

APLIKACE VYBRANÝCH MIKROEXTRAKČNÍCH TECHNIK NA HEADSPACE ANALÝZU SILIC

Lenka Čížková, Martin Adam, Petr Dobiáš, Karel Ventura

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,

Nám.Čs.legií565, Pardubice, 53010

E-mail: cizlenka@seznam.cz

Úvod

Silice jsou velmi rozmanitou skupinou látek. Jednotná definice jejich chemické podstaty je proto dosti složitá. Lze říci, že silice jsou směsi ve vodě obtížně rozpustných, lipofilních, prchavých látek, které jsou často vonné¹. Ke stanovení obsahu silic pomocí plynové chromatografie lze využít i mikroextrakční metody. Jde především o mikroextrakci tuhou fází (SPME) a mikroextrakci kapalnou fází (SDME).

SPME je jednoduchá a účinná sorpčně - desorpční technika zakoncentrování analytu, která nevyžaduje rozpouštědla ani komplikované aparatury². Principem metody je interakce malého množství extrakční fáze s nadbytkem vzorku. Proces SPME je rozdělen do dvou kroků. Prvním krokem je extrakce analytu na vlákno a druhým desorpce analytu z vlákna. K desorpci dochází nejčastěji v chromatografickém přístroji³. Podstatou SPME je křemenné vlákno pokryté různými typy stacionární fáze, které se liší polaritou i sorpčními vlastnostmi. Bylo prokázáno, že pro zachycení většího množství analytu je důležitá tloušťka vrstvy, její porozita a polarita².

SDME je „téměř“ bezrozpouštědlová technika. Jde o velmi snadnou, levnou a rychlou metodu zakoncentrování analytu⁵. Principem je interakce malého množství extrakční fáze s nadbytkem vzorku. K extrakci analytu ze vzorku dochází sorpcí do kapky o objemu několika mikrolitrů. V SDME dochází k rozdělení extrahované látky mezi dvě nemísitelné fáze⁶. Její dělicí schopnost je dána selektivní rozpustností látek v rozpouštědle. Množství extrahovaného analytu závisí na hodnotě rozdělovací konstanty⁷. U SDME odpadá proces desorpce analytu z extrakční fáze. SDME používá pro každou analýzu vždy nové rozpouštědlo. SPME vlákna jsou používána opakovaně a nezabrání se tak účinku negativních paměťových efektů z předchozí analýzy⁶. Obě metody se používají v kombinaci s plynovou i kapalinovou chromatografií⁸.

Časově nejnáročnějším a nejkritičtějším krokem analytického procesu je vzorkování. Jedna z metod vzorkování je z headspace prostoru. Zde je analyt vzorkován z plynné fáze, a to nad kapalným či tuhým vzorkem. Rovnováha je ustavována v třífázovém systému: extrakční fáze (vlákno, kapka), plynná fáze (headspace) a matrice vzorku. Důležité je optimalizovat podmínky SPME a SDME pro dosažení správných a přesných výsledků. Velkou roli hraje konstantní velikost vzorkovací nádoby a objem vzorku⁹. Též konstantní hloubka ponoru u SPME vlákna, která je zajišťována regulovatelnou jehlou, a výběr vhodného vlákna³ jsou velmi důležité parametry. U SDME lze ovlivnit selektivitu extrakce typem rozpouštědla a objemem kapky¹⁰. Také míchání vzorku, úprava pH, teplota vzorkovací nádoby a dostatečný dlouhý čas extrakce ovlivňuje výsledky u obou metod extrakce^{2,3,4}. Mezi výhody techniky SDME patří její vysoká citlivost, což umožňuje minimalizaci vzorku a extrakci analytu z vysoce znečištěných vzorků.

Jako porovnávací metoda pro obě mikroextrakční techniky se stala metoda destilace s vodní parou. Podstatou této normované metody (ČSN ISO 6571) je destilace vzorku s vodní parou a následné jímání destilátu v kalibrované trubici s odměřeným množstvím xylenu na pohlcení těkavých silic umožňující oddělit organickou a vodní fázi a odečíst celkový objem organické fáze.

Experimentální část

Analyty sorbované na SPME vlákne nebo do mikrokapky rozpouštědla byly separovány a stanovovány na plynovém chromatografu Hewlett–Packard 5890 (Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA). Separace byla prováděna na kapilární koloně Ultra # 2 dlouhé 25 m o průměru 0,32 mm s fenylmethylsilikonem (0,52 μm) jako stacionární fází a teplotním rozsahem – 60 až + 325 °C (HPST s.r.o, Praha, ČR). Pro nástřik analytu sorbovaného do mikrokapky byl použit liner pro analýzu kapalin. Pro desorpci analytu z SPME vlákna byl použit SPME liner, jehož objem je 250 μl . Chromatograf je vybaven plameno – ionizačním detektorem a tepelně vodivostním detektorem. Pro extrakci bylin metodou SPME bylo použito vlákno 50/30 μm DVB/CAR/PDMS Stable Flex (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Jako extrakční fáze u SDME byla použita mikrokapka xylenu (Lach–Ner, s.r.o., Neratovice, ČR) na hrotu jehly GC mikrostřikačky (Hamilton-Bonaduz AG, Bonaduz, Švýcarsko).

U SPME byla prováděna tepelná desorpce extraktu přímo v nástřikovém prostoru plynového chromatografu, a sice 10 min. Na držáku vlákna byla při desorpci nastavena hloubka vsunutí jehly do lineru nástřikového prostoru 2 cm.

Jako nosný plyn byl použit dusík. Desorbovaný analyt byl veden na kolonu s použitím děliče toku 1:10. Analýza vzorku probíhala při konstantním teplotě nástřiku 230 °C, teplotě detektoru 220 °C, přetlaku na vstupu kolony 50 kPa (průtok mobilní fáze 3,15 ml.min⁻¹). Teplota na koloně byla řízena teplotním gradientem uvedeným v tabulce I.

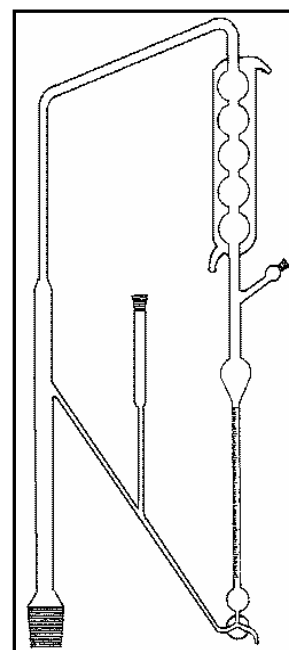
Tabulka I: Teplotní gradient analýz na plynovém chromatografu

teplota [°C]	izoterma [min]	gradient [°C.min ⁻¹]
60	5	2
86	0	20
220	8	0

Pro obě metody byl postup přípravy vzorku stejný. Sušené bylinky byly rozdrceny ve třecí misce a poté naváženy do 10 ml vzorkovacích nádobek (Supelco, Bellefonte, PA, USA) v množství přibližně 0,5 g a uzavřeny víčky se septy potaženým teflonem. Před analýzou byly vzorky temperovány 30 minut v termostatu při teplotě extrakce.

Při SDME bylo septum vzorkovací nádoby propíchnuto jehlou stříkačky, poté byla mikropipetka rozpouštědla vysunuta z jehly do plynného prostoru nad vzorkem. Hloubka vsunutí jehly dovnitř vzorkovací nádoby byla vždy 2 cm. Po uplynutí doby sorpce byla mikropipetka rozpouštědla (2 µl) vtažena zpět do jehly, která byla vytažena ze vzorkovací nádoby a přemístěna do nástřikového prostoru plynového chromatografu. U SPME byl postup stejný, ale místo mikropipetky jako extrakční fáze bylo použito polymerního vlákna chráněného dutou jehlou.

Pro destilaci byla sestavena aparatura viz. obr.1. Do destilační baňky bylo nalito 300 ml destilované vody a přidány varné kamínky proti utajenému varu. Baňka byla napojena na chladicí systém a dělená trubice, jímací baňka a šikmá trubice byly naplněny vodou. Pomocí pipety bylo přidáno postraním ramenem 1 ml xylenu. Destilační baňka byla zahřívána 30 min, pak byl záhřev přerušen. Po ochlazení byl odečten objem xylenu. Zkoušený vzorek byl nasypán do varné baňky a po opětovném napojení chladicího systému byla baňka zahřívána 3-4 hodiny. Po ukončení zahřívání se nechala aparatura zchladnout a bylo odečteno množství organické fáze (směs silic a xylenu). Rozdíl mezi objemem



Obr.1: Chladicí systém pro destilaci s vodní parou.

organické fáze po destilaci a objemem xylenů před destilací odpovídá objemu silic v předloženém vzorku.

Analýza destilátu bylinných silic byla provedena po přímém nástřiku 1 μl destilátu pomocí mikrostřikačky na objem 10 μl (Hamilton-Bonaduz AG, Bonaduz, Švýcarsko). Pro analýzu destilátu byl použit stejný přístroj i podmínky jako pro analýzu extraktu bylinných silic. Analyzované silice a jejich charakteristika je uvedena v tabulce II.

Tabulka II : Retenční časy a fyzikální charakteristiky analyzovaných silic

silice	$t_R[\text{min}]$	$T_V[^\circ\text{C}]$	$\rho[\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}]$	M_R	Sum vzor.
α -pinen	6,1	156-158	0,791	136,23	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$
myrcen	6,5	167	0,858	136,23	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$
eukalyptol	8,2	176-177	0,921	154,25	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$
1,4-cineol	8,8	173	0,9	154,25	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$
limonen	9,3	176-177	0,843	136,24	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$
γ -terpinen	9,6	182	0,85	136,23	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$
α -thujon	12,9	201	0,914	152,23	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$
menthon	14,9	207-210	0,893	154,25	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$
menthol	16,8	212	0,89	156,27	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}$
nerol	19,3	225-230	0,877	154,25	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$
thymol	20,8	232	0,965	150,22	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$
carvacrol	20,9	236-237	0,976	150,22	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$
α -humulen	22,6	166-168	0,889	204,34	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$

Kvantitativní a semikvalitativní obsah silic přítomných ve vzorku byliny byl stanoven pomocí metody standardního přídatku. Byly připraveny dva totožné vzorky, přičemž první z nich byl analyzován samotný a do druhého byly před temperací přidány xylenem ředěné standardy. Volba standardů byla provedena z retenčních časů jednotlivých píků, které byly nalezeny ve vzorcích bylin.

Vyhodnocování výsledků bylo provedeno na integrační stanici CSW 32 (Data Apex Praha, ČR), která umožňuje sběr dat z přístroje. Tato stanice umožňuje provádět integrace ploch a výšek píků, úpravy chromatografů a kalibrace. Dále dovoluje paralelní sběr a zpracování dat. Na každý vstup mohou být zapojeny dva detektory, avšak v provozu nemohou být oba najednou.

Výsledky a diskuze

Ve vzorcích vybraných bylin bylo pátráno po silicích uvedených v tabulce II. Kvalitativní složení silic ve vzorcích bylo určeno pomocí metody standardního přídatku. Retenční časy jednotlivých silic byly zjištěny na modelové směsi standardů, jež byly extrahovány ze vzorkovací nádoby bez byliny a při stejných podmínkách, jako byl analyzovaný vzorek. Pro porovnání a kvantifikaci metod SDME a SPME byly použity stejné

navážky vzorků a stejné vzorkovací nádoby, temperance vzorku byla provedena při teplotě extrakce a po dobu 30 minut. Na plynovém chromatografu bylo pro obě měření ponecháno stejné nastavení.

Na základě analýz extraktů získaných odlišnými technikami byly obě mikroextrakční techniky porovnány z hlediska extrakční účinnosti a selektivity a byly popsány jejich výhody a nevýhody.

Závěr

Metoda mikroextrakce jednou kapkou byla nakonec srovnána s metodou mikroextrakce tuhou fází. Za optimalizovaných podmínek bylo oběma metodami proměřeno několik bylin a podle výsledků analýz byly na základě kvalitativního a kvantitativního zastoupení silic obě jmenované metody porovnány. Podle naměřených obsahů silic lze přisoudit každé metodě různou selektivitu a citlivost na stanovované silice. Dalším rozdílem obou metod byla přehlednost chromatografických záznamů bylin vlivem přítomnosti interferujících látek a v těchto ohledech se lépe kvalitativně vyhodnocují chromatogramy po SPME.

Poděkování

Práce byla provedena díky finanční podpoře grantových projektů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MSM0021627502), Grantové Agentury ČR (203/05/2106) a interního grantu Univerzity Pardubice (FG360002).

Literatura

1. <http://www.biotox.cz>, staženo 11. října 2006
2. <http://www.sigmaaldrich.com>, staženo 16. listopadu 2006
3. Pawliszyn J.: Solid Phase Mikroextraction: Theory and Practice, Wiley – VCH, New York 1997
4. Procházková D.: Chem.Listy 96, 827-852 (2002)
5. Jeannot M. A., Cantwell F.F.: Anal.Chem. 68, 2236-2240 (1996).
6. Li X., Xu X., Wang X., Ma L.: Anal.Chem.84, 633-645 (2004).
7. Palit M., Paradasani D., Gupta A. K., Dubley D. K.: Anal.Chem. 77, 711-717 (2005).
8. Buszewski B., Ligor T.: LC – GC Europe 15, 92-97 (2002).
9. Kataoka H., Heather L. L., Pawliszyn J.: J.Chromatogr.A 880, 35-62 (2000).
10. Szumski M., Buszewski B.: Crit. Rev. Anal.Chem.32, 1–46 (2002).