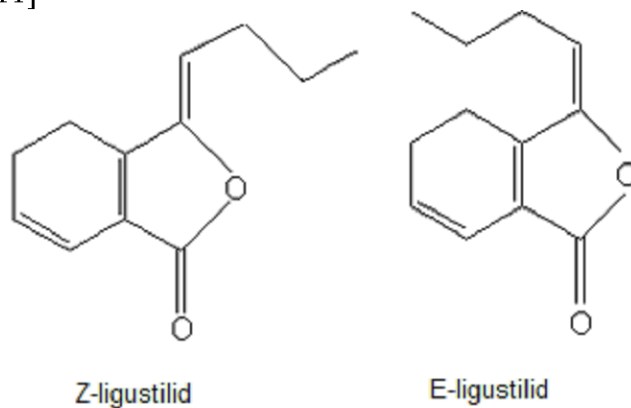
5.4. Analýza ligustilidů

PSE se používá například pro získání ligustilidů, což jsou zdraví prospěšné látky využívané v tradiční čínské medicíně (TCM). Extrakce se provádí horkou vodou za zvýšeného tlaku. Následuje headspace extrakce na mikrovlákně (HS-SPME) a analýza plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC-MS).

Stanovené byly dvě bioaktivní sloučeniny Z-ligustilid a E-ligustilid (viz obr. 9) ve dvou léčivých rostlinách používaných v TCM. Jde o rostliny *Ligusticum chinense* a

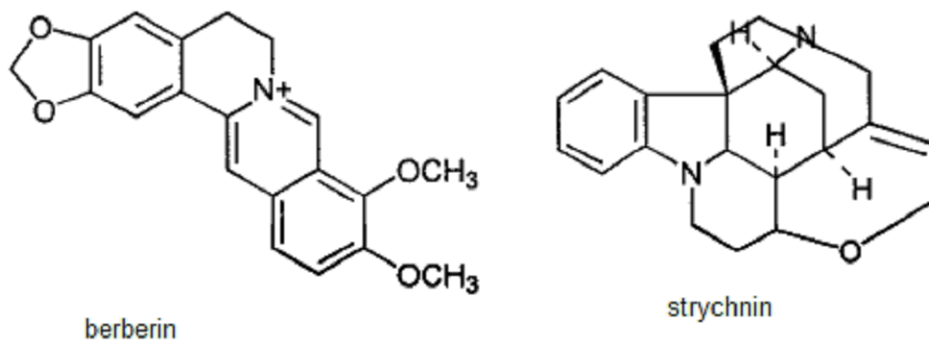
Angelica sinensis (Koprniček čínský a Děhel čínský). Léčivé rostliny užívané v TCM jsou atraktivní v moderních farmaceutických podnicích. Tam je jim věnována pozornost jako důležitým zdrojům léčivých látek. Farmakologické a klinické studie naznačují, že ligustilidy mohou zabraňovat nakupení krevních destiček, uvolnění průdušnice a hladkého svalstva, prevence gynekologických onemocnění, upravení menstruačních poruch, zabraňuje předčasnému porodu a upravuje hypertenzi.

Ligustilidy byly extrahované vodou při teplotě 150°C a tlaku 40 barů, následně koncentrované HS-SPME a analyzované pomocí GC-MS. Jako extrakční rozpouštědlo měla největší účinnost voda. Její extrakční schopnost byla studována v rozmezí teplot 125 – 175°C za konstantní průtokové rychlosti 1 ml/min, extrakčního času 10 minut a tlaku 4 MPa. Maximální extrakční výkonnost byla dosažena při 150°C a extrakční čas 10 minut byl dostatečný k extrakci ligustilidů. K udržení vody v kapalném stavu při teplotě vyšší než 100°C bylo použito tlaku 4 MPa. Nebyl pozorován žádný vliv tlaku na množství extrahovaného ligustilidu. Průtoková rychlost jako proměnná byla také studována a nejlepší extrakční výkonnost byla zjištěna při 2 ml/min. Jako optimální teplota a čas pro HS-SPME bylo 80°C a 10 minut. [11]



5.5. Extrakce strychninu a berberinu

Pomocí PSE byly dále v léčivých rostlinách a bylinných preparátech extrahované sloučeniny strychnin a berberin (viz obr. 10). Berberin je běžný alkaloid v medicínských rostlinách jako například *Rhizoma coptidis* (Koptis čínský) a druhy *Mahonia* (Mahonií). Strychnin je nalezený v léčivých rostlinách jako například *Strychnos nuxvomica* (Kulčiba dávivá). Strychnin je stimulant centrální nervové soustavy, způsobuje větší citlivost smyslových orgánů a dále také stimuluje tělesné orgány a urogenitální trakt.



Identifikace požadovaných sloučenin byla provedena CZE užitím UV detekce při 254 nm. Byl zkoumán vliv pH a koncentrace pufru a organického modifikátoru v elektroforetické separaci. Pufir použitý pro CZE obsahoval 50 mM acetátu amonného, pH 3,1. Bylo dosaženo vyšší účinnosti extrakce strychninu v léčivých rostlinách a berberinu v bylinných preparátech pomocí PSE v porovnání s klasickou Soxletovou extrakcí. Teplota pro PSE byla nastavena na 120 °C užitím methanolu jako extrakčního rozpouštědla. Pro překonání nižší rozpustnosti strychninu v methanolu, bylo nastavené takové množství vzorku, aby to bylo pod bodem nasycení. Větší rozpustnosti strychninu je také dosaženo při vyšších teplotách. Extrakční účinnost drasticky roste při teplotě od 80 do 140 °C. Co se týká berberinu a aristolochinové kyseliny analyzovaných v léčivých rostlinách extrakční výkonnost se významně neměnila od 100 – 120 °C. Teplota PSE byla nakonec nastavena na 130 °C a cílové analyty byly extrahované v 25 ml rozpouštědla.

V porovnání PSE se Soxhletem množství strychninu bylo významně vyšší, množství berberinu bylo porovnatelné nebo vyšší. Důvod zvětšení výkonu při použití PSE je větší rozpustnost analytů, protože je použita vyšší teplota. Ta způsobuje rozrušení silných vazeb v matici rozpuštěné látky, jako jsou van der Waalsovi síly, vodíkové vazby a dipólová přitažlivost mezi molekulami rozpuštěných látek a aktivními místy na matici vzorku. Rychlé analýzy berberinu a strychninu v léčivých rostlinách a bylinných preparátech bylo dosaženo užitím techniky PSE s CZE. [12]

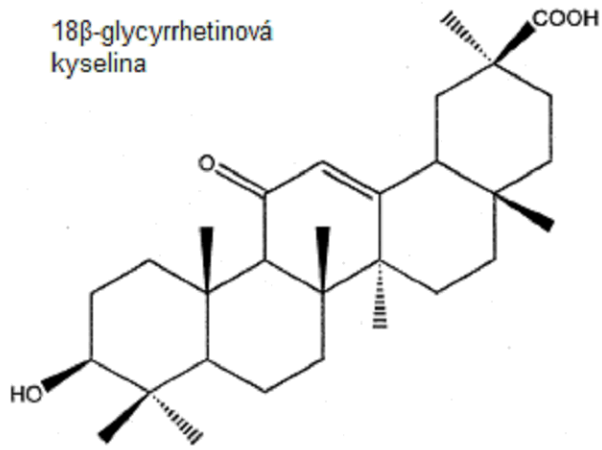
5.6. Glycyrhizin v kořenu lékořice pomocí PSE a CZE

Kořen lékořice se užívá jako utišovalo při ošetření bolavého hrdla a jako prostředek usnadňující vykašlávání při léčení kašle a průduškového kataru. Dále je užíván jako protizánětlivý faktor při ošetření alergických reakcí, revmatismu a artritidě, zabraňuje játrové toxicitě a k ošetření tuberkulózy.

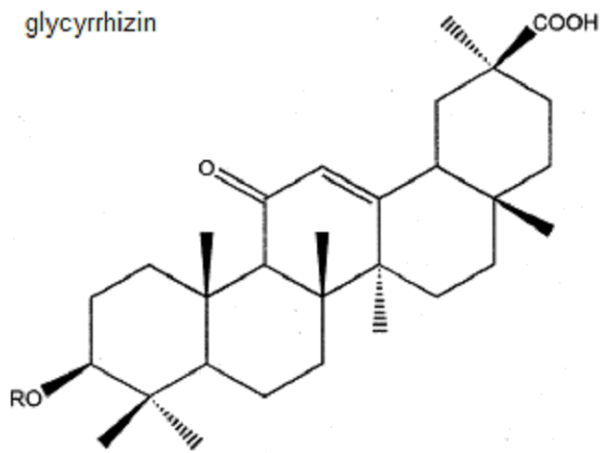
Při extrakci byla teplota shledána jako velmi důležitý parametr, bylo pozorováno snížení získaného množství u tepelně nestálých vzorků při zvyšování teploty od 100 – 160 °C. Z tohoto důvodu byla pro další práci vybrána teplota 100 °C. Glycyrhizin byl udáván jako snadno rozpustný v horké vodě a alkoholu. Běžně se z léčivých rostlin extrahoval směsí methanolu a vody (7:3) v ultrazvukové lázni. Směs methanolu a vody byla pozorována jako nevyhovující pro PSE, protože práškovité léčivé rostliny měly velkou snahu absorbovat vodu, což mělo za následek zablokování systému. Čistý methanol měl bezvýznamnou extrakční účinnost glycyrhizinu při extrakci ultrazvukem. V PSE působící teplota nad teplotu varu rozpouštědla zvyšuje rozpustnost analytů. Interakce, které přirozeně existují mezi analyty a maticí léčivých rostlin, se při této zvýšené teplotě také přerušují. Proto mohl být 100% methanol vybrán jako vhodné extrakční rozpouštědlo pro techniku PSE.

Dále se jako optimální jeví podmínky při použití extrakčního času 20 minut s 20 až 25 ml rozpouštědla při průtokové rychlosti 1 ml/min. Kombinace laboratorní výroby PSE systému s CZE poskytuje celkový roztok pro chemickou standardizaci glycyrhizinu v kořenu glycyrhizea. Ve srovnání s metodami používanými ve farmakologii a dalších odvětvích, navržená metoda šetří počet kroků v preparaci vzorku a může být provedena přímá filtrace v PSE. Dobrá přesnost metody byla zjištěna pro analýzu glycyrhizinu a kyseliny 18β-glycyrhetinové v extraktech léčivých rostlin. [13]

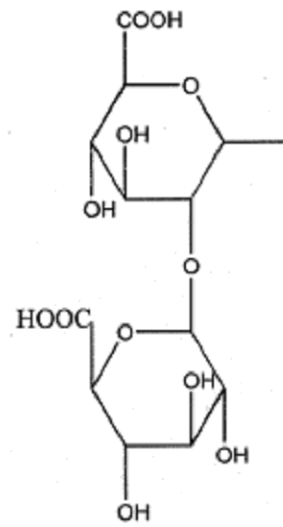
18 β -glycyrrhetinová
kyselina



glycyrrhizin



R=



6. EXTRAKCE POMOCÍ PSE Z BIOLOGICKÝCH VZORKŮ

6.1. Získávání stopových prvků v mořských materiálech

Pomocí PSE se vyluhovali stopové prvky z mořských materiálů za účelem určení hlavních a stopových prvků (Al, As, Cd, Cu, Hg, Li, Mn, Pb, Se, Sr, V a Zn). Prvky uvolněné kyselinou mravenčí byly analyzovány emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES).

Extrakční teplota byla statisticky významná (interval spolehlivosti 95 %) pro většinu prvků, to znamená, že vysokého uvolnění kovů se dosáhlo při vysokých teplotách. Pro kovy Cd a Cu byla významnou proměnou koncentrace kyseliny mravenčí. Většina kovů může být extrahovaná pomocí PSE za daných podmínek: koncentrace kyseliny mravenčí 0,1 M, extrakční teplota 125 °C, jeden extrakční krok trvající 5 minut, tlak 3450 kPa a poměr hmotnosti sušícího činidla ku hmotnosti vzorku se rovná dvěma. Čas 6 minut je potřebný k předeřhnutí extrakční cely (nádoby). Víceprvkové vyluhování je kompletní za 12 minut.

Na extrakci stopových prvků byla jako extrakční činidlo použita většina karboxylových kyselin. Například kyselina octová, mravenčí, šťavelová, citronová a askorbová. Pro další studie byla vybraná kyselina mravenčí, protože nezabíjí ventily v PSE systému. Tlak je v extrakčním procesu potřebný pouze aby udržel rozpouštědlo v kapalném stavu při vyšší teplotě. Poměr hmotnosti sušícího činidla k hmotnosti vzorku je podstatný parametr pro PSE, protože vyžaduje, aby byl vzorek před extrakcí rozptýlený v inertním disperzním médiu. Směs vzorku s inertním materiálem zaručuje jeho jednotný rozptyl a poskytuje dobrý kontakt vzorku a rozpouštědla uvnitř extrakční nádoby a zabrání nahromadění částic vzorku. Aplikace PSE na extrakci stopových prvků může být méně škodlivá pro životní prostředí, protože používá méně toxické kyseliny a hlavně nižší koncentraci těchto kyselin k uvolnění z matrice vzorku. [14]

6.2. Extrakce látek z *Piper gaudichaudianum* Kunth

Pepřová skupina je originální forma tropických oblastí a to ukazuje více než 700 druhů na světě. *Piper gaudichaudianum* Kunth (P.g.K.) je druh více početný v Brazílii. Listy P.g.K. jsou užívány v populární medicíně jako protizánětlivé a v úlevě proti bolesti zubů. Byly vyšetřované druhy *Piper* a ukazují ohromnou rozmanitost sloučenin jako terpeny, steroidy, alkaloidy, polyfenoly, ligniny, neolignany, kavapyrony, piperolideony, chalkony a dihydrochalkony. [15]

Získávání terpenů (terpenových alkoholů a fytosterolů), mastných kyselin a vitamínu E z listů *Piper gaudichaudianum* Kunth bylo provedeno použitím PSE a následnou analýzou těchto sloučenin pomocí GC – MS. Zkoumal se vliv některých experimentálních parametrů PSE na P.g.K. listy, používáním petroleum etheru a ethanolu jako extrakčního rozpouštědla. Palmitová a stearová kyselina, stigmasterol, vitamin E, squalen a nerolidol byly lépe vyluhované petroleum etherem. Avšak kyselina linoleová, 9, 12, 15-oktadekatrienová a lignocerová se zjistily pouze v etanolovém extraktu. [16]

Petroléter se použil jako extrakční rozpouštědlo při získávání látek z *Piper gaudichaudianum* Kunth. Na výtěžek nemělo významný vliv množství vzorku ani řada extrakčních cyklů, proto tyto proměnné byly nastavené na 3 gramy vzorku a jeden extrakční

cyklus. Extrakční čas se stanovil na 10 minut, což je dostatečné k dosažení vyšších výtěžkových hodnot a množství extrahovaných sloučenin.

Optimalizované podmínky byly tedy stanovené na tlak 10, 34 MPa, množství vzorku 3 gramy, jeden extrakční cyklus trvající po dobu 10 minut, velikost částic není přímo specifikována. Jedná se o mleté listy a teplota je nastavena na 85°C. [15]

Při porovnávání PSE s tradičními metodami se pro extrakci použil ethanol jako rozpouštědlo, protože jako jediný extrahoval všechny stanovované sloučeniny. Optimalizované podmínky se použily stejné jako při extrakci pomocí petroleum etheru. PSE byla prokázána mnohem jednodušší a více účinná pro získání aktivních sloučenin z rostlin ve srovnání s tradičními extrakčními metodami jako extrakce v ultrazvukové lázni (USE) a Soxhletova extrakce (SE). Pro identifikaci a kvantifikaci sloučenin obsažených v extraktech *Piper guadichaudianum* Kunth byla vybrána GC – MS. [16]

6.3. Analýza tokoferolů ze semen a ořechů

Při izolování tokoferolů ze semen a ořechů se získaly čisté extrakty a proto je byla možno přímo dávkovat do chromatografického systému. Podmínky byly nastaveny na 50°C, dva extrakční cykly, každý po dobu 5 minut a jako rozpouštědlo se použil acetonitril, protože jeho užitím byl získán vyšší analytický signál než při užití methanolu. Při LC separaci byla použita jako eluent směs methanolu a vody v poměru 99,9:0,1 obsahovaná o 2,5 mM kyseliny octové/acetátu sodného jako pufru. Byla použita coulometrická detekce s pórovitou grafitovou elektrodou při +700 mV.

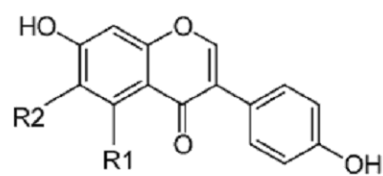
Tato metoda byla úspěšně aplikovaná na určování α -, (β + γ)- a δ -tokoferolů v mandlích, slunečnicových semenech, lískových a vlašských ořechách. Isomery vitamínu E byly kvantifikované užitím externích standardních metod. Limity detekce byly 10, 9,5 a 12 $\mu\text{g/l}$ pro δ -, γ - a α -tokoferoly. Extrakční nádoby se naplnily množstvím vzorku smíchaným se sušicím agentem, aby se zabránilo vzniku mrtvého objemu uvnitř nádoby a to dovoluje lepší kontakt vzorku s extrakčním rozpouštědlem. Byl použit pouze 1 gram vzorku. Aplikovala se teplota v rozmezí 40 – 70 °C, protože vitamin E je termicky nestabilní. Teplota 50 °C se vybrala pro další práci. Celkově bylo analyzováno 7 vzorků z různých semen a ořechů. [17]

6.4. Získávání izoflavonů ze sojových bobů

Izoflavonové deriváty ze zmrzlých vysušených sojových bobů byly extrahované pomocí PSE a určovaly se převrácenou fází HPLC se dvěma detekcemi fotodiodovým polem a hmotnostní spektrometrií. V rozvoji metod byly použité reálné i obohacené vzorky sojových bobů obsahující velké množství proteinů a oleje, ale také několik fytochemikálií. Spotřeba sojových bobů souvisí se snižováním rizika osteoporózy, kardiovaskulárního onemocnění a rakoviny prsu, prostaty a rakoviny tlustého střeva. Obsahují 12 hlavních isoflavonů jako daidzein (De), glycitein (Gle) a genistein (Ge) a jejich příslušné malonylové, acetylové a glukosylové formy (viz obrázek 13). Tyto tři rodiny jsou přibližně v poměru 6:3:1 (Ge:De:Gle).

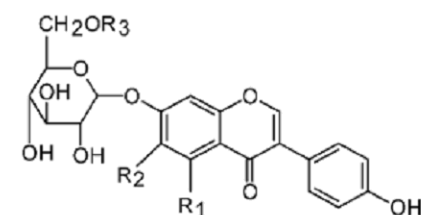
AGLYKONY

Sloučeniny	Symbol	R ₁	R ₂
Daidzein	De	H	H
Glycitein	Gle	H	OCH ₃
Genistein	Ge	OH	H



GLUKOSIDY

Sloučeniny		R ₁	R ₂	R ₃
Daidzin	Di	H	H	H
Glycitin	Gly	H	OCH ₃	H
Genistin	Gi	OH	H	H
Acetyldaidzin	AcDi	H	H	COCH ₃
Acetylglycitin	AcGly	H	OCH ₃	COCH ₃
Acetylgenistin	AcGi	OH	H	COCH ₃
Malonyldaidzin	MDi	H	H	COCH ₂ COOH
Malonylglycitin	MGly	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH
Malonylgenistin	MGi	OH	H	COCH ₂ COOH



Obrázek 9. Chemická struktura isoflavonů

Počáteční experimenty užívají 0,5 g zmrzlých sušených sojových bobů extrahovaných vodou, methanolem nebo ethanolem (30-80 % ve vodě) při 60°C a tlaku 10 MPa, užitím 3 extrakčních cyklů v čase 5 minut každý, aby se stanovily optimální podmínky pro další práci. Jako extrakční rozpouštědlo byl vybrán 70% ethanol, nejen kvůli vysoké účinnosti, ale také kvůli jeho nižší ceně, toxicitě a vyšší snášenlivosti s životním prostředím než methanol.

Teplota byla zkoumaná mezi 60-200°C. Extrakční účinnost MG_i (viz obr. 13) se zvyšuje do 100°C a nad tuto teplotu začíná klesat. Při 150°C byla pozorována zvýšená extrakční účinnost Di, Gly a Gi (viz obr. 13). Zvýšená extrakční účinnost byla kvůli degradaci malonylových forem isoflavonů vedoucí k vzniku jejich glukosidových forem, což zvyšuje jejich koncentraci ve vzorku a tak i extrahované množství. Množství Ge a De (viz obr. 13) se zvyšuje významně, hlavně při teplotě nad 100°C, kde Di, Gly a Gi koncentrace začínají klesat. Proto jako nejlepší extrakční teplota byla vybraná teplota 100°C, aby nedocházelo k degradaci některých isoflavonů a dosáhlo se tak vysoké extrakční účinnosti.

Zvyšování tlaku od 10-20 MPa nemělo vliv na extrakci testovaných isoflavonů, tak byl použitý tlak 10 MPa. Zkoumaly se 2 extrakční cykly po 10 minutách a tři cykly po 7 minutách. Vybrané byly 3 cykly po 7 minutách, protože bylo extrahované větší množství isoflavonů. Pro experimenty bylo použito 0,1 gramů vzorku. [19]

6.5. Stanovení proanthokyanidů extrahované ze sladu

Aplikace PSE následně s SPE a HPLC k určení proanthokyanidů ve sladu redukuje čas a manuální práci k minimu v porovnání s dřívějšími manuálními metodami. 20 vzorků

se může zpracovávat během 24 hodin a naopak v manuálních metodách se jedná pouze o 8 vzorků.

Výtěžky pěti hlavních sladových proanthokyanidů byly 97 %. Proanthokyanidy jsou skupina fenolických rostlinných metabolitů zahrnujících širokou řadu jednoduchých sloučenin. Vykazují příznivý fyziologický účinek a jsou technologicky důležité kvůli jejich antioxidační aktivitě a proteinovému vazebnému potenciálu. Tato metoda je vhodná k extrakci 99 % proanthokyanidů.

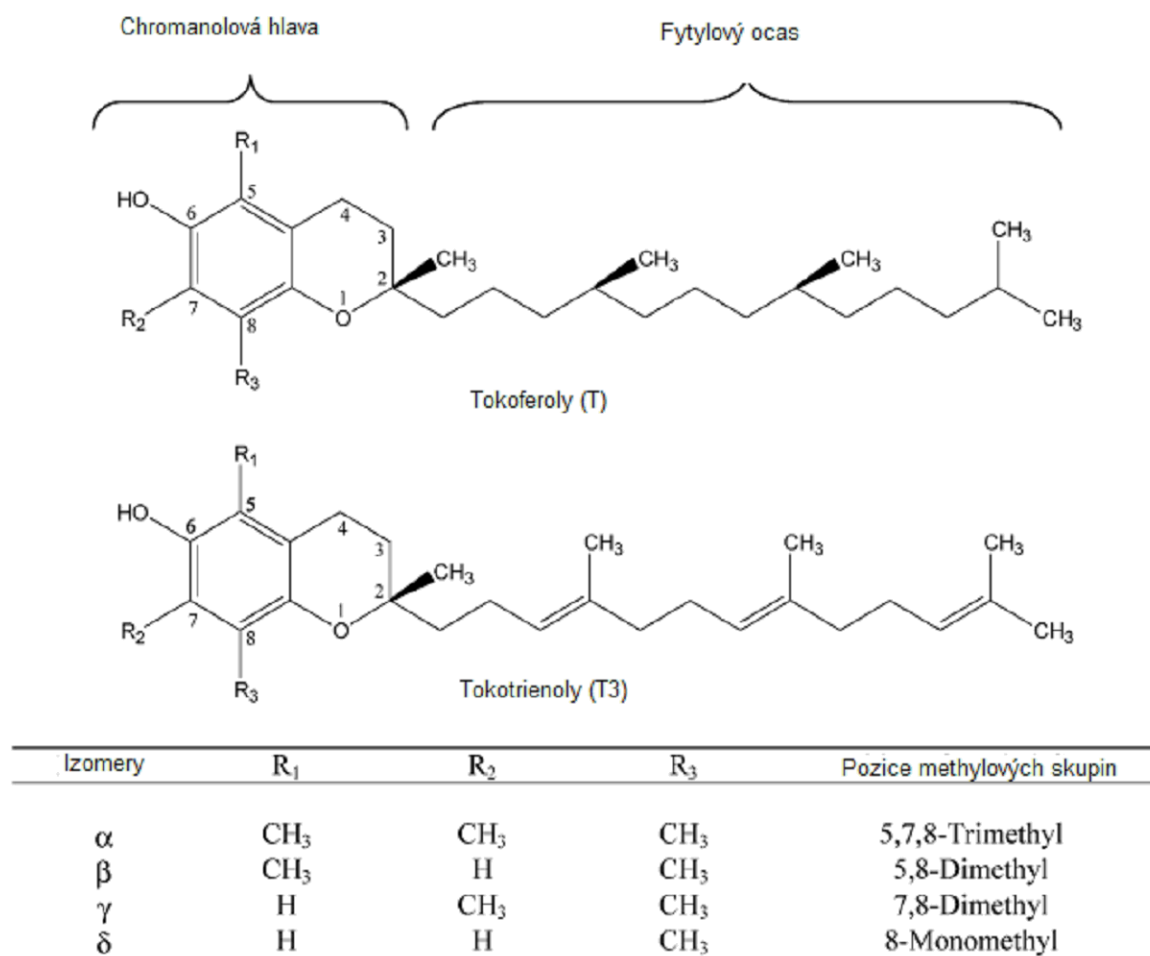
Jako optimální extrakční rozpouštědlo byla určena směs acetonu a vody v poměru 80:20. Při teplotě nižší než 60°C byla extrakce neúčinná a teplota vyšší měla za následek teplotní degradaci, proto tato teplota byla optimální. Tlak nastavený na 100 nebo 200 MPa neukazoval žádné rozdíly. Celkový čas pro jednoduchou extrakci vzorku byl přibližně 25 minut. Množství vzorku nad 4 gramy může být vloženo do extrakční nádoby k získání vyšších koncentrací analytu ve výsledných extraktech. Objem extraktu může být snížený přibližně na 14 ml celkového objemu extrakčních nádob.

Nový instrumentální postup pro automatizovanou analýzu pevných vzorkových materiálů pomocí přímého spojení PSE s automatizovaným SPE a HPLC je aplikovaný na analýzu proanthokyanidů ve vzorcích sladu. Ukazuje výhodu této metody mající za následek úsporu času analýzy, vyšší výkonnost a zlepšení výtěžků. [22]

6.6. Betakaroteny a vitamín E ve zbytcích oleje

PSE spolu s normální fází kapalinové chromatografie je vyhodnocený jako nový postup pro určení β -karotenů a izomerů vitamínu E ve zbytcích oleje získaných z palmových stlačených vláken (PPF). Relativní extrakční výtěžky byly přibližně 100%. Pomocí této metody se určovaly karoteny, tokoferoly a tokotrienoly. Tokoferoly (viz obr. 15) jsou methyl-substituované hydroxychromany s nasycenými fytylovými stranami řetězce tokotrienoly (viz obr. 15) s nenasycenou stranou řetězce.

Hlavní zájem pro studování vitamínu E jsou jeho přírodní antioxidační schopnosti. Byl známý jako nejúčinnější antioxidant pro přerušení volných radikálových vazebných reakcí a poskytuje přírodní oxidační ochranu oleje. Většina rostlinných olejů a biologického ovoce obsahují různé množství dominantních tokoferolů. Nicméně tokotrienoly mohou být nalezené v palmovém a kokosovém oleji a cereálních zrnech jako například pšenice, žito, oves a ječmen.



Obrázek 10. Chemická struktura tokoferolů a tokotrienolů

Separace tokoferolů a tokotrienolů byla provedena při různých teplotách 30, 40, 50 a 60 °C. Shromážděná data výtěžků ukazují, že nejlepší separace bylo dosaženo při 40°C. Optimalizace množství vzorku se vykonala použitím 2, 4, 5 a 6 gramů vzorku s teplotou 100°C, tlakem 10350 kPa a n-hexanem jako rozpouštědlem. Výtěžky byly nejlepší pro 5 gramů vzorku, proto toto množství bylo vybráno jako optimální.

Teplota je nejdůležitější parametr při užití PSE extrakce. Vyšší teplota napomáhá přerušení analytických vazeb v matici vzorku a povzbuzuje analytický rozptyl v povrchu matrice. Teplota optimalizovaná použitím různých hodnot 60, 80, 100 a 120°C použitím 5 g vzorku, tlaku 10350 kPa a n-hexanu jako rozpouštědla. Jako optimální teplota se vybralo 80°C. Tlak 10350 kPa byl určen jako optimální. Pro experimenty byly použité dva cykly extrakce trvající každý 10 minut. [24]

6.7. Určování polyfenolů v jablcích Golden Delicious

Všechny komponenty, které jsou obsažené v jablečné dužině jsou také obsaženy ve slupce, ačkoli ve slupce je větší množství. Nejužívanější rozpouštědlo k extrahování fenolických sloučenin z jablek je methanol a jeho směs s vodou. Dále jsou studované jako rozpouštědla pouze hydromethanolické směsi. Extrakční výtěžky se zvyšují s procenty methanolu v extrakčním rozpouštědle pro všechny čtyři třídy fenolických sloučenin: kytechiny, florentin glykosidy, kvercetin glykosidy a kyseliny hydroxykořicové.

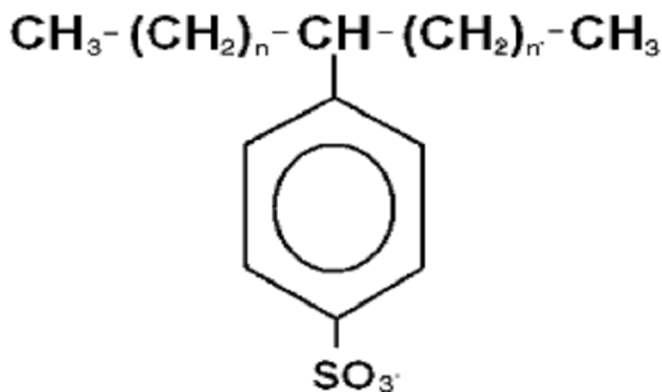
Předchozí studie s touto novou technikou ukazuje, že obsah vody v extrakčním rozpouštědle nebo ve vzorku snižuje preciznost metody. Proto byl nakonec pro extrakci vybraný methanol jako extrakční rozpouštědlo. Tento výběr později zvýhodňuje vypařování extraktu. Optimální teplota byla určena na 40°C, protože poskytuje průhledný roztok a také proto, že může docházet k degradaci polyfenolů při teplotě nad 40°C.

Zkoumaný extrakční čas byl 5, 10 a 15 minut, množství extrahovaných analytů bylo prakticky konstantní během těchto period, proto 5 minut bylo vybráno jako optimální čas a použily se 2 extrakční cykly. Vybraný tlak byl 6900 kPa. Požadovaný objem rozpouštědla pro tyto podmínky byl přibližně 25 nebo 40 ml, když se použily extrakční nádoby 11 a 22 ml.

Identifikace sloučenin byla provedena srovnáním jejich retenčních časů a jejich UV-viditelného spektra. Výkonnost této metody je porovnatelná s tradičními metodami. Šetří však čas a spotřebu rozpouštědla. [25]

6.8. Stanovování alkybenzensulfonátů (LAS) z mořských organismů

Po extrakci LAS pomocí PSE byla dále použita extrakce na pevné fázi (SPE) na čištění (purifikaci) vzorku a vzorek se analyzoval pomocí HPLC-FL (fluorescenční detektor). LAS (viz obr. 12) jsou mezi hlavními anionaktivními činidly v současném komerčním použití a jejich každoroční spotřeba v pracích prostředcích v Evropě byla odhadována okolo 270 x 106 kg/rok v roce 2000.



Obecná struktura alkybenzensulfonátů (LAS)

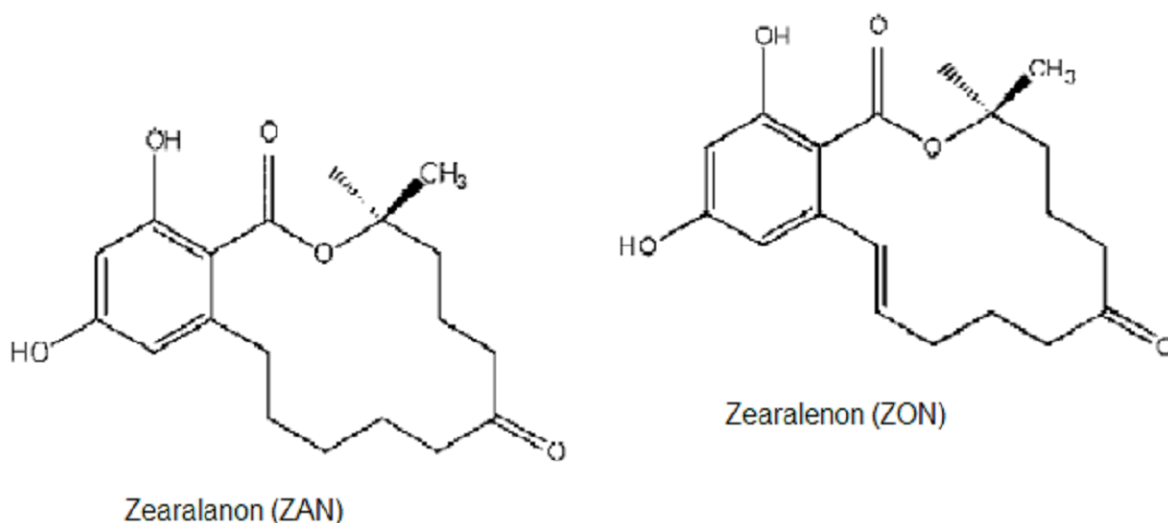
Byly používány vzorky z organismů *Solea senegalensis* (druh platýze) a *Ruditapes semidecussatus* (druh měkkýše). Do vzorků se dodával formaldehyd kvůli zamezení degradaci sloučenin. Ve většině případů byly při 100°C získané dobré výtěžky LAS extrahovaných z mořských organismů. Při 150 °C směřují k překonání 100% výtěžků LAS. Určení získaných výsledků PCB z rybí tkáně (při 100°C) bylo přijatelné, ale některé hodnoty se pohybovaly mimo interval spolehlivosti 95%. Extrakce těchto vzorků byla provedena užitím PSE při 100 °C, následované SPE s minikolonou a následující HPLC-FL detekcí.

Tato technika použila první extrakci s hexanem a následovanou extrakci s methanolem. Tlak byl nastavený na 10 350 kPa, použily se tři cykly v časech 5 minut každý. Objem methanolickeho extraktu byl 30 ml, toto množství se odpařilo v rotační odparce do vysušení a suchý zbytek byl znovu rozpuštěný v 75 ml horké vody v ultrazvukové lázni. Rozpouštědlo prošlo skrz náplň, což bylo podmíněné 10 ml methanolu a 5 ml vody a

vyluhováním s 10 ml methanolu. Eluát se odpařil do sucha a znovu se rozpustil v 1 ml směsi methanolu a vody v poměru 80:20. Vzorky byly před analýzou filtrované skrz 0,45 µm filtr. [18]

6.9. Extrakce ZON z pšenice a kukuřice

Zearalenon (ZON) (viz obr. 14) byl extrahován z pšenice a kukuřice pomocí PSE s následnou analýzou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) bez další čistících procedury. ZON je fusariový toxin důležitý z hlediska jeho zdraví škodlivých účinků Zearalanon (ZAN) (viz obr. 14) byl použitý jako vnitřní standard.



Tato metoda má hlavní výhody v drastické redukci analytických ztrát během manipulace se vzorkem, snížení potřebného času pro analytickou proceduru a nižší náklady na materiál a pracovní sílu, což jsou žádoucí charakteristiky během rozvoje metody. Pouze rozpouštědlo má významný vliv na ZON výtěžky z pšenice a kukuřice. Dokonce ani extrakční teplota nevykazuje významný vliv na výtěžky v žádné matici bez ohledu na použité rozpouštědlo. Výtěžky byly nad 100% při všech teplotách, to znamená, že nedocházelo k termické degradaci ZON při zvýšené teplotě. Pro další experimenty se aplikovala střední teplota 80°C a extrakční čas 5 minut. Jako extrakční rozpouštědlo byla vybraná směs methanol – acetonitril (ACN), protože dával významně vyšší výtěžky a čistější extrakt pro obě matrice v porovnání směsi methanol – voda a ACN – voda. Teplota a čas nehrají důležitou roli v extrakční účinnosti bez ohledu na to, zdali byly použité přírodně kontaminované materiály nebo uměle kontaminované. Kvantifikační limity byli 15 ng/g v pšenici a 12 ng/g v kukuřici.

Výkomnost metody byla tedy testována při 80°C, dvou extrakčních cyklech každý po dobu 5 minut a směsi methanol – ACN. [20]

6.10. Extrakce polychlorovaných bifenylů (PCBs) z biovzorků

Optimalizované podmínky pro PSE jsou množství vzorku 2 gramy rozptýleného ve 4 gramech inertní matrice (Celatom) nebo polárního sorbetu (Florisil). Jako extrakční rozpouštědlo byl zkoumaný pentan nebo dichlormethan (DCM) -pentanová směs v procentech

5, 10, 15 a 50% DCM. Užitá teplota byla 175°C, tlak 13800 kPa, 15 minut extrakční čas, objemový průtok rozpouštědla 150% objemu nádoby a tři extrakční cykly.

Pentan byl vybrán pro relativně nízký bod varu a krátký čas k získání extraktů. Kvantitativní výtěžky se získaly užitím Celatomu, ale bylo spoluextrahované vysoké množství lipidů a proto je nezbytný čistící krok před chromatografickou analýzou. Když byl do extrakční nádoby vložený Florisil bylo nezbytné použití minimálně 15% DCM k získání uspokojivých výtěžků. S nižším procentem DCM se získaly významně nižší výtěžky. Abychom dosáhli čistější extrakty, zkoumalo se několik extrakčních teplot 30, 40, 60, 125 a 175 °C. Užitím nižších teplot byl snížen i obsah spoluextrahovaných lipidů. Při teplotě 40°C byl extrakt dostatečně čistý pro GC – MS analýzu, proto byla vybrána pro další experimenty.

Tlak neměl významný účinek na extrakci. Bylo potřeba nejméně 10 minut čas cyklu a pro další analýzu se použily 2 extrakční cykly k získání kvantitativních výtěžků. Jako rozpouštědlo se použilo 55 ml směsi DCM – pentanu v poměru 15:85 k dosažení kvantitativní extrakce. Nejčistější extrakty byly získané užitím Florisilu v extrakčních nádobách. Čistota extraktu byla dostatečná pro přímé vstříknutí extraktu do GC – MS nebo do GC – ECD (detektor elektronového záchytu). [21]

6.11. Analýza dioxinů získaných z biologických maticí

PSE se používá pro analýzu dioxinů (PCDD/Fs, polychlorované dibenzo-p-dioxiny /dibenzofurany a Co-PCB, koplánární polychlorované bifenyly) v biologických maticích bohatých na lipidy. Prozkoumával se potenciálně nebývalých extrakčních metod, skládající se z kombinace PSE užitím směsi dimethyl sulfoxidu (DMSO) a acetonitrilu v poměru 1:9 jako rozpouštědla a směsi DMSO, acetonitrilu a hexanu k rozdělování. Tato metoda může potenciálně snížit široké množství lipidů typicky vytvořených v extrakci dioxinů.

Optimální podmínky pro PSE byly tlak 13800 kPa a teplota nad 180°C a běžně se užívaly ke všem rozpouštědlům. K dosažení kompletního vyluhování dioxinů bylo nezbytné 120 ml hexanu. Zvýšením teploty a tlaku bylo množství lipidů získaných pomocí všech metod rozdílné. Tyto rozdílnosti byly kvůli prostoupení rozpouštědla maticí, zbývající vlhkostí po sušení zmrazením nebo existenci vazeb vodních a polárních hmot ve vzorku. Množství lipidů extrahovaných užitím nové metody bylo přibližně 1/100 těch získaných se směsí acetonu a hexanu v poměru 1:1, a proto zpracování kyselinou sírovou není nezbytné. [23]

6.12. Stanovování pesticidů v ovoci

Několika stupňová metoda PSE a kapalinová chromatografie následovaná čtyřpólovým iontovým záchytem a dále trojitým stupněm hmotnostní spektrometrie (LC-IT-MS³) se vyvinula pro určování stopového množství pesticidů v ovoci. Vybrané pesticidy jsou významné benzimidazoly a azoly, organofosfory, karbamáty, neonikotinoidy a akaricidy.

Teplota neukazovala významnou změnu ve výtěžcích. To znamená, že tam nebyl termální pokles pesticidů vyjma trichloroform-organofosforových pesticidů, které jsou známé jako termicky degradativní a ty se ztratily při 150°C. Nejlepší výtěžky byly pozorované při 75°C a tlaku 10350 kPa. Extrakční čas byl nastavený na 7 minut k zajištění dostatečné

extrakce. Proudové procento bylo ověřované od 50 % až do 150 % a řada cyklů od 1 do 5. Nejvyšší výtěžky byly dosaženy při 100% proudu. Extrakční účinnost byla konstantní od jednoho do tří cyklů, zatímco pokles byl pozorovaný od cyklu čtvrtého.

Jako sušící materiály byli zkoumané aluminum, florisil, silikagel a bezvodý síran sodný pro PSE v pomerančích a broskvích. Florisil dává nižší výtěžky pro všechny sloučeniny a bezvodý síran sodný dává také nízké výtěžky pro thiabendazol, imidazol, bitertanol, pyriproxyfen a hexythiazox. Jako extrakční rozpouštědlo byl testovaný methanol, etylacetát a dichlormethan. Optimalizovaná procedura používá k rozptýlení vzorku s kyselým aluminem a extrahované ethylacetátem (100% proud) při 75°C, tlaku 10350 kPa, užitím dvou cyklů každý po dobu 7 minut. [26]

7. POTRAVINY

7.1. Bisfenol diglycidyl étherové zbytky

Byla vyvinuta nová potvrzující metoda pro souběžné stanovování bisfenolu diglycidyl étherových zbytků z konzervovaných potravin. Navrhovaná metoda zahrnuje extrakci pomocí PSE následované rozdělením kapalina–kapalina a očištění SPE. Analýza látek se provedla na obrácené fázi HPLC a byla připojena k chemické ionizaci za atmosferického tlaku spojené s hmotnostním spektrometrem (APCI-MS-MS).

Užití rozpouštědla při vyšší teplotě zvyšuje kapacitu rozpouštědla k solubilizaci (rozpouštěcí) analýze a zvyšuje difúzní rychlost. Zvýšením teploty také snížíme viskozitu kapalného rozpouštědla, to znamená lepší pronikání matricovými částicemi a může přerušit matricové interakce způsobené van der Waalovými silami, vodíkovými vazbami a dipólovými momenty molekul rozpouštědla a aktivních míst v matrici.

Jako extrakční rozpouštědlo se zkoumal hexan a směs dichlormethanu s acetonem a hexanu s acetonem v poměru 1:1 a dále směs hexanu a acetonu v poměru 4:1, za teploty 100°C, tlaku 10350 kPa a při dvou cyklech po dobu 5 minut každý. Pro extrakci bisfenolových zbytků byla vybraná směs hexanu a acetonu (4:1).

Teplota byla zkoumaná v intervalu 80 – 125°C. Zlepšené výtěžky byly při růstu teploty, ale koncentrace analytů byla úplně srovnatelná jako při teplotě 100°C. Extrakční čas se testoval v intervalu 5 – 15 minut. 5, 10 i 15 minut poskytovaly adekvátní výtěžky, proto byl použitý čas 5 minut, aby se minimalizoval čas analýzy. Jeden extrakční cyklus není vždy schopný kvantitativně extrahovat analyt z matrice, a proto byly vybrané cykly dva.

Optimalizované podmínky byly použity k analýze 20 reálných vzorků, 12 konzervovaných ryb v oleji, 3 konzervované ryby ve vodním roztoku a 5 vzorků dětského jídla. Výtěžky dosahují výnosných hodnot v rozmezí 81 – 101%. [27]

7.2. Určení pesticidů v potravinářském zboží

PSE bylo aplikováno k souběžné extrakci široké řady pesticidů z potravinářského zboží. Testované extrakční rozpouštědla byly ethyl aceton, aceton, směs ethyl acetátu s acetonem v poměru 1:1 a ethyl acetátu a acetonu 3:1. Pro tři alikvotní množství „spajkových“ kukuřičných vzorků, které byly extrahované, se použily následující podmínky: teplota 100°C, tlak 10350 kPa s 5 minutovými cykly. Nejlepší výsledky byly sledované pro všechny sloučeniny se směsí ethyl acetátu a acetonu 3:1.

Optimalizace extrakčního času a teploty byla provedena použitím tří časů 3, 5 a 10 minut a tří teplot 75, 100 a 125°C při stálém tlaku 10350 kPa. Porovnání výtěžků ukazuje, že výsledky získané se stálou periodou 5 minut při teplotě 100°C byly nejlepší. Vyšší hodnoty nepřinášely významně lepší výtěžky. Vliv tlaku na extrakční výtěžky byl také testovaný. Zkoumané hodnoty byly 6900, 10350 a 13800 kPa a nejvyšší výtěžky byly získané aplikací tlaku 10350 kPa.

PSE podmínky se optimalizovaly při použití porcí od 3 do 8 gramů vzorku. Nejlepší výtěžky byly pozorované při použití 4 gramů vzorku. Vyšší množství vzorku dávalo více vodní extrakt, zatímco nižší množství ukazuje nízkou preciznost hodnot. PSE byla optimalizovaná vykonáním paralelních extrakcí více než 100 pesticidů s různými polaritami

v potravinářském zboží. Pesticidy byly pak analyzovány pomocí každého GC – MS/MS nebo LC – MS/MS. [28]

7.3. Analýza PCB v rybím mase a v krmení pro drůbež

Další využití techniky PSE bylo na extrakci sedmi vybraných polychlorovaných bisfenolů (PCB) v přírodně kontaminovaném rybím mase a dva potravinové vzorky z přírodně kontaminovaných vzorků rybiho oleje. Zkoumaly se tři různé teploty 50, 100 a 150°C, použily se na experimenty různá rozpouštědla n-heptan a směs n-heptanu a acetonu v poměru 1:1, průtoková rychlost 50 a 150 %. Provedlo se 12 experimentů při různých kombinacích těchto parametrů.

Pro PCB obsažených v jídle z ryb zvyšuje vysoká teplota výtěžkovou rychlost. Experimenty provedené při zvýšené teplotě často dávají výtěžky nad 100%. Tyto výsledky však byly získané pro méně těkavé PCB. Dodatek polárního rozpouštědla do extrakčního roztoku má pozitivní účinek na výtěžkovou rychlost, která se ukázala být významná pouze pro 2 formy ze 7 zkoumaných. Při zkoumání vzorků z krmení pro drůbež bylo pozorováno, že čistý n-heptan dával lepší výtěžky než směs n-heptanu a acetonu, ačkoli síla účinku rozpouštědla na výtěžkovou rychlost se liší mezi různými PCB.

Experimenty neobjevily významný účinek teploty na výtěžkovou rychlost PCB. Výsledek pro krmivo pro drůbež je různý od výsledků získaných z rybiho masa. Rozdílnosti v extrakčním chování mezi jídlem z ryb a krmivem pro drůbež svědčí o způsobu PCB uvedených v matrici. Čistý n-heptan může být dostačující k extrahování z analytu. Ve specifickém případě krmiva pro drůbež se vysoká polarita rozpouštědla zdá být jako by bránila extrakci. Naopak pro přírodně kontaminované materiály přídavek acetonu dává mírně lepší hodnoty vzhledem k tomu, že polární rozpouštědlo pravděpodobně pomáhá v extrahování více pevně vázaných analytů pomocí průniku polární oblasti matrici.

Výsledky také ukazují, že vysoká teplota v kombinaci s čistým n-heptanem může získat podobnou extrakční účinnost. Průtokový objem rozpouštědla byl aplikovaný 60%. Na základě výsledků se preferoval n-heptan jako extrakční rozpouštědlo, při užití teplotě nad 100°C. [31]

7.4. Látky určované v rybích vzorcích

Polychlorované bifenyly byly určované i v rybích vzorcích. Pro testování byla použita rybí svalová tkáň obsahující 3,2% lipidů a přirozené polychlorované bifenyly (PCB), organochloridové pesticidy (OCP) a další související sloučeniny. Čištění surových extraktů se provedlo pomocí chromatografie gelového záhytu a identifikace a kvalifikace cílových indikátorů PCB a OCP byly vykonané pomocí vysoce rozlišovací plynové chromatografie a dvěma paralelními detektory elektronového záhytu (HRGC–ECD–ECD). Všechny experimenty byly navrženy, aby se vyvarovaly náhodných chyb prostředků replikace.

Obecně, zvýšení teploty může přerušit silné interakce rozpouštědla a matrice způsobené Van der Walsovými silami, vodíkovými vazbami nebo dipólovými přitažlivostmi rozpuštěné látky a aktivních míst v matrici. Vyšší teploty také snižují viskozitu rozpouštědla, to dovoluje jejich lepší proniknutí do matricových částic a zvětšení extrakční účinnosti. Experimenty byly provedené za konstantního tlaku a teplota se měnila v řadě od 60 do 90 °C, kdy bylo pozorované zřetelné zvýšení výkonnosti.

Cílové analyty byly extrahované směsí hexan-acetonu z materiálu s malými rozdílnostmi velikosti částic užitím jednoduchého 5 minutového extrakčního kroku. Dalších hodně zadržovaných nehomogenních sedimentů až 14% některých protějšků, které byly pak kompletně uvolněné během druhého 5 minutového kroku. Důležitá je aplikace opakovatelného extrakčního cyklu pro účinnou izolaci OCP z půdy. Zanedbatelné rozdíly byly shledané mezi jedním a dvěma cykly. V průměru tři extrakční cykly dávaly pro obě testované extrakční směsi maximální výtěžky, ale rozdíly mezi dvěma a třemi cykly nebyly statisticky významné. Proto byly vybrány dva extrakční cykly.

Když se vybírá rozpouštědlo jsou zvažované fyzikálně-chemické vlastnosti jako například bod varu, polarita, specifická hustota, která má vliv na průnik rozpouštědla do matrice vzorku, stejně tak toxicita. Rybí vzorky se extrahovaly směsí hexanu a dichlormethanu v poměru 1:1 a hexanu a acetonu v poměru 4:1. Vzhledem k výtěžkům cílových analytů, bez ohledu na použitou směs rozpouštědel, nebyly pozorované statisticky významné rozdílnosti mezi výsledky získanými pomocí PSE (extrakční teplota 100°C, dva cykly po pěti minutách) a těmi získanými pomocí Soxhleta. PSE mohou být ovlivněny optimalizací polaritativy užití extrakční směsi rozpouštědel. V tomto případě byly parametry polaritativy mírně vyšší u směsi hexanu a dichlormethanu. Maximální množství vzorku, který může být vložený do extrakční nádoby při používaných extrakčních podmínkách, je pouze 10 gramů. [32]

7.5. PCB v potravinových a krmivových vzorcích

Jako tuková matrice se používal čistý vepřový tuk. Půl gramu tohoto tuku se kombinovalo s 5, 6, 7, 10 nebo nakonec 20 gramy zálohy, což znamená, že poměr různých tuků k tukovým zálohám (FFR) je 0,100, 0,075, 0,050, 0,025. Byly testovány všechny kombinace při dvou teplotách 50 a 100°C a se třemi různými typy rozpouštědla: n-pentanem, n-hexanem a n-heptanem.

Když je použitý FFR 0,025, množství spolu extrahovaného tuku nikdy nepřekona 0,5 mg pro žádné rozpouštědlo při žádné teplotě, ale při teplotě 100°C bylo množství dost nižší. Florisil je více účinný v odstranění tuku na váhový základ, a proto FFR poměr 0,14 pro florisil se rovná okolo 0,070 pro alumina a silikagel impregnovaný kyselinou sírovou. Porovnání zachycující kapacity od 60% (125°C) k 90% (60°C) s odpovídající hodnotou silikagelu impregnovaného kyselinou sírovou při 100 a 50°C, s FFR poměrem 0,075 určuje, že změna zachycovací kapacity tuku pro čistý n-pentan je pouze asi 8%. To ukazuje, že silikagel impregnovaný kyselinou sírovou je mnohem méně citlivý ke změně teploty, třebaže část toho kurzu může být kvůli tomu, že experimenty nebyly provedené pod přesně identickými podmínkami. Aby se dosáhlo úplně tukově volného extraktu v aplikaci s vajíčky veslonoha amerického je použitý florisil a teplota musí být snížena na teplotu 30°C, která je neuspokojivá pokud jde o výtěžky PCB.

Dodatečně musí být využíván dichlormethan, kterého by se ale mělo vyvarovat vzhledem k tomu, že dnes je pokládán za environmentální kontaminant. Silikagel impregnovaný kyselinou sírovou je stále zvažovaný jako nejlepší výběr pro on-line odstranění tuku, při extrakci analytů odolných proti kyselinám, držení rozumně vysoké teploty. Aby se ověřilo, že dvě možné rozpouštědla n-pentan a n-heptan byly schopné nahrazování n-hexanu byly testované na vzorku jídla z ryb přírodně kontaminovaného k určení zdali

se chovaly rozdílně při extrahování reálných světových maticí. Tyto jídla z ryb byly důkladně vyšetřované a data jsou dostupná v evropské mezinárodní studii. [33]

Před testováním výkonnosti n-pentanu a n-heptanu, jídlo z ryb bylo extrahované s neselektivním PSE odkazující se na metodu 3545 užitím směsi n-hexanu a acetonu v poměru 1:1 jako extrakčního rozpouštědla následované externím čištěním na silikagelu impregnovaného kyselinou sírovou. Kvantitativní výtěžky pro všechny kombinace rozpouštědel a teplot byly použité, třebaže malé snížení ve výtěžcích bylo pozorované pro některé PCB. Z předchozích studií je známo, že toto může být způsobené spoluextrakcí tuku. Vysvětlení může být, že dost malý tokový objem byl užitý vzhledem k tomu, že hodnoty tokového objemu 150% v některých případech zvyšují extrakční účinnost. Některé dodatečné experimenty byly provedené při 100°C s n-heptanem a měnícím se objemovým tokem z 50 - 150%. Vzhledem k tomu, že byly získané dobré výtěžky v kombinaci s extrakty s volným tukem, konečná metoda n-heptan při 100°C po dobu 5 minut ve dvou cyklech s průtokovým objemem 60% a FFR 0,025 byly testované na většině kvalifikovaných potravinových a krmivových maticích. [33]

7.6. Extrakce oxysterolů z vaječného prášku

Byly hodnocené oxysteroly v celém vaječném prášku užitím PSE pro kvantitativní určení. Jako vzorky celých vajec sušených rozprašováním byly použité italské vanilkové koláče (Pandoro) a vaječné nudle. Testované byly dvě různá rozpouštědla směs chloroformu a mehanolu v poměru 2:1 a hexanu s isopropanolem 3:2 při různých extrakčních teplotách a tlacích, 60°C při 15 MPa, 100°C při 15 MPa, 120°C při 20 MPa. PSE vanilkového koláče a vaječných nudlí s chloroform/methanolovou směsí nebylo dost výběrové a vedlo k extrakci nelipidových frakcí, včetně sloučenin obsahujících nitrogen. Ve stejném případě, natlakované směsi hexan/isopropanol dávaly lepší výsledky ve výtěžcích, porovnatelné s Folch metodou.

Cholesterolové oxidační produkty Folch extraktu a tlakovaný kapalínový extrakt vaječného prášku sušeného rozprašováním, získaného se směsí hexan/isopropanolu v poměru 3:2, při 60°C a 15 MPa, byly určeny pomocí GC. Množství lipidů extrahovaných Folch metodou bylo 45% pro vaječný prášek, 24,5% pro vanilkový koláč a 5 % pro vaječné nudle. Tyto tři vzorky se vybraly pro rozvíjení PSE procedury pro preparaci vzorku, protože reprezentují potraviny s vysokým, středním a relativně nízkým obsahem tuku. Tlakovaná směs hexan/isopropanol (3:2) může být účinné extrakční rozpouštědlo pro PSE a může nahradit chlorovaná rozpouštědla. Výtěžek schválený se směsí hexan/isopropanolem je uspokojivý ve většině případů, dokonce i při použití jemných podmínek, jako 60°C a 15 MPa. Navíc použitím této směsi se téměř nevyskytují spoluextrahované nelipidové frakce.

Byly testované vysoké extrakční teploty, protože jsou aktuálně užívané pro mnoho aplikací a navrhované pro určení celkového obsahu tuků v potravinách pomocí PSE. Pro extrakci oxysterolů ze vzorků vaječného prášku byla použita směs n-hexan/isopropanol v poměru 3:2, při teplotě 60°C a tlaku 15MPa. Tato metoda byla vybrána, protože chloroform je nahrazen nechlorovanými rozpouštědly. Folch extrakce může být úspěšně nahrazena PSE pro analýzu lipidových frakcí potravin obsahující vejce. [30]

7.7. Lipidy určované v drůbežím mase

Extrakce celkových lipidů v drůbežím mase se zkoumala užitím kapalného rozpouštědla při vysokých teplotách od 60 do 200°C a tlacích od 3,5 do 20 MPa, tekoucího skrz nádoby z nerezové oceli obsahující pevný vzorek. Metoda PSE byla užitá ke kvantitativnímu určení obsahu tuku v homogenizovaných vzorcích drůbežního masa.

Byly testované dvě extrakční směsi chloroform/methanol a n-hexan/2-propanol při různých teplotách a tlacích a s různými preparáty vzorků. Určované bylo složení extraktu ze všech metod a porovnávaly se analýzou pomocí chromatografie na tenké vrstvě a byla provedena plynná chromatografie (GC) mastných kyselin v extraktech. Výtěžky ze směsi n-hexanu a 2-propanolu v poměru 3:2 pro extrakci vzorku, při 60 a 100 °C byly významně nižší než ty získané pomocí upravení Folch a kysele hydrolytické procedury. Takové nízké lipidové výtěžky jsou pravděpodobně kvůli prostoupení směsi zvláště skrz svalovinou tkáň a jeho neschopnost poskytnout dostatečné rozpuštění dalších svalových komponent.

Tlak 15 MPa byl použitý pro extrakci užitím směsi chloroformu a methanolu v poměru 2:1 a testovaly se různé teploty od 60 do 120°C. S těmito extrakčními procedurami, byly nalezené průměrné hodnoty, ale jsou nižší než s modifikací Folch metodou nebo kysele hydrolytickou procedurou. Výsledky byly dále zlepšeny i zvýšením času cyklu i aplikovaného tlaku. Fixovaný tlak 20 MPa a vyšších teplot 80, 100 a 120°C byly schopné kvantitativně extrahovat lipidy jako v modifikované Folch a kysele hydrolytické proceduře.

Vyšší výtěžky mohou být kromě jiného vysvětleny vyšší extrakční rychlostí nelipidových kontaminantů jako například cukry, aminokyseliny a soli. K odstranění těchto molekul, jako navrhovaný Folch a solné rozpouštědlo by mohly být dodané před vázicím krokem. Vzhledem k tomuto čistícímu kroku je to přiměřeně zdůrazněné, že některé stopové prvky, jako například glykolipidy, mohou být částečně ztraceny užitím této promývací procedury. Průměrné váhy lipidů pro hydrolytickou metodu byly nejvyšší, protože tato procedura také odstraňuje komplexní a polární lipidy, jako například fosfolipidy, glykolipidy nebo lipoproteidy, které jinými metodami nemohou extrahovat. Volné mastné kyseliny byly lépe extrahované při vyšší teplotě a tlaku. Složení mastných kyselin, pomocí GC analýzy methylesterů, ukazovaly stejné výtěžky polynenasycených mastných kyselin pomocí obou Folch procedury i ASE (PSE) metody, potvrzení možnosti užití ASE na místo Folchovy procedury.

K zachránění autooxidačních lipidů by měl být dusík použitý jako tlakovací plyn. Extrahovalo se 20 vzorků vykostěných a homogenizovaných drůbežích půlek, všemi třemi metodami. Výsledky všech metod byly porovnané a bylo shledáno, že jsou ekvivalentní. Směs chloroformu a methanolu v poměru 2:1, při tlaku 20 MPa a dva cykly po dobu 10 minut každý byly užitě pro extrakci metodou PSE. [29]

7.8. Určování mastných kyselin v masových produktech

PSE byl aplikován k určení lipidových ukazatelů vznikajících v centrální nervové soustavě (CNS) krav obsažených v tepelně zpracovaných párcích. Tyto studie jsou důležité v kontrole kvality, v první řadě odhadové studie rizika BSE krize. Diagnózy CNS ukazatelů, které mohou být přítomné v masových produktech bez CNS přísad, byly rozpoznané

na kompletní transesterifikaci jako polární 2-hydroxy mastné kyseliny, tak dobře jako zvláště počítané nerozvětvené mastné kyseliny s řetězcem delším než C22.

Tři různé vzorky obsahující masové produkty bez CNS dodatků, maso s 3% CNS dodatků a čistý CNS homogenát se podrobily posupné PSE skládající se ze dvou kroků. Zaprvé se extrahuje směsí n-hexanu a acetonu v poměru 9:1 při 50°C k odstranění neutrálních lipidů a následně pak směsí chloroformu a methanolu v poměru 1:4 při 110°C k izolování polárních CNS lipidů, 10 minut každý cyklus. Ke zvětšení frakcionační výkonnosti byl použit kyanopropyl modifikovaný křemíkem stejně dobře jako chemicky nemodifikovaný silikagelový sorbent. Vložil se při výstupu PSE náplně ke zpomalení polárních lipidů v prvním kroku. Schéma skládající se z těchto dvou kroků dovolí rozdělení neutrálních lipidů z fosfolipidů.

PSE dovolí kompletní extrakci „spajkových“ lipidů (jako roztok v chloroformu). Nově rozvíjená metoda by měla být ohodnocena s ohledem na izolace CNS lipidů z „neCNS“ lipidů v CNS doplňcích jídla. [34]

8. ZÁVĚR

V první části mé práce se věnuji představení přístroje PSE. Z jakých částí se přístroj skládá a jaké je jeho další příslušenství. Existují dva typy PSE, One PSE a Fast PSE. Každý z nich má své výhody i využití. One PSE je spíše konstruovaný pro laboratoře s menší výkonností, kde se metody vyvíjejí, protože je schopný zpracovávat naráz pouze jeden vzorek. Na rozdíl Fast PSE, který je do laboratoří, kde je potřeba v co nejkratším čase dosáhnout přijatelných výsledků určené metody. Je schopný paralelně zpracovat až 6 vzorků. Tím se výkonnost extrakce zvyšuje. Princip fungování PSE je popsán na trojfázovém diagramu, jedná se o závislost teploty na tlaku. Čím vyšší chceme dosáhnout teploty varu rozpouštědla, tím vyšší musíme nastavit tlak působící na soustavu.

Dále se zabývám EPA metodou 3545, protože EPA metody jsou mezinárodně uznávané. Schvaluje je mezinárodní společnost EPA, což je Agentura pro ochranu životního prostředí. V metodě 3545 je obecně popsána příprava vzorku pro extrakci s PSE, jaká jsou použitelná rozpouštědla, vlastnosti matric, ze kterých lze extrahovat vzorek a samozřejmě se zde zmiňují i extrakční podmínky, které jsou experimentálně určovány.

V páté části je zmíněno využití PSE při extrakci látek z léčivých rostlin. Získávání látek je především kvůli jejich léčebným účinkům. Proto je jejich využití hlavně ve farmakologii. Například ligustilidy mohou zabraňovat nakupení krevních destiček, způsobují uvolnění průdušnice a hladkého svalstva, fungují jako prevence gynekologických onemocnění. Látky extrahované z Třemdavy huňatoplodé (*Cortex Dictamni*) se užívají pro léčbu kožního zanícení, ekzémů a akutní revmatické artritidy. Další stanovovanou látkou byl strychnin, který je stimulatorem centrální nervové soustavy. Pozornost se věnovala i kořenu lékořice. Ten se užívá jako utišovadlo při ošetření bolavého hrdla a jako prostředek usnadňující vykašlávání při léčení kašle a průduškového kataru.

V šesté části jsem se zabývala získáváním látek z biologických vzorků pomocí PSE. Vzorky obsahují látky nejen zdraví prospěšné, ale určovaly se i látky nežádoucí tedy toxické. Mezi zdraví prospěšné látky se řadí např. izoflavony, které snižují rizika onemocnění osteoporózou, kardiovaskulárním onemocněním a rakovinou. Dále se stanovovaly stopové prvky, mastné kyseliny, vitamin E a terpeny, které slouží jako doplňky stravy. Významnými látkami byly i polyfenoly, což jsou přírodní antioxidační sloučeniny potírající bakterie a viry. Z látek toxických se extrahovaly polychlorované bifenyly, dioxiny, zearolenon (ZON). Je zde věnována pozornost i aklylbenzensulfonátům, které jsou obsaženy v pracích prostředcích.

Poslední kapitola se zabývá extrakcí látek obsažených v potravinách s použitím PSE. Určují se zde podobně jako u biologických vzorků látky zdraví škodlivé jako jsou bisfenol diglycidyl etherové zbytky, pesticidy a polychlorované bifenyly (PCB). PCB jsou kumulativní jedy a mají karcinogenní rizika rakoviny slinivky břišní a jater. Stanovovaly se i oxysteroly, což jsou oxidační produkty cholesterolu a ve vysokém množství jsou nežádoucí a zdraví škodlivé. Riziko oxysterolů v potravinách se dá snížit použitím antioxidantů. Ze zdravotně nezávadných látek se určovalo celkové množství lipidů a nebo pouze množství mastných kyselin.

Ze získaných informací se ukázala technika PSE porovnatelná s tradičními metodami (jako například Soxhletova extrakce) co se týká výtěžků látek. Tradiční metody jsou však časově náročné, měly velkou spotřebu rozpouštědla a bylo potřeba hodně manuální práce, na rozdíl od PSE, která šetří čas i spotřebu rozpouštědla a jde o automatizovanou techniku. To všechno jsou velké výhody pro rychlejší rozvoj výzkumu nejen v oblasti potravin.

9. ODKAZY

- [1] Klouda Pavel: *Moderní analytické metody*, nakladatelství: Pavel Klouda, Ostrava 2003, 43 – 49 s.
- [2] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Hernández-Méndez; Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples, *Journal of Chromatography A*, 1089, 2005, 1–17
- [3] Oficiální stránka společnosti Appliedseparation; [cit. 15. 4. 2008]; dostupné z <http://www.appliedseparations.com/pse/default.asp> ;
- [4] Oficiální stránka společnosti Appliedseparation; [cit. 15. 4. 2008]; dostupné z http://www.appliedseparations.com/pse/one_PSE/default.asp >
- [5] Oficiální stránka společnosti Appliedseparation; [cit. 15. 4. 2008]; dostupné z http://www.appliedseparations.com/pse/fast_PSE/default.asp>
- [6] Oficiální stránka společnosti Appliedseparation; [cit. 15. 4. 2008]; dostupné z http://www.appliedseparations.com/pse/pse_Technology.asp >
- [7] Oficiální stránka společnosti EPA; [cit. 15. 4. 2008]; dostupné z http://www.epa.gov/SW-846/3_series.htm - metoda 3545 >
- [8] Yuan X. Gong, Shao P. Li, Yi T. Wang, Peng Li, Feng Q. Yang; Simultaneous determination of anthraquinones in Rhubarb by pressurized liquid extraction and capillary zone electrophoresis; *Electrophoresis* 2005, 26, 1778–1782
- [9] Hwei Khien Lee, Hwei Ling Koh, Eng Shi Ong, Soo On Woo; Determination of ginsenosides in medicinal plants and health supplements by pressurized liquid extraction (PSE) with reversed phase high performance liquid chromatography; *Journal of Separation Science*, 2002, 25, 160-166
- [10] Y. Jiang, S.P. Li, H.T. Chang, Y.T. Wang, P.F. Tu; Pressurized liquid extraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of seven active compounds in Cortex Dictamni; *Journal of Chromatography A*, 1108, 2006, 268–272
- [11] Chunhui Deng, Jie Ji, Xiaochuan Wang, Xiangmin Zhang; Development of pressurized hot water extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determination of ligustilides in *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis*; *Journal of Separation Science*, 2005, 28, 1237–1243
- [12] Eng Shi Ong, Siti Norasikin binte Apandi; Determination of berberine and strychnine in medicinal plants and herbal preparations by pressurized liquid extraction with capillary zone electrophoresis; *Electrophoresis* 2001, 22, 2723–2729
- [13] Eng Shi Ong, Chemical assay of glycyrrhizin in medicinal plants by pressurized liquid extraction (PSE) with capillary zone electrophoresis (CZE); *Journal of Separation Science*, 2002, 25, 825–831
- [14] Jorge Moreda-Piñeiro, Elia Alonso-Rodríguez, Purificación Lopez-Mahía, Soledad Muniategui-Lorenzo, Esther Fernández-Fernández, Darío Prada-Rodríguez, Antonio Moreda-Piñeiro, Adela Bermejo-Barrera, Pilar Bermejo-Barrera; Pressurized liquid extraction as a novel sample pre-treatment for trace element leaching from biological material; *Analytica Chimica Acta*, 572, 2006, 172–179
- [15] Valéria Flores Péres, Jenifer Saffi, Maria Inês S. Melecchi, Fernanda C. Abad, Migdalia M. Martinez, Eniz Conceição Oliveira, Rosângela de Assis Jacques, Elina B.

- Caramão; Optimization of pressurized liquid extraction of *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves; *Journal of Chromatography A*, 1105, 2006, 148–153
- [16] Valéria Flores Péres, Jenifer Saffia, Maria Inês S. Melecchi, Fernanda C. Abad, Rosângela de Assis Jacques, Migdalia M. Martinez, Eniz Conceição Oliveira, Elina B. Caramão; Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth; *Journal of Chromatography A*, 1105, 2006, 115–118
- [17] M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, A. Sánchez-Pérez, R. Carabias-Martínez; Pressurized liquid extraction prior to liquid chromatography with electrochemical detection for the analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts; *Journal of Chromatography A*, 1056, 2004, 249–252
- [18] D. Álvarez-Muñoz, M. Sáez, P.A. Lara-Martín, A. Gómez-Parra, E. González-Mazo; New extraction method for the analysis of linear alkylbenzene sulfonates in marine organisms – Pressurized liquid extraction versus Soxhlet extraction; *Journal of Chromatography A*, 1052, 2004, 33–38
- [19] M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso; Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans; *Analytica Chimica Acta* 522, 2004, 169–177
- [20] Lea Pallaroni, Christoph von Holst; Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry; *Journal of Chromatography A*, 993, 2003, 39–45
- [21] J.L. Gómez-Ariza, M. Bujalance, I. Giráldez, A. Velasco, E. Morales; Determination of polychlorinated biphenyls in biota samples using simultaneous pressurized liquid extraction and purification; *Journal of Chromatography A*, 946, 2002, 209–219
- [22] Menelaos Papagiannopoulos, Benno Zimmermann, Annett Mellenthin, Martin Krappe, Giovanni Maio, Rudolf Galensa; Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt; *Journal of Chromatography A*, 958, 2002, 9–16
- [23] Kimiyoshi Kitamura, Yoshikatsu Takazawa, Shunji Hashimoto, Jae-Won Choi, Hiroyasu Ito, Masatoshi Morita; Effective extraction method for dioxin analysis from lipid-rich biological matrices using a combination of pressurized liquid extraction and dimethyl sulfoxide/acetonitrile/hexane partitioning; *Analytica Chimica Acta* 512, 2004, 27–37
- [24] M. Marsin Sanagi, H.H. See, Wan Aini Wan Ibrahim, Ahmedy Abu Naim; Determination of carotene, tocopherols and tocotrienols in residue oil from palm pressed fiber using pressurized liquid extraction-normal phase liquid chromatography; *Analytica Chimica Acta* 538, 2005, 71–76
- [25] R.M. Alonso-Salces, E. Korta, A. Barranco, L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente; Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple; *Journal of Chromatography A*, 933, 2001, 37–43
- [26] Cristina Blasco, Guillermina Font, Yolanda Picó; Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–ion trap–triple stage mass spectrometry; *Journal of Chromatography A*, 1098, 2005, 37–43
- [27] Olga Pardo, Vicent Yusá, Nuria León, Agustín Pastor; Determination of bisphenol diglycidyl ether residues in canned foods by pressurized liquid extraction

- and liquid chromatography–tandem mass spectrometry; *Journal of Chromatography A*, 1107, 2006, 70–78
- [28] A. Garrido Frenich, I. Martínez Salvador, J. L. Martínez Vidal, T. López-López; Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC–MS/MS and LC–MS/MS; *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383, 1106–1118
- [29] T. Gallina Toschi, A. Bendini, A. Ricci, G. Lercker; Pressurized solvent extraction of total lipids in poultry meat; *Food Chemistry* 83, 2003, 551–555
- [30] Emanuele Bosellia, Viviana Velazco, Maria Fiorenza Caboni, Giovanni Lerckera; Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food; *Journal of Chromatography A*, 917, 2001, 239–244
- [31] C. von Holst, A. Müller, F. Serano, S. Sporning, E. Björklund; Optimisation of Pressurized Liquid Extraction for the Determination of Seven Selected Polychlorinated Biphenyls in Feed Samples; *Chromatographia* 2005, 61, April, 7/8
- [32] Petr Suchan, Jana Pulkrabová, Jana Hajšlová, Vladimír Kocourek; Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish samples; *Analytica Chimica Acta* 520, 2004, 193–200
- [33] Sune Sporning, Erland Björklund; Selective pressurized liquid extraction of polychlorinated biphenyls from fat-containing food and feed samples Influence of cell dimensions, solvent type, temperature and flush volume;

10. VYSVĚTLIVKY

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

Blank – je tak zvaný slepý vzorek, skládá se ze stejných součástí jako použitý vzorek, ale neobsahuje stanovovanou složku

CZE – kapilární zónová elektroforéza

DAD – detektor diodového pole

ECD – detektor elektronového záchytu

FL – fluorescenční detektor

GC – plynová chromatografie

HPLC – vysoko účinná kapalinová chromatografie

HRGC – vysoce rozlišovací plynová chromatografie

HS-SPME – headspace extrakce na mikrovlákně

ICP – OES – emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

IT – čtyřpólový iontový záchyt

LC – kapalinová chromatografie

MS – detektor hmotností spektrometrie

Obohacené vzorky – jedná se o analytický slangový výraz, jde o tzv. metodu přidavku standardu

PSE – extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty, také známá jako zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE), kapalinová extrakce za zvýšeného tlaku (PFE), tlaková kapalinová extrakce (PLE), tlaková extrakce horkým rozpouštědlem (PHSE), extrakce rozpouštědlem za vysokého tlaku (HPSE), extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty (HPHTSE) a subkritická extrakce rozpouštědlem (SSE)

Soxhlet – extrakce látky z pevné fáze do kapaliny

SPE – extrakce na pevné fázi