



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# OPTIMALIZACE A VALIDACE GC-MS METODY PRO STANOVENÍ TĚKAVÝCH AROMATICKÝCH LÁTEK V SÝRECH

THE OPTIMIZATION AND VALIDATION OF THE GC-MS METHOD FOR ASSESSMENT OF VOLATILE  
AROMA COMPOUNDS IN CHEESE

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Miroslav Koubek

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2016



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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK1018/2015</b>	Akademický rok: <b>2015/2016</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Miroslav Koubek</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Eva Vítová, Ph.D.</b>	
Konzultanti:	Ing. Martina Mahdalová	

### Název bakalářské práce:

Optimalizace a validace GC-MS metody pro stanovení těkavých aromatických látek v sýrech

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:

- přírodní sýry - obecná charakteristika, chemické složení
- aromatické látky - charakteristika, rozdělení; aromatické látky v sýrech
- plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), princip, popis, instrumentace

2. Optimalizujte podmínky a ověřte vybrané validační parametry metody stanovení těkavých aromatických látek v sýrech

### Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Miroslav Koubek  
Student(ka)

-----  
Ing. Eva Vítová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce je zaměřena na zavedení metody stanovení těkavých aromaticky aktivních látek v různých typech přírodních a tavených sýrů.

V teoretické části jsou popsány základní skupiny aromatických látek. Dále metody využívané pro jejich stanovení se zaměřením na mikroextrakci pevnou fází a plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií.

Experimentální část se zabývá především optimalizací vybraných parametrů metody. Pro extrakci těkavých látek z matrice vzorku bylo zvoleno vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$ , sloučeniny byly následně stanoveny plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií.

V rámci validace byla ověřena opakovatelnost metody, RSD retenčních časů  $< 1 \%$ , RSD ploch píků 7–21%. Optimalizovaná metoda byla následně aplikovaná na modelový vzorek taveného sýra, ve kterém bylo identifikováno 14 sloučenin, z toho 3 alkoholy, 3 aldehydy, 7 esterů a 1 keton.

## **ABSTRACT**

This work deals with the introducing of the method for the determination of volatile aroma active compounds in different types of natural and processed cheeses.

The theoretical part describes the basic groups of aroma compounds. Than the methods used for their determination with focusing on solid phase microextraction and gas chromatography coupled with mass spectrometry are described.

The experimental part deals with the optimization of the selected method parameters. For extracting volatile substances from the sample matrix the fiber DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$  was selected, these compounds were then determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry.

In the frame of validating proces the repeatability of the method was verified, RSDs of retention times  $< 1 \%$ , RSDs of peak areas in rage 7–21%. The optimized method was then applied on the model sample of processed cheese, where in total 14 compounds were identified, including 3 alcohols, 3 aldehydes, 7 esters and 1 ketone.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

sýry, GC, MS, aromatické látky

## **KEY WORDS**

cheese, GC, MS, aroma compounds

KOUBEK, M. *Optimalizace a validace GC-MS metody pro stanovení těkavých aromatických látek v sýrech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 65 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, 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:*

*Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí bakalářské práce Ing. Evě Vítové Ph.D. a konzultantce Ing. Martině Mahdalové za odborné vedení, čas a cenné rady při zpracování bakalářské práce.*

# OBSAH

1 ÚVOD .....	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 AROMATICKÉ LÁTKY .....	8
2.1.1 Uhlovodíky.....	8
2.1.2 Alkoholy.....	8
2.1.3 Aldehydy .....	8
2.1.4 Ketony .....	9
2.1.5 Kyseliny.....	9
2.1.6 Estery.....	9
2.1.7 Aromatické látky v sýrech.....	9
2.2 POUŽITÉ INSTRUMENTÁLNÍ TECHNIKY .....	9
2.2.1 Mikroextrakce pevnou fází.....	9
2.2.2 Plynová chromatografie .....	10
2.2.2.1 Instrumentace plynové chromatografie .....	10
2.2.3 Hmotnostní spektrometrie .....	12
2.2.4 Plynový chromatograf spojený s hmotnostním spektrometrem .....	14
2.2.4.1 Chromatografický vstup .....	14
2.2.4.2 Výběr kolony a plynu .....	14
2.3 VALIDACE METODY .....	14
2.3.1 Opakovatelnost.....	15
2.3.2 Linearita.....	15
2.3.3 Mez detekce.....	15
2.3.4 Mez stanovitelnosti.....	15
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	17
3.1 VZORKY .....	17
3.2 CHEMIKÁLIE .....	17
3.3 LABORATORNÍ VYBAVENÍ .....	18
3.3.1 Přístroje .....	18
3.3.2 Plyny.....	18
3.3.3 Pracovní pomůcky .....	18
3.4 PODMÍNKY SPME EXTRAKCE.....	19
3.5 PODMÍNKY GC–MS ANALÝZY.....	19
3.6 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ .....	19
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	20
4.1 OPTIMALIZACE EXPERIMENTÁLNÍCH PODMÍNEK.....	20
4.1.1 Optimalizace SPME extrakce.....	21
4.1.1.1 Výběr typu vlákna .....	21
4.1.1.2 Výběr extrakčního způsobu.....	25
4.1.1.3 Doba inkubace (dosažení rovnováhy) .....	25
4.1.1.4 Doba extrakce.....	26

4.1.1.5 Teplota extrakce a inkubace .....	27
4.1.1.6 Velikost vialky vs. množství vzorku .....	28
4.1.1.7 Hloubka ponoření vlákna do vialky .....	29
4.1.1.8 Míchání vzorku.....	30
4.1.1.9 Vliv vysolování a pH.....	30
4.1.2 Optimalizace desorpce .....	30
4.1.2.1 Způsob dávkování vzorku (split/splitless).....	31
4.1.2.2 Teplota desorpce.....	32
4.1.2.3 Doba desorpce .....	32
4.1.2.4 Hloubka ponoření vlákna do injektoru .....	33
4.1.3 Optimalizace chromatografických podmínek .....	33
4.1.3.1 Průtok nosného plynu .....	33
4.1.3.2 Teplotní program .....	34
4.1.4 Parametry MS detektoru.....	35
4.1.4.1 Výsledné optimální podmínky SPME–GC–MS analýzy .....	35
4.2 OVĚŘENÍ VYBRANÝCH VALIDAČNÍCH PARAMETRŮ .....	36
4.2.1 Opakovatelnost.....	36
4.3 IDENTIFIKACE TĚKAVÝCH (AROMATICKÝCH) LÁTEK VE VZORKU TAVENÉHO SÝRA .....	37
5 ZÁVĚR.....	41
6 LITERATURA.....	42
7 POUŽITÍ ZKRATKY .....	44
8 PŘÍLOHY .....	45

# 1 ÚVOD

Senzoricky aktivní látky charakteristicky ovlivňují senzorickou jakost potravin. Nejvýznamnější zastoupení mezi těmito látkami mají látky vonné (aromatické). Vznik aromatických látek je způsoben sekundárními produkty metabolismu použitých surovin nebo vznikají při zpracování a skladování potravin. Aromatické látky jsou veškeré sloučeniny, které vykazují vjem vůně a chuti. Mezi hlavní zástupce řadíme uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, kyseliny a estery. Všichni tito zástupci jsou nedílnou součástí všech druhů sýrů.

Identifikaci aromatických sloučenin je možno uskutečnit různými metodami. V této bakalářské práci byla využita metoda GC–MS. V současnosti běžná analytická metoda, která kombinuje vysokou separační schopnost kapilární plynové chromatografie s vysoce specifickou MS detekcí. K získání extraktu aromatických látek existuje mnoho vyvinutých metod, mezi něž patří destilace s vodní parou, extrakce různými rozpouštědly, simultánní destilace–extrakce, superkritická fluidní extrakce, headspace metody, extrakce tuhou fází příp. mikroextrakce tuhou fází.

Cílem této práce bylo nalézt optimální podmínky a ověřit vybrané validační parametry metody stanovení těkavých aromatických látek v přírodních resp. tavených sýrech, založené na použití mikroextrakce tuhou fází a následné analýze pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Aromatické látky

Senzorickou jakost potravin určují přítomné sensoricky aktivní látky (SAL), tj. látky, které vnímáme svými smysly. K nejvýznamnějším sensoricky aktivním látkám patří látky vonné (tzv. aromaticky aktivní, resp. aromatické), chuťové, barviva a látky určující texturu [1]. Podle způsobu vzniku lze SAL rozdělit do dvou základních skupin: primární a sekundární. Jako primární SAL jsou označovány ty, které jsou již přítomny v potravinách jako produkty sekundárního metabolismu použitých surovin. Látky vznikající jako produkty enzymových a neenzymových reakcí bílkovin, lipidů a sacharidů se nazývají sekundární SAL. K jejich vzniku dochází při zpracování a skladování potravin, zejména při fermentačních pochodech a tepelné zátěži [2, 3]

Aromatické látky jsou veškeré sloučeniny, které vykazují vjem vůně a chuti. Látky, které působí na čichové receptory, se nazývají vonné. Mohou zároveň působit na receptory chuťové, poté jsou rovněž látkami chuťovými. Lze je nalézt v každé skupině organických sloučenin (viz dále), přičemž celkový charakter potravin určuje zpravidla více těchto látek [2, 4].

#### 2.1.1 Uhlovodíky

Uhlovodíky jsou přirozenou složkou mnoha potravin. Uhlovodíky vyskytující se v potravinách můžeme podle struktury dělit na alifatické, alicyklické a aromatické. Vznikají hlavně jako sekundární produkty oxidace lipidů. Pro aromatizaci potravin jsou poměrně málo používané, ale využívají se jako výchozí složky pro syntézy jiných vonných látek. Některé uhlovodíky (hexan) nebo jejich směsi (petrolether) mají uplatnění jako rozpouštědla v oblasti vonných a chuťových látek a v tukovém průmyslu [2, 5].

#### 2.1.2 Alkoholy

Alkoholy a fenoly je možné považovat za první stupeň oxidační řady uhlovodíků. Bývají jak primárními, tak sekundárními vonnými a chuťovými látkami rostlinného a rovněž živočišného původu. Nejvýznamnější jsou volné primární alkoholy a jejich estery, které tvoří aroma zejména u ovoce a alkoholických nápojů. Přírodními vonnými látkami jsou zejména nižší alifatické nenasycené a nasycené alkoholy. Vázaný etanol je v malém množství běžnou složkou aroma mnoha potravin. Volný etanol vzniká jako hlavní produkt alkoholového kvašení. Proto se vyskytuje ve všech alkoholických nápojích, těstě a kysaných mléčných výrobcích. Vlivem mezimolekulárních přitažlivých sil vodíkové vazby jsou alkoholy poměrně dobře rozpustné ve vodě a mají relativně vysoké body varu. Mezi nejdůležitější reakce alkoholů patří oxidace a esterifikace, většinou enzymově katalyzované [5, 3].

#### 2.1.3 Aldehydy

Jako vonné látky mají význam skoro všechny nasycené alifatické aldehydy. Monoterpenové aldehydy jsou důležité látky ze skupiny nenasycených alifatických aldehydů. Aminokyseliny a nenasycené mastné kyseliny přítomné v lipidech jsou prekurzory mnoha sensoricky aktivních karbonylových sloučenin. Z aminokyselin aldehydy vznikají jako



sekundární produkty alkoholového a mléčného kvašení. Streckerovou degradací zase vznikají při termických procesech [2, 3].

#### **2.1.4 Ketony**

Obdobně jako aldehydy se rovněž ketony vyskytují jako primární nebo sekundární složky aroma potravin a potravinářských surovin. Značná řada ketonů se vyznačuje charakteristickým pachem, a proto se uplatňují jako žádoucí i nežádoucí složky různých aromat. Nejrozšířenějším ketonem je aceton. Vzniká dekarboxylací acetocetové kyseliny, která se tvoří jako meziprodukt degradace mastných kyselin  $\beta$ -oxidací nebo jinými mechanismy [3].

#### **2.1.5 Kyseliny**

Karboxylové kyseliny jsou důležité složky rostlinných produktů. Nejčastěji se v potravinách vyskytují karboxylové kyseliny alifatické, alicyklické a aromatické nebo heterocyklické. Podle obsahu karboxylových skupin se dělí na monokarboxylové a polykarboxylové. Vícesytné karboxylové kyseliny jsou významné především jako chuťové látky. Mnoho druhů karboxylových kyselin je prekurzorem vzniku vonných a chuťových látek jakou jsou estery a laktony [2, 5].

#### **2.1.6 Estery**

Estery jsou produkty reakce kyselin s alkoholy. V potravinách patří k nejrozšířenějším sloučeninám. Nejběžnější jsou estery jednosytných kyselin, méně časté jsou pak estery kyselin vícesytných. Hlavní složkou primárního aroma ovoce, zeleniny, nápojů a koření jsou estery nižších mastných kyselin a nižších alkoholů. Při záhřevu a dlouhodobém skladování estery vznikají také sekundárně [3, 5].

#### **2.1.7 Aromatické látky v sýrech**

Sýry jsou typické mnoha aromatickými látkami, přičemž se jednotlivé druhy sýru značně liší v jejich kvalitativním i kvantitativním zastoupení. Tvrdé sýry typu Gouda jsou charakteristické některými estery (ethyl-butanoát), kyselinami (máselná, octová, valerová). U typu Roquefort jsou nejpodstatnější nižší mastné kyseliny (hexanová) a methylketony (2-heptanon). Sýry s mazem na povrchu (Romadur) jsou známé zastoupením fenolu, kresolu nebo acetofenonu. Typ Camembert je typický houbovou vůní, která je způsobena okt-1-en-3-olem [2, 3, 6].

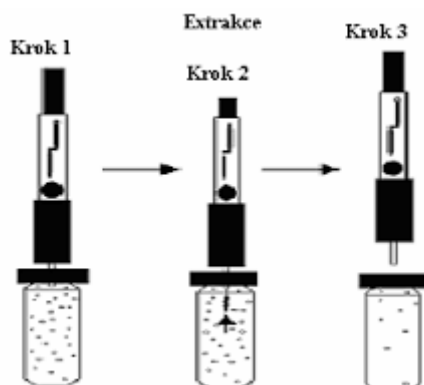
### **2.2 Použití instrumentální techniky**

#### **2.2.1 Mikroextrakce pevnou fází**

Mikroextrakce pevnou fází (SPME) je poměrně mladá moderní metoda extrakce. Při jejím využití není potřeba rozpouštědel. Patří do kategorie velmi jednoduchých a přesto účinných metod. Metoda se řadí mezi rychlé techniky s využitím i pro malé koncentrace analytu [7, 8].

Základ metody tkví v extrakci analytu z roztoku nebo plynné fáze na fázi stacionární, která je upoutána na křemenném vlákne (viz Obrázek 1). Po uplynutí určité doby, kdy probíhá sorpce na pevnou fázi, následuje přesun k desorpčnímu stupni. Při použití plynové

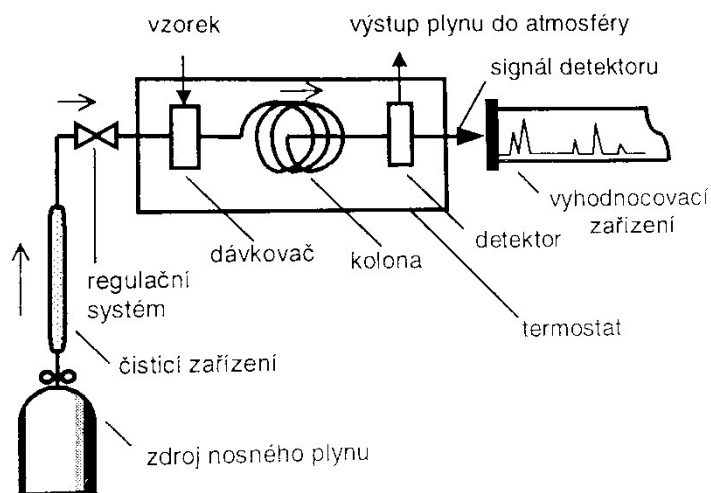
chromatografie probíhá tepelná desorpce analytů v nástřikovém prostoru plynového chromatografu [5, 9].



Obrázek 1: Schéma SPME vlákna [22]

## 2.2.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je separační metoda, která slouží k oddělení a stanovení složitějších, zpravidla organických látek s teplotou varu do 400°C. Touto metodou lze také analyzovat těkavé anorganické látky či netěkavé anorganické látky po převedení na těkavý derivát [10]. Metoda spočívá v rozdělení složek mezi dvě fáze, kde jsou dané složky vzorku rozděleny na základě odlišných interakcí se stacionární fází a jsou postupně vymývány fází mobilní. Jednotlivé složky opouštějící kolonu jsou následně identifikovány pomocí detektoru [11].



Obrázek 2: Schéma plynového chromatografu [12]

### 2.2.2.1 Instrumentace plynové chromatografie

Podle stacionární fáze lze plynovou chromatografii rozdělit na adsorpční a rozdělovací. U plynové adsorpční chromatografie je primárním dějem adsorpce složky z plynné fáze na povrch tuhého adsorbentu. Tato metoda je omezena na použití pro plyny a některé kapaliny s nízkou molekulární hmotností. Plynová rozdělovací chromatografie využívá jako stacionární fázi netěkavou kapalinu, která je nanesena na povrchu tuhého nosiče [10, 11].

## Nosný plyn

Mobilní fáze (nosný plyn) je využíván jako inertní transportér složek plynného vzorku. Podle způsobu detekce se využívá vodík, helium, dusík nebo argon. Zdrojem těchto plynů bývají nejčastěji tlakové láhve, které jsou opatřeny regulátory tlaku a průtoku. Je kladen důraz na vysokou čistotu nosných plynů, proto jsou zde rovněž připojeny sušičky či absorbenty kyslíku [10, 11].

## Dávkovací zařízení

Dávkovací zařízení je určeno k převedení zkoumaného vzorku do plynného stavu a nanesení na začátek kolony. Teplota injektoru je zpravidla vyšší o cca 50°C než teplota kolony a teplota nejméně těkavé složky. Nejvyužívanější typy dávkovačů jsou [11, 14]:

- dávkování bez děliče toku – splitless injector
- dávkování s děličem toku – split injector
- dávkování s programově zvyšovanou teplotou vypařování vzorku
- dávkování přímo do kapilární kolony – on column injector

## Druhy kolon

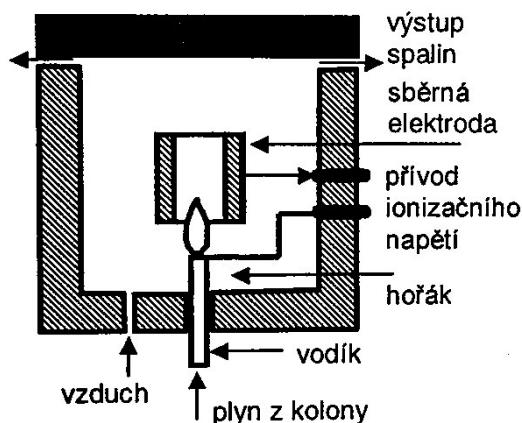
Kolony využívané pro plynovou chromatografii jsou náplňové a kapilární. Náplňové kolony jsou trubice plněné adsorbenty nebo nosiči, na kterých je nanášena stacionární fáze. V současnosti jsou upřednostněny kolony kapilární díky jejich vyšší účinnosti. Kapilární kolony se nejčastěji vyrábí z křemene nebo skla. Stacionární fáze je zde upevněna ve formě tenkého filmu na stěnách kolony [10, 14].

## Termostat

Zajišťuje udržení konstantní a dostatečně vysoké teploty dávkovače, kolony a detektoru. Jednotlivé části plynového chromatografu mají svůj vlastní termostat. Regulací teploty kolony ovlivňujeme retenční čas [11, 12].

## Detektory

Nedílnou součástí plynového chromatografu je detektor, který má za úkol rozpoznat



Obrázek 3: Schéma FID detektoru [12]

signály při průchodu nosného plynu obsahujícího eluovanou složku. Hlavními parametry pro volbu detektorů jsou citlivost, odezva, šum signálu, nejmenší detekovatelná koncentrace nebo

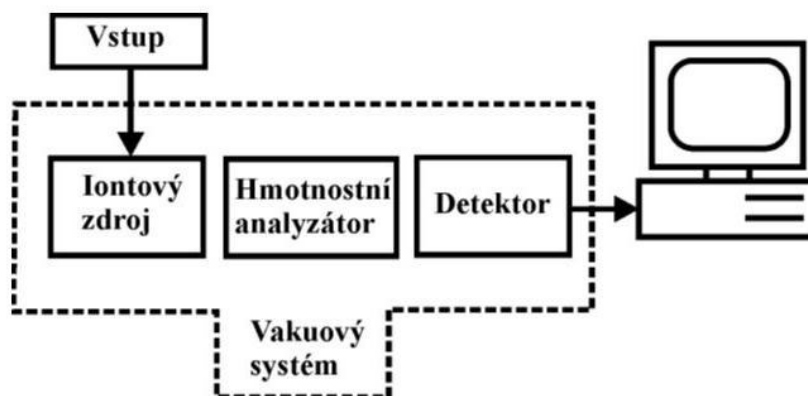
hmotnostní průtok. Pro analýzu organických sloučenin se nejvíce využívá plamenový ionizační detektor (FID) (viz Obrázek 3). Tento detektor využívá tvorby iontů a elektronů, které vznikají spálením složek unášených nosným plynem. Tyto částice proudí mezi dvě elektrody, na nichž je vloženo stejnosměrné napětí. Vzniklé ionty zvyšují vodivost plamene a detektorem prochází proud, který je přímo úměrný koncentraci analyzované látky v nosném plynu [10, 11].

### 2.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Je to vysoce účinná a široce využívaná fyzikálně chemická metoda. Hlavní využití této metody je především v oblasti stopové analýzy organických látek s cílem zjistit jejich strukturu. Velký význam má hmotnostní spektrometrie po spojení se separačními metodami. Metoda spočívá v určování hmotností atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladně nebo záporně nabitě ionty [13].

#### *Instrumentace*

Běžný hmotnostní spektrometr se skládá ze vstupu, iontového zdroje, separátoru, detektoru se zesilovačem a záznamovým zařízením a vakuového systému [10].



Obrázek 4: Schéma hmotnostního spektrometru [14]

#### *Vstup*

Je to místo, kde se přivádí vzorek do hmotnostního spektrometru. Standardně se využívá vstup přes zásobník o objemu 1–2 l. Zde se vzorek vypaří při zvýšeném tlaku a malým otvorem putuje do iontového zdroje. Zavádění vzorku přímo do iontového zdroje je možné u málo těkavých látek. Pro techniku plynového chromatografu spojeného s hmotnostním spektrometrem se využívá tzv. chromatografický vstup [10].

#### *Iontový zdroj*

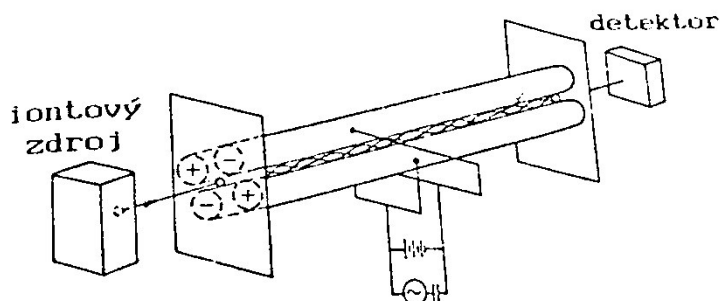
Tady vznikají z molekul vzorku ionty. Vznik je způsoben nevratným odštěpením valenčních elektronů. Podle velikosti dodané energie se ionizační techniky dělí na měkké a tvrdé. Existují tři základní ionizační techniky [10, 14]:

1. Ionizace nárazem elektronů
2. Chemická ionizace
3. Sprejové ionizační techniky

## Hmotnostní analyzátor

Zařízení, které dělí vzniklé ionty podle poměru jejich hmotnosti a náboje  $m/z$ . Je známo několik druhů separátorů:

- sektorový separátor – je tvořen elektromagnetem s pólovými nástavci ve tvaru kruhové výseče. Ionty o určité kinetické energii vstupují do homogenního magnetického pole, kde na ně působí Lorentzova (dostředivá) síla, která je v rovnováze se silou odstředivou. Jestliže jsou tyto síly v rovnováze tak částici o dané hmotnosti odpovídá určitý poloměr dráhy  $r$ .
- kvadrupólový separátor – je sestaven ze čtyř tyčí kruhového průřezu (viz Obrázek 5), které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Ionty, které se dostanou mezi tyče, začnou oscilovat. Podle zvolených hodnot a poměru stejnosměrného a střídavého napětí, projdou kvadrupólem ionty jen o určité hodnotě  $m/z$ .



Obrázek 5: Schéma kvadrupólového separátoru iontů [10]

- iontová past – je složena ze tří elektrod. Vstupní elektrodou se přivedou ionty do iontové pasti. Na střední prstencovou elektrodu se přivádí střídavé napětí. Ionty vykonávají v pasti kruhový pohyb. Dráhy iontů o nižší hmotnosti začnou postupně vyletovat otvory ve výstupní elektrodě. Tento druh separátorů je znám nízkou rozlišovací schopností [10, 14].

## Detektor

Detektory využívané v hmotnostní spektrometrii se dělí do dvou kategorií:

1. detektory pro přímá měření – zaznamenávají elektrický proud vznikající po dopadu iontů. Tyto detektory se používají pro specifické účely, např. pro stanovení přesného izotopového zastoupení prvků nebo při určování stáří hornin.
2. násobičové detektory – využívají násobení elektronů vytvořených po dopadu iontů. Využití těchto detektorů je ve většině instrumentací. Dříve používané elektronnásobičové detektory jsou postupně nahrazovány fotonásobičovými detektory s delší životností a vyšší citlivostí [14].

## Vakuový systém

U vzniklých iontů nesmí docházet k nechtěným srážkám. Aby se tak nestalo, je potřeba, aby v celém systému byl udržován velmi nízký tlak. Pro tlak v rozmezí  $10^{-3} - 10^{-4}$  Pa jsou používány turbomolekulární vývěvy. Pro tlaky nižší obvykle difúzní vývěvy [11].

## 2.2.4 Plynový chromatograf spojený s hmotnostním spektrometrem

Plynový chromatograf spojený s hmotnostním spektrometrem (GC–MS) je široce rozšířená metoda. Umožňuje bezpečně identifikovat a kvantifikovat jednotlivé složky složitých směsí látek. Metoda využívající separačních schopností plynového chromatografu a identifikačních vlastností hmotnostního spektrometru je nedílnou součástí pro řešení složitých analytických problémů [10].

### 2.2.4.1 Chromatografický vstup

Největším problémem je způsob propojení obou zařízení vzhledem k jejich tlakové nekompatibilitě. Hlavním předpokladem správného spojení GC–MS je účinný čerpací systém, který odčerpá nadbytečné množství nosného plynu. U vysoce účinných čerpacích systémů se využívá tzv. přímý vstup. Pokud tomu tak není, bývá zavedeno propojení s děličem. Ten je umístěn na výstupu z kolony a dělí proud nosného plynu s eluovanými složkami do dvou větví. Jedna vstupuje do běžného detektoru a druhá do iontového zdroje [10, 14].

### 2.2.4.2 Výběr kolony a plynu

Kromě kritérií, jako je průměr kapiláry nebo tloušťka vrstvy stacionární fáze, která platí pro optimální dosažení chromatografické separace, je dále výběr omezen hmotnostním spektrometrem. Doporučuje se využívat kolony s chemicky vázanou stacionární fází a s nízkým pokrytím. Negativní vliv na stabilitu stacionární fáze má působení vysoké teploty a vakua, kterým je vystavena kolona v závislosti na spojení s iontovým zdrojem. Preferovaným nosným plynem je helium [14].



Obrázek 6: Použitý plynový chromatograf Trace<sup>TM</sup> 1310 s hmotnostním spektrometrem ISQ<sup>TM</sup> LT

## 2.3 Validace metody

Jedním z cílů této práce je validace GC–MS metody pro stanovení aromatických látek v potravinových matricích. Validace je proces, při kterém se posuzuje platnost vybrané analytické metody. Nejčastěji se provádí u zavedení nové metody, nebo pokud rozšiřujeme

použití platné metody o jiný účel. Za základní validační parametry jsou považovány opakovatelnost, linearita, meze detekce a meze stanovitelnosti [15, 16].

### 2.3.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost vyjadřuje těsnost shody mezi výsledky nezávislých měření stejného vzorku stejnou metodou na stejném materiálu, v té samé laboratoři, stejným pracovníkem, s využitím stejných přístrojů v krátkém časovém rozmezí [16].

### 2.3.2 Linearita

Linearita je definována jako přímková závislost mezi dvěma proměnnými, a to mezi analytickým signálem a koncentrací analytu. Lineárnost dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient, který nabývá hodnot v rozmezí 0–1. Čím víc se koeficient blíží číslu 1, tím větší je lineárnost daných proměnných [15].

### 2.3.3 Mez detekce

Mez detekce udává nejmenší množství látky, které je možné danou metodou stanovit. Toto množství však nemusí být kvantifikované jako exaktní hodnota. Koncentrace, pro kterou je analytický signál patrně odlišný od šumu, odpovídá mezi detekce. Pro separační metody je mez detekce rovna trojnásobku šumu základní linie [15, 16].

Pro separační metody se využívá ke stanovení meze detekce hodnota signálu slepého pokusu. Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie ( $h_{\max}$ ) v oblasti dané dvaceti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu.

Pro odezvu meze detekce platí:

$$y_D = 3 \cdot h_{\max} \quad (1)$$

Pro koncentraci na mezi detekce:

$$x_D = \frac{y_D}{b_1} \quad (2)$$

Směrnice kalibrační přímky  $b_1$  musí být z koncentrační závislosti  $y = b_1 \cdot x$ , kde  $y$  je výška chromatografického píku [15].

### 2.3.4 Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti vyjadřuje nejnižší množství stanovované látky, kterou lze stanovit jako exaktní hodnotu se stanovenou přesností. Rovněž mez stanovitelnosti odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení. U separačních metod je mez stanovení charakterizována jako desetinásobek šumu základní linie.

Pro odezvu meze stanovení platí:

$$y_S = 10 \cdot h_{\max} \quad (3)$$

Pro koncentraci na mezi stanovení:

$$x_s = \frac{y_s}{b_1} \quad (4)$$

Pro  $y = b_1 \cdot x$  jsou charakteristické stejné podmínky jako pro stanovení meze detekce [15].



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Vzorky

Jako testovací vzorky byly použity: tvrdý sýr holandského typu zakoupený v běžné tržní síti a modelový tavený sýr vyrobený na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně standardním technologickým postupem.

Pro analýzu byl sýr nakrájen na drobné kousky, promíchán a příslušná navážka vpravena na dno vialky. Tavený sýr byl promíchán a do vialky vpraven injekční stříkačkou.

### 3.2 Chemikálie

Byly použity následující standardy aromatických látek, všechny v čistotě p.a.:

- 2-(4-methyl-1-cyclohex-3-enyl) propan-2-ol ( $\alpha$ -terpineol), Merck, Německo
- 2,6-dimethylokta-2,7-dien-6-ol (linalool), 97%, Alfa–Aesar, Německo
- 2-methylbutan-1-ol, 99%, Sigma–Aldrich, Německo
- 2-methylpropan-1-ol čistý, Lachema, Česká republika
- 2-methylpropanová kyselina pro syntézu 99%, Merck, Německo
- 3-hydroxybutan-2-on 98%, Merck, Německo
- 3-methylbutan-1-ol 98%, Merck, Německo
- 3-methylbutanal 98%, Sigma–Aldrich, Německo
- 3-methylbutanová kyselina pro syntézu 99%, Merck, Německo
- 4-methylpentan-2-on, Loba Chemie Indo Australanal Co., Indie
- Butan-1-ol čistý, Lachema, Česká republika
- Butan-2-ol, Reonal, Maďarsko
- Butan-2-on 99%, Lachema, Česká republika
- Butanová kyselina 99,5%, Sigma–Aldrich, Německo
- Butylethanoát 98%, Lachema, Česká republika
- Damascenon Sigma–Aldrich Německo
- Dekan-1-ol pro syntézu 99%, Merck, Německo
- Dekan-2-on pro syntézu 95%, Merck, Německo
- E-2-oktanal 94 %, Sigma–Aldrich Německo
- E-hex-3-en-1-ol 97%, Sigma–Aldrich, Německo
- Ethanal pro syntézu 99%, Merck, Německo
- Ethanol 96%, Lach–Ner, Česká republika
- Ethanová kyselina 99%, Lach–Ner, Česká republika
- Ethylbutanoát pro syntézu, 98%, Merck, Německo
- Ethyldekanoát pro syntézu 99%, Merck, Německo
- Ethylethanoát p.a. 99,5%, Lachema, Česká republika
- Ethylheptanoát 98%, Merck, Německo
- Ethylhexanoát 98%, Merck, Německo
- Ethylpentanoát 98%, Merck, Německo
- Ethyloktanoát 98%, Merck, Německo
- Fenylethanal pro syntézu 90%, Sigma–Aldrich, Německo

- Fenylethanol pro syntézu 96%, Merck, Německo
- Fenylmethanal, Reachim, Rusko
- Fenylmethanol pro syntézu, Lachema, Česká republika
- Heptan-2-ol pro syntézu 99%, Merck, Německo
- Heptanal 97%, Merck, Německo
- Hexan-1-ol pro syntézu, Merck, Německo
- Hexanal pro syntézu 98%, Merck, Německo
- Hexanová kyselina pro syntézu, Merck, Německo
- Methanol 99,5%, Lachema, Česká republika
- Methylethanoát 99%, Merck, Německo
- Nonan-2-ol 98%, Merck, Německo
- Nonan-2-on pro syntézu, 98%, Merck, Německo
- Nonanal pro syntézu, Merck, Německo
- Okt-1-en-3-ol 98%, Sigma-Aldrich, Německo
- Oktan-2-ol 98%, Fluka Chemie, Švýcarsko
- Oktanal pro syntézu 98%, Merck, Německo
- Oktanová kyselina p.a., Reachim, Rusko
- Pentan-2-ol pro syntézu, Merck, Německo
- Pentan-2-on pro syntézu, Merck, Německo
- Pentanal pro syntézu 98%, Merck, Německo
- Propan-2-on 99%, Lachema, Česká republika
- Propanal pro syntézu 98%, Merck, Německo
- Propanová kyselina pro analýzu 99%, Merck, Německo
- Propylethanoát čistý, Bruxelles, Belgie
- Tetrahydro-4-methyl-2-(2-methylpropenyl)-2H-pyran, Sigma-Aldrich, Německo
- Undekan-2-on pro syntézu, Merck, Německo
- Z-hex-3-en-1-ol 97%, Sigma-Aldrich, Německo

### 3.3 Laboratorní vybavení

#### 3.3.1 Přístroje

- Plynový chromatograf Trace<sup>TM</sup> 1310 se split/splitless injektorem (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Hmotnostní detektor ISQ<sup>TM</sup> LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 2.0 (Gaithersburg, Maryland, USA)
- Analytické digitální váhy HELAGO, GR-202-EC, Itálie

#### 3.3.2 Plyny

- Helium, čistota 4.8, v tlakové lahvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika)

#### 3.3.3 Pracovní pomůcky

- SPME vlákna, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA
  - Carboxen/PDMS 85  $\mu\text{m}$
  - PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$

- DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$
- Mikropipety BiohitProline (100–1000  $\mu\text{m}$ ), špičky
- Vialky o objemu 10 a 20 ml se šroubovacím magnetickým uzávěrem
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

### 3.4 Podmínky SPME extrakce

Optimalizace podmínek metody byla podstatou této práce, níže uvedené podmínky SPME–GC–MS analýzy byly určeny jako optimální a budou používány dále pro analýzu vzorků.

- Doba inkubace (temperování) 10 min.
- Doba extrakce 20 min.
- Teplota extrakce a inkubace (teplota agitátoru) 40 °C
- Agitátor zapnutý 5 s, vypnutý 30 s
- Množství vzorku 3 g
- Hloubka ponoření vlákna do vialky 20 mm

### 3.5 Podmínky GC–MS analýzy

- Kapilární kolona TG–WaxMS (30 m x 0,25 mm x 0,5  $\mu\text{m}$ )
- Teplota injektoru (desorpce) 240 °C
- Doba desorpce 40 min.
- Dávkování splitless, ventil uzavřen 10 min.
- Hloubka ponoření vlákna do injektoru 40 mm
- Nosný plyn helium, průtok 1 ml·min<sup>-1</sup>
- Teplotní program: 40 °C s výdrží 2 min., vzestupný gradient 3 °C/min. do 130 °C s výdrží 0 min., vzestupný gradient 5 °C/min. do 200 °C s výdrží 0 min., celková doba analýzy 46 min.
- Hmotnostní detektor v modu EI, energie ionizačních elektronů 70 eV, teplota iontového zdroje 200 °C, skenovací rozsah m/z 30–370 amu, rychlost skenování 0,2 s

### 3.6 Statistické zpracování výsledků

Data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu MS Excel 2010. Výsledky optimalizace parametrů jsou vyjadřovány jako plocha píků vybraných sloučenin na chromatogramu. V rámci statistického vyhodnocení bylo použito následujících statistických parametrů: aritmetický průměr, směrodatná odchylka (SD) a relativní směrodatná odchylka (RSD).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Podstatu chuti a vůně sýrů, obecně i jakékoli potraviny, tvoří těkavé aromatické látky, které se uvolňují během jejich konzumace. Podle chemického složení sem patří zástupci prakticky všech chemických tříd: uhlovodíky, aldehydy, ketony, alkoholy, fenoly, ethery, mastné kyseliny, estery, laktony, dusíkaté a siřné sloučeniny [17, 18]. Pro studium aromatických látek v tak komplexní matici, jako je sýr, je důležité mít účinnou metodu, která umožní jejich identifikaci a kvantifikaci. Cílem této práce bylo nalézt optimální podmínky a ověřit vybrané validační parametry metody vhodné pro stanovení těkavých aromatických látek založené na technice GC–MS; v současnosti běžná analytická metoda, která kombinuje vysokou separační schopnost kapilární plynové chromatografie s vysoce specifickou MS detekcí [12]. Metoda byla vypracovaná tak, aby byla použitelná pro analýzu různých typů přírodních a tavených sýrů, lze ji však aplikovat i na jiné druhy potravinových matic.

Studiu těkavých aromatických látek různých druhů sýrů je dnes věnována velká pozornost a byla vyvinuta řada analytických metod vhodných pro jejich stanovení. Pro přípravu extraktu se používá destilace s vodní parou, extrakce různými rozpouštědly, simultánní destilace-extrakce, superkritická fluidní extrakce, headspace metody, extrakce tuhou fází příp. mikroextrakce tuhou fází. Analytickou koncovku prakticky vždy tvoří GC nebo GC–MS, které využívají jejich těkavosti [17, 19].

### 4.1 Optimalizace experimentálních podmínek

Díky evropskému projektu "Modernizace areálu VUT v Brně" získalo naše pracoviště



Obrázek 7: Autosampler TriPlus RSH pro přímý nástřik kapalin, headspace a SPME nástřik

nový moderní přístroj GC–MS, vybavený nejmodernějším typem autosampleru (viz Obrázek 7), který umožňuje plně automatizované provedení celé analýzy prakticky bez zásahu lidské ruky. Vzhledem k tomu, že obdobná metoda pro stanovení těkavých aromatických látek je už na našem ústavu zavedena a poměrně dlouhou dobu používána, ale na plynovém chromatogramu s FID detekcí [19, 20], jako výchozí základ byly zvoleny zde používané podmínky, které byly následně optimalizovány pro potřeby GC–MS, tedy jiný detektor, jiná separační kolona, jiný nosný plyn.

Parametry byly testovány na modelových vzorcích přírodních a tavených sýrů, příp. na směsi vybraných standardů. Vzhledem k počtu sledovaných parametrů byl sledován vždy vliv jedné proměnné, zatímco ostatní parametry zůstaly konstantní. Podmínky SPME extrakce byly optimalizovány tak, aby bylo dosaženo maximálního extrakčního výtěžku cílených analytů, přičemž extrakční výtěžek byl stanoven jako plocha píků vybraných analytů na chromatogramu, v některých případech byl brán v úvahu i počet získaných píků. Podmínky GC–MS analýzy byly optimalizovány za účelem co nejlepšího rozlišení, zisku ostrých a symetrických píků a možnosti následné identifikace a kvantifikace. Pro přesnou analýzu je potom nezbytné dodržení konstantních podmínek měření i všech dále uvedených parametrů [8].

#### **4.1.1 Optimalizace SPME extrakce**

Přímé stanovení aromatických látek je možné jen zřídka, protože se v sýrech nacházejí většinou ve velmi nízkých koncentracích ( $\mu\text{m–ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Před analýzou je třeba je extrahovat z matrice sýra a zakoncentrovat [20].

Pro extrakci aromatických látek z matrice vzorku byla využita metoda SPME. Její hlavní výhody jsou jednoduchost, rychlost a především velmi šetrné extrakční podmínky, při nichž nedochází k tepelné, chemické ani mechanické modifikaci vzorku. Principem SPME je expozice malého množství extrakční fáze nadbytkem vzorku. Na rozdíl od klasických extrakčních metod není analyt extrahován ze vzorku úplně, ale pouze do dosažení rovnováhy [8].

##### **4.1.1.1 Výběr typu vlákna**

Selektivitu a maximální výtěžek extrakčního procesu lze ovlivnit typem stacionární fáze pokrývající SPME vlákno. Stacionární fáze lze hodnotit podle mnoha kritérií, asi nejvýznamnější je dělení na:

- absorbenty – homogenní čisté polymery
- adsorbenty – porézní částice suspendované v polymeru

Při absorpci je analyt zachycen přímo ve vrstvě pokrývající křemenné vlákno, v případě adsorpce je analyt zachycen na povrchu porézních částic, které jsou suspendované ve vrstvě na povrchu vlákna [8, 21].

Dalším možným dělením je na polární a nepolární. Nepolární fáze jsou efektivnější pro extrakci nepolárních látek, polární fáze naopak pro extrakci polárních analytů [8, 21]. V Tabulce 1 je pro zajímavost uveden přehled základních komerčně dostupných SPME vláken, použité sorpční materiály, jejich tloušťka a doporučené použití.

Volba vhodného vlákna závisí především na vlastnostech analytů: molekulové hmotnosti, tvaru molekuly, její polaritě a přítomnosti funkčních skupin [8]. Důležitá je také tloušťka vrstvy stacionární fáze: silnější vrstva je schopna sorbovat větší množství analytu, ale extrakce i desorpce trvá dlouho. Silnější vrstva se tedy hodí pro více těkavé látky, protože analyt je na tuto vrstvu sorbován rychleji, ve větším množství a dochází k menším ztrátám. Analyty s vyšším bodem varu se sorbují dlouho a při nedostatečném ošetření vlákna mezi jednotlivými extrakcemi mohou být přenášeny až do další extrakce (tzv. „carry over efekt“).

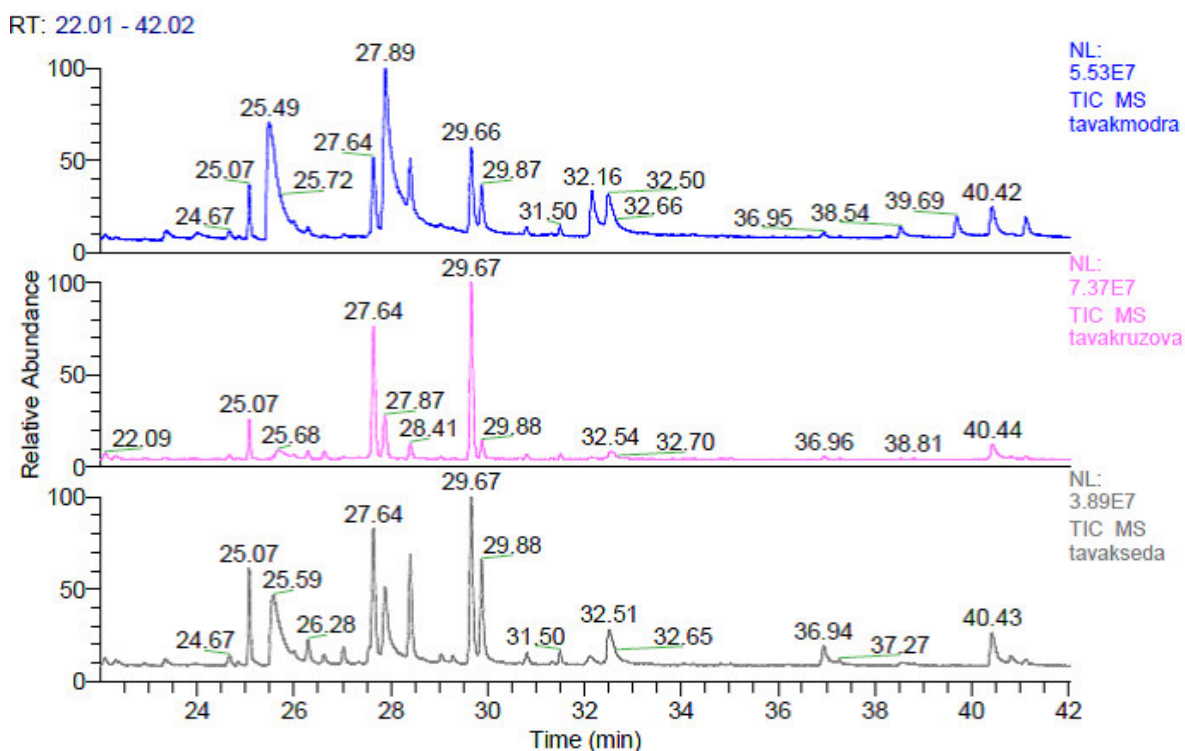
Tabulka 1: Přehled komerčně dostupných SPME vláken [22]

Stacionární fáze/tloušťka vrstvy	Zkratka názvu stacionární fáze	Určeno pro chromatografii	Doporučeno pro analýzu
Polydimethylsiloxan	PDMS	GC/HPLC	
100 μm			Těkavé látky
30 μm			Nepolární středně těkavé látky
7 μm			Slabě polární až nepolární střednětěkavé látky
Polydimethylsiloxan/divinylbenzen	PDMS/DVB	GC	
65 μm			Polární těkavé látky
60 μm		HPLC	Obecné užití (pouze pro HPLC)
Polyakrylát	PA	GC/HPLC	
85 μm			
Carboxen/polydimethylsiloxan	CAR/PDMS	GC	
75 μm			
Carbowax/divinylbenzen	CW/DVB	GC	
65 μm			
Carbowax/pryskyřice	CW/TPR	HPLC	
50 μm			
Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan	DVB/CAR/PDMS	GC	
50 μm Carboxen /30 μm Polydimethylsiloxan			

Oproti tomu sice tenká vrstva nemá tak dobré extrakční vlastnosti, ale extrakce i desorpce probíhá rychleji. Proto je třeba při výběru vhodné tloušťky vrstvy přihlídnout nejen k množství extraktu získaného při extrakci, ale také k časové náročnosti celého postupu [8, 21].

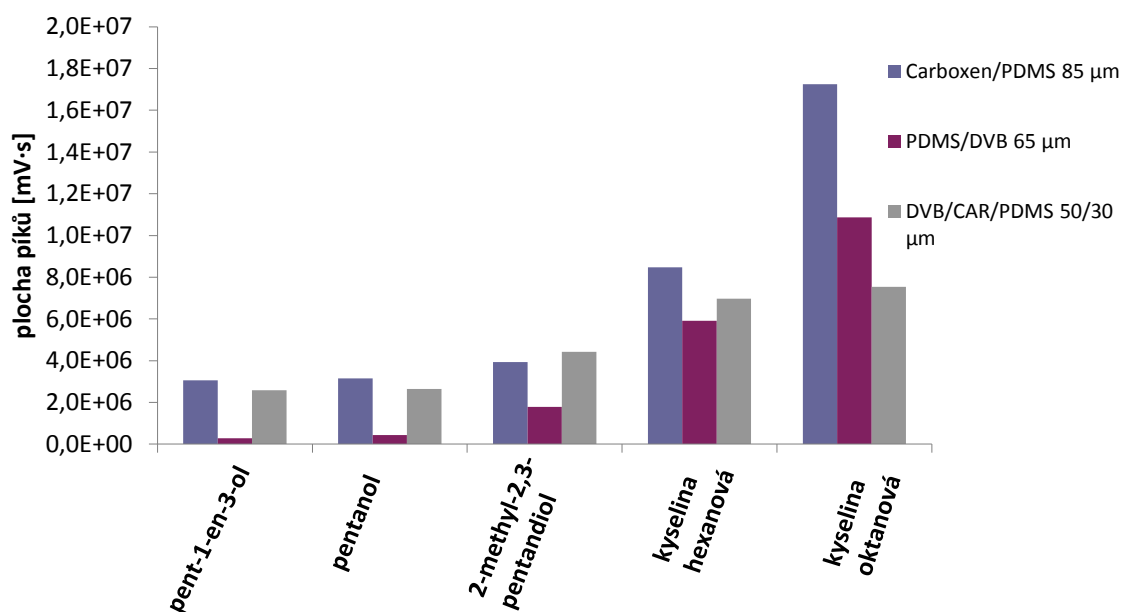
Jak již bylo zmíněno, aromatické látky patří do různých chemických skupin, které se liší svými fyzikálně–chemickými vlastnostmi. Vzhledem k uvedeným diferencím mezi analyty byly pro tuto práci vyzkoušeny tři typy vláken doporučené výrobcem pro extrakci polárních těkavých sloučenin: Carboxen/PDMS 85  $\mu\text{m}$ ; PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$ ; DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$ . Tyto tři typy vláken jsou zároveň v dostupných publikacích nejčastěji používané pro extrakci aromatických sloučenin z různých typů potravin [23]. Porovnání jejich extrakční účinnosti je znázorněno na Grafech 1a a 1b. Z grafů je patrné, že nejnižší extrakční výtěžky poskytuje vlákno PDMS/DVB. Toto vlákno má nejtenčí vrstvu stacionární fáze, navíc je podle literatury vhodné pro extrakci polárních látek, ale s vyšší molekulovou hmotností [22]. Podstatně vyšší výtěžky byly získány na vláknech Carboxen/PDMS a DVB/CAR/PDMS. Vlákno Carboxen/PDMS je vhodné pro extrakci molekul s uhlíkovým řetězcem  $\text{C}_{2-12}$  (molekulová hmotnost asi do 200), výrobcem doporučováno obecně pro nízkomolekulární látky. Vlákno DVB/CAR/PDMS je určeno pro stopovou analýzu látek s uhlíkovým řetězcem  $\text{C}_{3-20}$  a molekulovou hmotností cca 40–275. Výrobcem je přímo doporučeno pro extrakci aromatických látek. Tato dvě vlákna jsou používána ve většině publikací [23].

Na Obrázku 8 je pro zajímavost uvedeno porovnání získaných chromatogramů modelového vzorku taveného sýra. Vlákno PDMS/DVB poskytuje nejlepší tvar piků, ale je jich celkově méně, ostatní dvě vlákna poskytují obdobné chromatogramy.

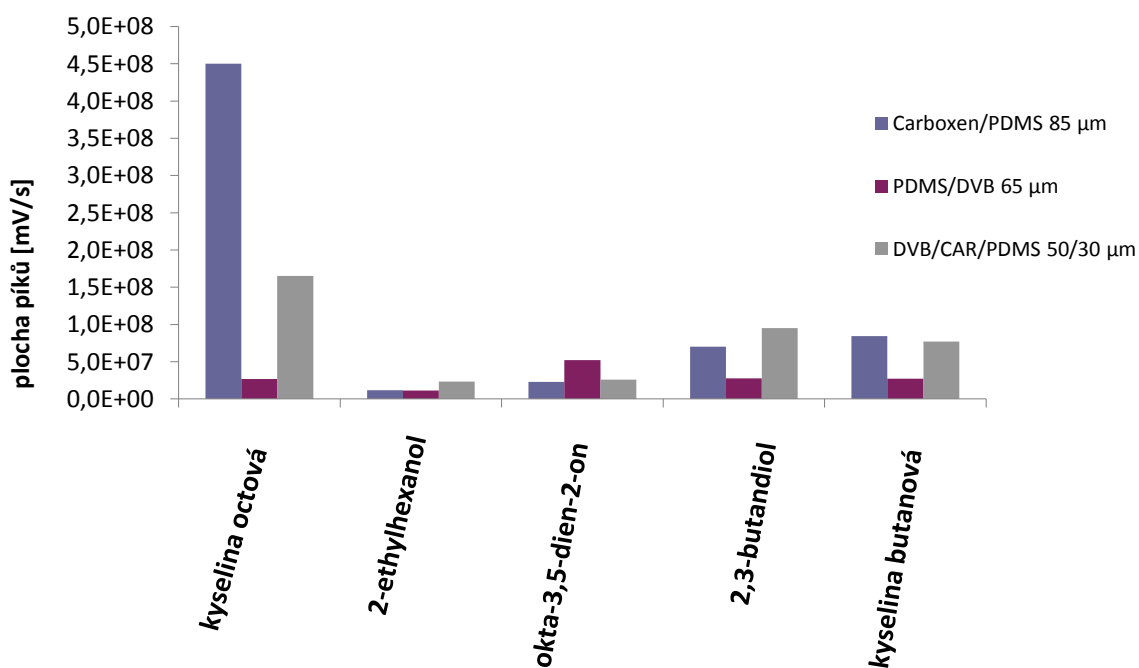


Obrázek 8: Porovnání vybraných typů SPME vláken – Carboxen/PDMS 85  $\mu\text{m}$  (modré); PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$  (růžové); DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$  (šedé)

Po posouzení všech získaných výsledků bylo pro další analýzy zvoleno vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$ , které je přímo určeno pro extrakci aromatických látek, poskytuje vysoké výtěžky a kvalitní píky na chromatogramu.



Graf 1a: Porovnání vybraných typů SPME vláken – Carboxen/PDMS 85  $\mu\text{m}$  (modré); PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$  (růžové); DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$  (šedé)



Graf 1b: Porovnání vybraných typů SPME vláken – Carboxen/PDMS 85  $\mu\text{m}$  (modré); PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$  (růžové); DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$  (šedé)



#### 4.1.1.2 Výběr extrakčního způsobu

Obecně existují dva způsoby extrakce:

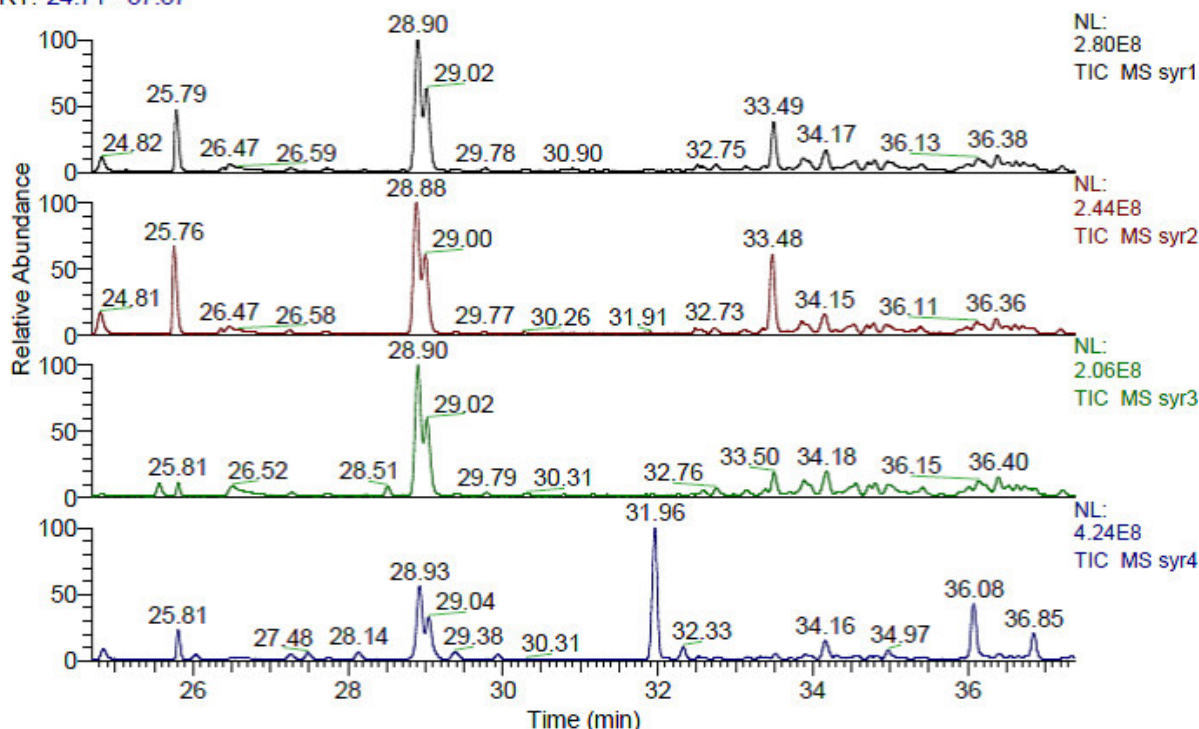
- **direct immersion (DI–SPME)** – vlákno je ponořené přímo do vzorku
- **headspace (HS–SPME)** – vlákno je umístěno do plynné fáze nad vzorkem

Hlavní kritéria pro způsob výběru extrakce jsou matrice vzorku, těkavost analytů a afinita analytů k matrici [8, 21]. Pro izolaci těkavých látek z tuhé matrice sýra byla zvolena metoda HS-SPME, kdy je vlákno exponováno plynné fázi nad vzorkem v uzavřeném prostoru. Tato technika je pro těkavé látky jednoznačně vhodnější, protože je citlivější, rychlejší, vykazuje vyšší selektivitu, zabraňuje kontaminaci, snižuje vliv matrice a prodlužuje životnost vlákna (cca 100–150 extrakcí). Technika DI–SPME je vhodná spíše pro středně a málo těkavé analyty a čiré kapalně vzorky [8, 19, 20, 21].

#### 4.1.1.3 Doba inkubace (dosažení rovnováhy)

Metoda HS–SPME je založena na rovnováze analytů mezi třemi fázemi: sorpční vrstva, headspace a vzorek. Nejprve je vialka se vzorkem ponechána při vhodné teplotě pro ustanovení rovnováhy mezi pevnou a plynnou fází, potom je do prostoru nad vzorkem zavedeno SPME vlákno a analyty se sorbují až do dosažení rovnováhy mezi headspace a povrchem vlákna [8]. Jakmile je dosaženo rovnováhy, je koncentrace analytů pokládána za konstantní ve všech třech fázích [19]. Díky modernímu přístroji lze oba tyto kroky provádět automaticky v tzv. „agitátoru“, který umožňuje zahřívání a zároveň i míchání vzorku, je však třeba optimalizovat potřebné teploty a doby trvání.

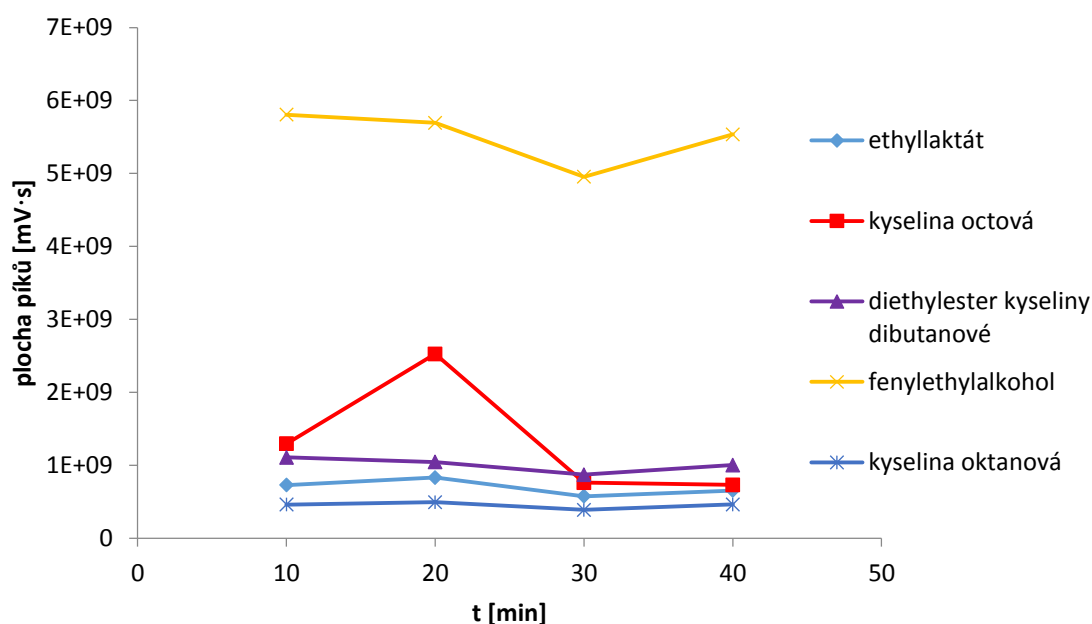
RT: 24.71 - 37.37



Obrázek 9: Změny chromatogramu v závislosti na době inkubace – 10 min. (černá); 20 min. (červená); 30 min. (zelená); 40 min. (modrá)

V rámci této práce byla testována inkubační doba 10, 20, 30 a 40 min. Podle teorie SPME je právě doba inkubace krokem limitujícím, neboť přechod analytů ze vzorku do headspace může být u větších molekul velmi pomalý (pro sloučeniny s vyšší molekulovou hmotností i delší než 2 hod) [8, 20, 21]; těkavější látky se uvolňují mnohem rychleji [20].

Na Obrázku 9 je pro zajímavost uvedeno porovnání získaných chromatogramů modelového vzorku sýra. Jsou zde patrné rozdíly, z čehož lze soudit, že ne u všech analytů bylo dosaženo rovnováhy. Nicméně jak je patrné z Grafu 2, k nasycení headspace prostoru parami těkavých látek zřejmě dochází poměrně rychle a delší doba inkubace nemá na zvýšení extrakčního výtěžku tak významný vliv. Vzhledem k udržení přiměřeně dlouhé analýzy byla jako optimální zvolena doba inkubace 10 min.

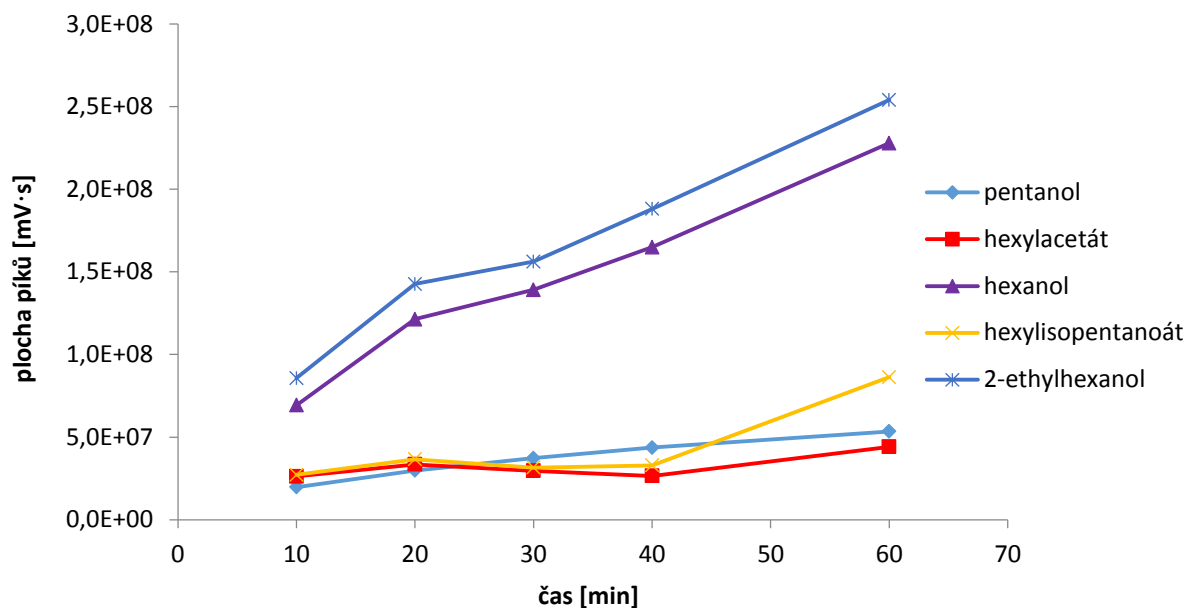


Graf 2: Závislost plochy píků vybraných sloučenin na době inkubace

#### 4.1.1.4 Doba extrakce

Extrakční (adsorpční doba), tj. doba potřebná k dosažení rovnováhy mezi SPME vláknem a headspace ve vialce, závisí na obalu vlákna a na vlastnostech analytů. I když SPME má maximální účinnost v rovnovážném stavu, plné dosažení rovnováhy není nutné, protože existuje lineární vztah mezi množstvím nasorbovaného analytu a jeho počáteční koncentrací ve vzorku. Kritické období extrakce nastává v okamžiku, kdy je změna koncentrace analytu na vláknech za časovou jednotku velká, v této fázi není vhodné extrakci provádět [8, 21].

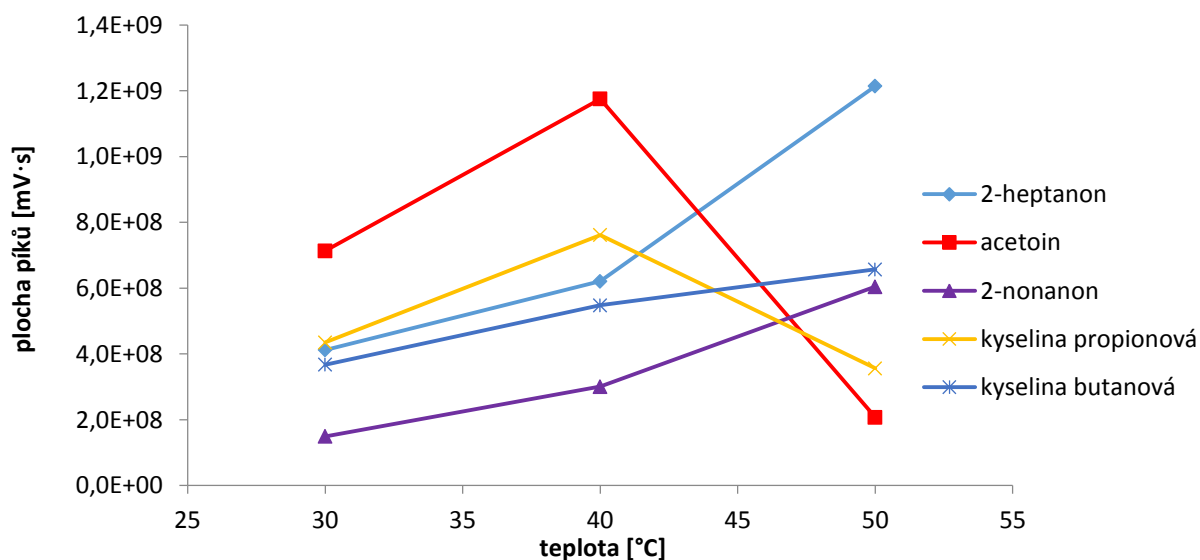
V rámci této práce byla testována extrakční doba v rozmezí 10–60 min. Z Grafu 3 je zřejmé, že extrakční výtěžek s delší dobou extrakce stoupá, u některých analytů rychleji, u některých pomaleji. Analyty s nižší molekulovou hmotností dosahují rovnováhy po 15–20 min., látky s vyšší molekulovou hmotností potřebují i více než 60 min. Na druhou stranu však v průběhu extrakce může dojít k tzv. kompetitivní sorpci, kdy aktivnější analyty obsadí póry vlákna a vytlačí ostatní, proto není vhodné extrakci příliš protahovat [8, 20, 21]. Z tohoto důvodu a v zájmu zachování přiměřeně dlouhé doby analýzy byla nakonec jako optimální zvolena doba extrakce 20 min.



Graf 3: Závislost plochy píkú vybraných sloučenin na době extrakce

#### 4.1.1.5 Teplota extrakce a inkubace

Použití vyšší teploty při HS-SPME usnadňuje uvolňování analytů ze vzorku, dojde ke zvýšení difuze analytu směrem k vláknu, a tudíž zkracuje extrakční i inkubační dobu. Současně se ale zachycený analyt z vlákna snáze uvolňuje a snižuje se tak extrakční účinnost vlákn. Mezi těmito dvěma procesy není přímá úměra a je tedy nezbytné provádět všechna měření při stejné, nejlépe optimální teplotě [8, 20, 21].



Graf 4: Závislost plochy píkú vybraných sloučenin na teplotě extrakce

Byly testovány různé extrakční teploty v rozsahu od 30 °C, což je nejnižší teplota, kterou umožňuje nastavení agitátoru, až do 50 °C. Použití vyšší teploty není příliš vhodné, protože může docházet k předčasnému uvolnění analytů z vlákna, příp. ztrátě termolabilních analytů,

navíc hrozí degradace vzorku [8, 20, 21]. Už při 50 °C byly pozorovány zřetelné nežádoucí změny konzistence vzorku.

Jak je vidět z Grafu 4 vliv zvýšené teploty na extrakční výtěžky není jednoznačný, většina analytů vykazovala mírné zvyšování výtěžků. Pro další analýzy byla jako optimální zvolena teplota 40 °C. Poskytuje dostatečné výtěžky, v obdobných publikacích je často používána [23] a navíc je (vzhledem k zamýšlenému porovnávání budoucích výsledků se senzorickou analýzou vzorků) blízká teplotě v ústech při konzumaci.

#### **4.1.1.6 Velikost vialky vs. množství vzorku**

Hmotnost vzorku musí být dostatečná, aby byla využita adsorpční kapacita vlákna. Na druhé straně při dosažení maximální kapacity se už nasorbované množství analytů s větším množstvím vzorku nezvyšuje. U HS–SPME navíc není důležitá jen hmotnost vzorku, ale také objem headspace. Má být spíše malý, doporučuje se asi 30–50 % vialky. Vlákno pak extrahuje více vzorku, rychleji a s vyšší účinností [8, 20, 21].

K uvedenému typu autosampleru jsme měli k dispozici dva typy vialek, menší o objemu 10 ml a větší o objemu 20 ml (viz Obrázek 10). Větší vialka nabízela možnost většího množství vzorku a tudíž větších výtěžků, na druhou stranu objem headspace je poměrně velký. V malé vialce naopak stačí malá navážka vzorku, objem headspace je relativně malý, což slibuje vyšší extrakční účinnost.

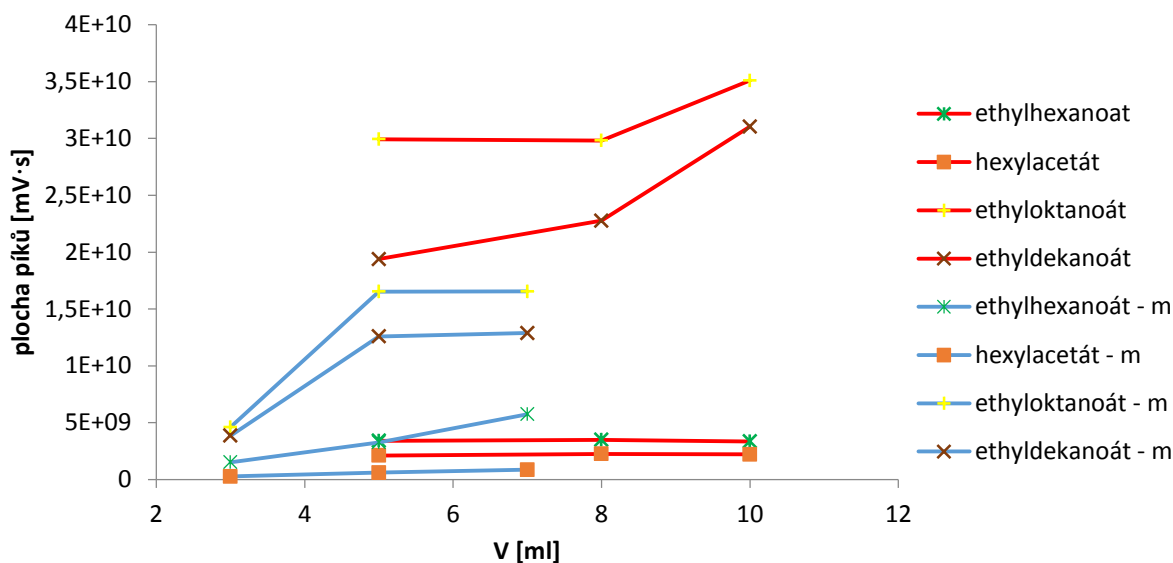
Určitou nevýhodou se ukázala být konstrukce přístroje, neboť agitátor je kovový, neprůhledný a není možné vizuálně kontrolovat kontakt vlákna se vzorkem. Proto byl tento parametr testován na kapalně smíšených standardů, aby nedošlo v případě většího množství vzorku k poškození vlákna. Byly testovány různé objemy vzorku v rozmezí 3–7 ml v menší vialce a 5–10 ml ve větší vialce. Jak je patrné z Grafu 5 extrakční výtěžky byly obdobné v obou typech vialek a závisí spíše na typu analytu, s vyšším objemem docházelo k mírnému zvyšování výtěžku.



*Obrázek 10: Porovnání velké a malé vialky*

Menší vialky jsou praktičtější z hlediska manipulace a pro analýzu je dostačující jen malé množství vzorku, proto byl předběžně pro další měření zvolen objem 5 ml v malé vialce. Po provedení kontrolních analýz se vzorkem sýra však bylo zjištěno, že rozdíl ve výtěžku při

navážce 3, 4 a 5 g vzorku je zanedbatelný a pro další analýzy byla jako optimální zvolena navážka syra 3 g (resp. 3 ml standardu). Tato navážka poskytuje dostatečné výtěžky, zabírá cca třetinu objemu vialky a není třeba se obávat poškození vlákna.

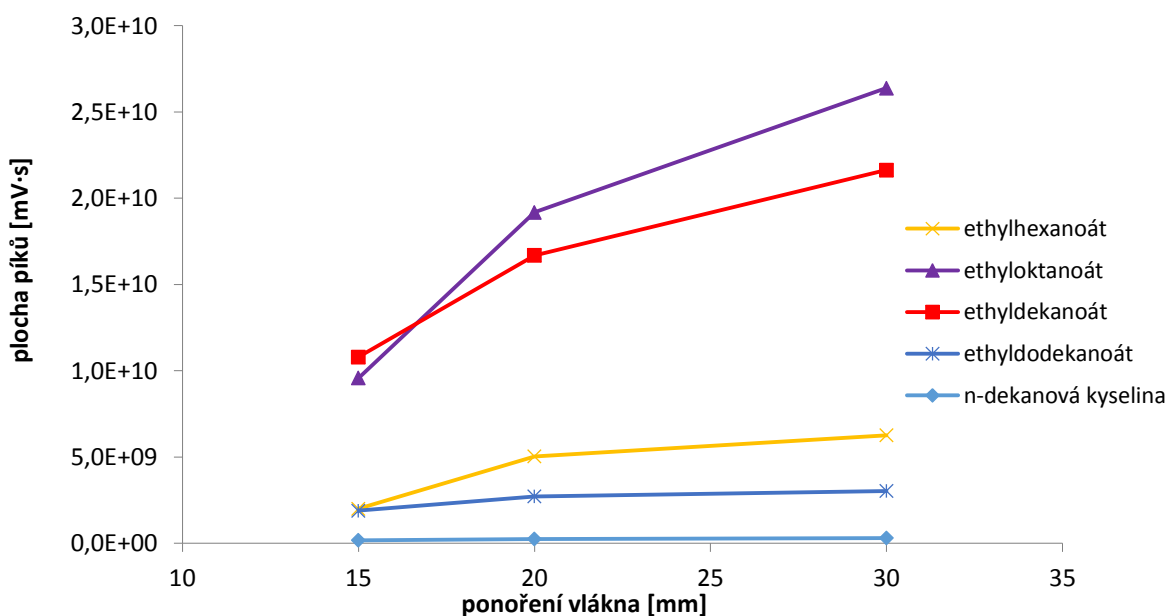


Graf 5: Závislost plochy píků vybraných sloučenin na množství vzorku ve velké a malé vialce – malá vialka (světle modrá); velká vialka (červená)

#### 4.1.1.7 Hloubka ponoření vlákna do vialky

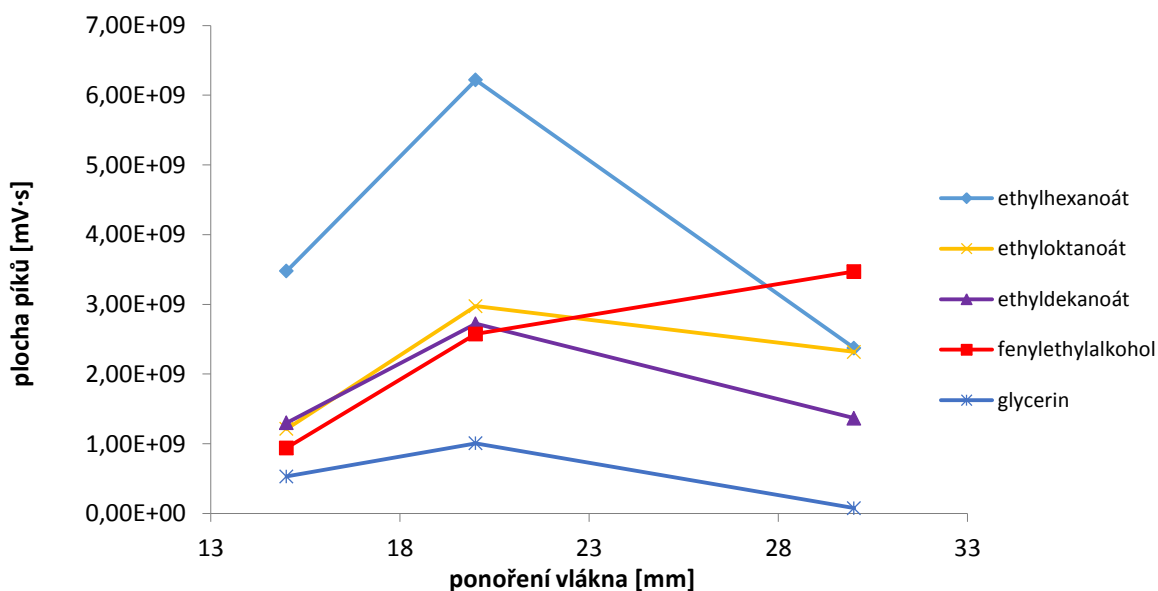
Také tento parametr byl testován na kapalně směsi vybraných standardů, aby nedošlo v případě větší hloubky ponoření k poškození vlákna o dno vialky, příp. o vzorek. Minimální hloubka ponoření, kterou nastavení přístroje umožňuje, je 10 mm, což je pravděpodobně ochrana proti poškození vlákna o uzávěr nebo septum vialky.

Byla testována hloubka ponoření vlákna 15, 20 a 30 mm ve velké i malé vialce.



Graf 6: Závislost plochy píků vybraných sloučenin na ponoření vlákna do velké vialky

Vzhledem k tomu že headspace prostor je rovnoměrně nasycen parami aromatických látek, neměl by být vliv hloubky vlákna velký. Jak je patrné z Grafů 6 a 7 hloubka ponoření mírně ovlivňuje extrakční výtěžky, v případě malé vialky (Graf 7) je nejvyšší výtěžek při hloubce 20 mm. Stejná hloubka ponoření vlákna během analýz zlepšuje reprodukovatelnost [20].



Graf 7: Závislost plochy píků vybraných sloučenin na ponoření vlákna do malé vialky

#### 4.1.1.8 Míchání vzorku

Pro urychlení transportu analytů ze vzorku do obalu vlákna lze použít míchání. Zkracuje dobu extrakce, je však vhodné spíše u DI-SPME a kapalných vzorků, na těkavé analyty nemá míchání vliv [8, 21]. Pohyb agitátoru však nelze zcela vypnout, intenzita míchání tedy byla alespoň nastavena co nejnižší (míchání 5 s, klid 30 s), také proto, že při intenzivním míchání je velmi namáháno SPME vlákno a hrozí jeho poškození až ulomení.

#### 4.1.1.9 Vliv vysolování a pH

Zvýšení extrakční účinnosti lze dosáhnout také přidávkem soli nebo úpravou pH, podstatou je změna rozpustnosti analytů ve vzorku [8, 21]. Hrozí však riziko vnesení nečistot [20].

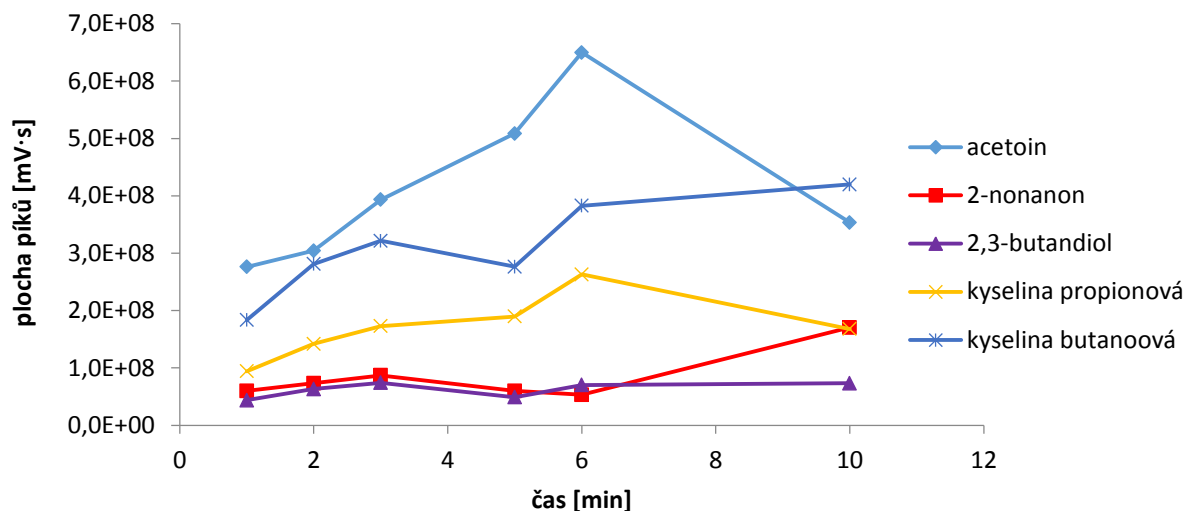
Jak již bylo zmíněno, výsledky analýz sýrů budou v konečné fázi porovnávány se sensorickým hodnocením, cílem je tedy ponechat matrici sýrů v přirozeném stavu a dosáhnout tak podmínek co nejbližších lidské konzumaci. Efekt těchto parametrů nebyl tedy zkoumán.

#### 4.1.2 Optimalizace desorpce

Při desorpci je SPME vlákno zavedeno do injektoru plynového chromatografu, kde jsou analyty tepelně desorbovány a převedeny na kolonu. I tyto parametry je třeba optimalizovat.

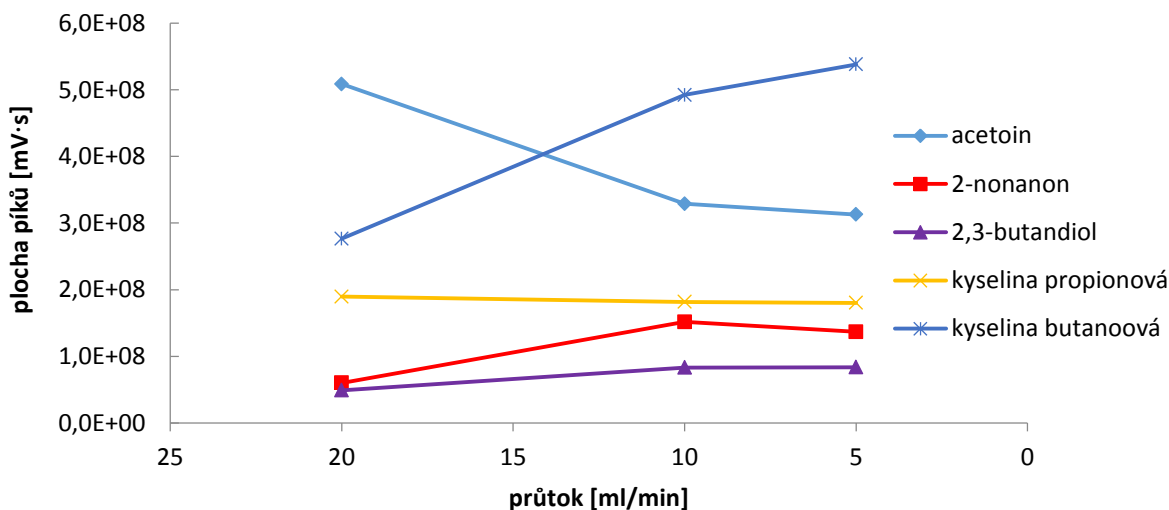
#### 4.1.2.1 Způsob dávkování vzorku (split/splitless)

Na GC je k dispozici klasický split/splitless injektor. Při použití SPME je nutné dávkování tzv. splitless (bez děliče toku) pro přímé zavedení analytů na kolonu [21]. Dělič je v tomto



Graf 8: Závislost plochy píků vybraných sloučenin na době uzavření děliče

případě uzavřený, otevře se až po určité době a veškeré zbytky vzorku, které zůstaly v injektoru, odchází do prostředí. Doba uzavření děliče ovlivňuje velikost a tvar píků a je



Graf 9: Závislost plochy píků vybraných sloučenin na průtoku nosného plynu děličem

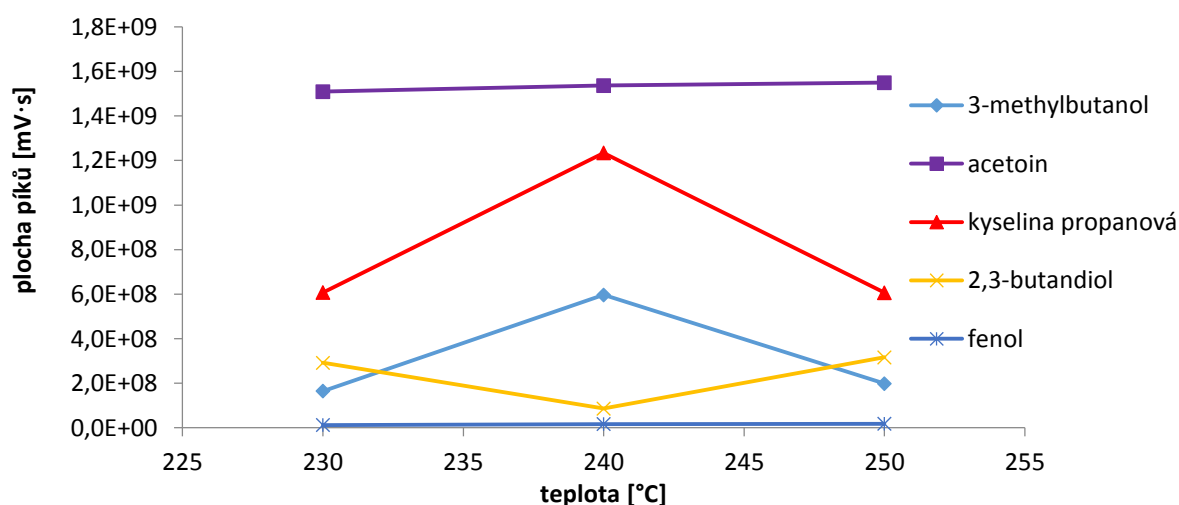
vhodné ji optimalizovat. Jak je vidět na Grafu 8 delší doba uzavření děliče zvyšuje plochu získaných píků, zhruba po 10 min. dochází k desorpci většiny sloučenin, nicméně jak je uvedeno dále (viz kap. 4.1.2.3) některé analyty jsou na vlákne navázány pevněji. Doba uzavření děliče byla nastavena na 10 min. pro max. nanesení analytů na kolonu, průtok nosného plynu děličem (Graf 9) neměl významný vliv a v rámci šetření byl nastaven na nejnižší hodnotu 5 ml·min<sup>-1</sup>.

Pro zlepšení tvaru píků je vhodné použít „liner“ (skleněná vložka v injektoru) s malým vnitřním průměrem (0,75–1 mm) [8]. Vzhledem k tomu, že jsme měli od výrobce k dispozici pouze liner 4 mm, testování probíhalo s tímto typem.

#### 4.1.2.2 Teplota desorpce

Účinná desorpce analytů je závislá na těkavosti analytů, tloušťce vrstvy vlákna, injekční teplotě a době desorpce. Teplota injektoru ovlivňuje rychlost desorpce, musí být minimálně o 50 °C vyšší než bod varu nejméně těkavé složky vzorku, aby nedošlo ke kondenzaci analytu. Tak se získají úzké a vysoké píky, které lze snadno interpretovat. Na druhou stranu příliš vysoká teplota nadměrně poškozuje septum v injektoru, počátek kolony a také samotné vlákno snese max. teplotu 300 °C, navíc může docházet k tepelnému rozkladu některých látek [8, 20, 21]. Vzhledem k velkému množství různých typů cílených analytů (alkoholy, ketony, aldehydy atd.), rozsah jejich bodů varu je poměrně široký a je třeba počítat s možností diskriminace výševroucích, nebo naopak nízkovroucích složek vzorku [20].

K zajištění optimálního vzhledu píků byla testována injekční teplota v rozmezí 230–250 °C. Výsledky jsou uvedeny v Grafu 10, vliv na plochu píků vybraných parametrů nebyl významný, rozdíl se projevil spíše ve vzhledu píků na chromatogramu. Jako optimální byla zvolena teplota 240 °C, která poskytla kvalitní, dobře rozdělené píky.



Graf 10: Závislost plochy píků vybraných sloučenin na teplotě desorpce

#### 4.1.2.3 Doba desorpce

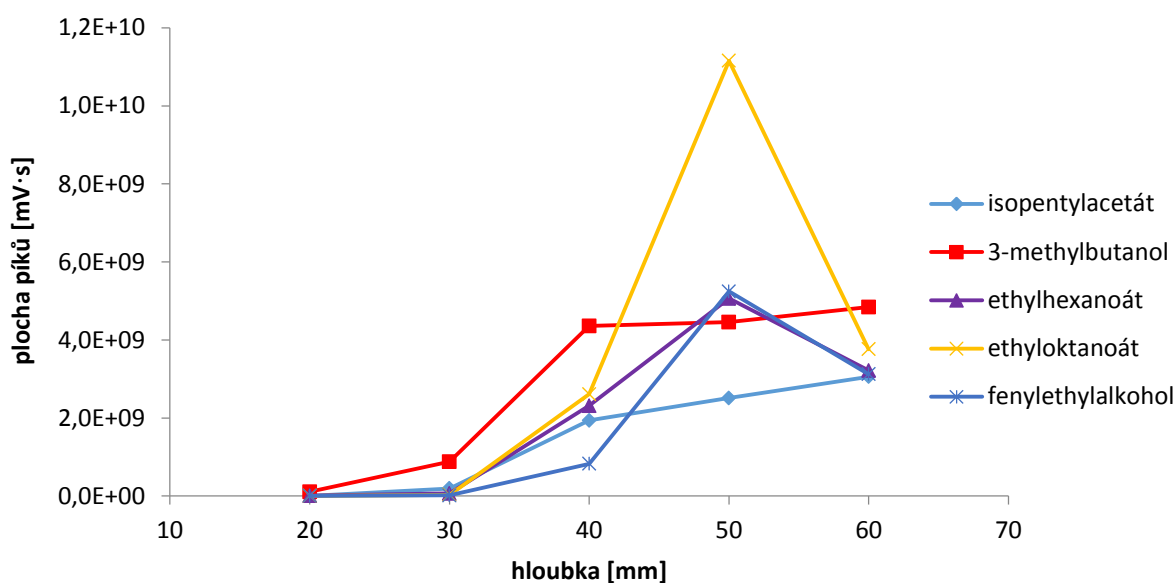
Méně těkavé analyty mohou být na SPME vlákno vázány tak pevně, že se velmi těžko desorbují a přenášejí se až do další extrakce (tzv. „carry over“ efekt) [8, 20, 21]. Doba desorpce tedy musí být dostatečně dlouhá, aby došlo k úplné desorpci všech analytů.

Byly testovány různé doby desorpce: 10, 20, 30 a 40 min. K ověření, zda je desorpce dostatečná a nedochází ke „carry over“ efektu, bylo vlákno vloženo do injektoru vždy podruhé bez předchozí extrakce. Teprve při desorpci 40 min nebyl na chromatogramu žádný měřitelný pík. Pro další analýzy byla zvolena doba desorpce 40 min., čímž bylo zároveň zaručeno pravidelné tepelné kondicionování vlákna.



#### 4.1.2.4 Hloubka ponoření vlákna do injektoru

Při desorpci by mělo být vlákno umístěno v nejteplejší části injektoru [8, 21]. V rámci této práce jsme testovali hloubku ponoření v rozsahu 20–60 mm. Jak je vidět z Grafu 11, hloubka ponoření vlákna má skutečně zřetelný vliv na výtěžek jednotlivých analytů. Pokud bylo vlákno ponořené pouze 20 mm, na chromatogramu byly velmi nekvalitní, špatně rozdělené píky, max. výtěžek je patrný mezi 40–50 mm, jako optimální byla nakonec zvolena hloubka 40 mm. Stejně jako při extrakci, konstantní hloubka ponoření vlákna do injektoru zlepšuje reprodukovatelnost měření [20].



Graf 11: Závislost plochy píků vybraných sloučenin na hloubce ponoření vlákna do injektoru

#### 4.1.3 Optimalizace chromatografických podmínek

Optimální nastavení chromatografických podmínek podstatně ovlivňuje účinnost separace daných látek [20].

##### 4.1.3.1 Průtok nosného plynu

Volba optimálního průtoku nosného plynu má zásadní vliv na rychlost analýzy, účinnost separace a rozšiřování zón separovaných látek, které by mělo být co nejmenší [12]. Z hlediska účinnosti je pro danou kolonu vždy určitý průtok nosného plynu – mobilní fáze, optimální a činí jednotky až desítky mililitrů za minutu. Optimální rychlost roste s klesajícím průměrem kapiláry a je přímo úměrná difúznímu koeficientu dané látky v nosném plynu [12].

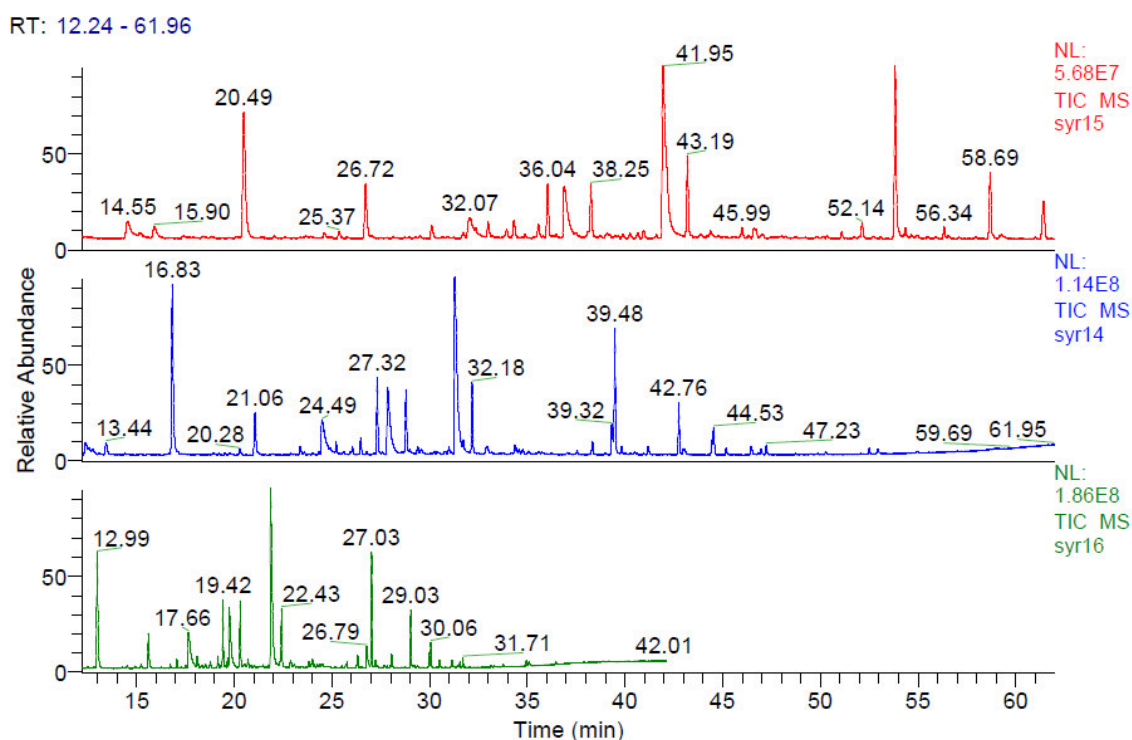
Pro naše účely byla použita kapilární kolona TG–WaxMS (30 x 0,25 mm x 0,5 μm) doporučená výrobcem pro stanovení těkavých aromatických látek a jako mobilní fáze bylo použito helium (He). Podle literatury je pro tento typ kolony doporučený optimální průtok nosného plynu 1 ml·min<sup>-1</sup>.

### 4.1.3.2 Teplotní program

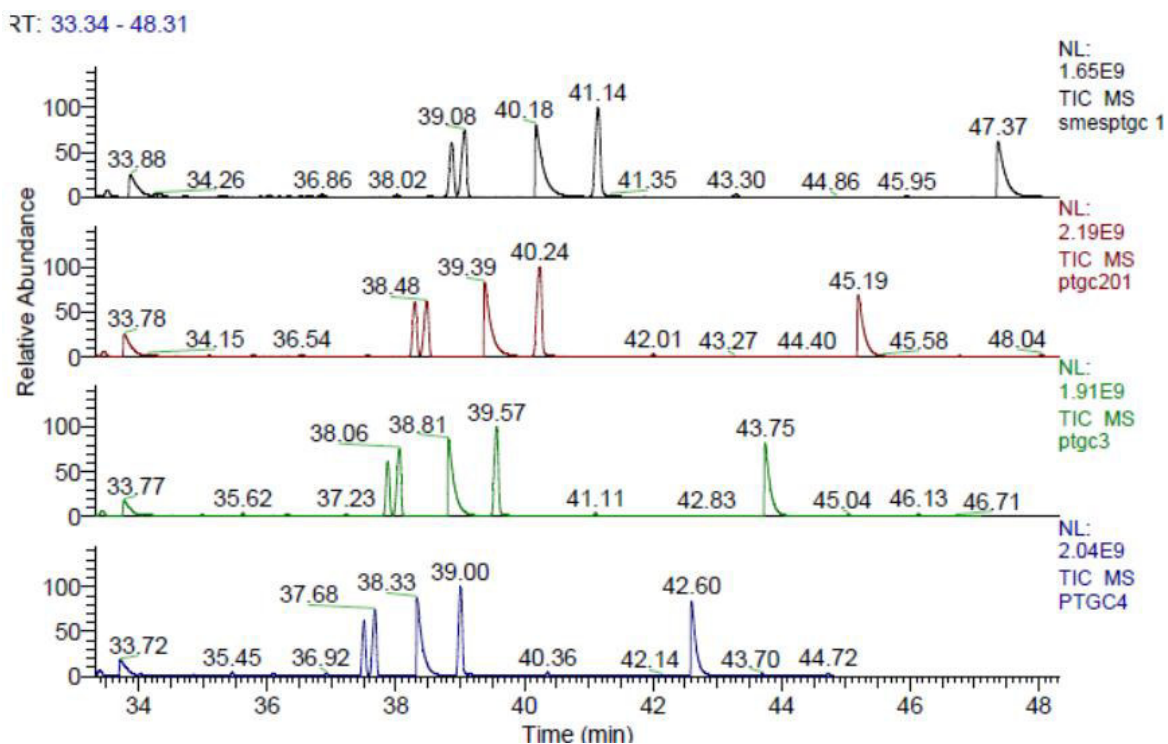
Pro dosažení kvalitního rozdělení všech separovaných látek je zásadní průběh teplotní křivky během GC analýzy (tzv. teplotní program), kdy se v průběhu analýzy zvyšuje teplota, takže i méně těkavé složky opouští kolonu rychleji [12]. Teplotní program byl převzat z již zavedené metody na našem ústavu: 40 °C, výdrž 1 min., vzestupný gradient 5 °C/min. do 200 °C s výdrží 5 min. [20]. Vzhledem k použití jiného nosného plynu (He) a kolony jiných rozměrů, v rámci této práce byly provedeny drobné změny s cílem dosáhnout co nejlepší separace a zároveň pokud možno zachovat co nejkratší celkovou dobu analýzy.

Počáteční teplota kolony by měla být co nejnižší, protože sledované aromatické látky mají nízké body varu [24]. Z tohoto důvodu byla zvolena počáteční teplota kolony 40 °C. Pro lepší separaci analytů s velmi krátkým retenčním časem (na začátku chromatogramu) byl vyzkoušen pomalejší začátek analýzy, tj. výdrž při počátečních 40 °C byla prodloužena na 2 min.

Ze stejného důvodu (lepší separace) byl testován i pomalejší ohřev, na Obrázku 11 je uvedeno srovnání získaných chromatogramů modelového vzorku sýra při ohřevu 2, 3 a 5 °C/min. Jak je vidět, při nejpomalejším ohřevu dochází k výraznému prodloužení celé analýzy, proto byl zvolen kompromis 3 °C/min, píky jsou dobře rozdělené a celková doba analýzy cca 56 min. je přijatelná.



Obrázek 11: Optimalizace začátku teplotního programu - ohřev 2 °C/min (červená), 3 °C/min (modrá), 5 °C/min (zelená)



Obrázek 12: Optimalizace konce teplotního programu - ohřev 3 °C/min (černá), 4 °C/min (červená), 5 °C/min (zelená) a 6 °C/min (modrá)

Z chromatogramů na Obrázku 11 je dobře patrné, že v posledních cca 10 minutách je už počet píků minimální. Z tohoto důvodu byl ke konci analýzy (zhruba od 30 minuty) aplikován naopak rychlejší ohřev pro urychlení málo těkavých analytů. Na Obrázku 12 je uvedeno srovnání získaných chromatogramů modelového vzorku sýra při ohřevu 3, 4, 5 a 6 °C/min. Při ohřevu 5 °C/min. bylo zachováno dostatečné rozlišení píků při rychlejší analýze, tento byl zvolen jako optimální, celková doba analýzy se tak zkrátila na 46 min.

#### 4.1.4 Parametry MS detektoru

Při spojení GC–MS je největším problémem způsob propojení obou zařízení vzhledem k jejich tlakové nekompatibilitě. V současné době se však v GC používají kapilární kolony, které mohou být díky malému použitému objemu nosného plynu přímo spojeny s MS [12]. Toto spojení se běžně nazývá „interface“, tj. teplotní (tlakový) přestup a optimální teplota zde by měla být zhruba stejná jako konec kolony [10, 14], tedy v našem případě 200°C. Pokud je teplota příliš nízká, méně těkavé látky zde mohou zůstat zachyceny a vůbec se nedostanou do iontového zdroje; pokud je teplota zde příliš vysoká, může dojít k poškození kolony, příp. tepelnému rozkladu analytu. Obecně by teplota měla být cca o 10 °C vyšší než je nejvyšší bod varu cílených analytů [10, 14]. V souladu s tím také teplota iontového zdroje byla nastavena na 200°C.

##### 4.1.4.1 Výsledné optimální podmínky SPME–GC–MS analýzy

Výsledné optimální parametry celé SPME–GC–MS analýzy jsou shrnuty v experimentální části práce v kapitolách 3.4 s 3.5.

## 4.2 Ověření vybraných validačních parametrů

Pro zjištění kvality a funkčnosti metody je nezbytné ji validovat. Validace je definována např. jako proces, při kterém se určuje vhodnost použití daného systému pro získání relevantních dat. Za základní validační parametry jsou považovány opakovatelnost, linearita, meze detekce a meze stanovitelnosti [15, 16]. Z časových důvodů byla ověřena pouze opakovatelnost metody, ostatní parametry budou ověřeny v rámci navazující diplomové práce.

### 4.2.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost je typ přesnosti vztahující se k měřením provedeným za opakovatelných podmínek; charakterizuje metodu a preciznost jejího provedení v laboratoři. Analýzy se provádějí všechny najednou, na téže zařízení s touž obsluhou [12].

Tabulka 2: Opakovatelnost plochy píků vybraných sloučenin

plocha píků (mV·s)				
číslo měření	ethanol	acetoin	kyselina octová	butyrolakton
1	433717745	4872511	13860470	6625461
2	460745816	3986586	16090104	8817065
3	429394977	3986586	16090104	8188525
4	392354676	4550237	14214654	7017009
5	380719441	2644473	18652329	8289594
<b>SD (mV·s)</b>	32565350	851692	1909024	924244
<b>RSD (%)</b>	7,76	21,25	12,10	11,87

Tabulka 3: Opakovatelnost retenčních časů vybraných sloučenin

retenční čas (min)				
číslo měření	ethanol	acetoin	kyselina octová	butyrolakton
1	4,35	12,96	17,78	22,00
2	4,39	12,98	17,77	22,00
3	4,36	12,97	17,76	21,99
4	4,39	12,98	17,78	22,00
5	4,40	12,98	17,77	21,99
<b>SD (min)</b>	0,02	0,01	0,01	0
<b>RSD (%)</b>	0,47	0,07	0,04	0

Opakovatelnost byla vypočtena ze série 5 měření modelového vzorku sýra, která byla realizována v průběhu jednoho dne. Analýzy byly provedeny za optimalizovaných podmínek metody SPME–GC–MS. Naměřené hodnoty retenčních časů a ploch píků pro vybrané sloučeniny, SD a RSD jsou uvedeny v Tabulce 2 a 3. Metoda je opakovatelná, pokud u všech výsledků měření, provedených za podmínek opakovatelnosti, nepřesáhla RSD hodnotu 10 % [25]. Z Tabulky 3 je vidět, že při měření retenčních časů se chyba měření pohybovala pod 0,5 %, což je výborné z hlediska budoucí identifikace analytů. V případě ploch píků (Tabulka 2) se však RSD pohybovala v rozmezí 7–21 % a pro získání dobrých kvantitativních výsledků bude potřeba ještě pracovat na zlepšení přesnosti metody. Bude jí věnována pozornost v rámci validace metody během dalších experimentů.

### 4.3 Identifikace těkavých (aromatických) látek ve vzorku taveného sýra

Na závěr byl optimalizovaný postup SPME–GC–MS aplikován pro identifikaci těkavých sloučenin ve vzorku modelového taveného sýra.

Identifikace aromatických látek byla provedena na základě srovnání hmotnostních spekter s knihovnou spekter a potvrzena srovnáním retenčních časů s dostupnými identickými standardy. Retenční časy dosud analyzovaných standardů za optimalizovaných podmínek jsou uvedeny v Tabulce 4, jejich hmotnostní spektra v Příloze 2–20.

Tabulka 4a: Retenční časy a body varů analyzovaných standardů

<b>látka</b>	<b>retenční čas [min]</b>	<b>bod varu [°C]</b>
acetaldehyd	2,34	20
propionaldehyd	3,02	46–50
aceton	3,22	57
methylacetát	3,41	57
ethylacetát	4,16	77
methanol	4,33	65
butan-2-on	4,40	79–80
3-methylbutanal	4,75	94
isopropanol	4,89	82
ethanol	5,07	78
propylacetát	6,05	102
pentanal	6,20	103
methyloisobutylketon	6,90	116
butan-2-ol	7,52	100
ethylbutanoát	7,79	119–121

Tabulka 4b: Retenční časy a body varů analyzovaných standardů (pokračování)

butylacetát	8,93	124–127
hexanal	9,27	128
pentan-2-ol	10,80	114–119
ethylpentanoát	11,04	146
butan-1-ol	11,93	117
heptan-1-al	13,30	152–154
peptan-2-on	13,50	149–151
3-methylbutan-1-ol	14,30	131
2-methylbutan-1-ol	14,30	128
ethylhexanoát	15,71	166
3-hydroxybutan-2-on	17,76	148
oktanal	18,25	171
heptan-2-ol	19,74	159
ethylheptanoát	19,81	188–189
trans-hex-3-en-1-ol	21,04	61–62
tetrahydro-4-methyl-2-(2-methylpropenyl)-2H-pyran	21,17	182
hexanol	21,28	157
cis-hex-3-en-1-ol	22,00	156–157
nonanal	22,38	79–81
nonan-2-on	22,84	195
oktan-2-ol	23,50	179–180
E-2-oktanal	23,82	84–86
kyselina octová	24,80	118
ethyloktanoát	24,86	206–208
okt-1-en-3-ol	25,60	173–175
dekan-2-on	27,50	210–212
benzaldehyd	27,91	178–179
2,6-dimethylokta-2,7-dien-6-ol	28,65	199–200
nonan-2-ol	28,77	196

Tabulka 4c: Retenční časy a body varů analyzovaných standardů (pokračování)

kyselina propanová	30,15	141
undekan-2-on	30,80	228
kyselina 2-methylpropanová	31,20	155
kyselina butanová	32,29	162–165
fenylethanal	32,61	194–196
ethyldekanoát	33,61	250–252
2-(4-methyl-1-cyclohex-3-enyl) propan-2-ol	34,36	217
kyselina 3-methylbutanová	35,26	175–177
dekan-1-ol	38,46	230–232
E-1-(2,6,6-trimethyl-1-cyklohexa-1,3-dienyl)but-2-en-1-on	39,02	276
1-fenylethanol	40,73	204
benzylalkohol	41,14	205
kyselina hexanová	42,11	205
kyselina oktanová	47,36	236–240

Vzhledem k tomu, že se jedná o vývoj nové metody a identifikaci v podstatě neznámých látek, bylo aplikováno snímání spekter v TIC („Total Ion Current“) modu, který poskytuje více informací, pokud jde o určení nebo potvrzení obsahu určité sloučeniny ve vzorku. Vzhledem k očekávaným analytům byla nastavena šířka skenovacího intervalu 30–370 m/z.

Tabulka 5a: Identifikace těkavých sloučenin ve vzorku taveného sýru

identifikované sloučeniny	nečistoty	retenční čas [min]	pravděpodobnost shody spekter [%]
–	kyselina fosfonoctová	18,62	–
oktanal	–	18,79	34
2-oktanol	–	24,24	28
–	oktasiloxan	25,87	–
ethyl-5-methylnonanoát	–	26,47	15
2-ethylhexan-1-ol	–	27,36	42
benzaldehyd	–	29,14	49

Tabulka 5b: Identifikace těkavých sloučenin ve vzorku taveného sýru (pokračování)

ethyl-4-decenoát	–	31,01	9
ethyldekanoát	–	33,61	66
–	farnesene	34,74	–
–	3-trifluoroacetoxypentadekan	35,13	–
ethyldodekanoát	–	39,87	78
3-methylbutylpenadekanoát	–	40,67	75
fenylethylalkohol	–	43,15	40
–	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-oxopropyl)fenol	44,66	–
–	N-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-4-nitro-benzensulfonamid	45,71	–
ethyltetradekanoát	–	48,44	60
2-hydroxy-iso-butyrofenon	–	50,37	94
5-hydroxymethylfurfural	–	53,07	66
ethylhexadekanoát	–	55,52	64

V Tabulce 5 jsou uvedené sloučeniny, které se podařilo identifikovat v modelovém vzorku taveného sýra. Získaný chromatogram je uveden v Příloze 1. Jak je patrné, bylo detekováno množství nečistot, které pravděpodobně pocházejí z SPME vlákna, příp. z GC kolony. Z cílených analytů se zatím se podařilo identifikovat pouze 14 sloučenin, což je pravděpodobně způsobeno aplikací TIC modu. Na základě získaných hmotnostních spekter standardů budou pro další práci zvoleny vhodné podmínky pro režim SIM (Selective Ion Monitoring), který umožňuje dosažení podstatně nižších detekčních limitů a mělo by se podařit detekovat mnohem více sloučenin. Interpretaci získaných spekter bude věnována hlavní pozornost v dalších experimentech.



## 5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřena na zavedení metody stanovení těkavých aromaticky aktivních látek v různých typech přírodních a tavených sýrů.

V teoretické části byla zpracována literární rešerše týkající se aromatických látek. Zejména jejich rozdělení, vlastnosti a složení těchto látek přirozeně se vyskytujících v různých druzích sýrů. Rovněž zde byly popsány metody aplikované v experimentální části práce.

Hlavním cílem experimentální části bylo nalézt optimální podmínky a ověřit vybrané validační parametry metody založené na použití mikroextrakce tuhou fází (SPME) a následné analýze pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Pro extrakci těkavých látek z matrice vzorku bylo zvoleno vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$ . Extrakce probíhala headspace způsobem, kdy je vlákno umístěno do plynné fáze nad vzorkem.

Jako modelová matrice byly vybrány: tvrdý sýr holandského typu zakoupený v běžné tržní síti a tavený sýr vyrobený na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně.

V rámci optimalizace metody byly optimalizovány následující parametry: teplota a doba inkubace/ SPME extrakce, velikost vialky vs. množství vzorku, hloubka ponoření vlákna do vialky a do injektoru GC, teplota a doba desorpce, teplotní program během GC analýzy. Parametry byly optimalizovány za účelem dosažení maximálního výtěžku sloučenin a co nejlepší GC separace při zachování přiměřeně dlouhé doby analýzy. Vybrané optimální podmínky SPME–GC–MS metody jsou přehledně shrnuty v kapitolách 3.4 a 3.5. Metoda je jednoduchá, poměrně rychlá (analýza jednoho vzorku trvá i s přípravou cca 80 min.), nenáročná na chemikálie a laboratorní materiál, plně automatizovaná.

V rámci validace byla z časových důvodů ověřena pouze opakovatelnost metody, RSD retenčních časů  $< 1\%$ , RSD ploch píků 7–21%.

Optimalizovaná SPME-GC-MS metoda byla následně aplikovaná pro identifikaci těkavých sloučenin v modelovém vzorku taveného sýra, ve kterém bylo předběžně identifikováno 14 sloučenin, z toho 3 alkoholy, 3 aldehydy, 7 esterů a 1 keton.

V navazujících experimentech budou ověřeny další validační parametry (reprodukovatelnost, linearita, limity detekce a kvantifikace), vylepšeny možnosti identifikace a kvantifikace analytů. Optimalizovaná a validovaná metoda bude použita pro sledování obsahu aromatických sloučenin v průběhu výroby, zrání a skladování přírodních a tavených sýrů.

## 6 LITERATURA

- [1] HUI, Y. H., 2006, *Handbook of food science, technology, and engineering*. Boca Raton : Taylor. Food science and technology (Taylor, 148. ISBN 08-493-9849-5.
- [2] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [3] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [4] HÁLKOVÁ, Jana, RUMÍŠKOVÁ, Marie and RIEGLOVÁ, Jana, 2001, *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna : I. Straka. ISBN 80-864-9402-0.
- [5] MAHDALOVÁ, Martina. *Stanovení aromaticky aktivních látek v odrůdách jablek: evaluation of volatile sensory active microbiological metabolites and their characterization*. Brno: VUT FCH, 2014. Diplomová práce. Vedoucí práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [6] DIRINCK, P and DE WINNE, A, 1999, Flavour characterisation and classification of cheeses by gas chromatographic–mass spectrometric profiling. *Journal of Chromatography A*. 1999. Vol. 847, no. 1-2p. 203-208. DOI 10.1016/S0021-9673(99)00193-4.
- [7] FRECHOVÁ, Vendula. *Stanovení aromaticky aktivních látek ve vybraných typech ovoce: evaluation of volatile sensory active microbiological metabolites and their characterization*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2011. Diplomová práce. Vedoucí práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [8] PAWLISZYN, Janusz. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. DOI: 0-471-19034-9.
- [9] FRANK, Damian Conrad, OWEN, Caroline Mary and PATTERSON, John, 2004, Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *LWT - Food Science and Technology*. 2004. Vol. 37, no. 2p. 139-154. DOI 10.1016/S0023-6438(03)00144-0.
- [10] VOLKA, Karel, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. *Analytická chemie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995, 236 s. ISBN 80-708-0227-8.
- [11] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [12] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [13] NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. *Spektrometrické analytické metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998, 2 sv. ISBN 80-718-4365-2.
- [14] ŠTULÍK, Karel, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 263 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [15] SUCHÁNEK, Miloslav a Jana HAJŠLOVÁ. *Kvalimetrie: řada příruček pro laboratoře*. Vyd. 2. upr. Praha: Eurachem-ČR, 1997, 137 s. ISBN 80-901-8682-3.

- [16] BAREK, J. Nomenklatura a terminologie: Metrologická terminologie v chemii. *Chemické listy*. 2000, 94(7), 439-444. ISSN 1213-7103.
- [17] WILKES, Jon G, CONTE, Eric D, KIM, Yongkyoung, HOLCOMB, Manuel, SUTHERLAND, John B and MILLER, Dwight W, 2000, Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *Journal of Chromatography A*. 2000. Vol. 880, no. 1-2p. 3-33. DOI 10.1016/S0021-9673(00)00318-6.
- [18] PÉRÈS, Christophe, VIALON, Christine and BERDAGUÉ, Jean-Louis, 2001, Solid-Phase Microextraction-Mass Spectrometry: A New Approach to the Rapid Characterization of Cheeses. *Analytical Chemistry*. 2001. Vol. 73, no. 5p. 1030-1036. DOI 10.1021/ac001146j.
- [19] DIVIŠOVÁ, Radka. *Alergenní vonné látky v potravinách a předmětech běžného užívání: evaluation of volatile sensory active microbiological metabolites and their characterization*. Brno, 2014. Disertační práce. VUT FCH. Vedoucí práce Doc. Ing. Jirina Omelková, CSc.
- [20] VÍTOVÁ, Eva. *Hodnocení tvorby těkavých sensoricky účinných látek mikrobiálních metabolitů a jejich charakterizace: evaluation of volatile sensory active microbiological metabolites and their characterization*. Brno, 2003. Disertační práce. VUT FCH. Vedoucí práce Prof. Ing. Milan Drdák, DrSc.
- [21] KATAOKA, Hiroyuki, LORD, Heather L and PAWLISZYN, Janusz, 2000, Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000. Vol. 880, no. 1-2p. 35-62. DOI 10.1016/S0021-9673(00)00309-5.
- [22] Firemní katalog společnosti SIGMA-ALDRICH [online]. [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme/selecting-spme-fiber.html#tips>
- [23] WARDENCKI, Waldemar, MICHULEC, Magdalena and CURYLO, Janusz, 2004, A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *International Journal of Food Science and Technology*. 2004. Vol. 39, no. 7p. 703-717. DOI 10.1111/j.1365-2621.2004.00839.x.
- [24] PILLONEL, L, BOSSET, J.O and TABACCHI, R, 2002, Rapid Preconcentration and Enrichment Techniques for the Analysis of Food Volatile. A Review. *LWT - Food Science and Technology*. 2002. Vol. 35, no. 1p. 1-14. DOI 10.1006/fstl.2001.0804.
- [25] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. *Kompendium statistického zpracování dat*. Vyd. 3., V nakl. Karolinum 1. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2196-8.

## **7 POUŽITÍ ZKRATKY**

SAL – senzoricky aktivní látky

SPME – mikroextrakce pevnou fází

GC – plynová chromatografie

FID – plamenový ionizační detektor

GC–MS – plynový chromatogram spojený s hmotnostním spektrometrem

DI–SPME – extrakce, kdy je vlákno ponořené přímo do vzorku

HS–SPME – extrakce, kdy je vlákno umístěno do plynné fáze nad vzorkem

SD – směrodatná odchylka

RSD – relativní směrodatná odchylka

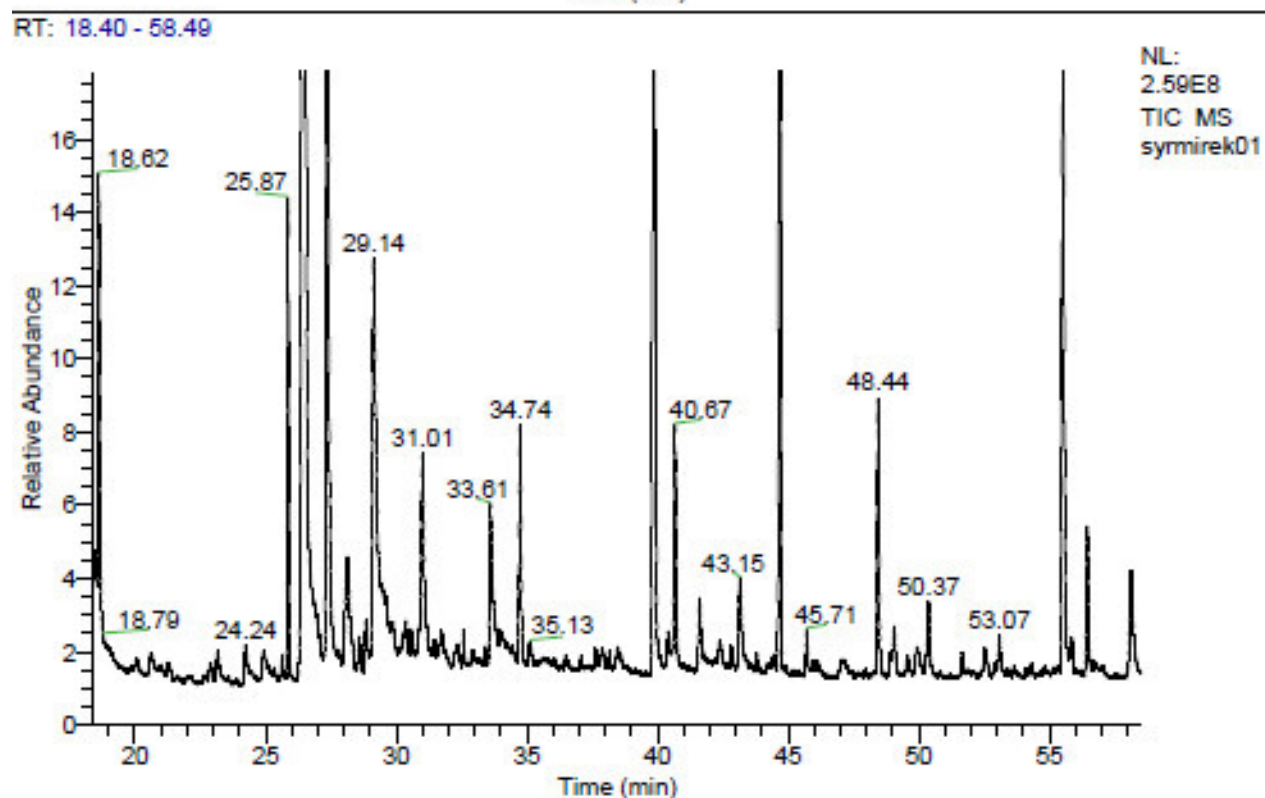
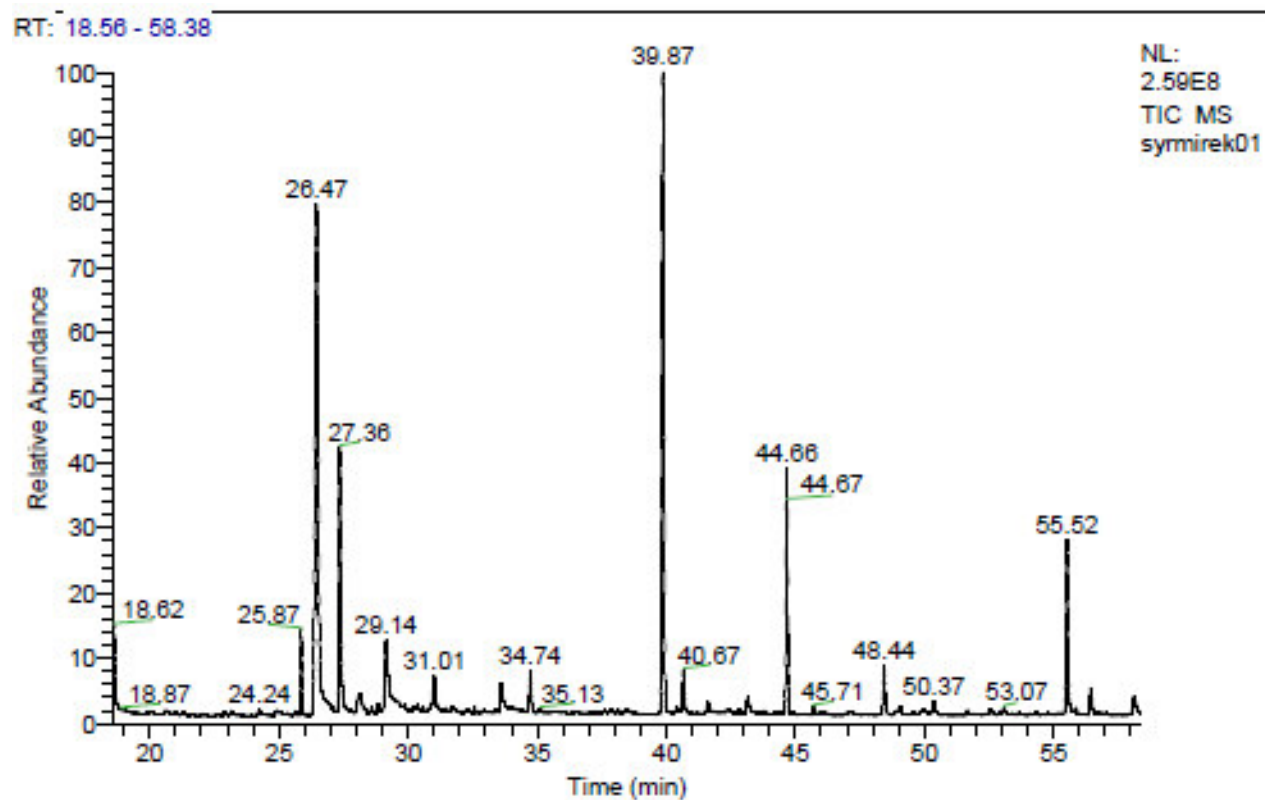
TIC – Total Ion Current

SIM – Selective Ion Monitoring

## 8 PŘÍLOHY

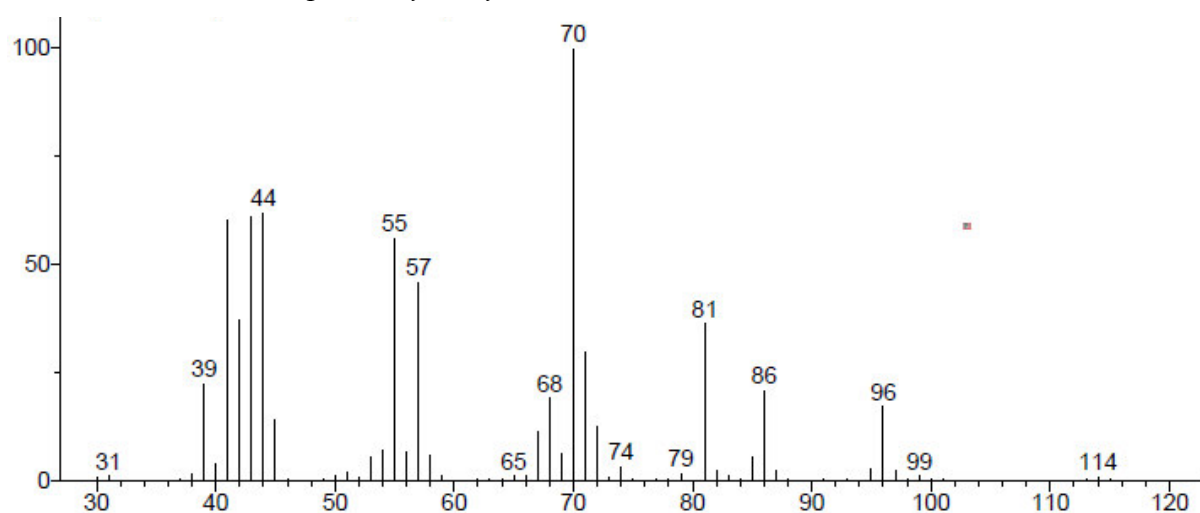
Příloha 1	Chromatogram těkavých sloučenin ve vzorku taveného sýra
Příloha 2	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 3	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 4	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 5	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 6	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 7	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 8	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 9	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 10	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 11	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 12	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 13	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 14	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 15	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 16	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 17	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 18	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 19	Hmotnostní spektra vybraných standardů
Příloha 20	Hmotnostní spektra vybraných standardů

Příloha 1: Chromatogram těkavých sloučenin ve vzorku taveného sýra

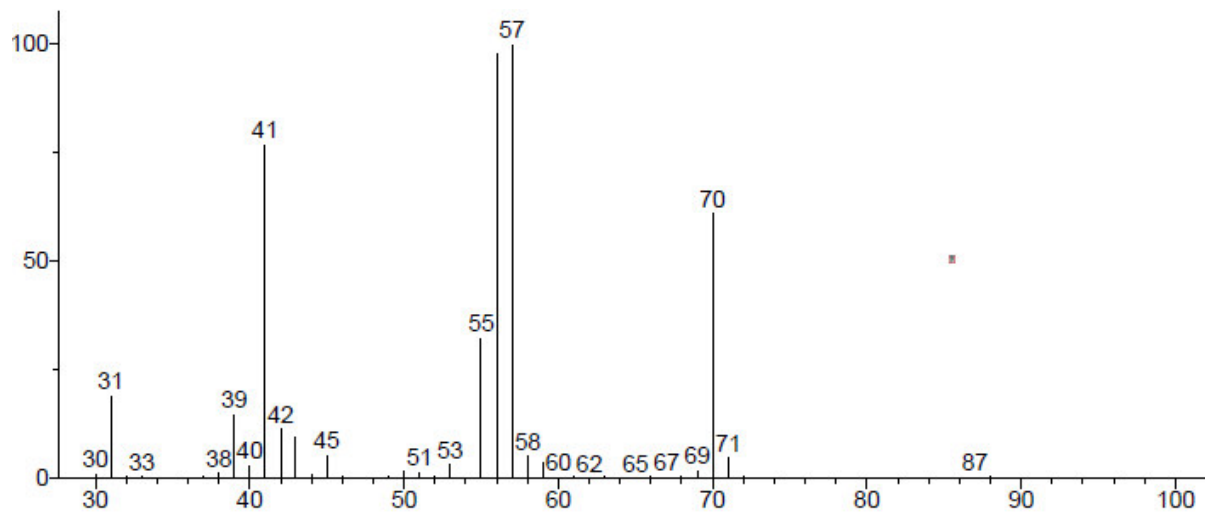


Pozn.: Identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 5)

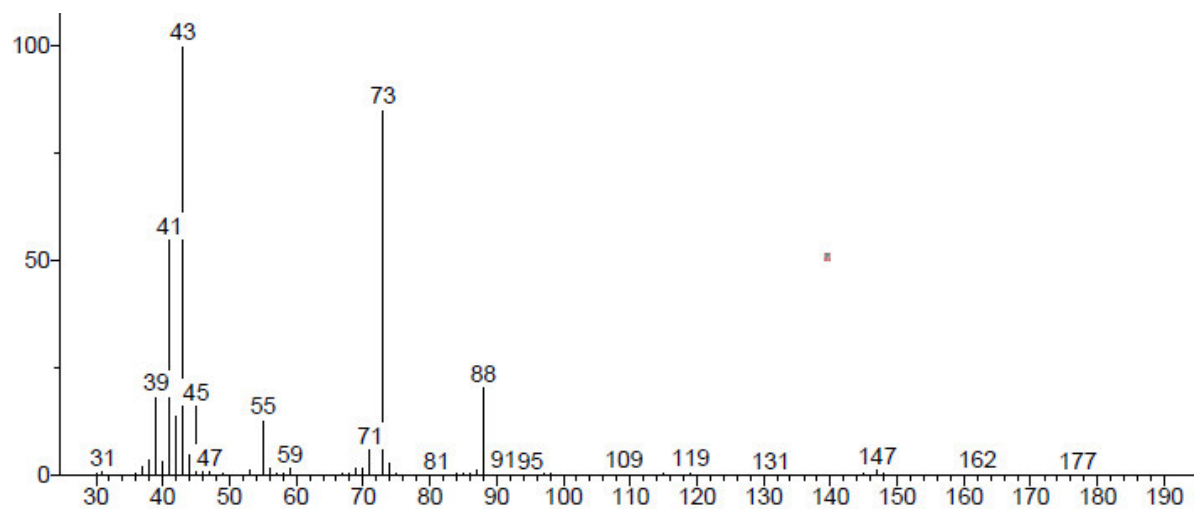
Příloha 2: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*1-heptanal*

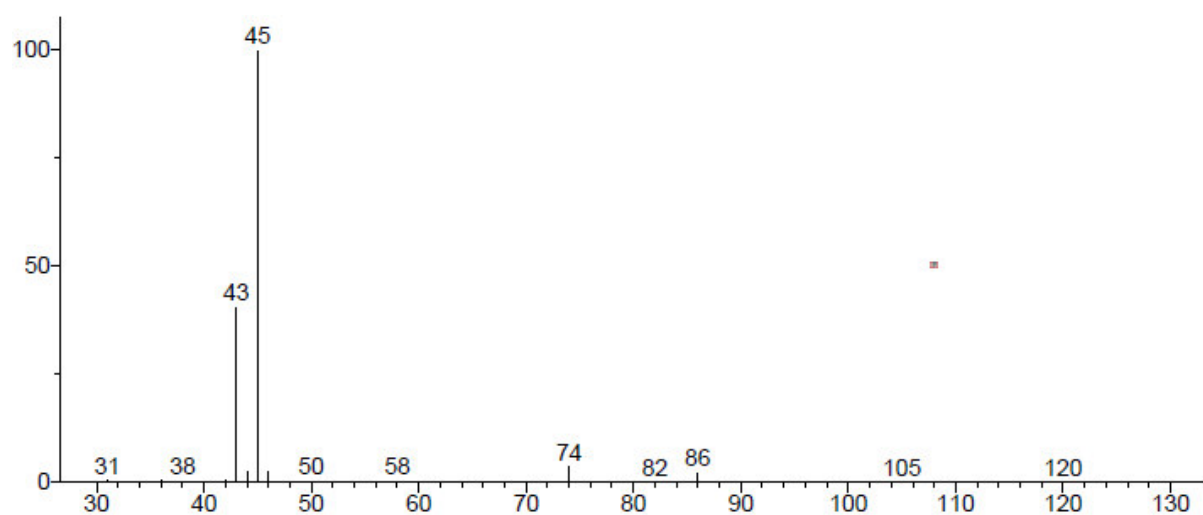


*2-methylbutan-1-ol*

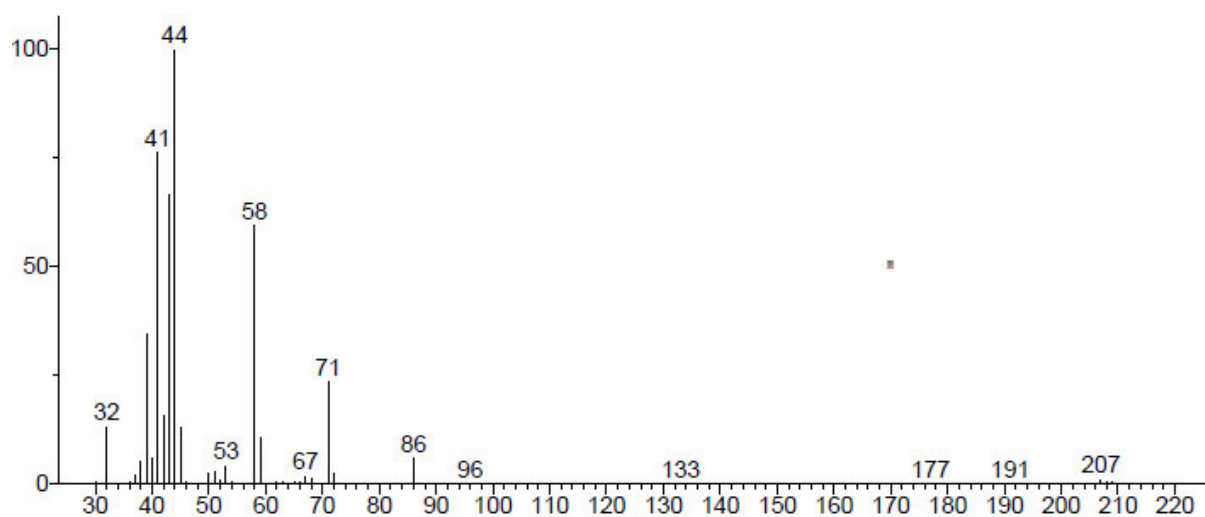


*2-methylpropanová kyselina*

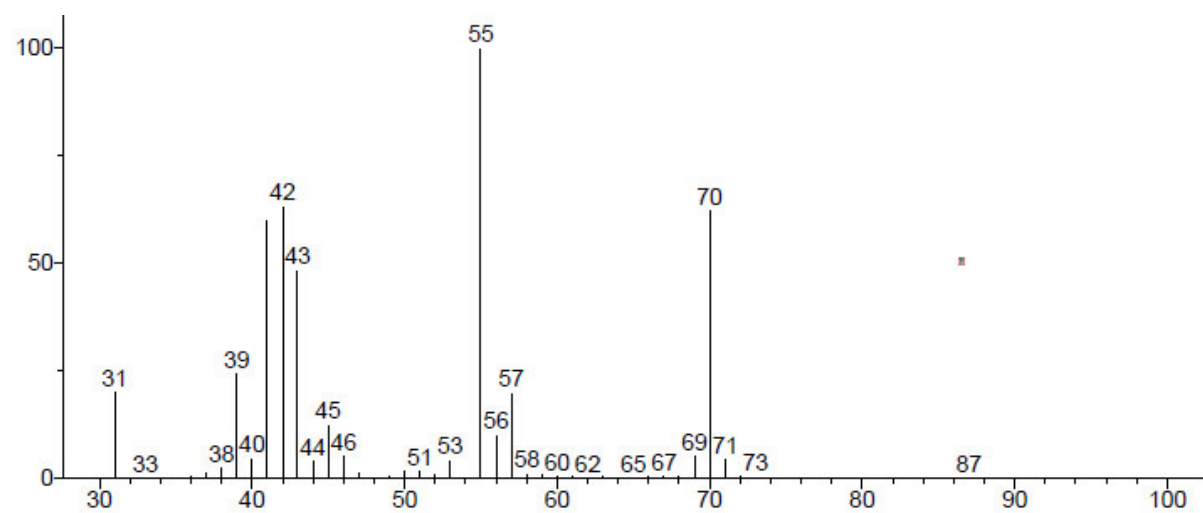
Příloha 3: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*3-hydroxybutan-2-on*



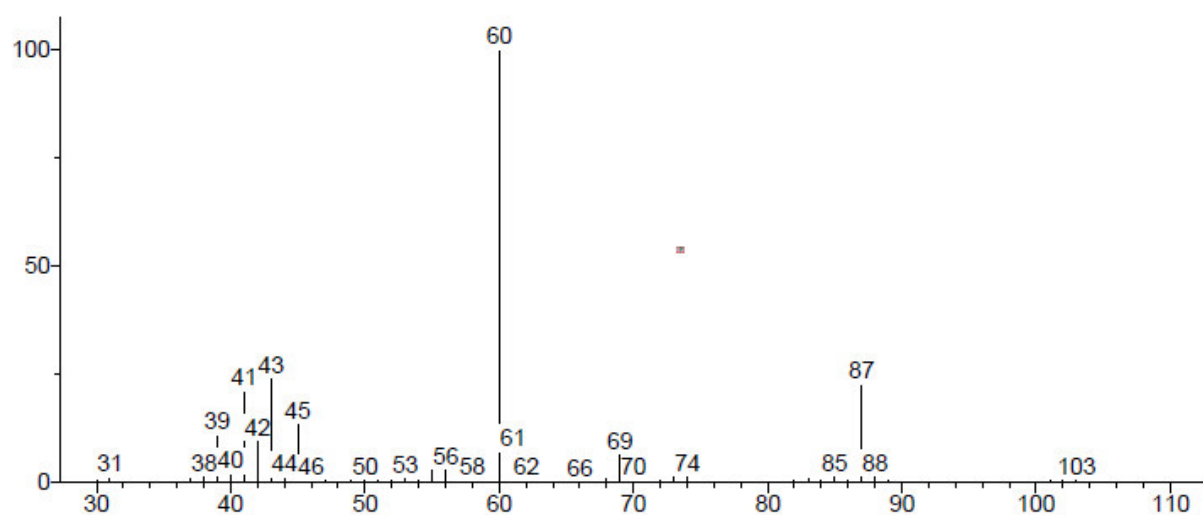
*3-methylbutan-1-al*



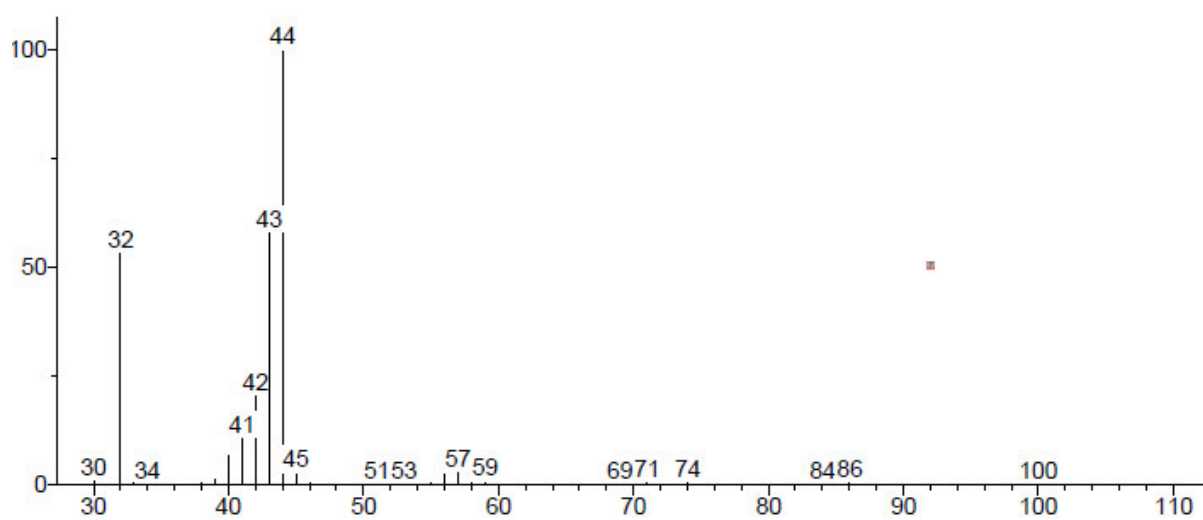
*3-methylbutanol*



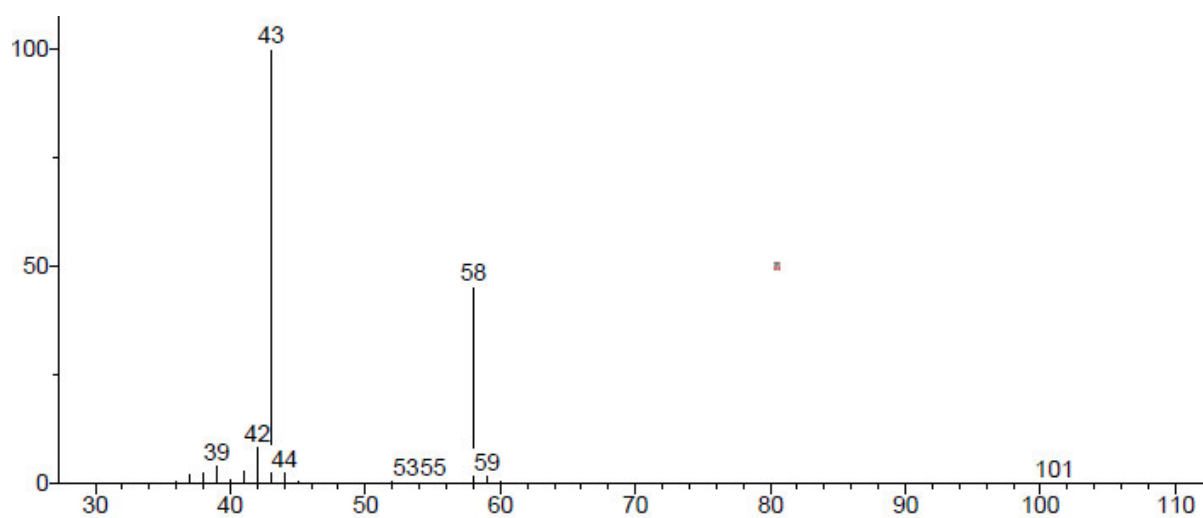
Příloha 4: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*3-methylbutanová kyselina*

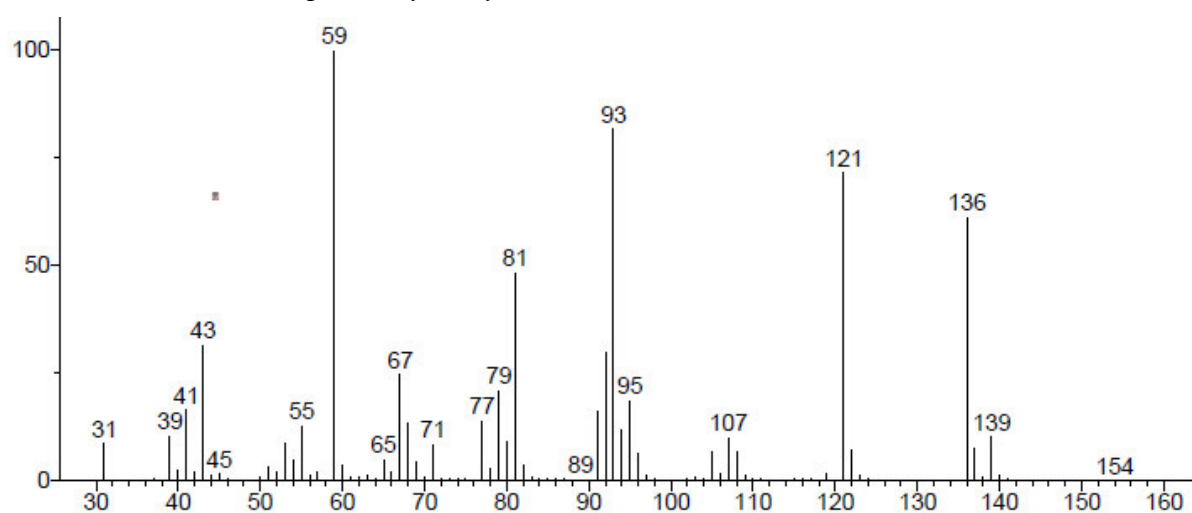


*acetaldehyd*

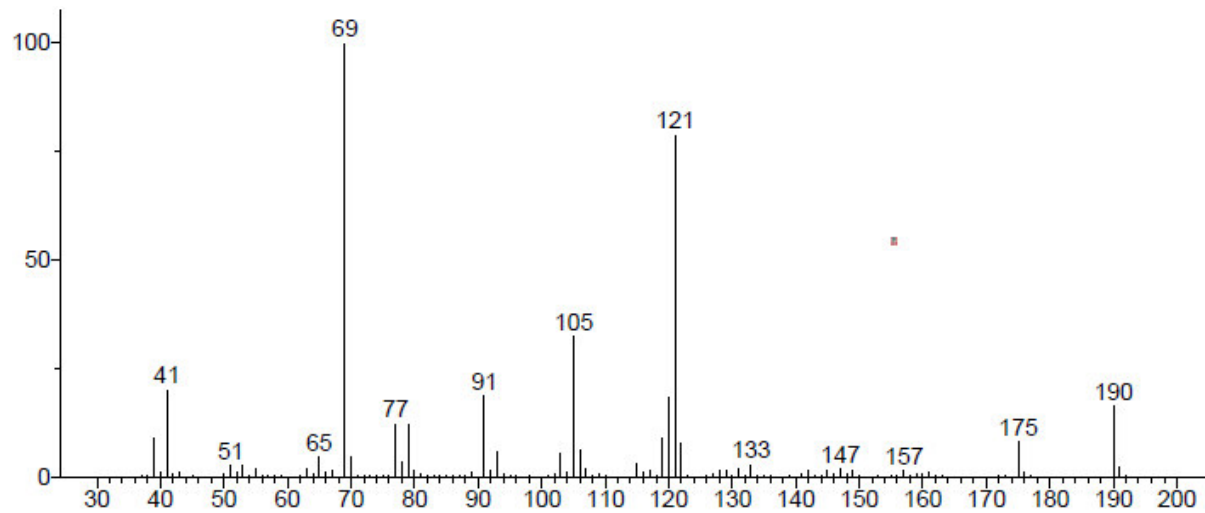


*aceton*

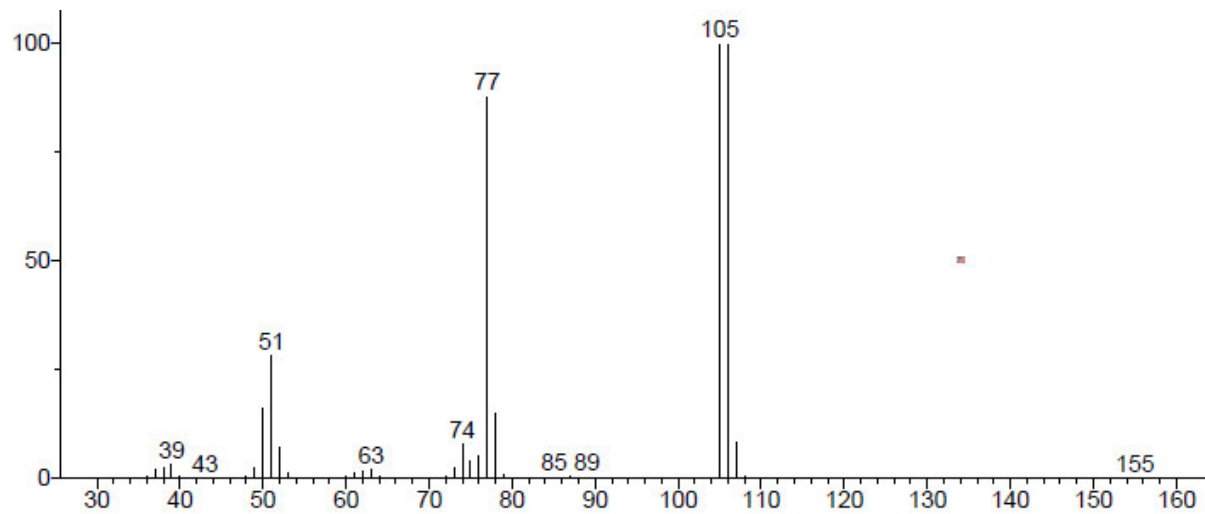
Příloha 5: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*α*-terpienol

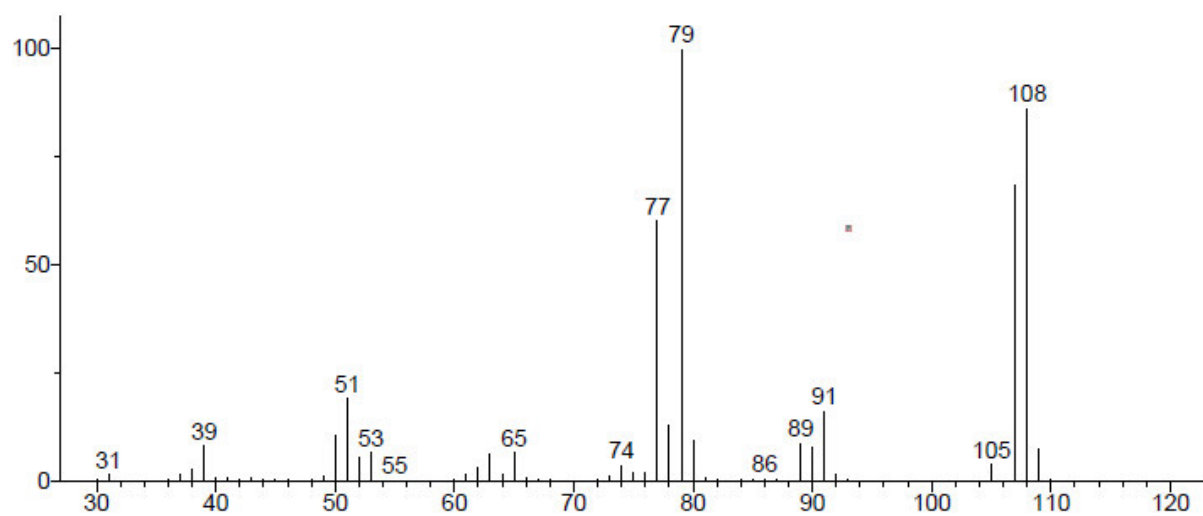


*B*-damascenon

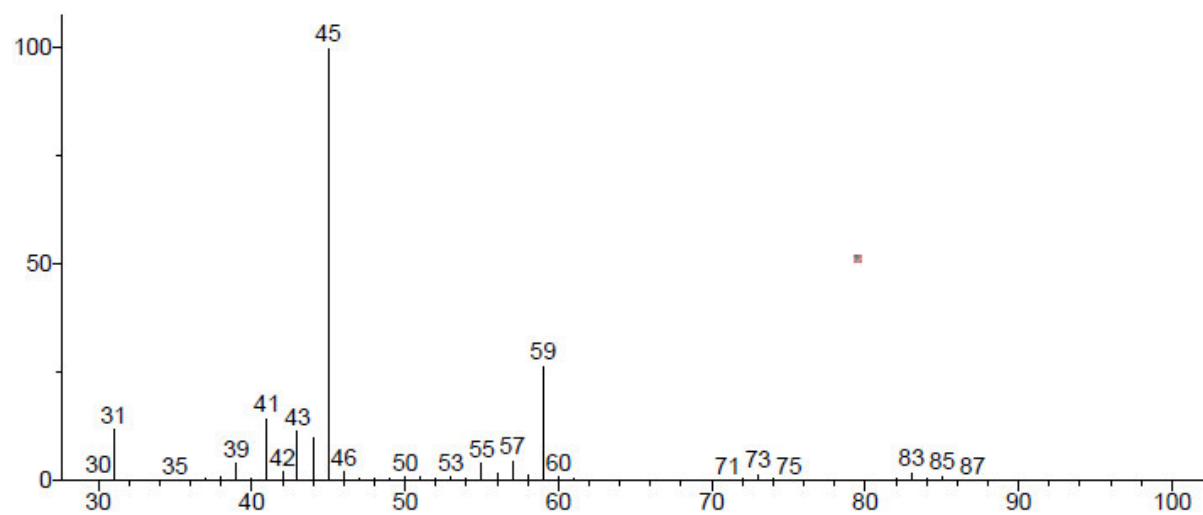


benzaldehyd

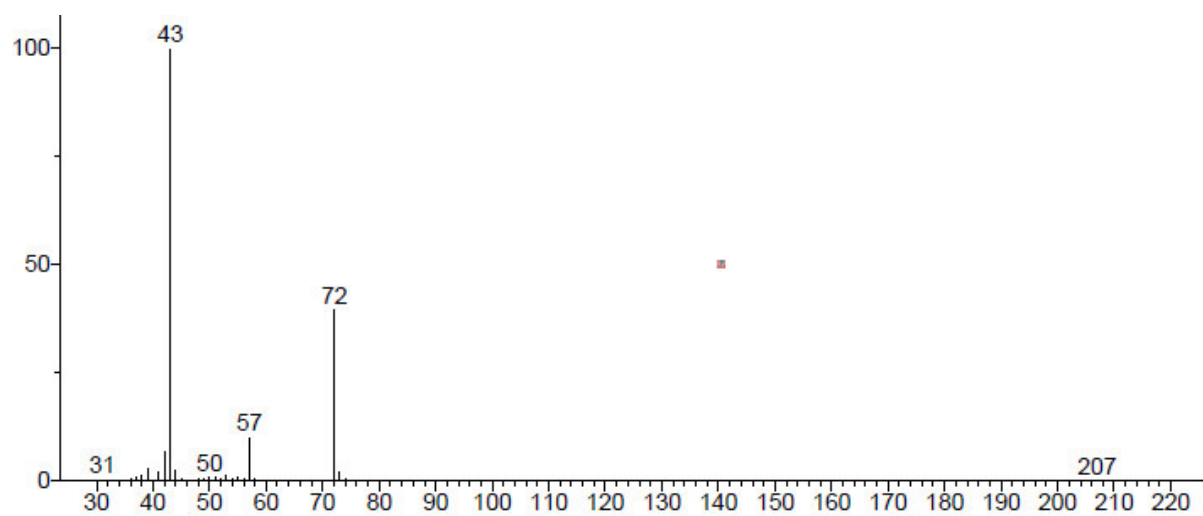
Příloha 6: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*benzylalkohol*

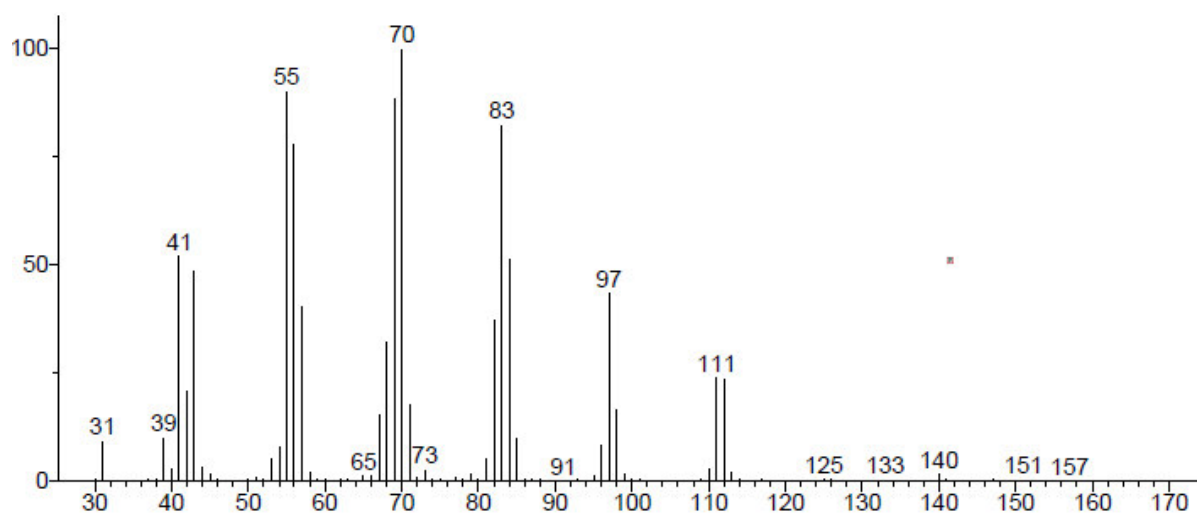


*butan-2-ol*

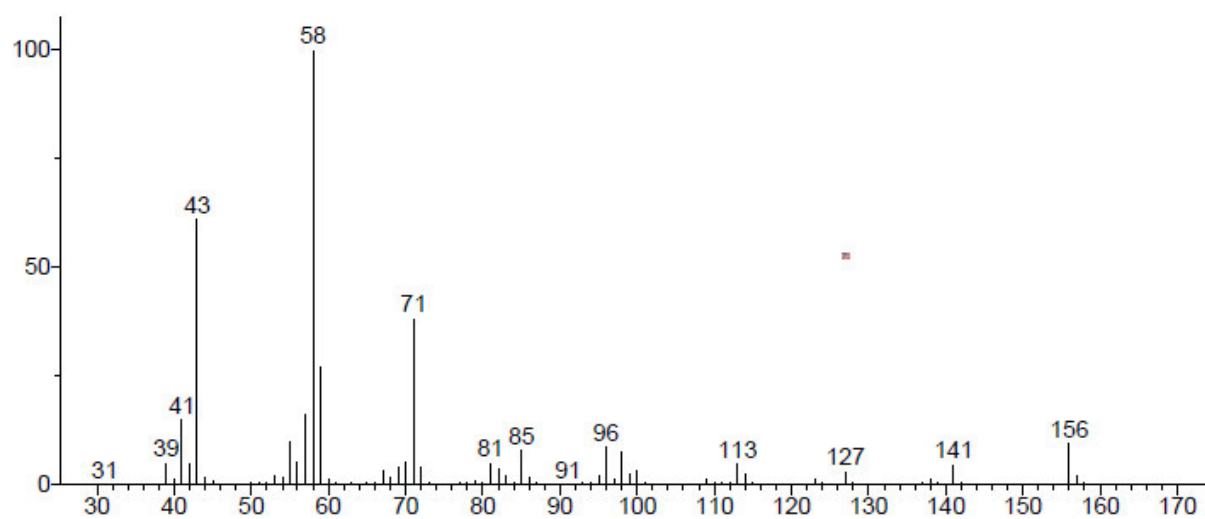


*butan-2-on*

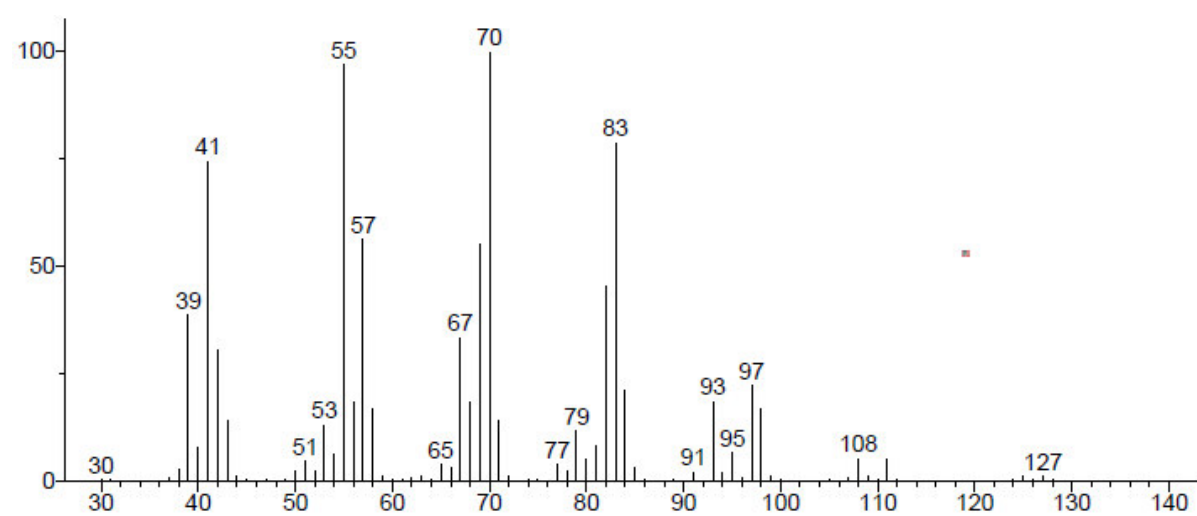
Příloha 7: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*dekan-1-ol*

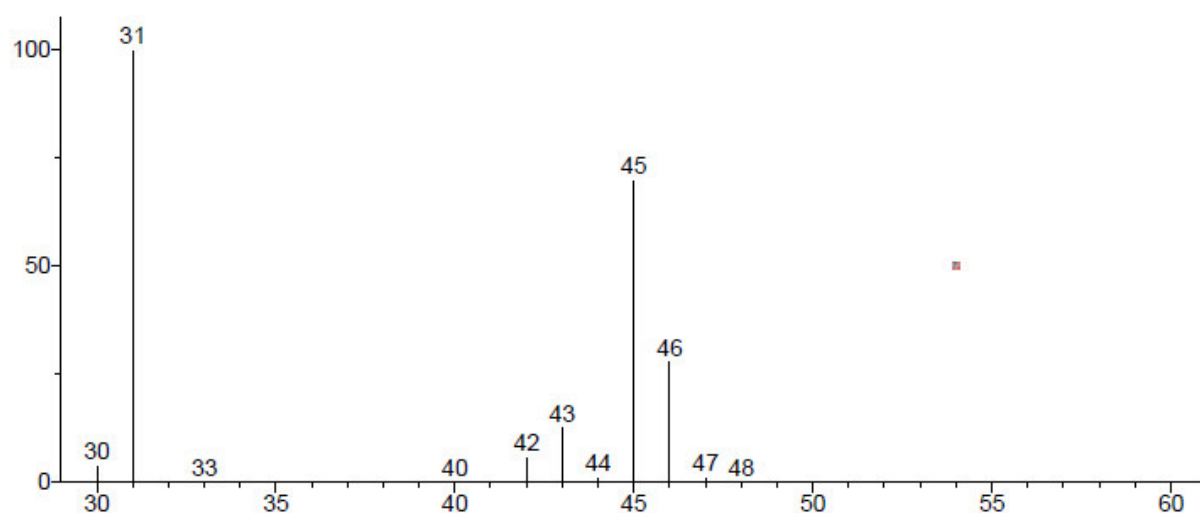


*dekan-2-on*

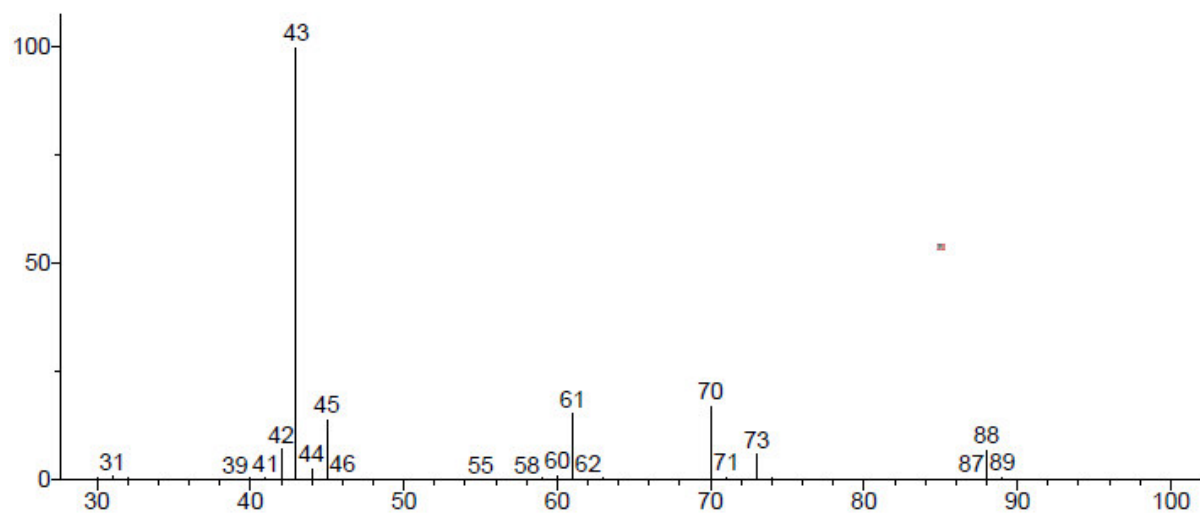


*E-2-oktenal*

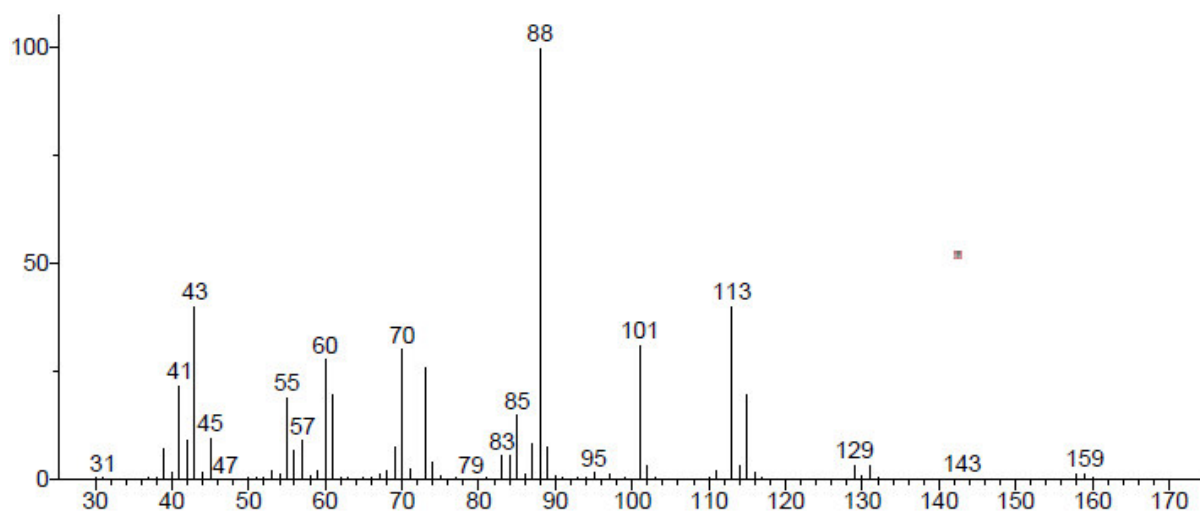
Příloha 8: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*ethanol*

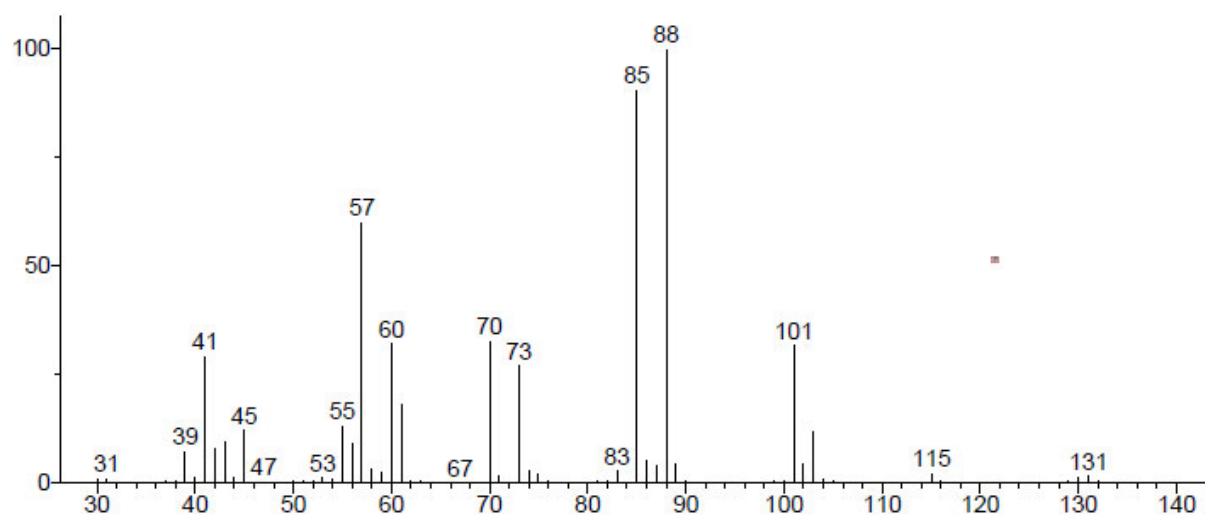


*ethylacetát*

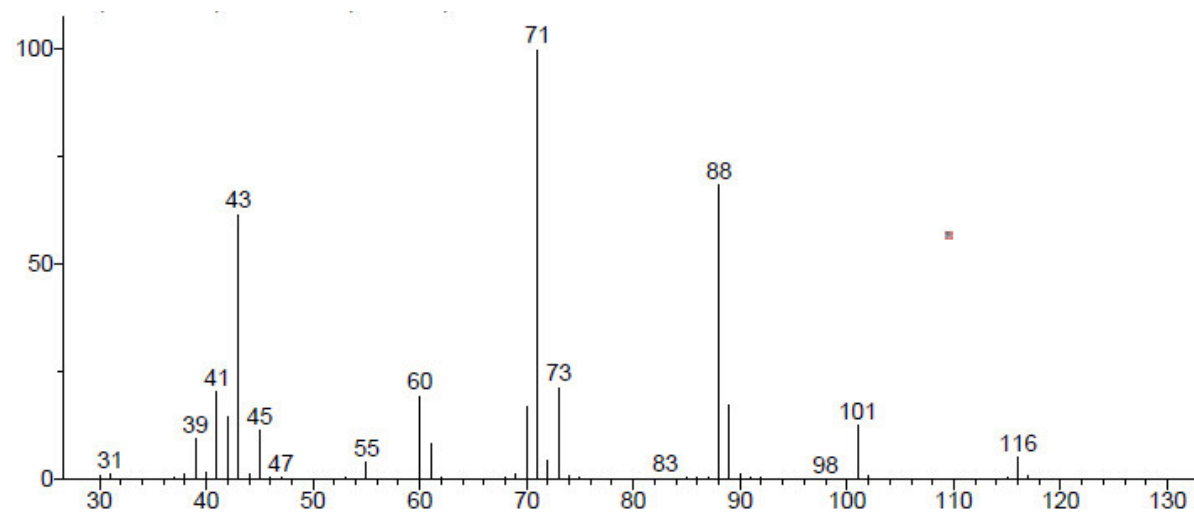


*ethylheptanoát*

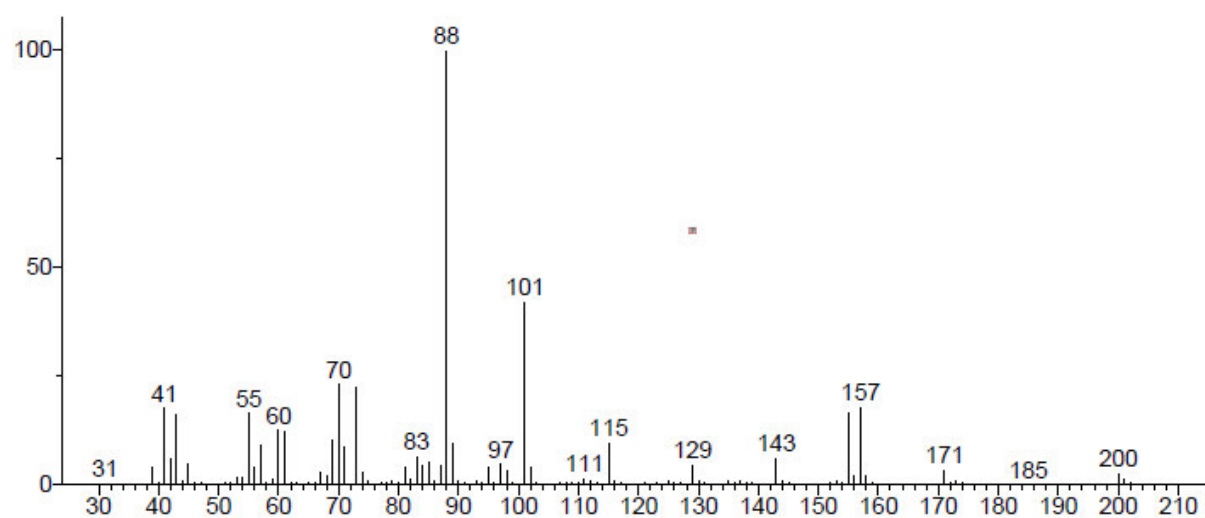
Příloha 9: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*ethylpentanoát*

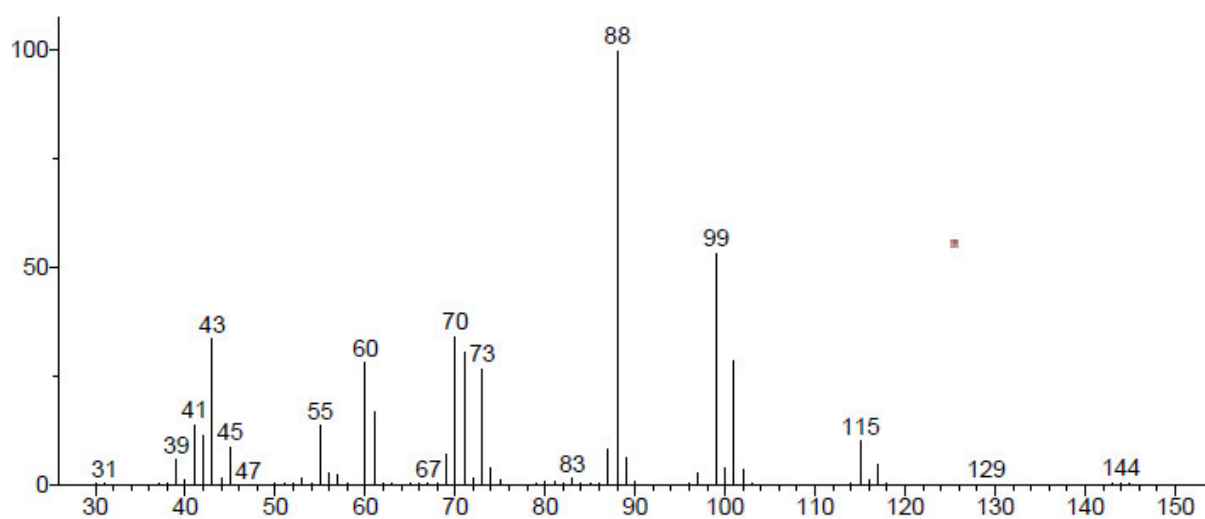


*ethylbutyrát*

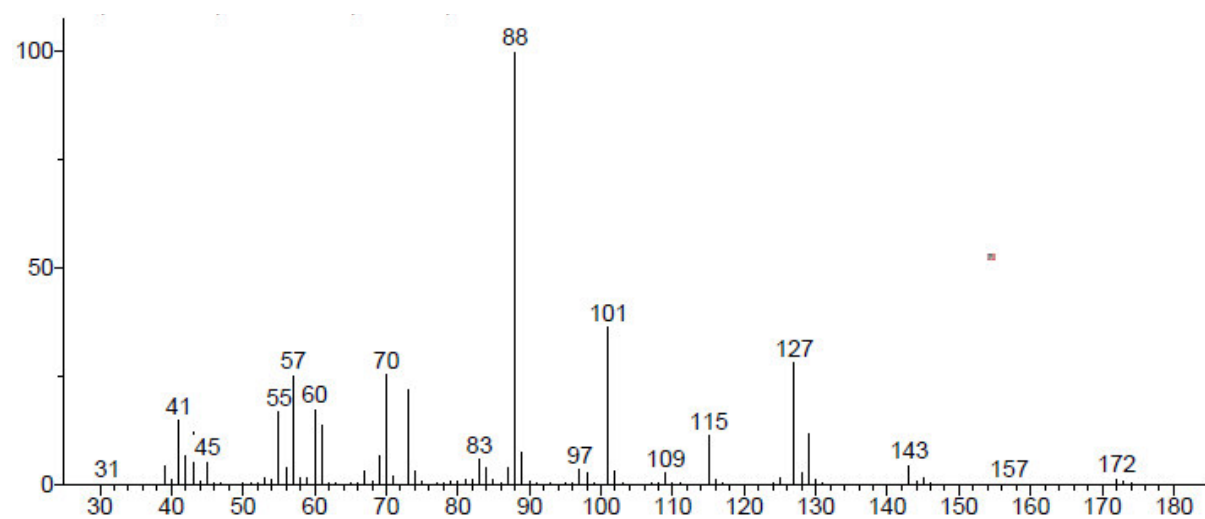


*ethyldekanoát*

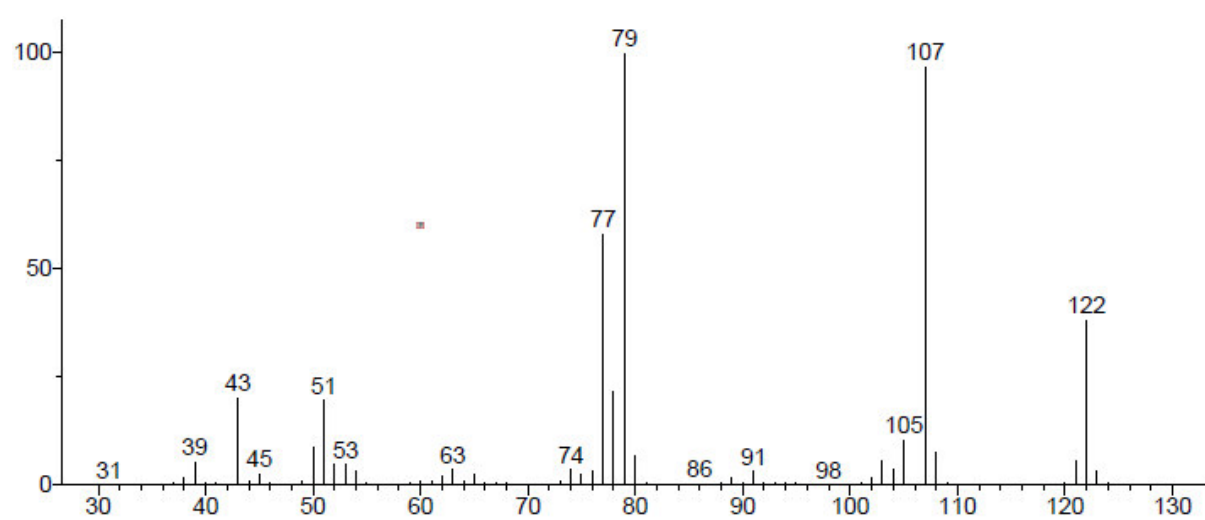
Příloha 10: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*ethylhexanoát*

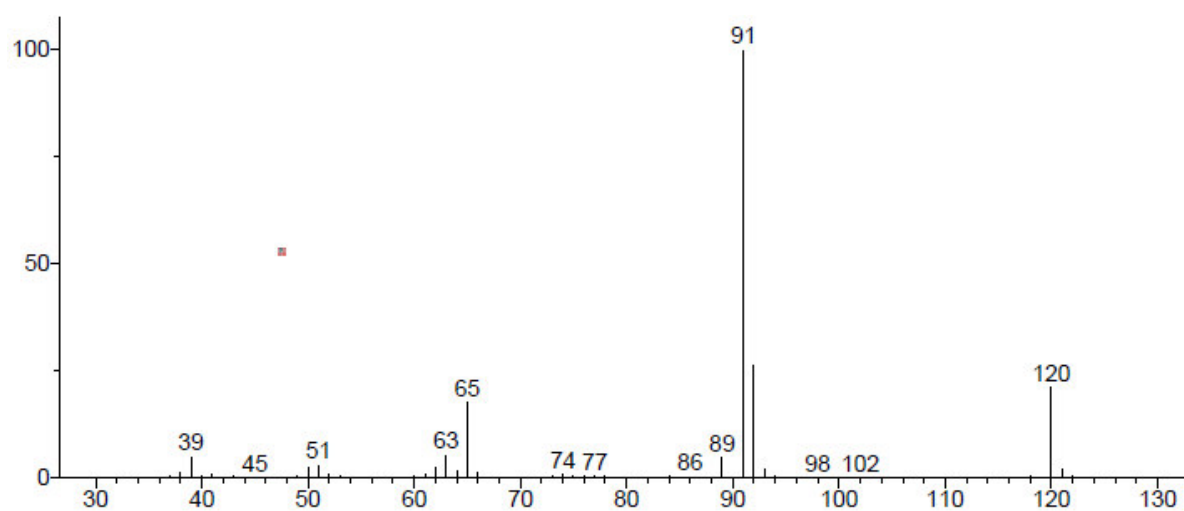


*ethyloktanoát*

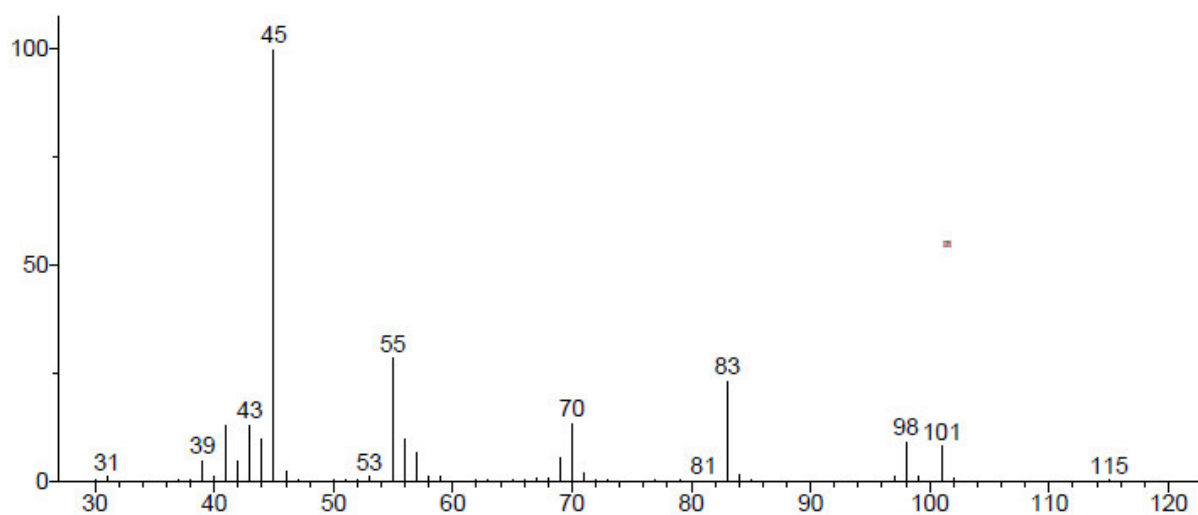


*fenylethanol*

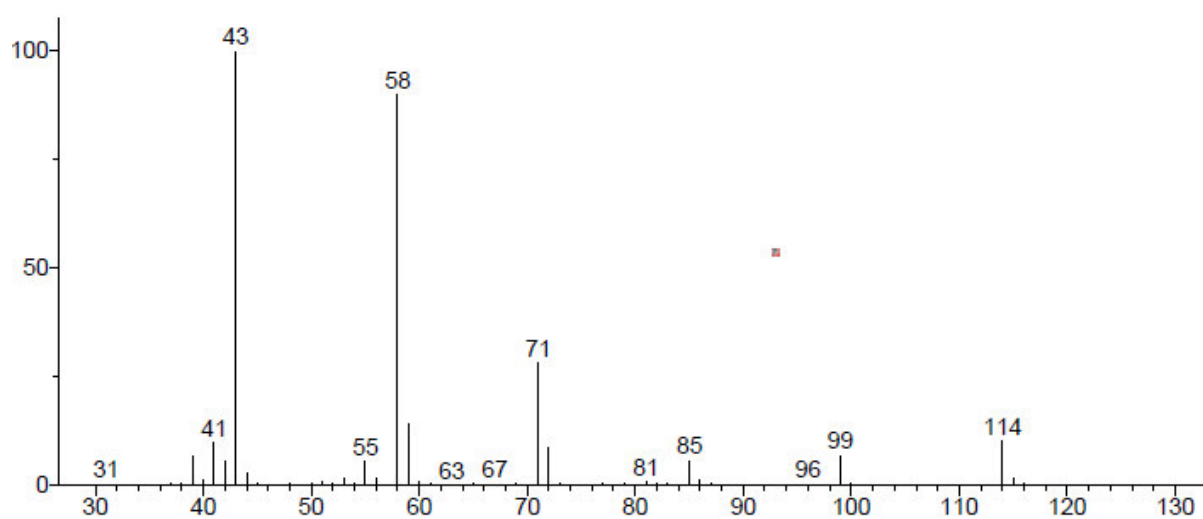
Příloha 11: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*fenylethanal*



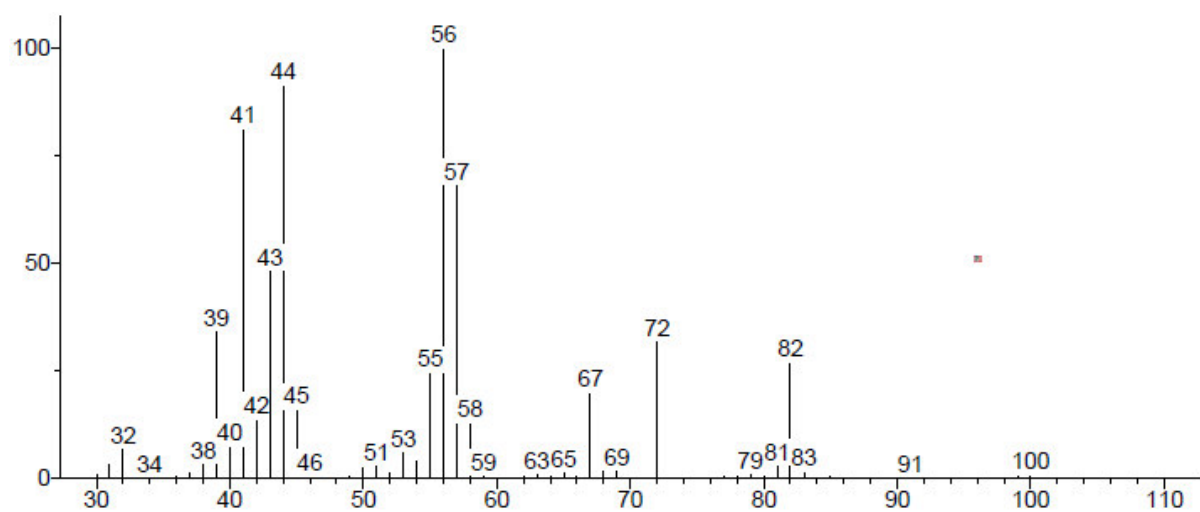
*heptan-2-ol*



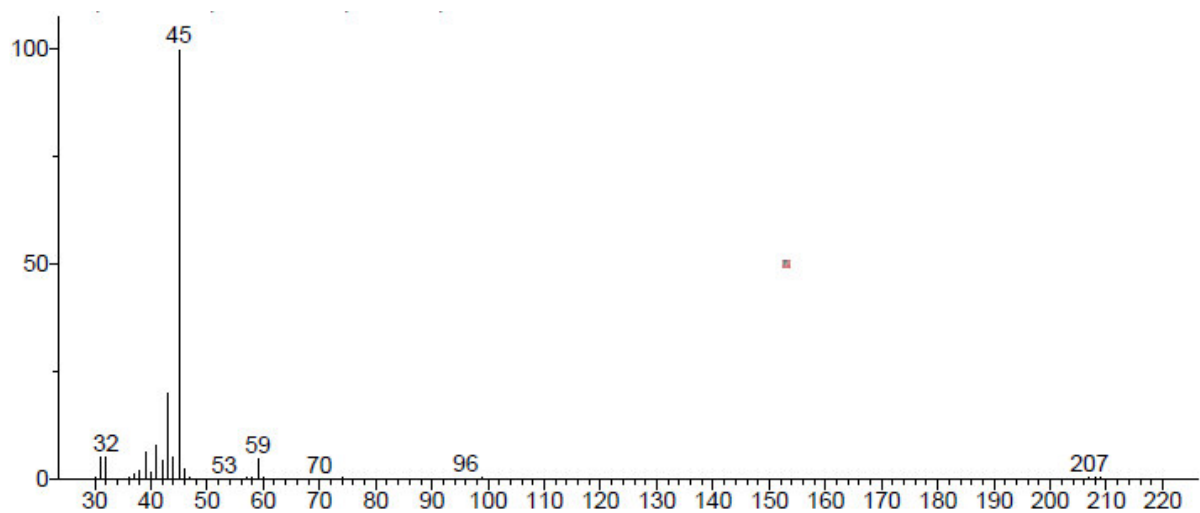
*heptan-2-on*



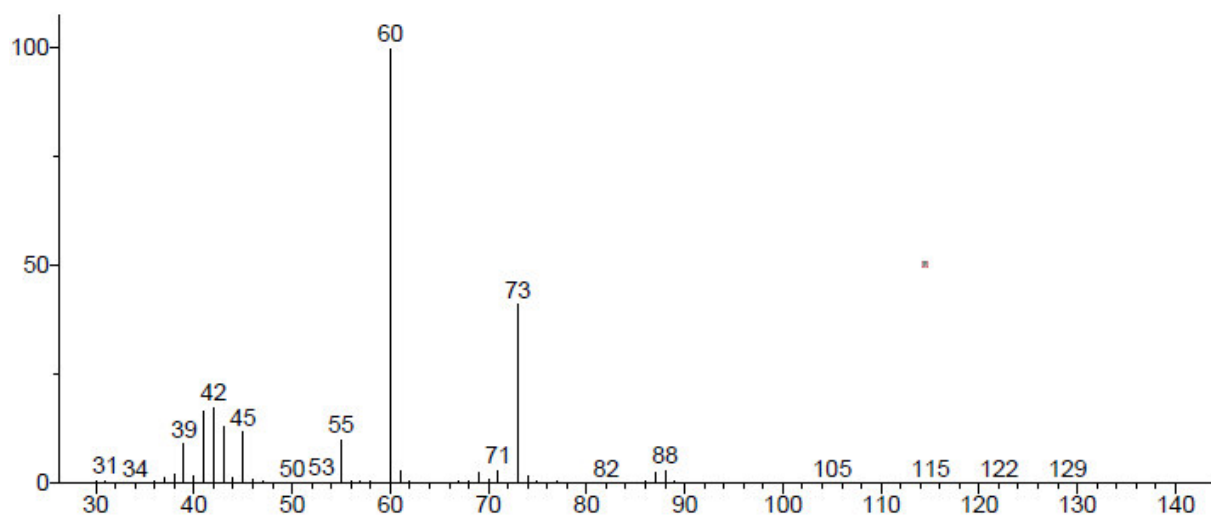
Příloha 12: Hmotnostní spektra vybraných standardů



hexanal

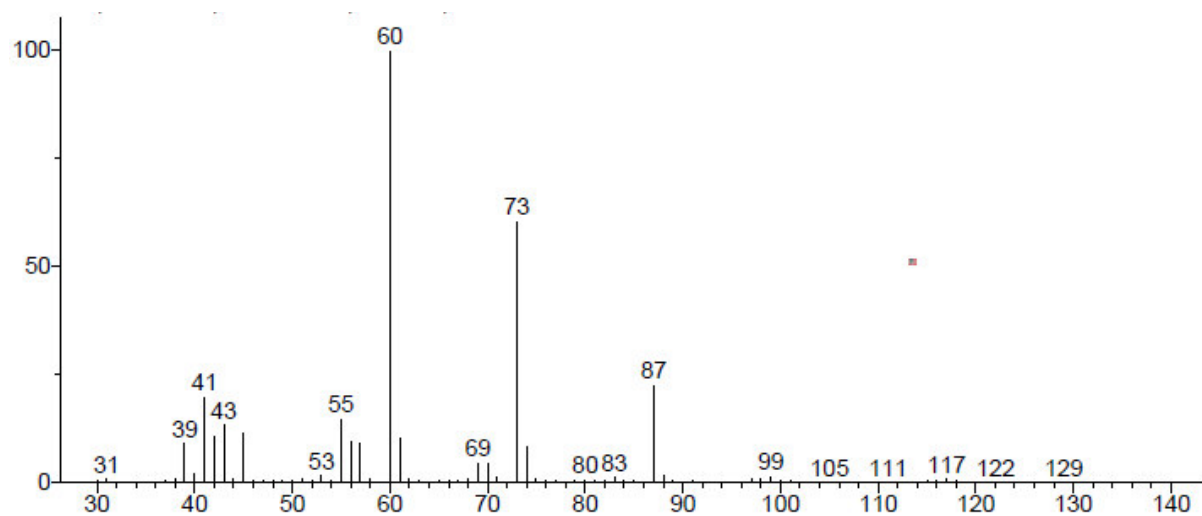


isopropanol

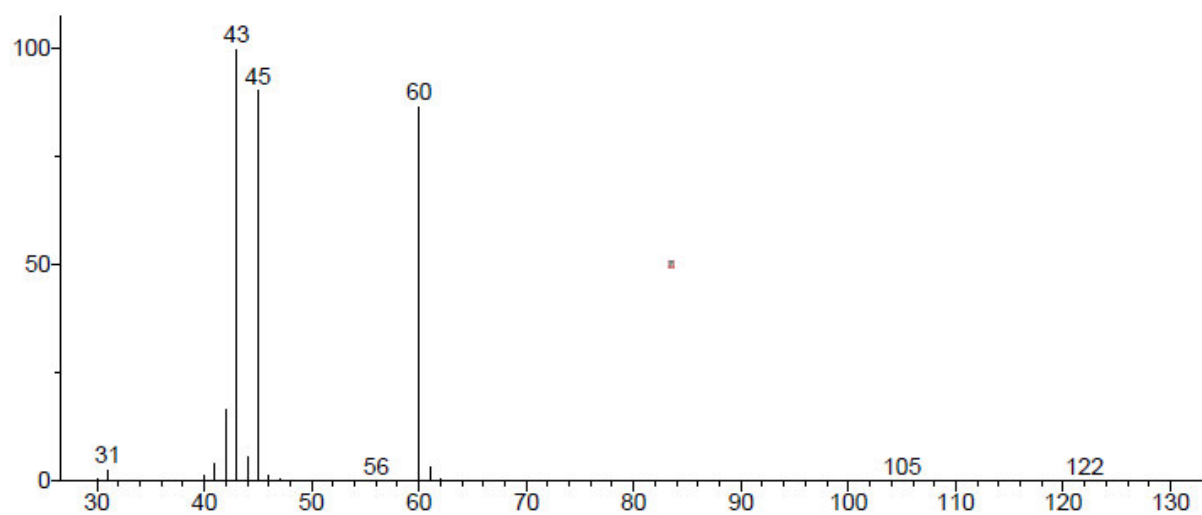


kyselina butanová

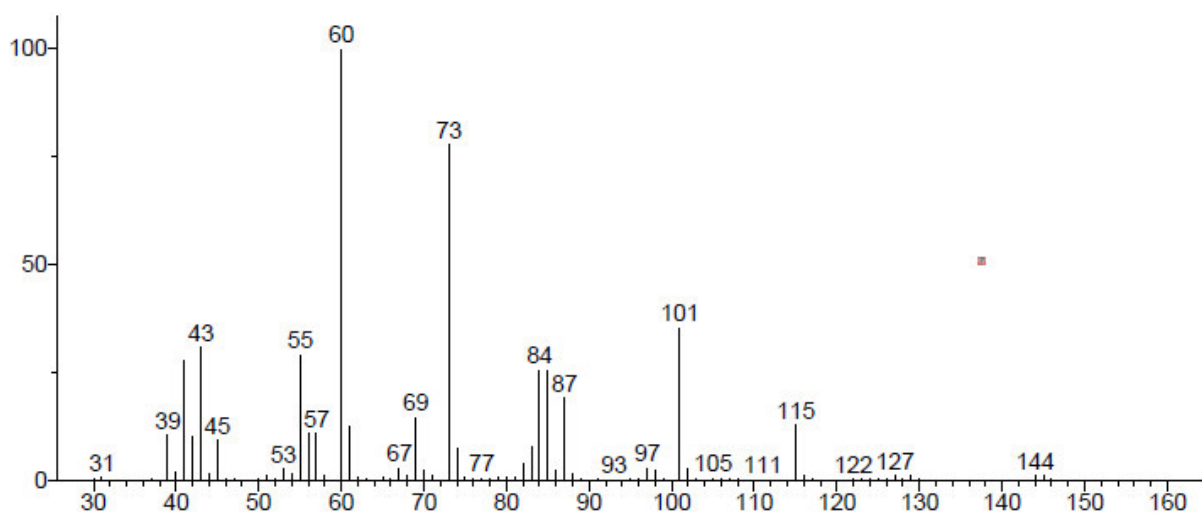
Příloha 13: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*kyselina hexanová*

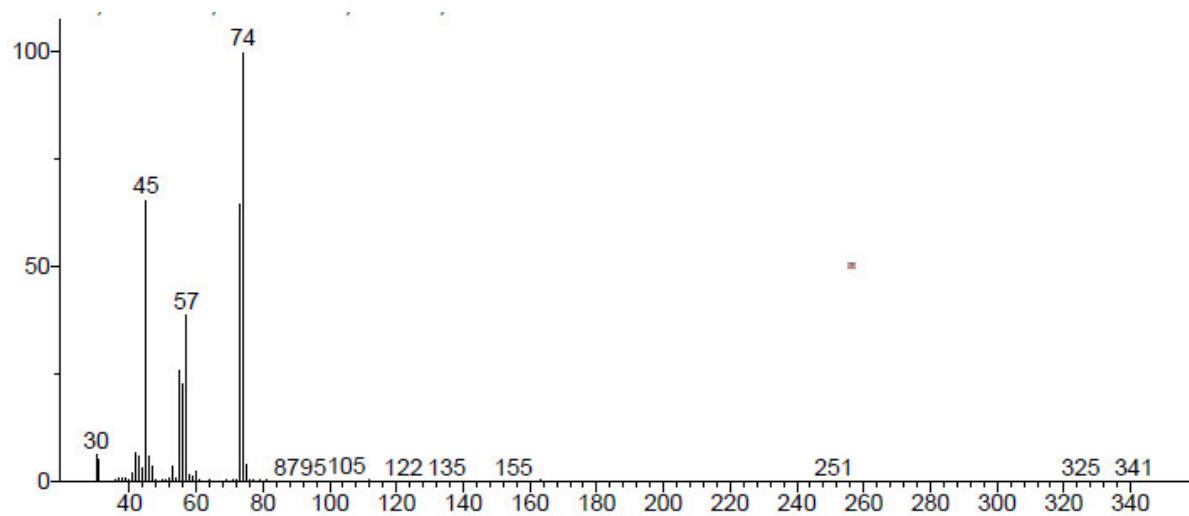


*kyselina octová*

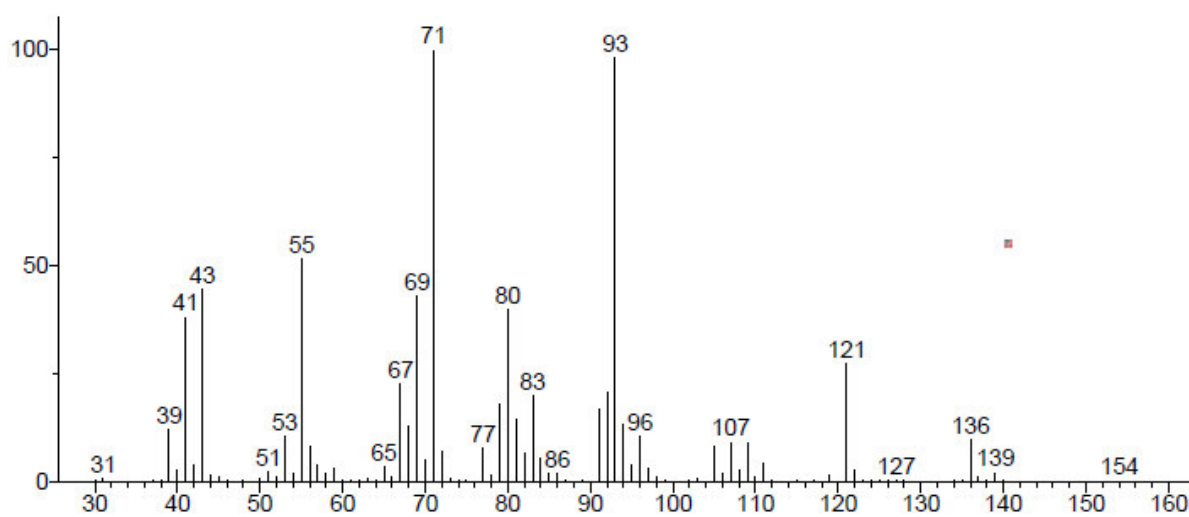


*kyselina oktanová*

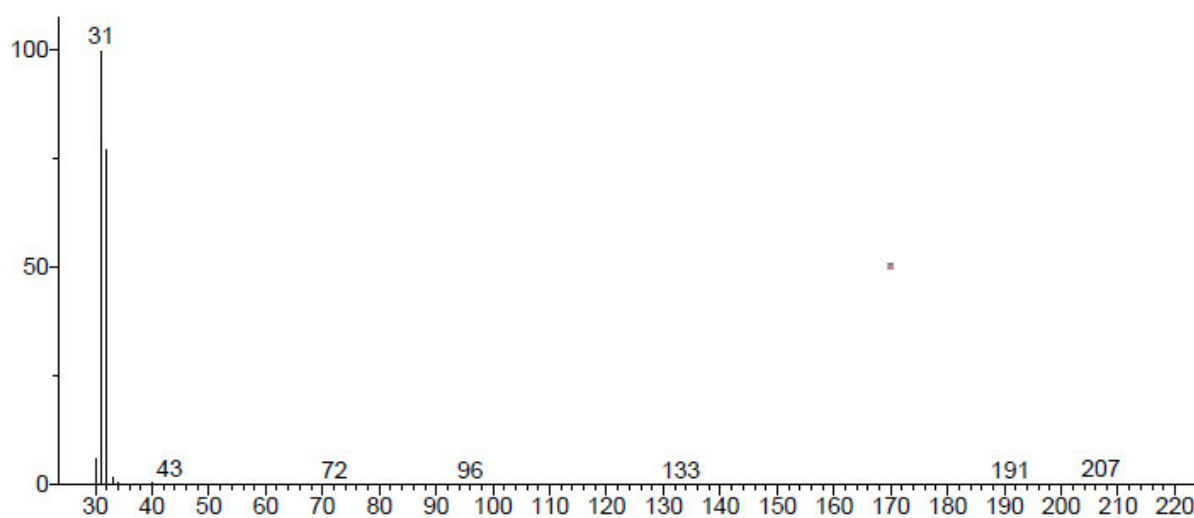
Příloha 14: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*kyselina propionová*

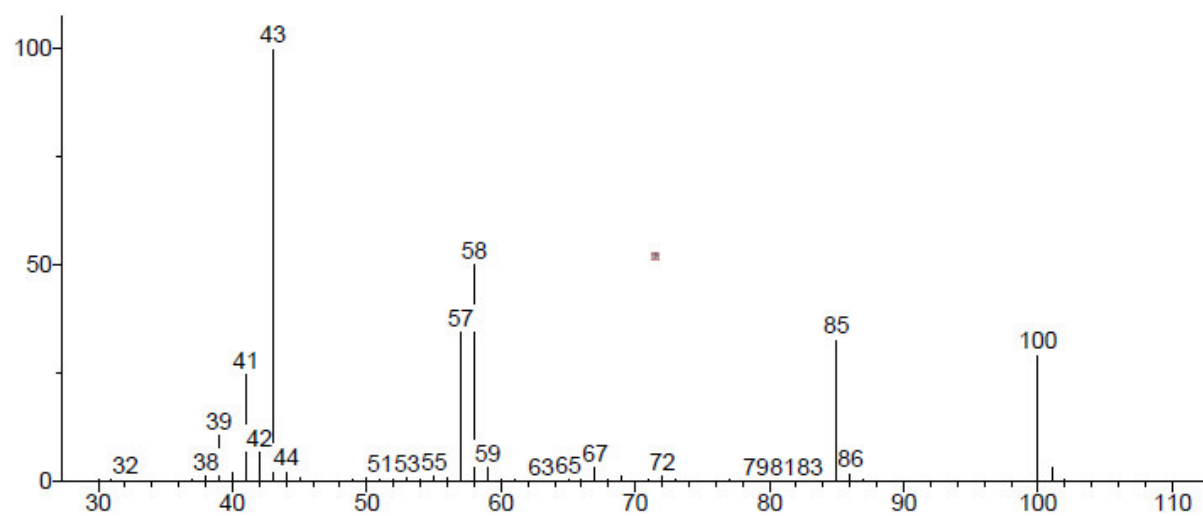


*linalool*

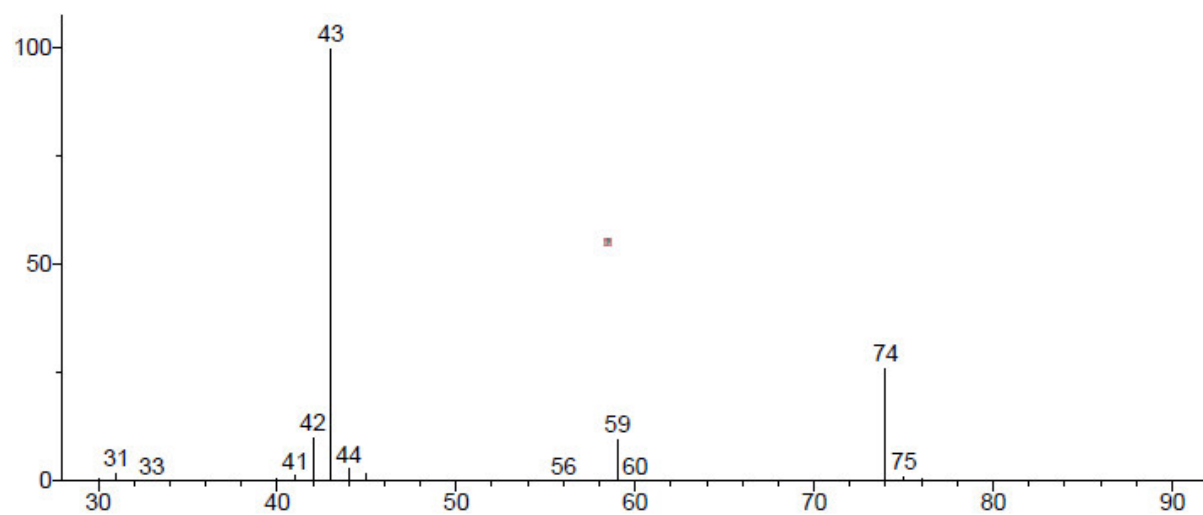


*methanol*

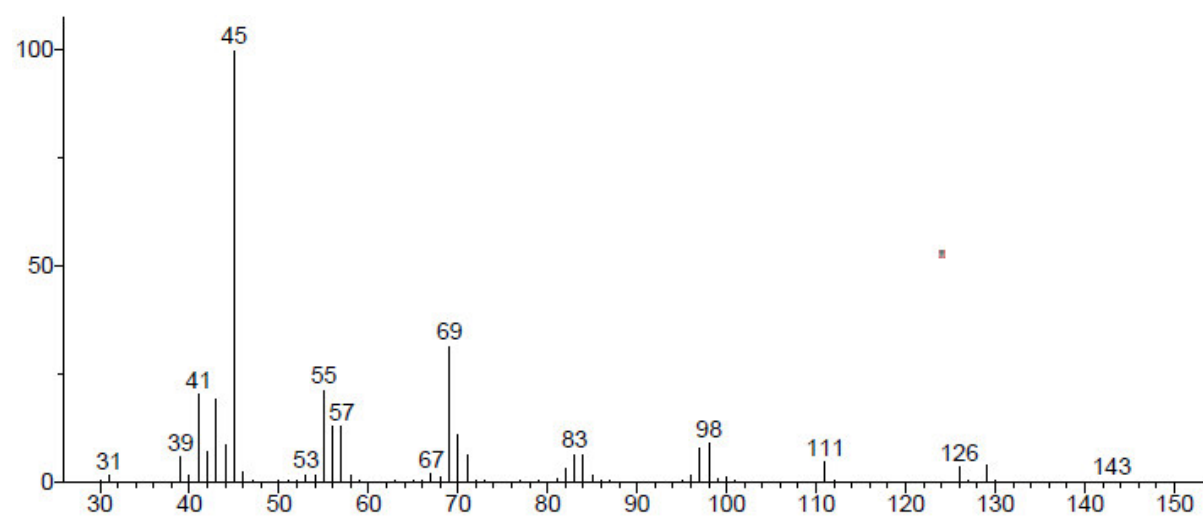
Příloha 15: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*methylisobutylketon*

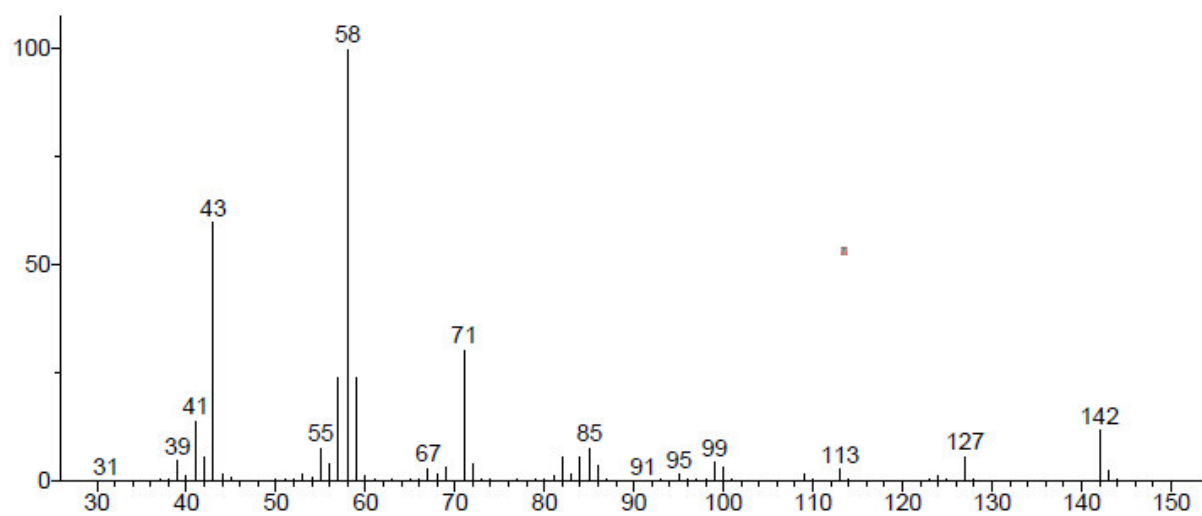


*methylacetát*

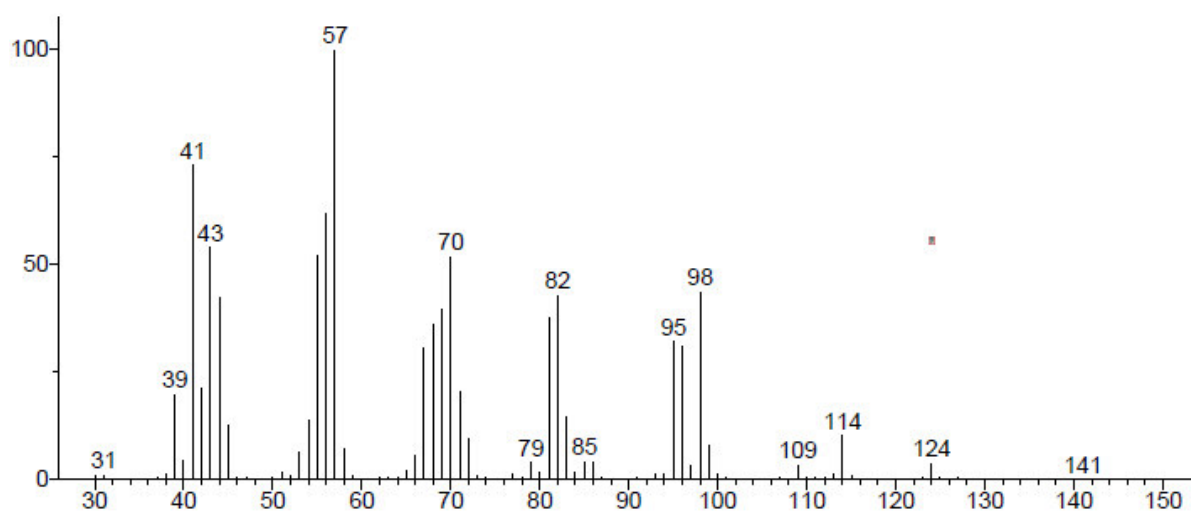


*nonan-2-ol*

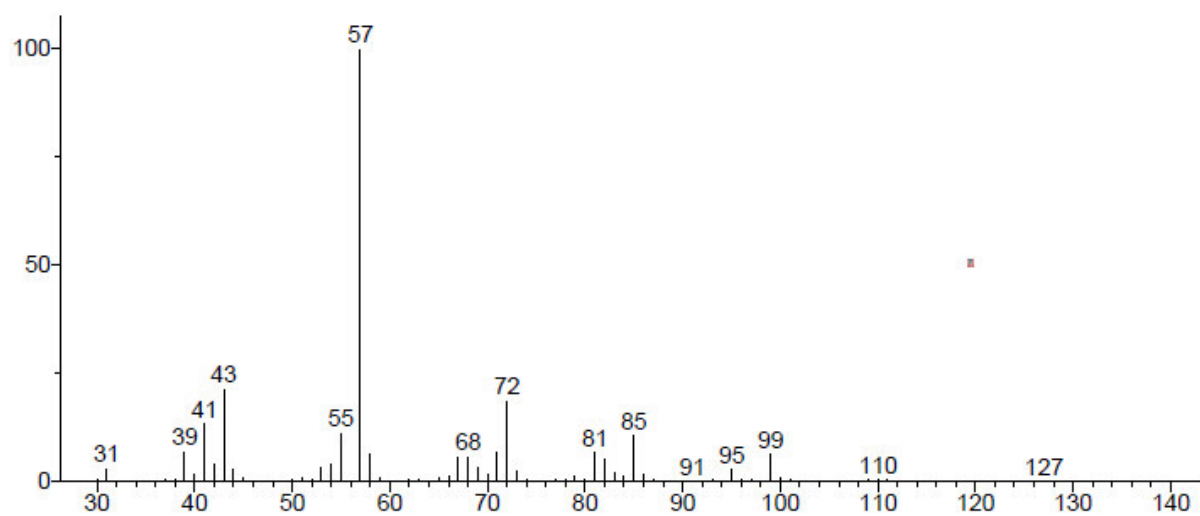
Příloha 16: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*nonan-2-on*

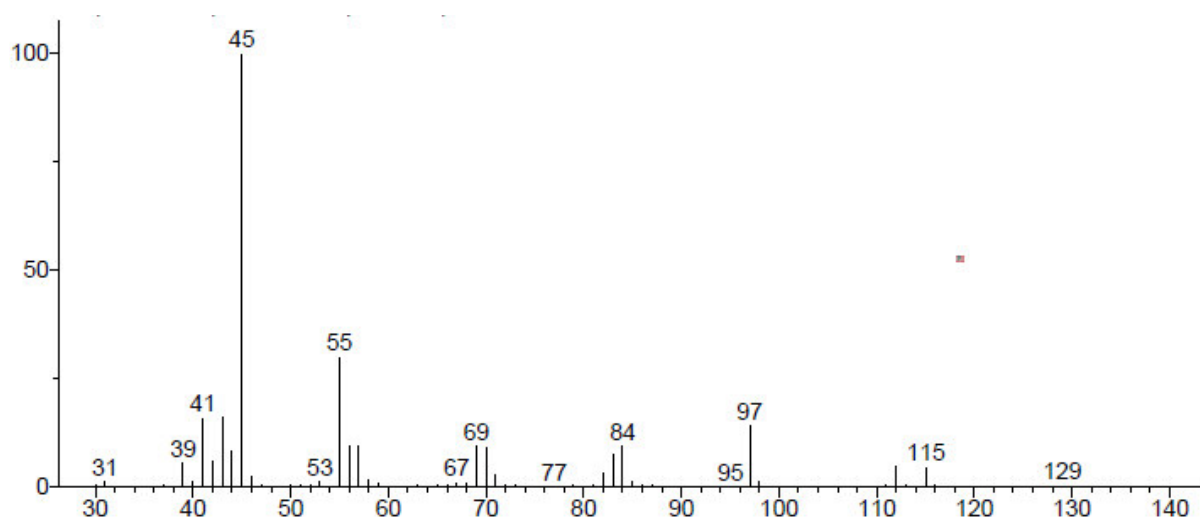


*nonanal*

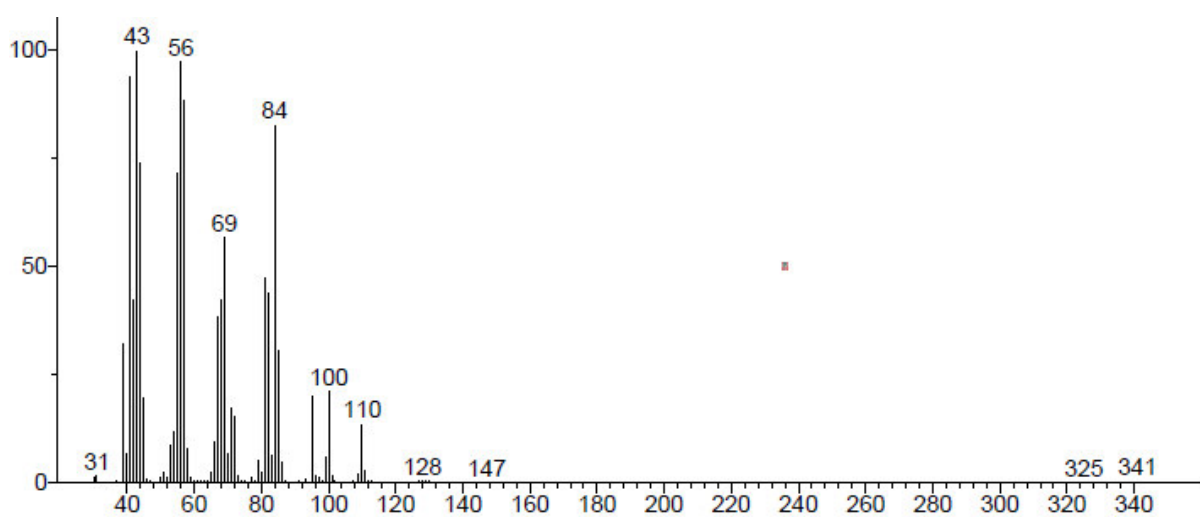


*okt-1-en-3-ol*

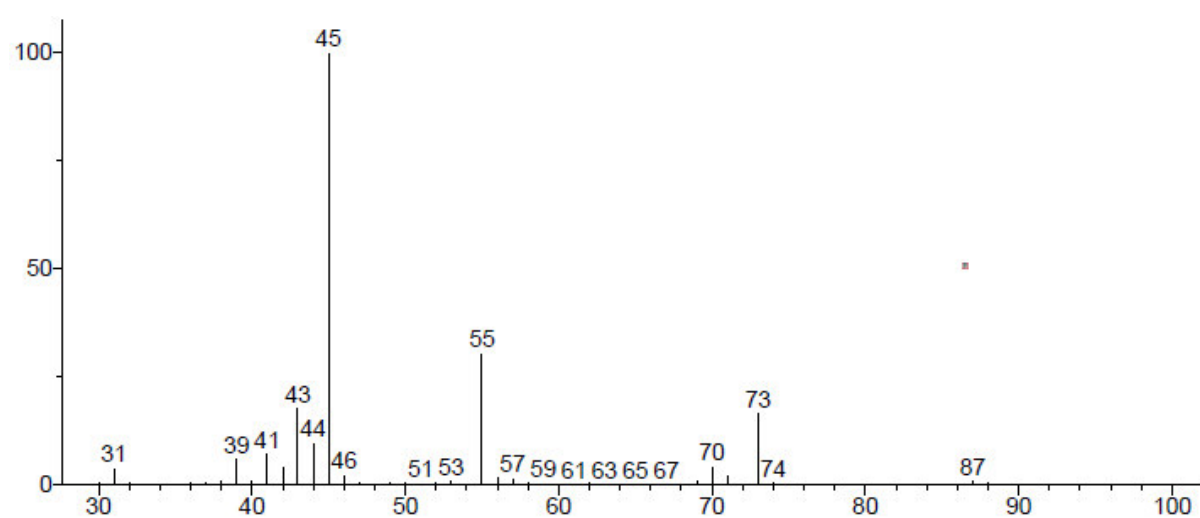
Příloha 17: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*oktan-2-ol*

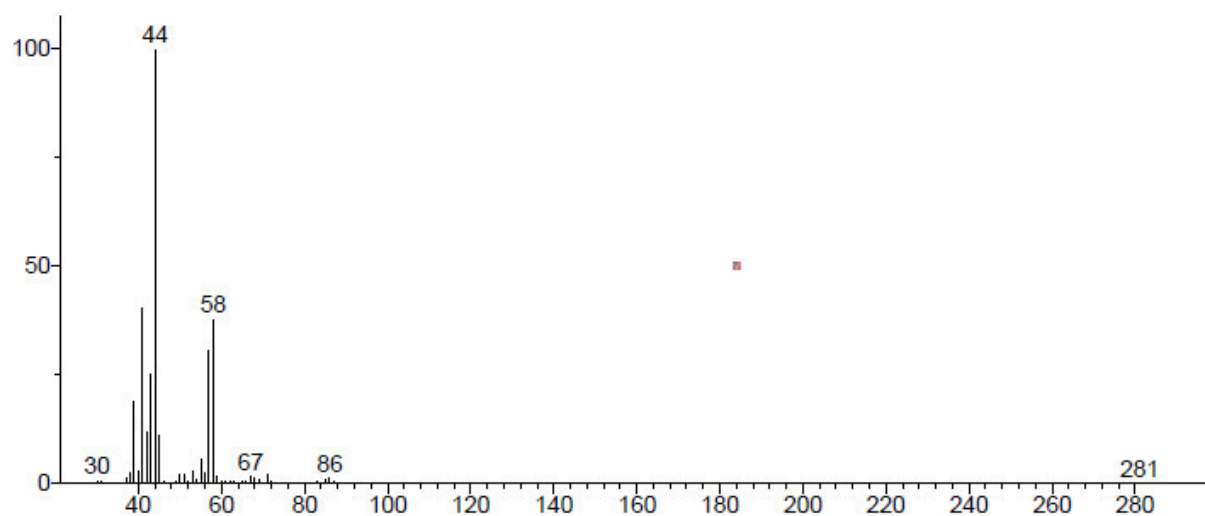


*oktanal*

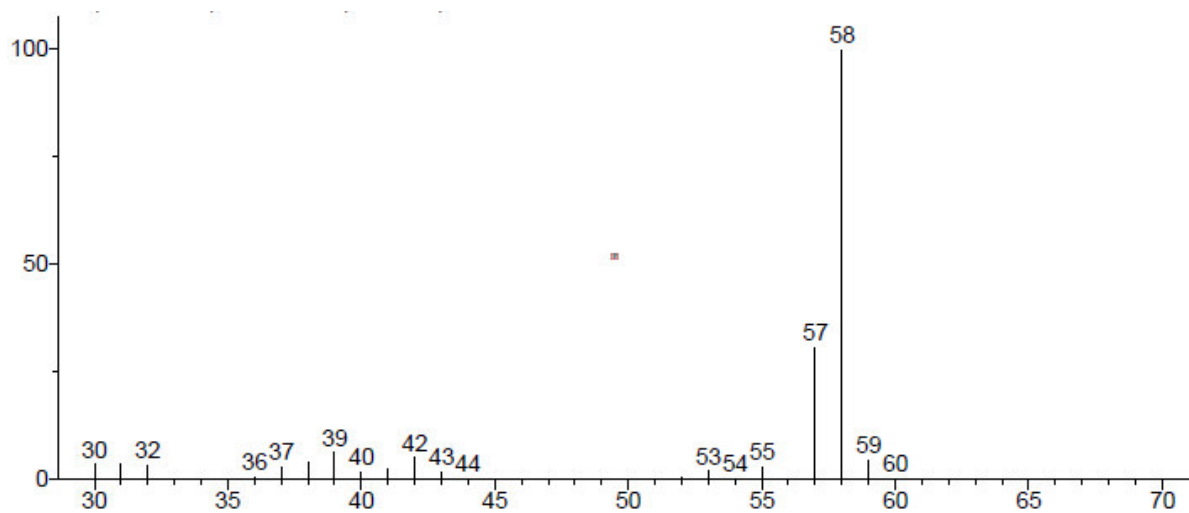


*pentan-2-ol*

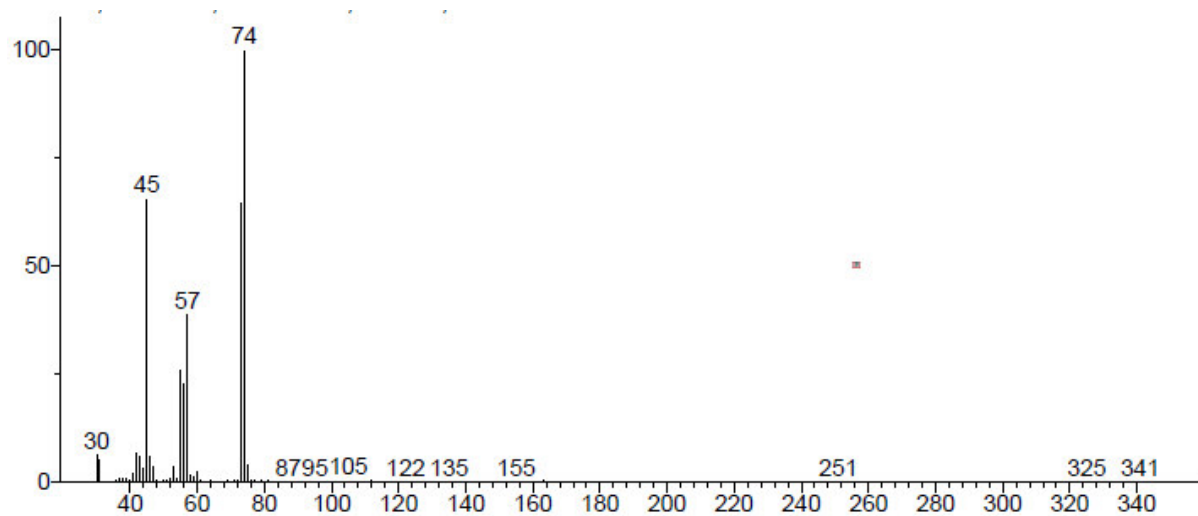
Příloha 18: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*pentanal*

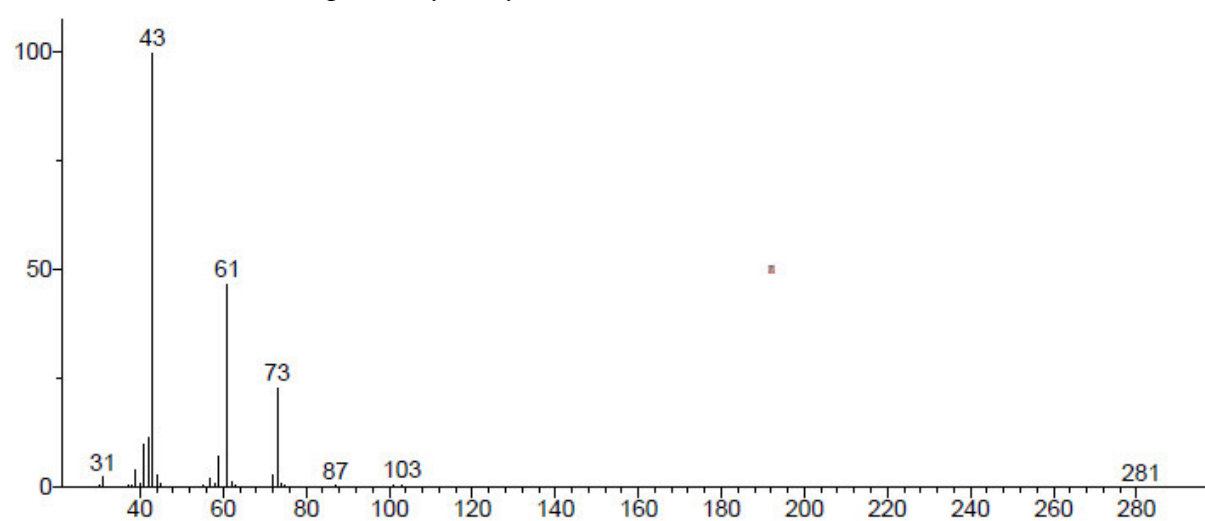


*propanal*

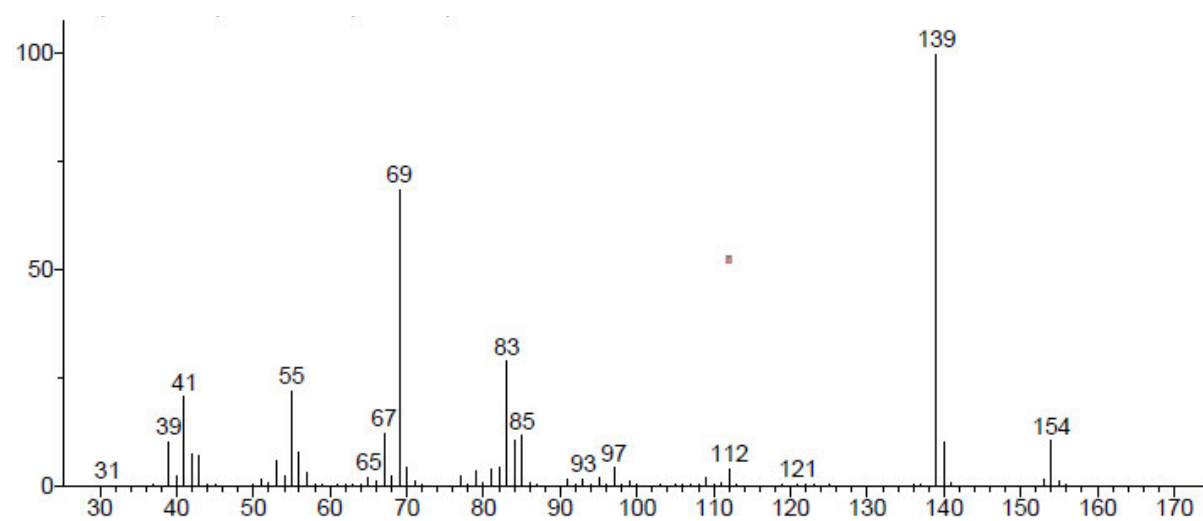


*kyselina propionová*

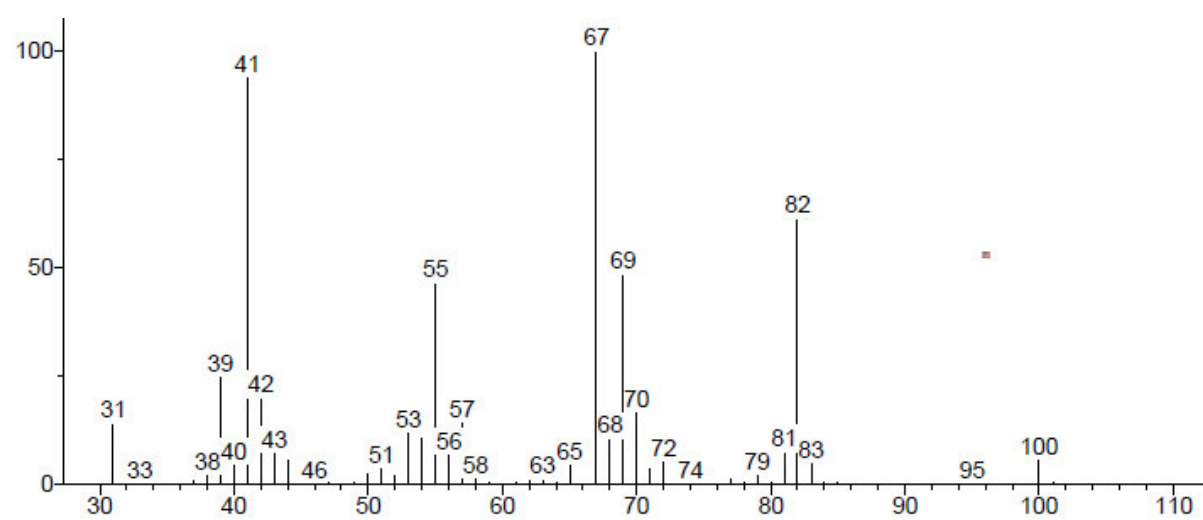
Příloha 19: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*propylacetát*



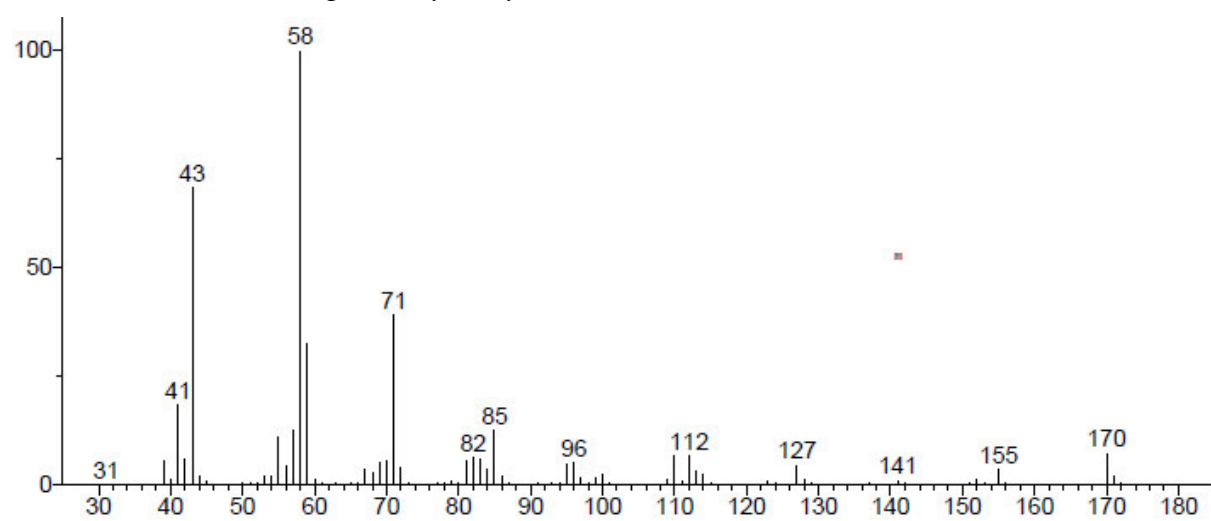
*rose oxid*



*trans-hex-3-en-1-ol*



Příloha 20: Hmotnostní spektra vybraných standardů



*undekan-2-on*