



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Ústav analýzy potravin a výživy

***LABORATOŘ INSTRUMENTÁLNÍCH METOD
V ANALÝZE POTRAVIN***

Stanovení furanu pomocí SPME-GC-HRMS

Garant úlohy: Ing. Michal Stupák, Ph.D.

VÝUKOVÉ CÍLE LABORATORNÍHO CVIČENÍ

- 1) Prohloubení teoretických a praktických znalostí v oblasti mikroextrakce tuhou fází, plynové chromatografie a vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (SPME–GC–HRMS)
- 2) Demonstrace analytické metody pro stanovení furanů v potravinách
- 3) Výpočet reálné koncentrace furanů ve vybraných vzorcích potravin pomocí metody standardního přídatku

KRITÉRIA HODNOCENÍ PRÁCE

- Znalost základních informací souvisejících s SPME–GC–HRMS instrumentací
- Praktické provedení práce
- Dodržení pravidel pro práci v laboratoři (bezpečnost, čistota, pořádek)
- Protokol – přehlednost experimentálních údajů, výsledky a závěr

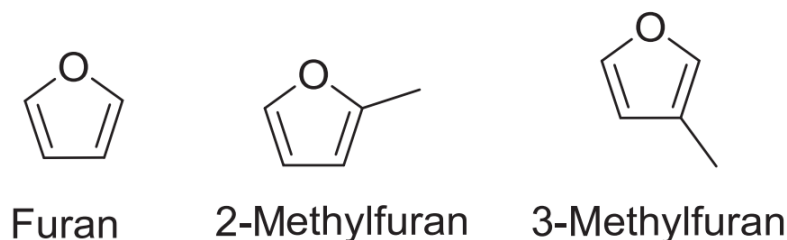
ČASOVÝ HARMONOGRAM PRÁCE

K rok č.	Činnost
1.	Výklad, prozkoušení a diskuse (45 min)
2.	Ukázka přípravy vzorku pro analýzu (10 min)
3.	Nastavení instrumentace GC-HRMS a ukázka vyhodnocení (60 min)
4.	Příprava vzorků (20 min)
5.	Vyhodnocení a zpracování dat (60 min)
6.	Příprava protokolu (30 min, lze vyhotovit též mimo laboratoř, po domluvě s asistentem)

STUDIJNÍ ČÁST

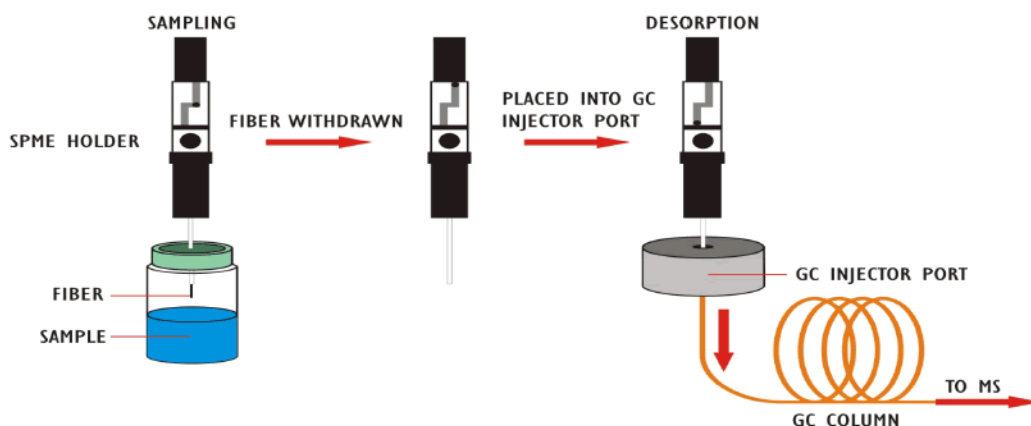
Furan a jeho methylované deriváty (2 a 3 –methylfuran) jsou procesní kontaminant, které vznikají přirozeně během tepelného zpracování potravin z kyseliny askorbové, polyenových nenasycených mastných kyselin, aminokyselin, sacharidů a dalších prekurzorů. Dlouhodobá expozice furanu z potravin může vést až k závažnému poškození jater. Nejvíce exponovanou skupinou populace jsou malé děti, které pravidelně konzumují příkrmy z konzerv nebo ze „zavařených“ sklenic. Ostatní část populace je exponovaná zejména konzumací cereálních produktů a také kávy.

Furan, společně s 2 a 3-methylfurany patří mezi velmi těkavá látky kvůli nízké molekulové hmotnosti (viz. **obrázek 1**) a pro jejich stanovení je tedy vhodná technika mikroextrakce tuhou fází (SPME) ve spojení s plynovou chromatografií (GC) a vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HRMS).



Obrázek 1: Molekulové struktury furanu, 2-methylfuranu a 3-methylfuranu.

SPME je relativně jednoduchá, levná, účinná, rychlá a ekologická vzorkovací metoda pro těkavé a částečně těkavé látky. V této technice je pro extrakci využito vlákno, které je pokryto polymerem různého typu (polydimethylsiloxan, divinylbenzen, carboxen, polyacrylate a polyethylenglycol) nebo směsí polymerů (polydimethylsiloxan/divinylbenzen/carboxen) a podle vlastností analyzovaných látek je vybráno vhodné vlákno s odpovídajícím polymerem o příslušné polaritě, tloušťce a povrchu. Celý proces vzorkování se skládá z následujících kroků: (i) kondicionace vlákna – odstranění nesorbovaných látek z prostředí, (ii) inkubace vzorku – dosažení rovnováhy koncentrací látek v případě „head space“ analýzy mezi vzorkem a prostorem nad vzorkem („head space“, (iii) extrakce vzorku – sorpce analytů na vlákno a (iv) desorpce – desorpce analytů z vlákna do nástřiku plynového chromatografu (viz. **obrázek 2**). V případě ponoření vlákna do kapalného vzorku („direct immersion“) odpadá krok inkubace.



Obrázek 2: ukázka extrakce a desorpce látek pomocí SPME techniky ve spojení s GC-MS

Doporučená literatura:

- <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/171025>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.5005>
- Čajka T., Hajslova J.: *Volatile compounds in food authenticity and traceability testing*. In: Food Flavors: Chemical, Sensory and Technological Properties. H. Jelen (editor), ISBN: 9781439814918, CRC Press (2011) 355–411. (info).
- Hajšlová, J.; Čajka, T. Gas chromatography in food analysis. In Handbook of Food Analysis Instruments; , Ed.; S. Ötleş: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008; pp119–144.
- Hajšlová, J.; Čajka, T. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). In Food Toxicants Analysis; Picó, Y., Ed.; Elsevier B.V., 2007; pp 419–473.

PRAKTICKÁ ČÁST

Náplň a cíl práce

Cílem úlohy je seznámení s analytickou metodou pro stanovení furanu a jeho metylovaných derivátů pomocí SPME-GC-HRMS ve vybraných potravinách. Budete také seznámeni s detailním nastavením techniky SPME, GC a také HRMS (viz **tabulka 1-3**). Vyhodnocení naměřených dat bude probíhat pomocí metody standardního přídávku.

Příprava vzorku

- *Stanovení furanu a jeho metylovaných derivátů v tuzemáku*

Do 10 ml vialky se naváží 1 g NaCl a napipetuje se 1 ml vzorku. Vialka se uzavře magnetickým plynotěsným víčkem tak, aby se víčko neprotáčelo. Takto se připraví vzorek ve čtyřech opakování. Do jednoho vzorku se přidá přes víčko hemiltonovou stříkačkou 50 μ l standard furanu a jeho metylovaných derivátů o koncentraci 0,004 mg/ml a do druhého vzorku se přidá 100 μ l stejného standardu.

- *Stanovení furanu a jeho metylovaných derivátů v kávě*

Do 10 ml vialky se naváží 0,1 g vzorku kávy a napipetují se 2 ml nasyceného roztoku NaCl. Vialka se uzavře magnetickým plynotěsným víčkem tak, aby se víčko neprotáčelo. Takto se připraví vzorek ve čtyřech opakování. Do jednoho vzorku se přidá přes víčko hemiltonovou stříkačkou 150 μ l standard furanu a jeho metylovaných derivátů o koncentraci 0,004 mg/ml a do druhého vzorku se přidá 200 μ l stejného standardu.

Zpracování naměřených dat

V prvním kroku je nutné vypočítat přesné hmoty stanovovaných analytů. V knihovně NIST vyhledejte spektra jednotlivých látek, určete kvantifikační a konfirmační hmoty a vypočítejte přesné hmoty. Určení retenčních časů analytů proveďte pomocí „extracted ion chromatogram (EIC)“ za pomoci přesných hmot. Poté proveďte dekonvoluci a v seznamu detekovaných látek najděte cílové analyty v určených retenčních časech. Po kontrole integrace jednotlivých hmot nakopírujte vypočtenou plochu analytů do souboru MS Excel a proveďte výpočet koncentrací metodou standardního přídávku dle následující rovnice:

$$c_i = \frac{A_i \cdot c_s \cdot V_s}{(A_{is}(V_i - V_s) - A_i \cdot V_i)}$$

c_i —neznámá koncentrace A_i —plocha peaku c_s —známá koncentrace přidaného standardu

V_s —objem přidaného standardu A_{is} —plocha peaku s přidaným standardem V_i —objem vzorku

Chemikálie, spotřební materiál a pomůcky

Deionizovaná voda (Milli-Q, Millipore, USA)

NaCl (Penta Praha, ČR)

Helium 6.0 (Siad, ČR)

Běžné vybavení laboratoře (kádinky, Pasteurova pipeta, navažovací lodička, lžička na chemikálie, 10 ml SPME vialky, ...)

Předvážky AND HF-1200 (A&D Instruments, Japonsko)

Automatická pipeta FINNPIPETTE 1 – 5 ml (Thermo Scientific, USA)

Instrumentace

GC-HRT (LECO Corp., USA)

- Automatický nástřikový systém MPS (Gerstel, Německo)
- Programovatelná pec Agilent 7890B (Agilent Technologies, USA)
- Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr Pegasus HRTOF (Leco Corp., USA)

Použité softwary

MS Search v2.0 (2011, Agilent Technologies, USA)

ChromaTOF (v 5.10., Leco Corp., USA)

Microsoft Office Excel (2013, Microsoft, USA)

Instrumentální metoda

Tab. 1 Parametry SPME:

Vlákno	polydimethylsiloxan/divinylbenzen/carboxen
Teplota extrakce a inkubace	50 °C
Doba inkubace	10 min
Doba extrakce	5 min
Doba desorpce	1 min

Tab. 2 Parametry plynové chromatografie chromatografie:

Kolona	HP-INNOWax (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm; Agilent Technologies)
Nosný plyn:	Helium
Průtok plynu	1 ml / min
Typ nástřiku	Splitless (1 µl)
Teplotní program pece	40 °C po dobu 1 min; 0,5 °C/min do 45 °C, 40 °C/min do 240 °C (10 min)
Teplota transferline	220 °C

Tab. 3 Podmínky hmotnostně-spektrometrické detekce

Ionizace	EI
Teplota zdroje	230°C
Hmotnostní rozsah	25 000 FWHM
Akviziční rychlost	5 spekter/s
Hmotnostní rozsah	40 – 550 <i>m/z</i>

PROTOKOL

- 1) Úvod – skupina, studenti
- 2) EIC vzorku s pozitivním nálezem furanů
- 3) Výpočet a koncentrace furanů v jednotlivých vzorcích
- 4) Závěr (cca jeden odstavec)