

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Veronika Čermáková

**Výzkum stability kalibračních faktorů při GC-FID analýze
kvality alkoholických nápojů metodami vnitřního standardu**

Investigation of calibration factor stability for GC-FID analysis of alcoholic
products quality by internal standard methods

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.
Konzultant: Anton Korban, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15. 4. 2024

Bc. Veronika Čermáková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr. za odborné vedení této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat konzultantovi Antonu Korbanovi, Ph.D. za odborné konzultace, pomoc při shromažďování odborné literatury a při zpracování výsledků této diplomové práce. Především děkuji za vstřícnost a laskavost.

Speciální dík patří RNDr. Michalu Dřevínkovi, Ph.D. za poskytnutí pracovních podmínek vhodných nejen k uskutečnění této diplomové práce, ale i k celému studiu. Velmi děkuji za věnovaný čas, cenné rady a důvěru.

Můj obrovský dík patří v neposlední řadě mému manželovi a rodině za neustálou podporu a povzbuzování.

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se věnuje měření kalibračních faktorů a závislosti jejich stability na experimentálních podmínkách pro účely kontroly kvality a bezpečnosti alkoholických nápojů metodou plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí (GC-FID). Bylo sledováno deset těkavých látek (acetaldehyd, methanol, methyl-acetát, ethyl-acetát, 1-propanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, acetal, 3-methyl-1-butanol) podle právní legislativy Evropské Komise. Tyto cílové látky byly v připravených roztocích analyzovány při 27 rozdílných podmínkách systému. Ke zjištění vlivu jednotlivých parametrů měření na stabilitu kalibračních faktorů byla použita Taguchiho multifaktoriální statistická metoda. Proměnnými měření byly zvoleny složení matrice, koncentrace těkavých látek, teplota GC injektoru, objem nástřiku vzorku, rozdělovací poměr nástřiku a teplota detektoru. Každý z těchto proměnných faktorů nabýval v rámci experimentů jednu ze tří možných hodnot. Relativní faktory odezvy (RRF) pro každou analyzovanou látku byly porovnány u dvou metod vnitřního standardu (IS). V jedné metodě byl využit jako interní standard běžně používaný 1-pentanol a v druhé byl vnitřním standardem ethanol, který představuje hlavní složku všech alkoholických nápojů.

Získané výsledky ukazují, že různé faktory a jejich úrovně mají rozdílný vliv na stabilitu relativních faktorů odezvy. Celková variabilita hodnot byla $13,3 \pm 1,6$ % pro tradiční metodu interního standardu a $7,8 \pm 1,8$ % pro metodu „Ethanol jako IS“. Bylo prokázáno, že při měnících se podmínkách analýzy, poskytuje metoda „Ethanol jako IS“ stabilnější hodnoty RRF. Zavedení této metody do každodenní praxe by mohlo zjednodušit současné postupy měření alkoholických produktů a zvýšit přesnost analýzy.

Abstract

This thesis focuses on measuring calibration factors and the dependence of their stability on experimental conditions for the purpose of quality control and the safety of alcoholic beverages using gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID). Ten volatile compounds (acetaldehyde, methanol, methyl acetate, ethyl acetate, 1-propanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, acetal, 3-methyl-1-butanol) were monitored according to the legal regulations of the European Commission. These target compounds were analysed in prepared solutions under 27 different measurement conditions. Taguchi's multifactorial statistical method was used to determine the influence of individual measurement parameters on the stability of calibration factors. The chosen variables for measurements were matrix composition, concentration of volatile compounds, GC injector temperature, sample injection volume, injection split ratio, and detector temperature. Within the experiments, each of these variable factors took one of three possible values. Relative response factors (RRF) for each analysed compound were compared using two internal standard (IS) methods. One method utilised commonly used 1-pentanol as the internal standard, while in the other, ethanol, the main component of all alcoholic beverages, was used as the internal standard.

The obtained results indicate that different factors and their levels have varying effects on the stability of relative response factors. The overall variability of values was $13,3 \pm 1,6$ % for the traditional internal standard method and $7,8 \pm 1,8$ % for the "Ethanol as IS" method. It was demonstrated that under changing analysis conditions, the "Ethanol as IS" method provides more stable RRF values. The introduction of this method into everyday practice could lead to the simplification of existing procedures for measuring alcoholic products and increase the accuracy of the obtained analytical results.

Klíčová slova

Alkoholické nápoje

Interní standard

Plynová chromatografie

Relativní faktory odezvy

Taguchiho experiment

Key words

Alcoholic beverages

Internal standard

Gas chromatography

Relative response factors

Taguchi experiment

Obsah

1 Úvod	11
2 Teoretická část	13
2.1 Plynová chromatografie.....	13
2.1.1 Dávkovací systémy v plynové chromatografii	13
2.1.1.1 Metody nástřiku kapalných vzorků	14
2.1.1.2 Metody nástřiku plynných vzorků.....	15
2.1.2 Detektory	15
2.1.2.1 Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem	17
2.1.3 Vyhodnocení chromatografické analýzy, vybrané charakteristiky metody ...	18
2.1.3.1 Kvalitativní analýza.....	19
2.1.3.2 Kvantitativní analýza.....	20
2.1.3.3 Relativní faktory odezvy	21
2.2 Taguchiho experiment	23
3 Alkoholické nápoje	24
3.1 Hlavní těkavé sloučeniny alkoholických nápojů a jejich vliv na organismus.....	25
3.1.1 Alkoholy	25
3.1.2 Karbonylové sloučeniny	27
3.1.3 Estery	28
3.2 Legislativa spojená s kontrolou kvality alkoholických nápojů	29
3.3 Metoda „Ethanol jako interní standard“	30
4 Experimentální část	32
4.1 Seznam chemikálií použitých pro přípravu kalibračních roztoků.....	32
4.2 Příprava kalibračních roztoků.....	32
4.3 Instrumentace a podmínky měření	35
4.4 Optimalizace podmínek měření.....	36
4.5 Taguchiho experiment	36
5. Výsledky a diskuse	39
5.1 Optimalizace chromatografických podmínek.....	39

5.2 Měření kalibračních roztoků.....	41
5.3 Hodnoty RRF.....	42
5.4 Taguchiho analýza	47
6 Závěr.....	54
7 Použitá literatura.....	56
8 Přílohy	65
Příloha 1 Taguchiho grafy	65

Seznam zkratek a symbolů

1-pent	1-pentanol
AA	absolutní alkohol
ABV	Alcohol by Volume, objemová procenta alkoholu
ADH	alkoholdehydrogenáza
A_i	plocha píku [mV.min]
ALDH	acetaldehyddehydrogenáza
c_i	molární koncentrace [mol.dm ⁻³]
CNS	centrální nervový systém
δ	interval spolehlivosti
ECD	Electron Capture Detector, detektor elektronového záchytu
EtOH	ethanol
FID	Flame Ionization Detector, plamenový ionizační detektor
F_M	objemový průtok mobilní fáze [ml/min]
FPD	Flame Photometric Detector, plamenově fotometrický detektor
GC	Gas Chromatography, plynová chromatografie
GC-FID	Gas Chromatography - Flame Ionization Detector, plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem
HS	Headspace
IS	Internal Standard, vnitřní standard
isoamylol	3-methyl-1-butanol
k	retenční faktor
LVI	Large Volume Injection, velkoobjemové dávkování
m	hmotnost [kg, g]
min	minuta
MS	Mass Spectrometry, hmotnostní spektrometrie
n	počet měření
PID	PhotoIonization Detector, fotoionizační detektor
PTV	Programmable Temperature Vaporizer, teplotně programovatelný nástřik
RF	Response Factor, odezvový faktor
RRF	Relative Response Factor, relativní odezvový faktor
RSD	Relative Standard Deviation, relativní směrodatná odchylka
s	směrodatná odchylka
SPME	Solid Phase Microextraction, mikroextrakce na pevné fázi
st	standardní roztok
$t_{0,05}$	Studentův koeficient pro interval spolehlivosti 95 %

t'_R	redukovaný retenční čas [min]
TCD	Thermal Conductivity Detector, tepelně vodivostní detektor
t_M	mrtvý retenční čas [min]
t_R	retenční čas [min]
UV	Ultraviolet, ultrafialové
V_R	retenční objem [ml]
w	hmotnostní procenta [%]
WES	Water-ethanol Solution, roztok ethanolu ve vodě
\bar{x}	průměrná hodnota
ρ	hustota [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$]

1 Úvod

Alkoholické produkty hrají významnou roli v potravinářském průmyslu na globální úrovni, a proto podléhají přísnému hodnocení kvality. Závazné postupy analytického hodnocení lihu jsou součástí nařízení Komise Evropského společenství (ES) č.2870/2000 ze dne 19. prosince 2000, kterým jsou stanoveny referenční metody pro rozbor lihovin v zemích Evropské unie. V souladu s tímto nařízením musí být alkoholické produkty podrobeny analýze s cílem zjistit jejich fyzikální a chemické složení a určit jejich organoleptické vlastnosti. Pro určení obsahu organických příměsí v alkoholických nápojích je příslušným nařízením referenční metodou stanovena plynová chromatografie s plamenově ionizační detekcí⁵⁴.

I přes pokroky v metodách a instrumentálních technologiích zůstává analytická kalibrace klíčovým prvkem v oblasti analytické chemie. Představuje zásadní krok v procesu hodnocení koncentrace sledované látky ve vzorku. Kalibrace je nezbytná, protože přístroje používané v chemické analýze poskytují informace ve formě intenzity analytického signálu, která sice koreluje s koncentrací analytu, ale přímo ji nedefinuje. Hlavním cílem kalibrace je co nejpřesněji převést intenzitu signálu na koncentraci analytu a zajistit tak spolehlivé výsledky⁵².

Podle výše uvedeného nařízení se pro kvantifikaci těkavých kongenerů v lihovinách využívá metoda vnitřního standardu⁵⁴. Kalibrace je realizována analýzou standardního roztoku se známou koncentrací látek. Z plochy signálu analytu a interního standardu se určí relativní faktor odezvy RRF, který se následně použije pro výpočet koncentrace měřeného analytu⁴⁴. Před vlastní analýzou musí být tedy roztok interního standardu přidáván jak do standardních roztoků, tak i do měřeného vzorku. Většinou se jedná o proces časově zdlouhavý a hodnoty RRF nemusí zůstat za všech podmínek analýzy konstantní a opakovatelné⁸⁵. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, do jaké míry zůstávají hodnoty RRF stabilní při změně vybraných kontrolních faktorů. Pro navržení efektivního experimentu, který je tvořen kombinací různých úrovní sledovaných

parametrů, byla využita statistická metoda Taguchiho experimentálního designu. Účelem použití této metody bylo najít nezávislé proměnné, které přispívají k variabilitě kalibračních faktorů významným způsobem a nalézt optimální podmínky analýzy, které vedou k robustním hodnotám RRF.

Dalším cílem bylo porovnat dvě metody interního standardu. Při jedné metodě byl interním standardem běžně používaný 1-pentanol, při druhé metodě byl vnitřním standardem ethanol. Ethanol představuje majoritní složku všech lihovin, a proto se nemusí k analyzovanému vzorku ani ke standardním roztokům přidávat zvlášť. Koncentrace těkavých kongenerů musí být dle nařízení uvedena v miligramech na litr absolutního alkoholu. Proto je nutné v daném výrobku stanovit obsah alkoholu a z důvodu přepočtu rovněž jeho hustotu⁵⁴. U metody využívající jako interní standard ethanol tyto kroky odpadají. Z tohoto důvodu se tato metoda jeví jako přesnější, robustnější a časově méně náročná⁸⁵.

2 Teoretická část

2.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC, angl. *Gas Chromatography*) je analytická separační technika, která má významné postavení v analýze těkavých látek v plynném stavu^{1,2}. Je velice využívanou metodou, protože umožňuje stanovení širokého spektra látek při jednoduchém a rychlém provedení analýzy. Poskytuje účinnou separaci i složitých směsí látek a dokáže pracovat s malými množstvími vzorků^{2,3}. Plynová chromatografie je využívána jak v rutinních analýzách, tak i ve výzkumných laboratořích. Nachází široké uplatnění v různých odvětvích chemického, petrochemického⁵ a farmaceutického průmyslu^{3,10}. Standardně se používá pro sledování kvality ovzduší a pro environmentální testování pesticidů¹⁰. Je nepostradatelnou technikou v toxikologii^{6,10} a díky derivatizaci se její aplikace rozšířila také na biomedicínské analýzy⁴. Sehrává významnou roli v potravinářském a kosmetickém průmyslu^{3,4,10} a patří také mezi nejvíce používané instrumentální metody v Celně technické laboratoři¹⁶. Široké uplatnění plynové chromatografie vychází z rozsáhlého výběru dávkovacích systémů a z vysoké variability detekčních možností, což umožňuje provádět kvalitativní a kvantitativní analýzu mnoha chemických látek²².

2.1.1 Dávkovací systémy v plynové chromatografii

Existuje řada technik vpravení vzorku do chromatografického systému. Pro výběr vhodného způsobu nástřiku analyzovaného vzorku se zohledňuje několik kritérií: typ analytické kolony (náplňová, kapilární), fyzikálně-chemické vlastnosti analyzovaných vzorků, množství vzorku, koncentrace stanovovaných analytů, jejich body varu, rozsah těkavostí, tepelná i chemická stálost a pod^{27,28}.

2.1.1.1 Metody nástřiku kapalných vzorků

Pro dávkování kapalných vzorků, mezi které patří zkoumané alkoholické produkty, se používají kalibrované injekční stříkačky nejčastěji o objemu 0,1 µl až 10 µl^{7,18}. Nejuniverzálnější metodou nástřiku vzorku do kapilární kolony je *dávkování s děličem toku (split injection)*. Celý dávkovaný objem vzorku (většinou 0,1 – 2 µl) je injektorem zaveden do vyhřátého lineru, kde dochází k jeho okamžitému odpaření²⁹. Pomocí děliče toku se dostává na kolonu jen definovaný podíl dávkovaného množství, větší část vzorku je společně s nosným plynem odvedena ze systému ven, což pomáhá zabránit přetížení kolony. Tento způsob dávkování je využíván u koncentrovaných, případně i kontaminovaných vzorků. Nízké dávkovací objemy poskytují ostré počáteční zóny a vedou k účinné separaci analytů^{18,20,30,31}.

Dalším způsobem je *dávkování bez děliče toku (splitless injection)*. V tomto případě je nějakou dobu po dávkování vzorku dělič toku uzavřen a do kolony se dostává většina dávkovaného vzorku (1 – 5 µl). Tento způsob nástřiku se využívá při stopových analýzách, při analýze ředěných vzorků a vzorků, které obsahují sloučeniny s relativně vysokým bodem varu. Z důvodu delší doby nanášení vzorku na kolonu (splitless perioda) dochází k rozšíření nástřikové zóny a k silnému chvostování píků, proto je nutná následná refokusace zóny vzorku^{20,27,29}.

Vedle těchto nejpoužívanějších technik existují i další metody nástřiku vzorku. Příkladem je *dávkování do kolony (on-column)*. Jedná se o složitější nástřik prostřednictvím velmi tenké jehly injektoru, který umožňuje zavést celý dávkovací objem vzorku přímo do kolony a k odpaření vzorku dochází v tomto případě až v koloně. Tento typ nástřiku se využívá například při analýze nestabilních látek a je základní metodou nástřiku vzorku v případě použití náplňových kolon. Nevýhodou je možná kontaminace kolony méně těkavými látkami^{18,20}.

Pro analýzu termolabilních sloučenin je vhodný *Teplotně programovatelný nástřik (PTV, angl. Programmable Temperature Vaporizer)*. Vstřikovací port je v místě dávkování vzorku nastaven na nízkou teplotu, zpravidla pod bod varu rozpouštědla. K rychlému zahřátí portu dochází teprve po injektáži vzorku, aby se s rozpouštědlem odpařil i celý vzorek. PTV lze použít v režimu split/splitless a díky tomu je možné analyzovat vzorky s vysokou i nízkou koncentrací analytů. Dalšími možnostmi nástřiku vzorků jsou například velkoobjemové dávkování (LVI, angl. Large Volume Injection) dávkování pyrolýzou nebo termodesorpce^{18,20,27}.

2.1.1.2 Metody nástřiku plynných vzorků

Jednou ze základních metod dávkování vzorku používaných při analýze těkavých látek je technika *headspace* (HS). Je založena na analýze těkavých složek přítomných v plynné fázi, která se nachází nad hladinou kapaliny nebo nad povrchem pevného vzorku^{32,33}.

Rozlišujeme dva základní typy *headspace* techniky, a to statickou a dynamickou *headspace*.

Při *statické headspace* analýze jsou kapalné nebo pevné vzorky situovány v uzavřených plynotěsných nádobkách po dobu potřebnou k ustavení rovnováhy těkavých složek vzorku mezi plynnou fází a kapalnou, případně pevnou fází^{32,34}. Následně je alikvotní část plynné fáze odebrána z nádoby a nástříknuta na analytickou kolonu. Pro dávkování může být použita plynotěsná stříkačka nebo ventilový systém s dávkovací smyčkou^{35,38}.

U *dynamické headspace* proudí nosný plyn nad hladinou vzorku, postupně vymývá všechny těkavé složky ze vzorku a unáší je v plynné fázi do analyzátoru. V praxi se častěji využívá způsob *Purge-and-Trap*, kdy je dávkovací systém opatřen probublávacím zařízením. Probubláváním vzorku jsou těkavé látky extrahovány z roztoku a následně jsou zachyceny v kryogenní nebo sorpční kolonce, která je udržovaná při nízké teplotě. Do mobilní fáze jsou následně zadržené látky desorbovány rychlým ohřátím kolonky^{32,34}.

V současnosti se s oblibou využívá spojení *headspace* techniky s *mikroextrakcí na pevné fázi* (HS-SPME, angl. *Solid Phase MicroExtraction*). SPME je pokroková metoda univerzální pro mnoho aplikací s možností automatizace. Principem techniky je sorpce analytů na křemenné vlákno s modifikovaným povrchem z plynné fáze nad kapalným či pevným vzorkem. Pro vlastní sorpci se může využít jak adsorpčních tak absorpčních procesů. Poté jsou zachycené analyty desorbovány z vlákna na analytickou kolonu plynového či kapalinového chromatografu. Mezi hlavní výhody SPME se řadí eliminace rozpouštědel a možnost opakovaného použití vláken. Technika SPME se s výhodou používá zejména pro stopovou analýzu látek^{36,37}.

2.1.2 Detektory

Jedním z nejběžněji používaných detektorů v plynové chromatografii je plamenově ionizační detektor (FID, angl. *Flame Ionization Detector*). V souladu s nařízením Komise ES byla tato detekční technika použita pro analýzu těkavých látek v této diplomové práci a podrobněji je jí věnována následující kapitola 2.1.2.1.

Nejstarším detektorem používaným v GC je tepelně vodivostní detektor (TCD, angl. *Thermal Conductivity Detector*). Je vybaven dvěma vlákny, která jsou žhavana stálým elektrickým proudem. Jedno vlákno je umístěno před nástřikovou hlavou a slouží jako referentní pro čistý nosný plyn. Druhé vlákno, umístěné na výstupu kolony, je měrné a

proudí přes něj plyn z kolony. Složka přítomná v mobilní fázi mění její tepelnou vodivost, a to vede k změně teploty a elektrického odporu měrného vlákna. Elektrické odpory obou vláken se porovnávají ve Wheatstoneově můstku^{7,18,19}. Jedná se o univerzální detektor s širokým lineárním dynamickým rozsahem, ale relativně nízkou citlivostí¹⁰. Používá se pro analýzu anorganických plynů a organických látek s nízkou molekulovou hmotností¹⁸. TCD lze využít i pro analýzu některých látek, které neposkytují odezvu v plamenově ionizačním detektoru, např. stanovení oxidu uhličitého⁶⁶.

Citlivou detekci sloučenin obsahujících elektronegativní funkční skupiny, jako jsou například halogeny, nitroskupiny nebo peroxidy, poskytuje detektor elektronového záchyty (ECD, angl. *Electron Capture Detector*)⁷. Uvnitř detektoru se nachází radioaktivní β zářič (obvykle ⁶³Ni) emitující rychlé elektrony, které ionizují nosný plyn, čímž dochází k emisi pomalých (termálních) elektronů a k tvorbě konstantního proudu. Termální elektrony jsou zachycovány elektronegativními atomy, tím dochází k poklesu jejich počtu a tedy i k poklesu intenzity protékajícího elektrického proudu^{10,13,18}. Pro vysokou selektivitu k halogenovaným organickým látkám, jako jsou pesticidy, polychlorované bifenyly apod., se stal ECD jedním z nejvíce používaných detektorů při analýzách vzorků životního prostředí¹⁹.

Dalším detektorem využívaným v GC je plamenově fotometrický detektor (FPD, angl. *Flame Photometric Detector*), který je založený na specifické emisi světla o určité vlnové délce při hoření látky obsahující heteroatomy ve své molekule. Umožňuje vysoce selektivní detekci látek s fosforem či sírou ve své struktuře a proto se používá pro jejich stopovou analýzu v komplexních maticích vzorků životního prostředí, pro analýzu vzorků potravin nebo pro analýzu plynů s obsahem síry^{19,39,40}.

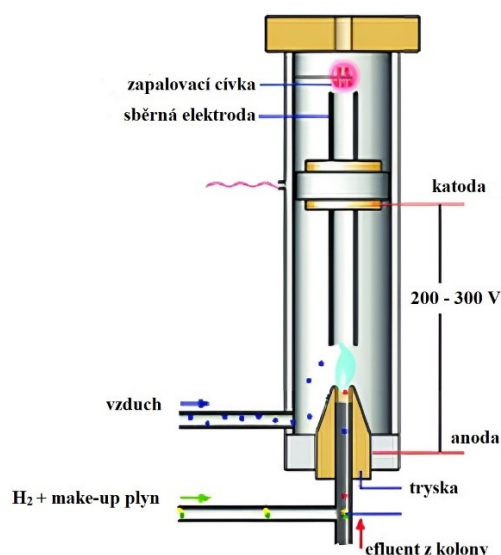
U fotoionizačního detektoru (PID, angl. *PhotoIonization Detector*) jsou eluované molekuly ionizované v ionizační komůrce UV zářením, jehož zdrojem je UV lampa o vysoké energii. Vzniklý proud je úměrný koncentraci eluované složky. Jedná se o vysoce citlivý detektor vhodný pro analýzu sloučenin ionizovatelných UV zářením, jako jsou například organické látky, kyslík, sulfan, amoniak^{18,40}.

V současné době se v praxi stále častěji využívá spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí GC-MS (MS, angl. *Mass Spectrometry*). Tato tandemová metoda umožňuje separaci látek ze složitých směsí a jejich identifikaci v jedné analýze⁴¹. Během analýzy jsou neutrální molekuly vzorku unášeny nosným plynem systémem plynového chromatografu, kde dochází k jejich separaci. Následně vstupují do detektoru, kterým je hmotnostní spektrometr. V iontovém zdroji hmotnostního spektrometru dochází k jejich ionizaci. Vzniklé ionty jsou pak separovány v hmotnostním analyzátoru podle jejich poměru hmotnosti a náboje a následně jsou detekovány. Výsledkem měření je chromatogram, který poskytuje kvalitativní i kvantitativní data analýzy a hmotnostní

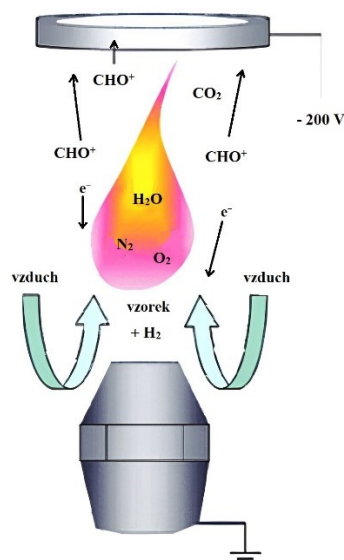
spektrum, které slouží k identifikaci neznámých analytů a poskytuje informace o struktuře a z ní vyplývajících chemických vlastnostech molekul⁴³. Výhodou této techniky je možnost porovnání získaného hmotnostního spektra s knihovnou spekter¹⁹. Je vhodná pro méně polární a těkavé termostabilní látky⁴¹. Pro svou vysokou citlivost a schopnost detekovat i velmi malé množství látek se stala nezastupitelnou technikou při stopové analýze organických sloučenin a je nejvýkonnějším nástrojem pro analýzu komplexních směsí organických a biochemických molekul^{6,7}. Hmotnostně spektrometrický detektor se řadí mezi nejuniverzálnější detektory v GC⁷. Aplikační oblast GC-MS je široká a uplatnění této techniky nacházíme v analytických laboratořích mnoha průmyslových odvětví. Standardně se používá v toxikologických laboratořích, kde umožňuje identifikaci a kvantifikaci návykových a dopingových látek. V potravinářském průmyslu je využívána pro analýzu těkavých látek ovlivňujících chuť a vůni potravin a rovněž se uplatňuje při hodnocení trvanlivosti potravin. V oblasti ekologie je účinným nástrojem stopové a ultrastopové analýzy polutantů ve vzorcích ovzduší, vod a půd⁴².

2.1.2.1 Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem

Jedná se o široce využívanou techniku pro kvantitativní analýzu organických látek na bázi uhlíku. Principem detekce je spalování organických sloučenin eluovaných z kolony v plamínku vodíku a vzduchu, který má minimální vodivost, protože obsahuje velmi málo iontů. Tepelná energie plamene způsobí štěpení chemických vazeb detekovaných sloučenin, což vede k tvorbě nestabilních radikálů $\cdot\text{CH}$. Ty rychle reagují s kyslíkem za vzniku nabitých částic CHO^+ a elektronů. Vzniklé částice s nábojem zprostředkují vedení elektrického proudu mezi dvěma elektrodami (jednu elektrodu tvoří samotný hořák, druhá sběrná elektroda je umístěna nad plamenem), na které je vloženo napětí asi 300 V (Obr. 2.1 a Obr. 2.2). Vzniklý proud je následně zesílen vysokoimpedačním zesilovačem a zpracován^{18,20,21,22}.



Obrázek 2.1: Schéma plamenového ionizačního detektoru, (Převzato z ²¹).



Obrázek 2.2: Vznik nabitých částic v plamenovém ionizačním detektoru, (Převzato z ²¹).

Plamenový ionizační detektor představuje výkonný detektor vynikajících kvalit – poskytuje vysokou citlivost (mez detekce se pohybuje v pikogramech uhlíku za sekundu), nízkou úroveň šumu a velmi široký lineární dynamický rozsah (10^7). Rušivé faktory, jako jsou například teplota detektoru nebo změny průtoku mobilní fáze, mají na odezvu detektoru jen nepatrný vliv^{7,21}. Detektor generuje signál pro širokou škálu organických sloučenin, přičemž intenzita signálu roste pouze s počtem uhlíkových atomů poskytujících ionty CHO^+ , tzv. efektivních uhlíkových atomů. Atomy uhlíku, které jsou vázané s kyslíkem dvojnou vazbou (CO , CO_2 , HCOOH apod.) signál neposkytují. To platí také pro většinu anorganických plynů (SO_2 , NH_3 apod.), některé oxidy dusíku (NO , N_2O apod.) a vodní páru. Voda a heteroatomy můžou v důsledku rekombinančních reakcí způsobit pokles odezvy detektoru^{7,13,18,20,23,24,25}. Nevýhodou plamenového ionizačního detektoru je jeho destruktivní charakter a nutnost použití dodatečných plynů s regulátory tlaku. Mezi další nevýhody se řadí také skutečnost, že vodík je hořlavý a se vzduchem tvoří výbušnou směs. Z bezpečnostního hlediska proto může používání vodíku představovat určité riziko^{7,26}.

2.1.3 Vyhodnocení chromatografické analýzy, vybrané charakteristiky metody

Výsledkem chromatografické analýzy je chromatogram, což je grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase. Chromatogram poskytuje informace o složení

analyzované směsi, o kvantitativním zastoupení jednotlivých složek a také o separační účinnosti chromatografického systému⁸.

2.1.3.1 Kvalitativní analýza

K identifikaci látek ve směsi rozdělených plynovou chromatografií slouží retenční časy nebo retenční objemy. Chromatografické píky reprezentují separované složky směsi a v ideálním případě mají symetrický tvar Gaussovy distribuce a navzájem se nepřekrývají⁹.

Mezi základní retenční charakteristiky patří:

Retenční čas t_R [min] odpovídá celkovému času, který stráví složka v koloně. Z chromatogramu je odečítán jako vzdálenost od nástřiku vzorku do zaznamenání maxima příslušného chromatografického píku detektorem.

Retenční objem V_R [ml] je objem nosného plynu potřebný k eluci složky při *objemovém průtoku mobilní fáze* F_M [ml/min] a je vyjádřený vztahem:

$$V_R = F_M \cdot t_R \quad (2.1)$$

Retenční čas se dělí na čas, kterým se analyt pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze, tj. retenční čas analytu, který není v koloně zadržován – *mrtvý retenční čas* t_M [min] a čas, který analyt stráví se stacionární fází – *redukovaný retenční čas* t'_R [min], podle vztahu:

$$t_R = t_M + t'_R \quad (2.2)$$

Retenční faktor k je parametr pro určení retenčních vlastností analytu. Je to poměr času, který analyt stráví ve stacionární fázi a v mobilní fázi. Charakterizuje separaci z hlediska rychlosti a často se používá k porovnání, jak rychle se analyty pohybují v různých kolonách. Optimálně se hodnota retenčního faktoru pohybuje v rozmezí 1 až 5 a závisí na teplotě a typu kolony^{7,9,10,11,12}.

$$k = (t_R - t_M)/t_M = t'_R/t_M \quad (2.3)$$

Retenční charakteristiky nejsou neměnnou vlastností analytu. Jsou výsledkem specifické interakce analyzované složky se stacionární a mobilní fází v daném chromatografickém systému. Při kvalitativní analýze se proto srovnávají retenční data neznámé látky s retenčními daty standardních látek analyzovaných za stejných experimentálních podmínek^{9,13}.

2.1.3.2 Kvantitativní analýza

Zjištění kvantitativního zastoupení analytů ve vzorku je založeno na porovnání ploch nebo výšek chromatografických píků stanovovaných složek a standardů o známé koncentraci. Plocha píku je nejpřesněji určována počítačovou integrací. Kvantitativní vyhodnocení na základě výšky se v praxi využívá jen minimálně, a to pouze u symetrických a úzkých píků. Při stanovení obsahu analyzovaných komponent se vychází z vlastností použitého detektoru¹⁴.

Pro kvantitativní vyhodnocení jsou běžně používány metody:

Metoda vnějšího standardu – Jedná se o univerzální metodu, která je založena na experimentálním zjištění relace mezi množstvím vzorku a jeho odezvou zkoušeného a porovnávacího roztoku. Vzorek a standardy jsou připravovány odděleně. Nevýhodou této metody je nutnost dodržení přesných objemů dávkovaných vzorků a vliv matricových efektů.

Metoda standardního přídávku – Provádí se nástřik samotného vzorku a vzorku s přidaným známým množstvím čisté stanovované složky. Z odezvy obou nástřiků lze vypočítat množství látky v původním vzorku za předpokladu lineární závislosti odezvy na koncentraci analytu. Používá se metoda s jedním přídávkem standardu nebo metoda násobných přídávků.

Metoda vnitřní normalizace – U této metody je zjišťován podíl ploch píků stanovovaných látek k celkové ploše všech detekovaných píků. Množství dané látky se pak vyjadřuje jako relativní frakce z celku. Základním předpokladem pro použití této metody je separace a následná detekce všech složek. Výhodou této metody je, že není potřeba znát přesné objemy dávkovaných vzorků.

Metoda vnitřního standardu – Vnitřní standard (IS, angl. *Internal Standard*) je referenční látka s přesně známou koncentrací, která je chemicky a fyzikálně podobná stanovovaným analytům. Tato látka musí poskytovat samostatný pík v blízkosti píků analyzovaných složek ve vzorku. Vnitřní standard je přidáván jak k analyzovanému roztoku standardu, tak k analyzovanému roztoku neznámého vzorku. Tato metoda má několik výhod. Zejména není citlivá na přesnost dávkovaného objemu vzorku při nástřiku. Dále použití vnitřního standardu odstraňuje vlivy změněných pracovních podmínek (složku, kterou stanovujeme, i IS ovlivní tato změna stejnou měrou).

2.1.3.3 Relativní faktory odezvy

Jak již bylo zmíněno, pro kvantitativní analýzu se v GC nejběžněji vychází z plochy píku, která představuje odezvu detektoru na analyzovanou sloučeninu. Poměr mezi odezvou detektoru A_i a koncentrací i -té analyzované sloučeniny c_i je charakterizován jako faktor odezvy (RF, angl. *Response Factor*), platí tedy⁴⁴:

$$RF = A_i/c_i \quad (2.4)$$

V důsledku změn v analytickém systému způsobených vlivem různých faktorů, jako jsou dávkování vzorku, variace v instrumentálním nastavení a v podmínkách na koloně (split, teplotní program, průtok nosného plynu) může docházet k odchylkám v odezvoém faktoru⁷. Hodnoty RF jsou ovlivněny rovněž typem detektoru, a také vlastnostmi analyzovaných sloučenin^{44,46}. Možným způsobem, jak překonat variability faktoru odezvy, je kalibrace GC systému metodou vnitřního standardu a použití relativních faktorů odezvy (RRF, angl. *Relative Response Factors*). Na hodnotu RRF může mít vliv druh detektoru, vlastnosti sloučenin a zvolená referenční látka. Změny v chromatografickém systému a změny, ke kterým dochází v průběhu času, by na hodnotu RRF neměly mít zásadní vliv⁴⁶. RRF je možné předem určit z experimentálně získaných dat, z poměru ploch (nebo výšek) píků referenční látky a vnitřního standardu, jejichž koncentrace jsou známé⁴⁴, podle vztahu:

$$RRF_i^{IS} = \frac{c_i^{st}}{A_i^{st}} \cdot \frac{A_{IS}^{st}}{c_{IS}^{st}} \quad (2.5)$$

kde A_i^{st} a A_{IS}^{st} jsou plochy píku i -té složky a vnitřního standardu v standardních roztocích, c_i^{st} a c_{IS}^{st} jsou koncentrace i -té složky a vnitřního standardu. V literatuře je někdy uváděn i výpočet pro RRF v obráceném poměru koncentrace a plochy pro i -tou složku i vnitřní standard, na rozdíl od tradičního zápisu znázorněného ve vztahu (2.5). Pro analýzu látek nemá zvolený typ výpočtu žádný vliv⁴⁷.

Hodnota RRF může být následně použita pro výpočet hledané koncentrace cílové látky v měřeném vzorku pomocí vztahu:

$$C_i^{test} = RRF_i^{IS} \cdot \frac{A_i^{test}}{A_{IS}^{test}} \cdot C_{IS}^{test} \quad (2.6)$$

kde C_i^{test} je hledaná koncentrace i -té složky v analyzovaném vzorku, C_{IS}^{test} je koncentrace vnitřního standardu v analyzovaném vzorku, A_i^{test} a A_{IS}^{test} jsou plochy píků i -té složky a vnitřního standardu v analyzovaném vzorku.

Z výše uvedeného vyplývá, že při měření RRF tímto experimentálním způsobem je nutné mít k dispozici standardy všech látek, které mají být kvantifikovány⁴⁷. To může představovat problém u komerčně nedostupných látek nebo u látek nestabilních^{45,46}. Z tohoto důvodu a rovněž z důvodu časové náročnosti experimentálního měření RRF pro každou složku analyzované směsi byly navrženy i další způsoby pro získání RRF⁴⁷.

Jednou z alternativních možností je *Databáze faktorů odezvy*, která shromažďuje RRF získané za stejných chromatografických podmínek. Výhodou databáze je úspora času, protože RRF stačí měřit pouze jednou a zároveň hodnoty RRF vykazují reprodukovatelnost mezi jednotlivými přístroji, stabilitu v čase a relativní robustnost při změnách podmínek analýzy⁴⁵. Databáze faktorů odezvy ovšem opět neřeší problém při analýze nedostupných sloučenin. Tyto látky musí být pro získání RRF obtížně syntetizovány. Proto byla snaha vyvinout další způsoby, jak získat hodnoty RRF, se zaměřením zejména na jejich predikci^{45,47}.

Empirický model, *Efektivní uhlíkové číslo*, vychází ze skutečnosti, že u těkavých organických látek je odezva FID obecně úměrná počtu jejich uhlíků s nižším příspěvkem částečně oxidovaných uhlíků⁴⁷. Ve skutečnosti se vlastně jedná o poloempirickou metodu, protože v případě, že sloučenina obsahuje novou a nepopsanou funkční skupinu, musí být přesto příspěvek oxidovaných uhlíků stanoven experimentálně⁴⁵.

Další skupinou prediktivních metod jsou teoretické modely:

- *Kvantitativní korelace mezi strukturou a vlastnostmi látek*, kdy jsou RRF odhadnuty na základě deskriptorů odvozených výhradně z molekulární struktury, bez ohledu na to, zda je sloučenina k dispozici či nikoli. V důsledku široké škály funkčních tříd a rozmanitosti struktur látek vyskytujících se v chemii zahrnuje tento model rozsáhlý a velmi složitý soubor parametrů, v některých případech zahrnující předchozí výpočet efektivního uhlíkového čísla^{45,47}.
- *Předpověď na základě spalovacích entalpií*, předpověď RRF vychází z termodynamických charakteristik hoření, ke kterému dochází ve FID a z molekulového vzorce sloučeniny. Bylo zjištěno, že na základě hodnot entalpií předvídatelných z molekulových vzorců, je možné předpovědět hodnoty RRF přímo z počtu různých atomů sloučeniny⁴⁵.

2.2 Taguchiho experiment

Metoda Taguchi, známá také jako Taguchiho multifaktorová analýza, je statistická optimalizační technika používaná v různých oblastech (inženýrství, strojírenství, biotechnologiích, marketingu a reklamě) ke zlepšení kvality produktů a výkonnosti procesů⁸⁶. Taguchiho experiment vyvinul japonským inženýr a statistik Genichi Taguchi. Zahrnuje systematický přístup k optimalizaci procesu tím, že se mění vstupní faktory (nezávislé proměnné) k určení jejich vlivu na výstup (závislou proměnnou) a současně minimalizuje variabilitu a identifikuje nejlepší kombinaci faktorů⁶¹. Taguchiho metoda zahrnuje použití ortogonálních polí, která odhadují vliv jednotlivých faktorů na průměr a variabilitu odezvy. Ortogonální pole udává vyváženost návrhu, každý faktor má stejnou váhu. Proto lze každý faktor hodnotit nezávisle na ostatních⁸⁸. Místo toho, aby se testovaly všechny možné kombinace, testuje Taguchiho metoda dvojice kombinací. To umožňuje shromáždit potřebná data a určit, které faktory nejvíce ovlivňují výsledek s minimálním množstvím experimentů, čímž se šetří čas a zdroje^{61,86}. Také vychází z předpokladu, že lze kontrolovat pouze některé faktory, které určují variabilitu hodnoty. Některé kontrolovat nelze, ty se nazývají šumové faktory. V Taguchiho návrhu tedy identifikujeme řídicí kontrolovatelné faktory, ty se mění tak, aby se zjistilo optimální nastavení řídicích faktorů a eliminovaly šumové faktory. Výsledek bude konzistentní s minimálním vlivem prostředí⁸⁸.

V plynové chromatografii (GC) lze Taguchiho metodu použít k optimalizaci experimentálních podmínek, jako je např. teplota kolony, průtok a objem vzorku⁸⁷.

3 Alkoholické nápoje

Jako alkoholické nápoje jsou definovány nápoje s obsahem minimálně 0,5 objemových % ethanolu⁴⁹. Alkoholické nápoje, kde ethanol tvoří nejméně 15 objemových %, se nazývají lihoviny⁵⁰. Do této skupiny se neřadí pivo a víno. Alkoholické produkty představují komplexní směs sloučenin, které odpovídají za celkový charakter a kvalitu nápoje. Zásadní podíl v lihovinách tvoří ethanol a voda. Další látky, jako jsou karbonylové sloučeniny, alkoholy, estery, kyseliny a acetyly, vznikají jako vedlejší produkty při alkoholovém kvašení, destilaci, skladování a zrání⁵¹. Složení a koncentrace těchto těkavých sloučenin se mohou značně lišit. Závisí na druhu použitých surovin, na jejich kvalitě a také na podmínkách fermentačního procesu⁵³. Tato skupina látek významně ovlivňuje organoleptické vlastnosti nápojů, a proto je důležité, aby bylo jejich zastoupení v lihovinách vyvážené. Stanovení obsahu těchto sloučenin má význam nejen pro určení sensorických vlastností, ale může být také použito při odhalování nezákonných lihovin, protože nesrovnalosti ve složení jednotlivých kongenerů mohou být využity k identifikaci odchylek, které naznačují nesoulad ve výrobních procesech⁷⁷. Dalším důležitým důvodem stanovení těkavých kongenerů v alkoholických nápojích jsou zdravotní aspekty. Některé kongenery, zejména methanol, mohou být toxické a způsobovat nežádoucí zdravotní účinky včetně otrav. Určování obsahu těchto látek zvyšuje bezpečnost konzumace alkoholických nápojů⁸¹.

3.1 Hlavní těkavé sloučeniny alkoholických nápojů a jejich vliv na organismus

3.1.1 Alkoholy

Ethanol

Z důvodu masové konzumace lze ethanol považovat za toxikologicky nejvýznamnější alkohol⁶⁴. Patří mezi nejčastěji zneužívané návykové látky po celém světě.

Konzumace alkoholu může být spojena s různými zdravotními problémy. Po požití nápoje s ethanolem dochází k jeho absorpci v žaludku a tenkém střevě. V žaludku zpomaluje proces vstřebávání přítomnost potravy. Konzumace teplých alkoholických nápojů, konzumace na lačno a přítomnost oxidu uhličitého v nápojích vstřebávání naopak urychluje^{62,63}. Ethanol je dobře rozpustný ve vodě i v tucích, snadno prostupuje membrány a je distribuován do tělních tekutin a orgánů. Hlavním orgánem, kde dochází k metabolické přeměně ethanolu, jsou játra. Enzym alkoholdehydrogenáza (ADH) katalyzuje přeměnu ethanolu na acetaldehyd. Acetaldehyd je přes acetát konvertován na acetyl CoA, který vstupuje do Krebsova cyklu, jehož reakcemi je oxidován na CO₂ a vodu^{6,64}.

Projevy působení ethanolu na organismus zahrnují jeho účinek na centrální nervový systém (CNS), gastrointestinální trakt, kardiovaskulární systém, dýchací centrum a metabolismus⁶⁵.

Účinek alkoholu na CNS představuje několikahodinové ovlivnění mentálních schopností člověka a připomíná působení narkotik. Zpočátku, při nižší koncentraci ethanolu (přibližně 0,5 g/kg) se změny v chování ani nemusí zvlášť projevit. Mírné dávky navozují příjemné uvolnění, objevuje se zvýšená družnost, euforie, případně sedace. Další zvyšování obsahu alkoholu v krvi vede k poruchám rovnováhy a motorické koordinace, klesá pozornost a schopnost soustředění. Dostávají se problémy s artikulací, jednání je impulzivní a sociálně nežádoucí^{6,64}.

Protože ethanol je stimulans tvorby žaludeční kyseliny, může být projevem zvýšeného abusu ethanolu nauzea, nevolnosti a zvracení. V hypofýze ethanol inhibuje tvorbu antidiuretického hormonu, který reguluje hospodaření s tekutinami. To vede ke zvýšené diuréze a dehydrataci. Reakce podílející se na metabolické přeměně ethanolu vedou k inhibici glukoneogeneze a u osob s nízkou zásobou glykogenu dochází k hypoglykémii^{65,66}. Další oblastí působení alkoholu je kardiovaskulární systém. Dochází k hypotenzi, tachykardii, vasodilataci. Vasodilatace spolu se zvýšeným pocením vedou k hypotermii.

Obsah alkoholu v organismu vyšší než 3 g/kg představuje ohrožení na životě. Dochází ke snížené citlivosti dýchacího systému na cizí tělesa (např. zvratky) a hrozí aspirace. Při množství 4 g/kg ethanolu hrozí bezvědomí a zástava dechového centra⁶⁵.

Klinicky nacházíme značně heterogenní skupinu příznaků. Stupeň intoxikace ethanolem ovlivňuje jednak množství požitého alkoholu, frekvence konzumace, individuální tolerance, tělesná konstituce a v neposlední řadě rychlost požití.

Pravidelná konzumace alkoholických nápojů u chronických alkoholiků vede ke zvýšené toleranci organismu na jejich účinek v důsledku adaptace CNS. Dochází k poškození jater a k poruchám metabolismu. Je porušena činnost mozku a dochází k celkové tělesné devastaci^{6,64,65}.

Methanol

Methanol je bezbarvá čirá těkavá tekutina, čichem a chutí téměř neodlišitelná od ethanolu. Je neomezeně rozpustný ve vodě, jiných alkoholech a éterech. Je hořlavý a vysoce toxický. V nízkých koncentracích je přítomnost methanolu v lihovinách běžná. Vzniká jako nežádoucí produkt z pektinů, které se vyskytují zejména v nezralém ovoci. Během destilačních procesů při výrobě lihovin ho nelze dostatečně oddělit. Množství methanolu, které vzniká tímto způsobem, je zdravotně nezávadné. Příčinou toxikologicky významného množství methanolu v alkoholických nápojích je nejčastěji ilegální výroba lihovin. Důvodem může být nesprávný výrobní proces nebo záměrné přidání methanolu do alkoholických nápojů z důvodu navýšení objemu nebo snížení výrobních nákladů^{67,68,69}.

Z hlediska toxicity nepředstavuje methanol sám o sobě riziko – toxicky působí na organismus jeho metabolické produkty. V prvním kroku metabolismu dochází k oxidaci methanolu enzymem alkoholdehydrogenáza (ADH) za vzniku formaldehydu. Pokud je léčba zahájena v tomto kroku, je velká šance na zmírnění otravy. Jelikož se ADH uplatňuje jak při metabolické přeměně methanolu, tak i v metabolických dráhách ethanolu, a zároveň má ethanol k tomuto enzymu vyšší afinitu než methanol, může oxidaci methanolu kompetitivně inhibovat. Methanol, který nepodléhá metabolické aktivitě enzymu, odchází z těla v nezměněné podobě močí, aniž by poškozoval organismus. Pokud není zahájena rychlá léčba, dochází k druhému kroku biotransformace účinkem enzymu aldehyddehydrogenázy na cytotoxickou kyselinu mravenčí. Maximální hladina v krvi a v moči je dosažena 2. – 3. den po požití. Oxidace kyseliny mravenčí na CO₂ a H₂O probíhá velmi pomalu. Na její detoxikaci se podílí kyselina listová. Jaterní zásoby folátů bývají ale u lidí nízké a z toho důvodu dochází k akumulaci mravenčanu ve tkáních, především v sítnici oka a v bazálních gangliích mozku^{64,65,70,71,72}.

V iniciální fázi se intoxikace methanolem projevuje na rozdíl od ethanolu jen mírnou opilostí, případně gastritidou. Nižší afinita ADH k methanolu vysvětluje jeho pomalejší

biotransformaci a pozdější nástup účinku. Latentní asymptomatická perioda trvá obvykle 12 až 24 hodin. Po latenci nastupuje různý stupeň zrakového postižení, které se projeví ztrátou barevného vidění, sníženou ostrostí, pacienti popisují vizi „sněhové bouře“. Dostavují se gastrointestinální potíže, rozvíjí se metabolická acidóza a dochází k dysfunkci CNS. Závažné intoxikace vedou k slepotě, hrozí multiorganové selhání, kóma a smrt^{65,70,71}. Oslepnutí dospělého člověka může způsobit pouhých 10 ml čistého methanolu. Dávka 100 ml může být smrtelná⁶.

V léčbě se uplatňuje ethanol nebo 4-methylpyrazol (Fomepizol) jako antidotum ADH⁷² a aktivní forma kyseliny listové (Leukovorin). Při vysoké hladině metylalkoholu je indikována rovněž hemodialýza. Klíčovou rolí při léčbě otravy sehrává čas, rychle zahájená léčba může mít pozitivní vliv na přežití a minimalizovat poškození orgánů⁷³.

Propan-1-ol

Primární alifatický alkohol je bezbarvá těkává kapalina nasládlé vůně. V lihovinách představuje 1-propanol indikátor bakteriálního znehodnocení. Jeho zvýšené koncentrace se mohou vyskytovat v důsledku mikrobiálního kažení během skladování suroviny za nepříznivých podmínek⁷⁴.

Po vstupu do organismu se rychle vstřebává a je metabolizován alkoholdehydrogenázou na kyselinu propionovou. Kyselina propionová může následně vstupovat do dalších metabolických drah a ovlivnit reakce citrátového cyklu a tvorbu laktátu. Z organismu je vylučován skrz plíce a ledviny⁷⁵.

Smrtelná dávka 1-propanolu není známa. Nicméně efektivní dávka 1-propanolu pro narkózu u králíků byla přibližně čtyřikrát nižší než pro ethanol. Akutní požití 1-propanolu může způsobit nevolnost, zvracení, křeče v břiše, průjem. Dráždí sliznice a působí depresi centrálního nervového systému, která může vést ke zvýšené ospalosti, případně až k těžkému stavu bezvědomí⁷⁶.

Vyšší alkoholy

Vyšší alkoholy přispívají v destilátech k vůni a esenciálnímu charakteru. Malé množství těchto látek pochází z použitých surovin, významnější množství je produkováno kvasinkami a bakteriemi během kvasného procesu. Pro výslednou kvalitu produktu jsou nevhodné jak příliš nízké, právě tak i velmi vysoké koncentrace těchto látek⁵¹.

3.1.2 Karbonylové sloučeniny

Acetaldehyd

Aldehydy se nacházejí v destilátech jako výsledek spontánní nebo mikrobiálně zprostředkované oxidace. Nejběžnějším aldehydem přítomným v ovocných destilátech je acetaldehyd, který je přímým vedlejším produktem alkoholového kvašení. Hladiny

acetaldehydu v pivech, vínech a destilátech se běžně zvyšují během stárnutí v důsledku oxidace ethanolu. Další oxidace acetaldehydu může vést k tvorbě malého množství kyseliny octové. Zvýšená koncentrace acetaldehydu je zodpovědná za nepříjemné organoleptické vlastnosti, dodává nápoji štiplavý dráždivý zápach a může být zdravotně závadná^{78,79}.

Acetaldehyd je toxičtější než ethanol a je zodpovědný za nepříjemné symptomy po konzumaci alkoholu⁶⁴. Acetaldehyd je potenciální karcinogen a dlouhodobější expozice při chronickém požívání alkoholu může zvýšit riziko rozvoje rakoviny, zejména jícnu a jater. Účinkem acetaldehyddehydrogenázy (ALDH) je acetaldehyd rychle metabolizován na kyselinu octovou. Množství tohoto enzymu je u člověka geneticky podmíněno⁶³. Někteří jedinci mohou disponovat genetickými variantami, které ovlivňují funkci tohoto enzymu. To vede k akumulaci acetaldehydu v těle a nepříjemné symptomy po konzumaci alkoholických nápojů bývají u těchto osob výrazně intenzivnější. Genetický polymorfismus u ADH a ALDH je rovněž odpovědný za náchylnost k alkoholismu. Stupeň polymorfismu se liší také v závislosti na rasových a etnických skupinách⁸⁰.

Acetal

Acetaly vznikají v značné míře v prostředí, kde se současně nacházejí aldehydy s nadbytkem alkoholu. V alkoholických nápojích vznikají v přirozených procesech během kvašení a stárnutí nápojů, především pak v nápojích s vysokým obsahem alkoholu. Acetaly jsou charakterizovány příjemnou vůní a jejich přítomnost může vylepšit vonné vlastnosti alkoholických nápojů⁶⁷.

3.1.3 Estery

Ethyl-acetát

Je jedním z nejdůležitějších esterů přítomných v alkoholických nápojích. Ethyl-acetát má významný vliv na organoleptické vlastnosti destilátů. Obsah esteru ethyl-acetátu způsobuje příjemné aroma s ovocnými vlastnostmi. Pokud se koncentrace zvýší nad 150 mg/l, příjemné aroma se změní na octové. Tato změna dává nápoji kazivé tóny a je příčinou nepříjemné chutě lihovin^{51,74,82}. Obsah ethyl-acetátu se zvyšuje během stárnutí lihovin kvůli kontinuální oxidaci ethanolu na kyselinu octovou a následné esterifikaci této kyseliny. Další příčinou zvýšené koncentrace tohoto esteru může být dlouhodobé skladování surovin za nepříznivých podmínek, které může vést k bakteriálnímu znehodnocení^{51,74}.

Methyl-acetát

Methyl-acetát je organická sloučenina, která má charakteristickou ovocnou vůni a chuť. Methyl-acetát se rychle hydrolyzuje na methanol a kyselinu octovou a to jak po požití, tak po inhalaci. Methyl-acetát je v určité míře toxický a při vyšších koncentracích může způsobovat nepříjemné reakce jako je bolest hlavy, závratě, nevolnost a poškození gangliových buněk v sítnici. Hlavním problémem je přeměna na methanol, který může způsobit trvalé poškození zraku⁸³.

3.2 Legislativa spojená s kontrolou kvality alkoholických nápojů

Legislativa související s kontrolou kvality alkoholických nápojů hraje klíčovou roli při zajišťování bezpečnosti a určitých standardů kvality pro spotřebitele. V rámci Evropské unie platí Nařízení Komise (ES) č. 2870/2000 ze dne 19. prosince 2000. Toto nařízení poskytuje referenční metody pro laboratorní analýzu lihovin, obsahuje specifikace a postupy pro stanovení různých parametrů a složek lihovin. Rovněž se zabývá jejich správným měřením a hodnocením. Lze zde najít popis referenčních metod pro:

- Stanovení obsahu alkoholu v objemových %. Specifikuje použití určitých metod a zařízení pro přesné měření obsahu ethanolu v lihovinách. Konkrétně se jedná o metody destilace ethanolu ze vzorku a následné měření jeho hustoty pyknometrickou metodou, elektronickou denzitometrií nebo metodou denzitometrie s využitím hydrostatických vah.
- Stanovení celkového suchého extraktu gravimetricky. Tato metoda vymezuje hmotnost suchého extraktu u akvavitu.
- Stanovení methanolu a těkavých kongenerů v lihovinách: acetaldehydu, acetalu (1,1-diethoxyethanu), 1-butanolu, 2-butanolu, 1-propanolu, isobutanolu (2-methyl-1-propanolu), ethyl-acetátu a methyl-acetátu. Alkoholy 2-methyl-1-butanol a 3-methyl-1-butanol mohou být stanoveny jako součet obou nebo každý jednotlivě.
- Stanovení anetholu v lihovinách pomocí plynové chromatografie.
- Stanovení kyseliny glycyrrhizonové, chalkonů a cukrů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.
- Stanovení koncentrace vaječného žloutku fotometrickou metodou⁵⁴.
- Stanovení obsahu ¹⁴C v ethanolu za účelem zjištění původu lihu přímým odečítáním scintilace roztoku⁵⁵.

Oficiální metodou, kterou se stanovují těkavé látky v alkoholických nápojích, je dle výše zmíněného nařízení platného pro státy Evropské unie plynová chromatografie s plamenově-ionizační detekcí⁵⁴. Pro tyto účely je GC-FID používána i v dalších zemích

jako jsou například USA (AOAC Official Methods, 972.10, 2005 a 972.11, 2005)⁵⁶, Čína (GB/T 11858, 2008)⁵⁷, Mexiko (NOM-199-SCFI 2017)⁵⁸ nebo Indie (BIS IS 3752, 2009)⁵⁹. Podle těchto nařízení je pro kvantifikaci analyzovaných složek v alkoholických produktech používána metoda vnitřního standardu. Jako vnitřní standard může být zvolený například 1-pentanol, 3-pentanol⁵⁴ nebo 4-methyl-1-pentanol apod⁸⁹. Sloučenina IS je přidávána do standardního roztoku i do zkušební vzorku před vlastní analýzou. Měření standardních roztoků během kalibrace jsou z plochy píku každého kongeneru a plochy píku vnitřního standardu získané relativní odezvové faktory (rovnice (2.5)). Hodnoty RRF jsou následně použité pro výpočet koncentrace jednotlivých kongenerů přítomných v analyzovaném vzorku lihoviny⁵⁴.

Podle příslušných legislativních norem je nezbytné výsledné koncentrace těkavých látek vyjádřit v jednotkách mg/l AA (absolutního alkoholu), to znamená, že hmotnostní koncentrace těchto složek vyjádřená v jednotkách mg/kg musí být přepočítána na 100% ethanol podle vztahu (3.1). Pro tento přepočet je nutné znát rovněž hustotu a obsah ethanolu v měřeném vzorku.

$$c_i[\text{mg/l AA}] = \frac{c_i[\text{mg/kg}] \cdot \rho_i \cdot 100 \%}{ABV} \quad (3.1)$$

kde c_i je koncentrace analytu v jednotkách [mg/kg], ρ_i je hustota analyzovaného vzorku v jednotkách [kg/m³] a ABV (angl. *Alcohol by Volume*) je obsah ethanolu ve vzorku [%]⁵⁴.

3.3 Metoda „Ethanol jako interní standard“

Z důvodu zlepšení standardně používaných metod pro stanovení těkavých látek v alkoholických nápojích byla pracovní skupinou Siarhee Charapitsi v roce 2013 navržena metoda „Ethanol jako interní standard“. Cílem této inovace bylo zvýšit spolehlivost a přesnost měření. Na rozdíl od běžně používaných metod vnitřního standardu používá tato metoda jako interní standard hlavní těkavou sloučeninu alkoholických nápojů, ethanol. Ethanol je součástí všech alkoholických produktů, a proto nemusí být dodatečně přidáván do analyzovaného vzorku⁶⁰. Koncentrace ethanolu vyjádřená v jednotkách mg/l AA je konstantní (789300 mg/l AA) a rovná se jeho hustotě, čímž také odpadá nutnost měření hustoty vzorku za účelem stanovení objemového obsahu ethanolu. To zjednodušuje a urychluje celý postup měření a vzorky mohou být měřeny přímo bez jakékoliv předúpravy⁶¹.

Z kombinace vztahů (2.5) a (3.1) a skutečnosti, že koncentrace ethanolu vyjádřená v jednotkách mg/l AA je konstantní, lze koncentrace analyzovaných složek vyjádřit

pomocí jejich faktorů relativní odezvy (RRF) vzhledem k ethanolu ve standardním roztoku vztahem:

$$c_i = RRF_i^{EtOH} \cdot \frac{A_i}{A_{EtOH}} \cdot 789300 \quad (3.2)$$

kde RRF_i^{EtOH} je odezvoový faktor analytu k ethanolu, A_i je plocha analytu a A_{EtOH} je plocha ethanolu⁶⁰.

Jedním z požadavků na vnitřní standard je, aby nebyl přítomen v měřeném vzorku a po jeho přidání před vlastním měřením byla jeho koncentrace v analyzovaném vzorku podobná koncentraci analyzovaných složek. Použití ethanolu jako referenční látky tomuto požadavku neodpovídá. Koncentrace ethanolu je zde o několik řádů vyšší než koncentrace analyzovaných kongenerů. Tato metoda se stala realizovatelnou díky širokému lineárnímu dynamickému rozsahu FID detektoru, který umožňuje s vysokou přesností analyzovat látky i takto rozdílných koncentrací^{60,89}.

Výhoda metody „Ethanol jako interní standard“ tedy spočívá v tom, že nevyžaduje přípravu roztoku vnitřního standardu, výpočet jeho koncentrace, ani jeho zavedení do analyzovaného vzorku a může proto poskytnout přesnější výsledky. Společně s již výše zmíněnou výhodou, že odpadá nutnost stanovení obsahu ethanolu ve vzorku a měření jeho hustoty, vyniká tato metoda tím, že je rychlejší a méně pracná, šetří materiál, je robustnější a eliminuje potenciální chyby, které by mohly vzniknout dodatečným pipetováním a výpočty⁸⁹.

Tato metoda umožňuje přímou kvantifikaci těkavých látek, protože nevyžaduje žádnou úpravu vzorku a koncentrace těkavých látek v jednotkách mg/l AA se stanoví přímo z údajů GC⁹⁰.

4 Experimentální část

4.1 Seznam chemikálií použitých pro přípravu kalibračních roztoků

Všechny následující chemické standardy: acetaldehyd, acetal (1,1-diethoxyethan), 1-butanol, 2-butanol, ethyl-acetát, isoamylol (3-methyl-1-butanol), isobutanol (2-methyl-1-propanol), methanol, methyl-acetát, 1-pentanol, 1-propanol a ethanol o koncentraci 96,4 % objemových alkoholu byly zakoupeny od firem Sigma-Aldrich, s.r.o., USA, Fluka analytical, Německo nebo PENTA s.r.o., Česká republika v nejvyšší dostupné čistotě (více než 99 %). GC čistota standardů byla stanovena pomocí analýzy GC-FID metodou vnitřní normalizace.

4.2 Příprava kalibračních roztoků

Pro analýzu těkavých složek sledovaných mezinárodní legislativou byla gravimetricky (odvážením jednotlivých látek) připravena sada kalibračních roztoků. V první fázi byly připraveny tři matrice – 20% a 40% roztok ethanolu v deionizované vodě a 96% ethanol. Do těchto zásobních roztoků byly kvantitativně přidány sledované těkavé látky: methanol, methyl-acetát, ethyl-acetát, 1-propanol, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, isoamylol, acetal. Jako poslední byl přidáván acetaldehyd z důvodu minimalizace jeho ztrát vypařováním. Tímto postupem byly získány tři zásobní roztoky s vysokou koncentrací přidávaných sloučenin. Ředěním těchto zásobních roztoků byly připraveny standardní roztoky ve třech různých přibližných koncentračních úrovních 300, 600 a 2000 mg/L AA v 15 ml skleněných zkumavkách. V předchozích pracích bylo zjištěno, že v roztocích s vyšší koncentrací ethanolu a acetaldehydu dochází k tvorbě sekundárních produktů acetaldehydu (acetalu, paraldehydu, metaldehydu)⁴⁸. Aby se zabránilo tvorbě těchto nežádoucích látek, byl acetaldehyd přidáván do standardních roztoků v menším

množství a jeho cílová koncentrace byla tedy přibližně o 50 % nižší než koncentrace ostatních přidávaných složek. Do každého kalibračního roztoku byl rovněž napipetován roztok běžně používaného vnitřního standardu 1-pentanolu. Celkově tedy bylo pro měření připraveno 9 standardních roztoků. Přesná koncentrace všech analyzovaných látek v jednotkách mg/l AA byla vypočtena podle vztahu:

$$c_i = \frac{m_i^{st} \cdot 1000000}{(m_{st} \cdot w_{st} + m_{IS\ 1-pent} \cdot w_{IS\ 1-pent} + m_{wes} \cdot w_{wes}) / \rho_{EtOH}} \quad (4.1)$$

kde c_i je výsledná koncentrace i -té složky v analyzovaném vzorku [mg/l AA], m_i^{st} je navážka i -té složky standardního roztoku [mg], m_{st} je navážka standardního roztoku [mg], w_{st} je hmotnostní zlomek ethanolu ve standardním roztoku, $m_{IS\ 1-pent}$ je navážka roztoku interního standardu 1-pentanolu [mg], $w_{IS\ 1-pent}$ je hmotnostní zlomek ethanolu roztoku interního standardu 1-pentanolu, m_{wes} je navážka roztoku matrice [mg], w_{wes} je hmotnostní zlomek ethanolu v roztoku matrice a ρ_{EtOH} je hustota ethanolu [0,7893 g/ml].

Přehled vypočtených koncentrací všech analyzovaných látek v jednotlivých kalibračních roztocích je uvedený v tabulkách 4.1, 4.2 a 4.3. Pro pipetování všech složek byly použity automatické pipety o objemu 200 μ l a 1000 μ l (Socorex Isba SA, Švýcarsko) a pro vážení jednotlivých látek a roztoků byly použity analytické váhy (APX-100 Analytical Balances, Denver Instrument s.r.o., USA) s hmotnostní kapacitou 100 g a s přesností vážení na 0,1 mg. Všechny připravené roztoky byly uchovávány v lednici při teplotě 8 °C. Před měřením byly pipetovány do 1,5 ml skleněných šroubovacích vialek a uzavřeny plastovým víčkem s teflon/silikonovým septem (Agilent Technologies, USA).

Tabulka 4.1 Přehled vypočtených koncentrací analyzovaných složek v kalibračním roztoku připraveném v matrici s 20% obsahem ethanolu.

ABV 20%	C ₃₀₀ mg/l AA	C ₆₀₀ mg/l AA	C ₂₀₀₀ mg/l AA
Acetaldehyd	122,4	254,7	772,0
Methanol	275,5	573,0	1736,9
Methyl-acetát	300,5	625,0	1894,6
Ethyl-acetát	288,1	599,1	1816,3
1-propanol	289,4	602,0	1824,8
Isobutanol	284,5	591,8	1794,0
Acetal	298,6	621,1	1882,9
2-butanol	295,0	613,6	1860,1
1-butanol	307,0	638,6	1935,8
Isoamylol	275,9	573,9	1739,9
1-pentanol	642,3	659,8	675,7
Ethanol	789300,0	789300,0	789300,0

Tabulka 4.2 Přehled vypočtených koncentrací analyzovaných složek v kalibračním roztoku připraveném v matrici s 40% obsahem ethanolu.

ABV 40%	C ₃₀₀ mg/l AA	C ₆₀₀ mg/l AA	C ₂₀₀₀ mg/l AA
Acetaldehyd	141,5	300,6	975,1
Methanol	303,3	644,1	2089,3
Methyl-acetát	319,1	677,6	2198,2
Ethyl-acetát	302,1	641,6	2081,4
1-propanol	309,6	657,5	2132,8
Isobutanol	304,2	646,0	2095,6
Acetal	302,4	642,2	2083,4
2-butanol	302,8	643,1	2086,1
1-butanol	308,7	655,5	2126,6
Isoamylol	308,7	655,5	2126,6
1-pentanol	619,4	652,2	730,2
Ethanol	789300,0	789300,0	789300,0

Tabulka 4.3 Přehled vypočtených koncentrací analyzovaných složek v kalibračním roztoku připraveném v matrici s 96% obsahem ethanolu.

ABV 96%	C ₃₀₀ mg/l AA	C ₆₀₀ mg/l AA	C ₂₀₀₀ mg/l AA
Acetaldehyd	96,3	229,8	704,9
Methanol	256,7	612,4	1878,2
Methyl-acetát	300,6	717,1	2199,5
Ethyl-acetát	292,5	697,6	2139,7
1-propanol	295,3	704,3	2160,2
Isobutanol	290,5	692,8	2125,1
Acetal	299,0	713,2	2187,5
2-butanol	290,1	692,0	2122,5
1-butanol	289,3	690,2	2116,9
Isoamylol	283,4	676,0	2073,3
1-pentanol	708,5	756,0	812,9
Ethanol	789300,0	789300,0	789300,0

4.3 Instrumentace a podmínky měření

Chromatografická měření byla provedena na plynovém chromatografu Agilent 6890N (Agilent Technologies, USA) vybaveném plamenovým ionizačním detektorem (FID) a slit/splitless injektorem. Pro nástřik vzorků do plynového chromatografu byla použita injekční stříkačka o objemu 5 μ l (Hamilton, USA). Dávkování vzorků bylo provedeno manuálně. Pro separaci látek byla použita kapilární kolona Zebron ZB-624 (Phenomenex, USA) o délce 60 m, vnitřním průměrem 0,25 mm a tloušťce filmu 1,4 μ m (6 % kyanopropylfenyl, 94 % dimethylpolysiloxan) s maximálním teplotním limitem 260 °C. Zvolená kolona umožnila po optimalizaci uspokojivou separaci všech analyzovaných těkavých látek. Jako nosný plyn bylo použito helium (Linde a.s., Česká republika, čistota 99,999 %) při rychlosti 40,8 cm/s; průtok kolonou byl 1,2 ml/min. Dusík (99,9995 %) a vodík (99,99 %) byly odebírány z tlakových láhví (Linde a.s., Česká republika) a zdrojem vzduchu byly tlakové láhve se stlačeným vzduchem. Byl nastaven následující teplotní program: počáteční izoterma 45 °C (3 min), teplotní gradient 1 (20 °C/min) do 70 °C, teplotní gradient 2 (65 °C/min), finální izoterma 240 °C (3 min). Pro sběr a vyhodnocení dat z plynového chromatografu byl použit software Clarity 8.8 (DataApex Ltd., Česká republika). Všechny výpočty byly provedeny pomocí programu Microsoft Excel

(Microsoft Corporation, USA). Statistické zpracování dat multifaktoriálním Taguchiho designem bylo provedeno pomocí programu Minitab 16 (LEAD Techn. Inc., USA).

4.4 Optimalizace podmínek měření

Experimentálnímu měření předcházelo testování různých modifikací teplotního profilu s cílem získat úplnou separaci všech analyzovaných složek vzorku při minimální době analýzy. Pro testování byl zvolen kalibrační roztok o koncentraci 2000 mg/l AA v matrici 40 % ABV. Dávkovací objem roztoku byl 1,2 μ l s poměrem dělení 1:20 a série optimalizačních měření probíhala při teplotě injektoru 210 °C a teplotě detektoru 250 °C.

4.5 Taguchiho experiment

Série měření probíhala podle Taguchiho metody zobrazené v tabulce 4.4. Tato technika využívá speciálních ortogonálních polí, která přesně specifikují nastavení vybraných faktorů (parametrů, nezávislých proměnných) a jejich úrovní v rámci jednotlivých experimentů tak, aby z nich mohly být odvozeny spolehlivé statistické závěry. Výsledkem je strategicky zvolený plán experimentů, který umožňuje zkoumat širokou škálu faktorů s relativně nízkým počtem experimentálních testů⁸⁴. V rámci této diplomové práce byl použit Taguchiho plán obsahující 27 variant měření vytvořených kombinací šesti různých kontrolních faktorů a jejich tří úrovní. Zvolené parametry zahrnovaly obsah alkoholu v matrici, koncentrace sledovaných látek, dávkovací objem vzorku, teplotu injektoru, poměr dělení a teplotu detektoru.

Deset těkavých látek bylo stanoveno ve třech opakováních za identických podmínek pro každou navrženou kombinaci kontrolních faktorů. Z naměřených chromatografických údajů byly vypočteny hodnoty kalibračních faktorů RRF (jako průměr tří opakováních měření) podle rovnice (2.5) pro každou analyzovanou složku. Konečný soubor dat obsahoval 27 hodnot RRF pro každou z deseti sloučenin. Míra variability hodnot RRF byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD, angl. Relative Standard Deviation) v procentech a vypočtena podle následujícího vzorce¹⁵:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad (4.2)$$

kde s představuje směrodatnou odchylku a \bar{x} je průměrná hodnota RRF.

Pro určení hodnoty intervalu spolehlivosti (δ) získaných výsledků byl použit Studentův t-test podle vzorce (4.3)⁹².

$$\delta = t_{0,05} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (4.3)$$

kde s je směrodatná odchylka, $n = 10$ hodnot RSD a $t_{0,05}$ hodnota koeficientu pro interval spolehlivosti 95 % (hladina významnosti $\alpha = 0,05$).

Diplomová práce byla dále zaměřena na porovnání stability hodnot RRF při změně podmínek měření a kalibračních roztoků u dvou metod, které by mohly být použity pro kvantitativní hodnocení těkavých látek v alkoholických nápojích, a to běžné metody, která používá jako interní standard 1-pentanol a metody „Ethanol jako interní standard“.

Tabulka 4.4 Design Taguchiho experimentu. Sloupce představují zvolené faktory, hodnoty ve sloupcích testované úrovně daného faktoru a řádky reprezentují experimenty. Hodnoty 1, 2, 3 udává tabulka 4.5.

#	ABV	Koncentrace	Objem nástríku	Teplota injektoru	Dělicí poměr	FID teplota
1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	2	2
3	1	1	1	1	3	3
4	1	2	2	2	1	1
5	1	2	2	2	2	2
6	1	2	2	2	3	3
7	1	3	3	3	1	1
8	1	3	3	3	2	2
9	1	3	3	3	3	3
10	2	1	2	3	1	2
11	2	1	2	3	2	3
12	2	1	2	3	3	1
13	2	2	3	1	1	2
14	2	2	3	1	2	3
15	2	2	3	1	3	1
16	2	3	1	2	1	2
17	2	3	1	2	2	3
18	2	3	1	2	3	1
19	3	1	3	2	1	3
20	3	1	3	2	2	1
21	3	1	3	2	3	2
22	3	2	1	3	1	3
23	3	2	1	3	2	1
24	3	2	1	3	3	2
25	3	3	2	1	1	3
26	3	3	2	1	2	1
27	3	3	2	1	3	2

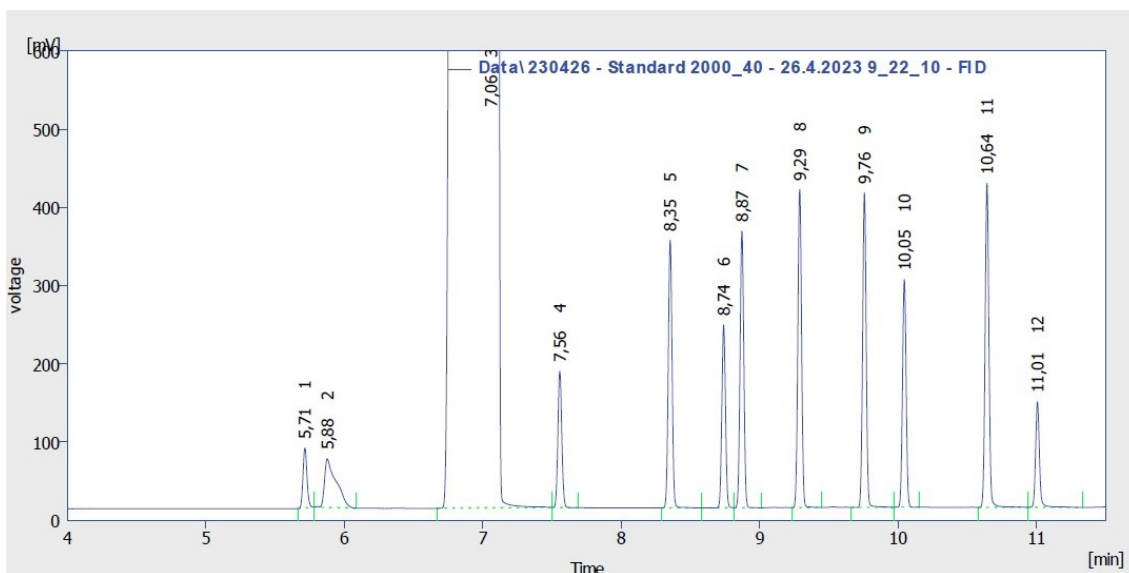
Tabulka 4.5 Vybrané kontrolní faktory a hodnoty tří úrovní každého faktoru.

Úroveň kontrolního faktoru	ABV, %	Koncentrace, mg/l AA	Objem nástríku, μl	Teplota injektoru, °C	Dělicí poměr	FID teplota, °C
1	20	300	0.4	180	20	220
2	40	600	0.8	210	40	250
3	96	2000	1.2	240	80	280

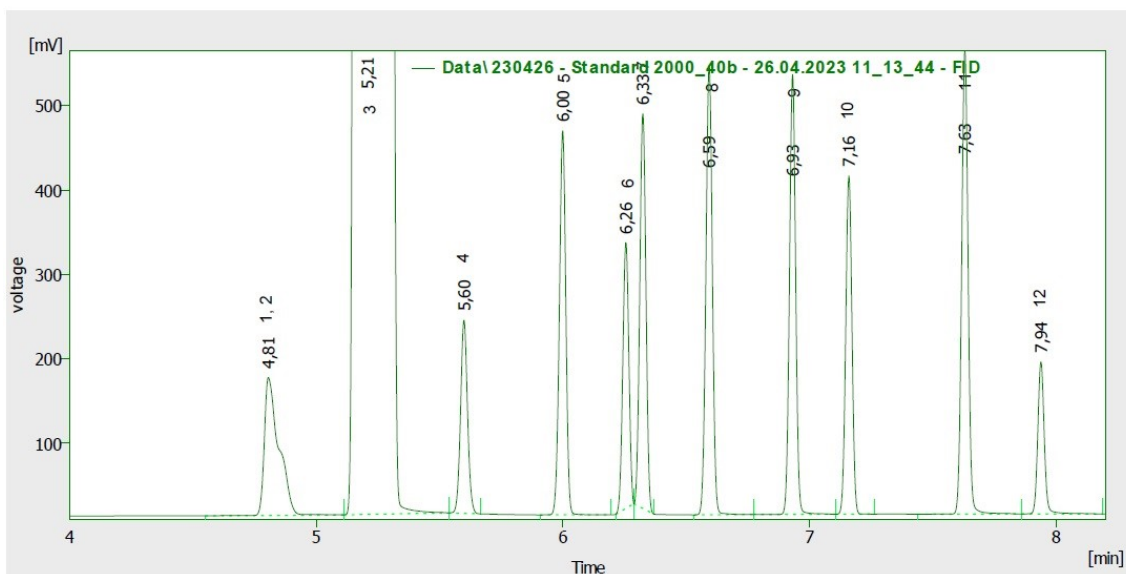
5. Výsledky a diskuse

5.1 Optimalizace chromatografických podmínek

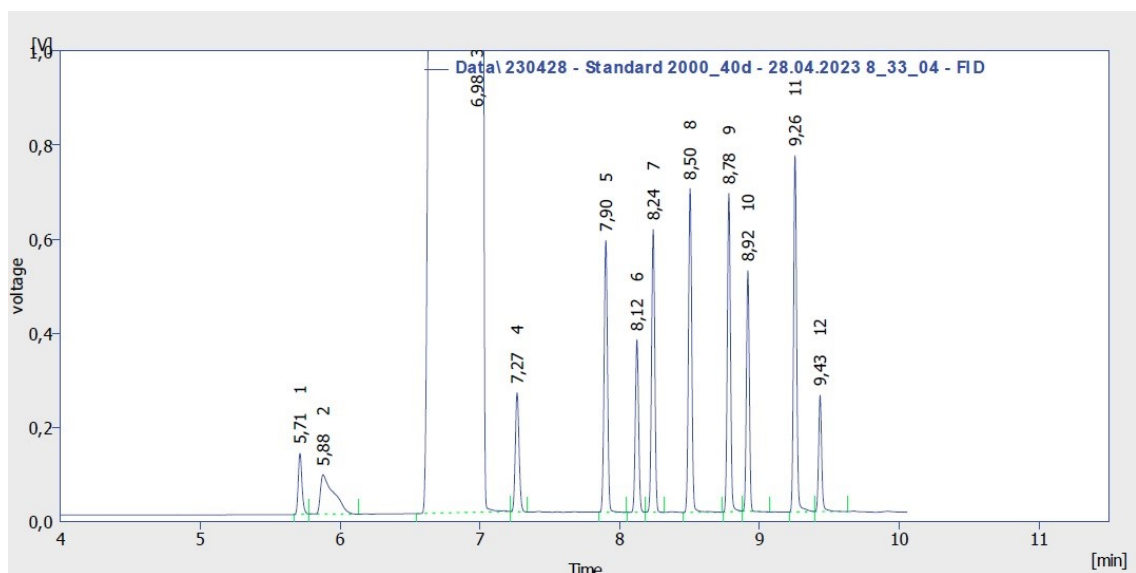
Optimalizace chromatografických podmínek pro separaci těkavých látek byla zahájena teplotním profilem navrženým softwarovým systémem Pro EZGC[®] (Restek, USA) pro konkrétní parametry daného chromatografického systému. Počáteční izoterma 50 °C po dobu 3 minut s následným teplotním gradientem 1 (20 °C/min) do 110 °C a teplotním gradientem 2 (25 °C/min) do finální izotermy 200 °C (3 min) umožnily dostatečnou separaci všech měřených složek, avšak při době analýzy delší než 11 minut (Obr. 5.1). Byly proto aplikovány úpravy měřicích parametrů, které by vedly ke zkrácení doby analýzy se zachováním dostatečné separace všech studovaných analytů. Příkladem dalšího zkoušeného teplotního profilu je nastavení počáteční teploty 60 °C s následným teplotním gradientem (20 °C/min) do finální izotermy 210 °C (5 min). Tento teplotní profil zkrátil dobu analýzy, ale jak je zřejmé z obrázku 5.2, došlo ke zhoršení separace píku 1 a 2, 6 a 7. Následovala série měření s úpravou teplotních a časových parametrů pro dosažení dostatečného rozlišení pro všechny eluované analyty. Po řadě experimentů byl vybrán teplotní profil, který umožnil uspokojivou separaci všech analyzovaných složek při co nejkratší době měření – počáteční izoterma 45 °C (3 min), teplotní gradient 1 (20 °C/min) do 70 °C, teplotní gradient 2 (65 °C/min), finální izoterma 240 °C (3 min). Z chromatogramů na obrázcích 5.1 a 5.3 je patrné, že retenční čas píku, který eluuje jako poslední, se zkrátil z 11,01 minuty na 9,43 minuty přičemž dostatečné rozlišení kritických píků 1 a 2, 6 a 7 zůstalo zachováno (rozlišení mezi píkem 1 a 2 činilo 1,4 a mezi píkem 6 a 7 bylo 2,5). Tento teplotní profil byl použitý pro měření sledovaných těkavých složek v připravených kalibračních roztocích s cílem následné analýzy variability odezvoových faktorů při různých experimentálních podmínkách měření.



Obrázek 5.1 Počáteční izoterma 50 °C po dobu 3 minut s následným teplotním gradientem 1 (20 °C/min) do 110 °C a teplotním gradientem 2 (25 °C/min) do finální izotermie 200 °C (3 min). Dostatečná separace všech analyzovaných složek, delší čas analýzy. Pořadí signálů: 1. acetaldehyd, 2. methanol, 3. ethanol, 4. methyl-acetát, 5. 1-propanol, 6. ethyl-acetát, 7. 2-butanol, 8. isobutanol, 9. 1-butanol, 10. acetal, 11. isoamylol, 12. 1-pentanol.



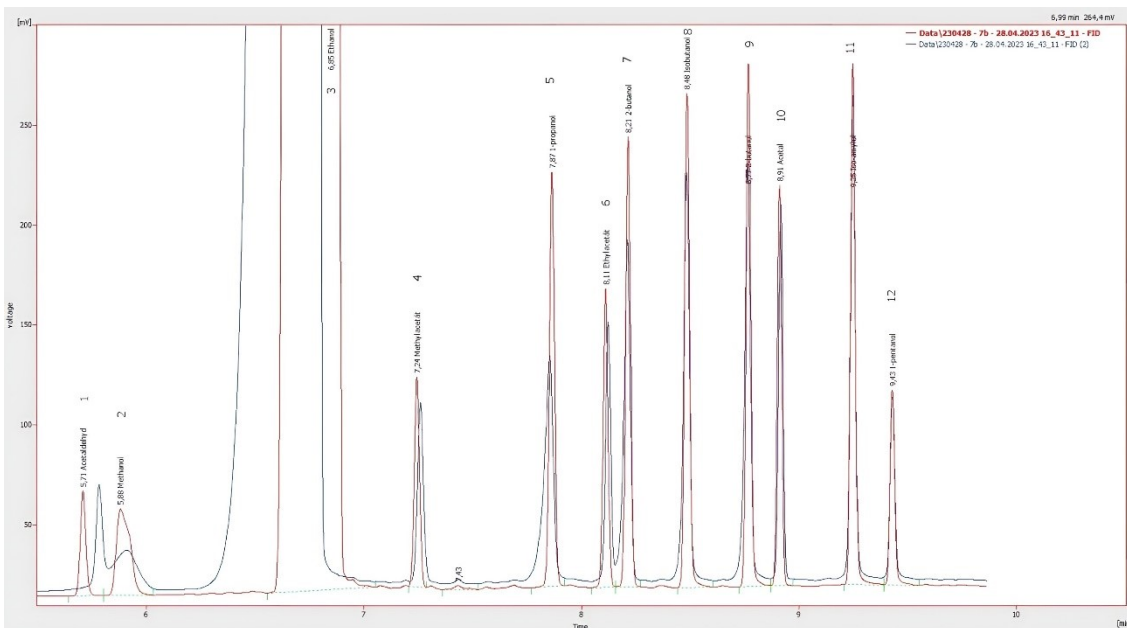
Obrázek 5.2 Počáteční teplota 60 °C s následným teplotním gradientem 20 °C/min do finální izotermie 210 °C (5 min). Krátká doba analýzy, nedostatečná separace píku 1 a 2, 6 a 7.



Obrázek 5.3 Počáteční izoterma 45 °C (3 min), teplotní gradient 1 (20 °C/min) do 70 °C, teplotní gradient 2 (65 °C/min), finální izoterma 240 °C (3 min). Dobrá separace všech analyzovaných složek, kratší doba analýzy.

5.2 Měření kalibračních roztoků

V rámci série měření podle navrženého Taguchiho experimentu bylo provedeno 27 GC-FID analýz při různých podmínkách chromatografického systému ve třech opakováních. Optimalizovaný teplotní profil GC systému poskytl dostatečnou separaci analyzovaných složek u všech 27 experimentálních podmínek měření. Pouze u analýzy, která zahrnovala kombinaci následujících parametrů (řádek 7 tabulky 4.4): obsah alkoholu 20 %, koncentrace analytů 2000 mg/l AA, objem nástřiku 1,2 µl, teplota injektoru 240 °C, dělicí poměr 1:20 a teplota detektoru 220 °C, byl pozorován problém při separaci píku acetaldehydu a methanolu (na chromatogramu pík č. 1 a 2) a píku pro ethyl-acetát a 2-butanol (na chromatogramu pík č. 6 a 7). Tyto podmínky analýzy poskytl nereprodukovatelné výsledky měření, jak je patrné z obrázku 5.4.



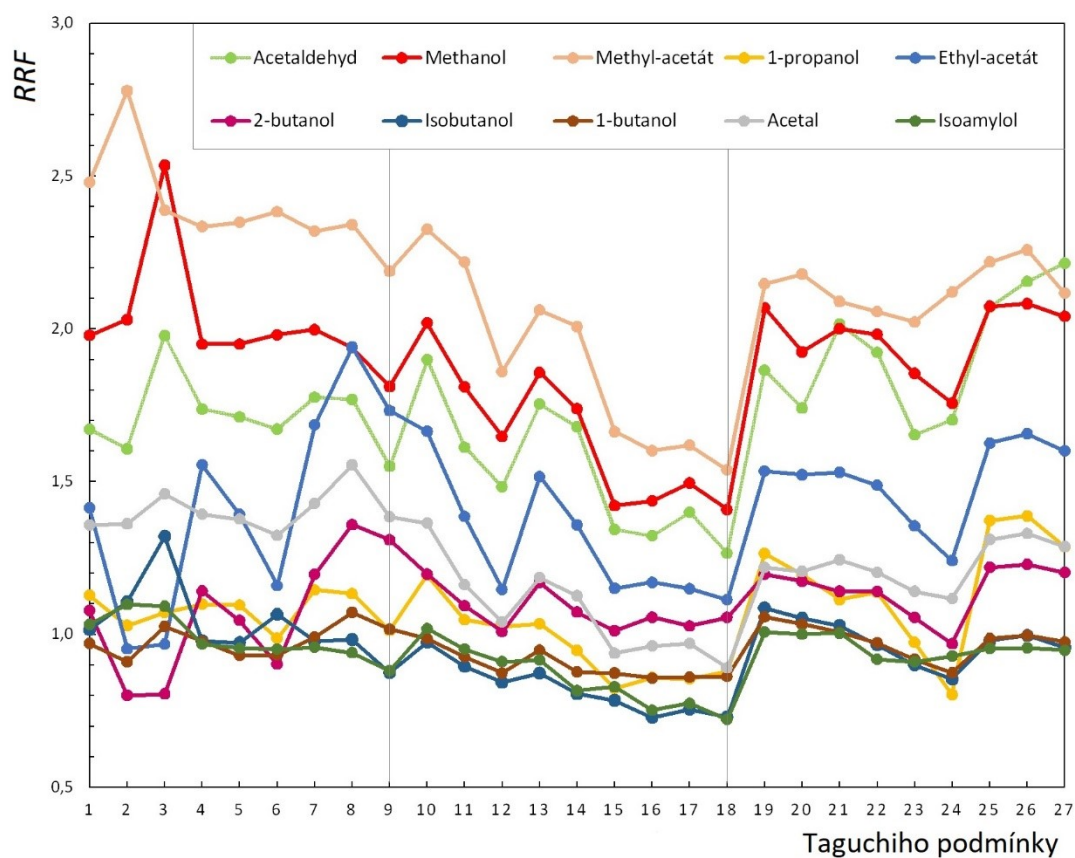
Obrázek 5.4 Chromatogramy získané při identických podmínkách měření, s kombinací faktorů: obsah alkoholu 20 %, koncentrace analytů 2000 mg/l AA, objem nástřiku 1,2 μ l, teplota injektoru 240 $^{\circ}$ C, dělicí poměr 1:20 a teplota detektoru 220 $^{\circ}$ C.

Bylo provedeno 8 nástřiků za identických podmínek. Z toho 4 měření vedla k nedostatečné separaci píků a byla proto z analýzy vyloučena. U zbylých 4 chromatogramů byly analyty úspěšně odděleny, aniž by bylo nutné upravovat podmínky analýzy. Příčinou tohoto problému by mohla být skutečnost, že podmínky daného měření, kdy byl do chromatografického systému aplikován nejvyšší dávkovací objem (1,2 μ l) a nejnižší dělicí poměr (1:2) u vzorku s nejnižším obsahem alkoholu, vedly k tomu, že do GC systému se v této kombinaci faktorů dostal největší objem vody. Přebytečná voda může ovlivnit vzájemné interakce mezi analyty vzorku a stacionární fází v chromatografické koloně a způsobit tím posun píku a snížení účinnosti separace látek. Zvýšený objem vody může vést také k nežádoucím fluktuacím teploty, a tím negativně ovlivňovat odezvu detektoru, případně může reagovat s dalšími materiály přístroje. To může způsobit nižší rozlišovací schopnost a opakovatelnost GC systému^{5,17}. Aby se předešlo tomuto nežádoucímu efektu, měly by být podmínky měření u vzorků s nízkým obsahem ethanolu upraveny na nižší objem nástřiku a/nebo větší dělicí poměr.

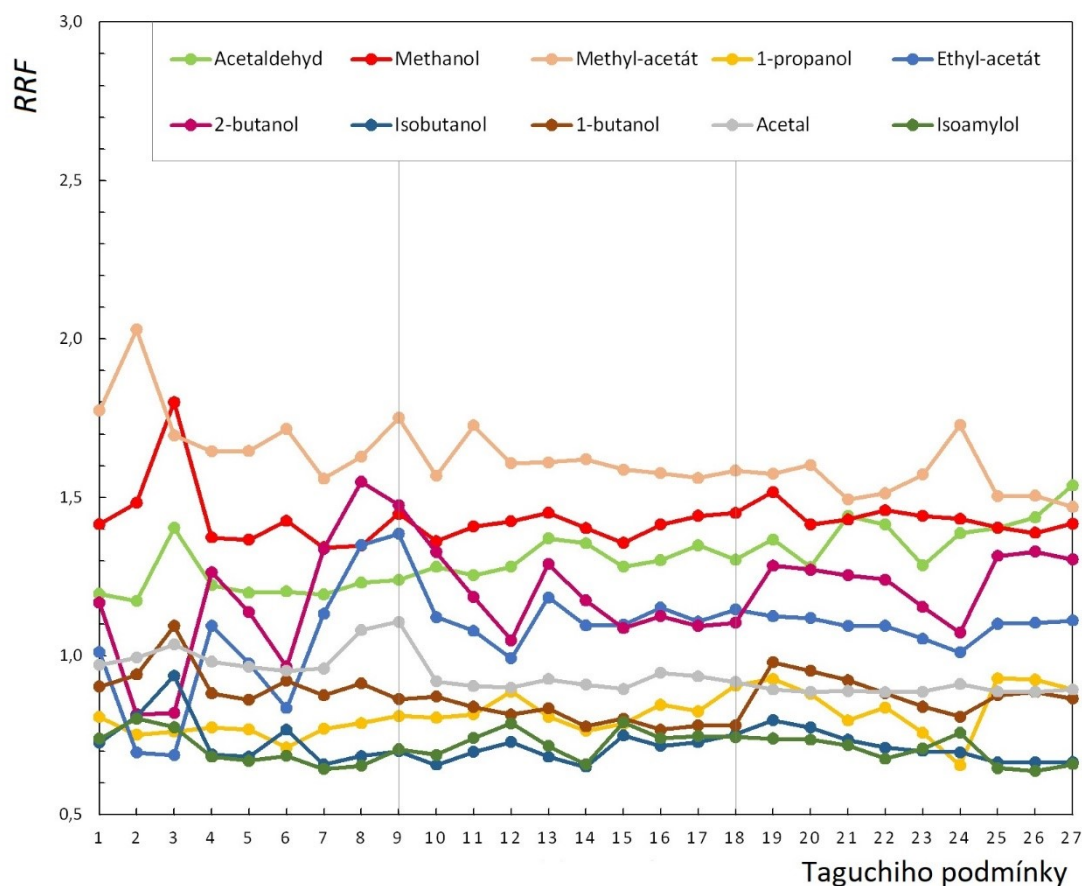
5.3 Hodnoty RRF

Cílová hodnota RRF v rámci jednotlivých měření byla pro každou analyzovanou látku získána jako průměrná hodnota ze tří opakovaných měření. Kompletní analýza poskytla 27 RRF hodnot pro každou zkoumanou látku u obou metod interního standardu. Sledovaná stabilita hodnot RRF by se měla projevit tím, že poměr mezi odezvou analytu

a odezvou interního standardu zůstává při opakovaných měřeních nebo při různých podmínkách analýzy konstantní. Na obrázcích 5.5 a 5.6 jsou znázorněny získané hodnoty relativních faktorů odezvy z celé série měření pro obě použité metody.



Obrázek 5.5 Přehled RRF hodnot všech analyzovaných látek pro metodu využívající interní standard 1-pentanol. Pro sadu měření 1 až 9 byla použita matrice s 20 % ABV. Pro měření 10 až 18 byla použita matrice s 40 % ABV a pro měření 19 až 27 byla použita matrice s 96 % ABV.



Obrázek 5.6 Přehled RRF hodnot všech analyzovaných látek pro metodu využívající interní standard ethanol. Pro měření 1 až 9 byla použita matrice s 20 % ABV. Pro měření 10 až 18 byla použita matrice s 40 % ABV. Pro měření 19 až 27 byla použita matrice s 96 % ABV.

Ze získaných grafů je patrné, že hodnoty RRF zejména u metody s běžně používaným vnitřním standardem 1-pentanolem v závislosti na podmínkách měření značně kolísaly. Pro lepší názornost byly použity spojnicové grafy a měřítko os y byla zachována na stejných hodnotách. Nejvýraznější odchýlení hodnot RRF se u této metody projevovalo během první série měření (1 až 9) a třetí série měření (19 až 27). V případě prvních devíti měření byla zvolena matrice s 20 % ABV, pro posledních devět analýz byl standardní roztok připraven v matrici 96 % ABV. Z grafického znázornění na obrázku 5.5 je patrné, že série měření 10 až 18, kdy byla zvolena druhá úroveň faktoru ABV, tj. matrice s 40 % ABV, poskytla v rámci celého experimentu nižší odchylky RRF. U měření s použitím ethanolu jako IS nedocházelo v průběhu experimentu k tak výrazným odchýlkám RRF mezi jednotlivými analýzami jako u předchozí metody. Podle obrázku 5.6 poskytla metoda „Ethanol jako IS“ při analýze těkavých látek celkově lepší stabilitu RRF.

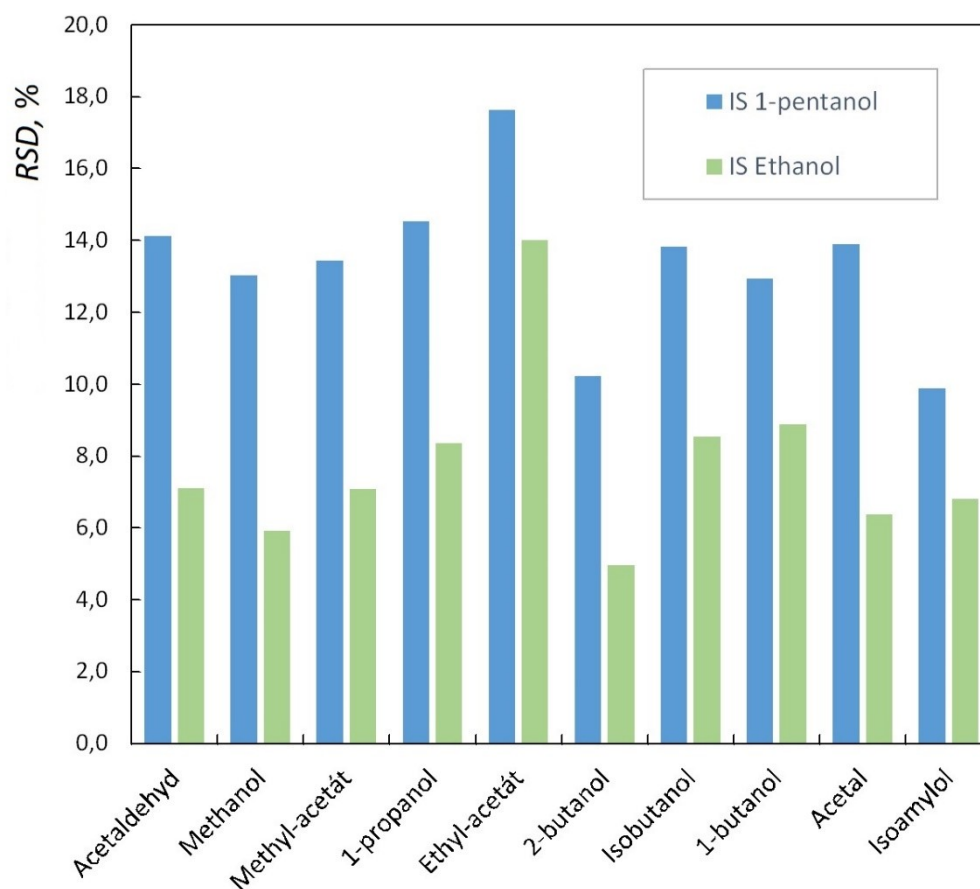
Nejvyšších hodnot RRF dosahovaly u obou metod nejvíce těkavé látky acetaldehyd, methyl-acetát a methanol.

Z 27 hodnot RRF každé měřené složky byla vypočítaná relativní směrodatná odchylka podle vztahu (4.2). Pro porovnání variability získaných RRF byla dále vypočítaná průměrná hodnota relativní směrodatné odchylky, která činila pro metodu s interním standardem 1-pentanolem $13,3 \pm 1,6$ % a pro metodu s interním standardem ethanolom $7,8 \pm 1,8$ %. Hodnoty vypočítaných RSD pro každou studovanou látku a obě metody vnitřního standardu jsou uvedeny v tabulce 5.1.

Tabulka 5.1 Přehled vypočítaných relativních směrodatných odchylek (RSD) [%] RRF hodnot studovaných analytů.

Analyt	1-pentanol	Ethanol
Acetaldehyd	14,1	7,1
Methanol	13,0	5,9
Methyl-acetát	13,4	7,1
1-propanol	14,5	8,4
Ethyl-acetát	17,6	14,0
2-butanol	10,2	5,0
Isobutanol	13,8	8,5
1-butanol	12,9	8,9
Acetal	13,9	6,4
Isoamylol	9,9	6,8
Průměrná hodnota RSD $\pm \delta$	13,3 \pm 1,6	7,8 \pm 1,8

Grafické znázornění získaných hodnot RSD pro odezvové faktory u obou metod interního standardu je uvedeno na následujícím obrázku 5.7.



Obrázek 5.7 Porovnání hodnot RSD u metody s interním standardem 1-pentanolem a metody „Ethanol jako interní standard“.

Porovnáním získaných dat je zřejmé, že hodnoty odezvoových faktorů pro metodu „Ethanol jako IS“ vykazují vyšší stabilitu ve srovnání s tradiční metodou interního standardu. Největší hodnota směrodatné odchylky byla zaznamenána pro látku ethyl-acetát při použití obou metod vnitřního standardu. V rámci jednotlivých měření této látky byla zaznamenána výrazná variabilita hodnot RRF, zejména při analýzách, které představovaly kombinaci faktorů nejvíce koncentrovaného vzorku (2000 mg/l AA) v 20% matrici, největší dávkovaný objem (1,2 μ l) a nejvyšší teplotu injektoru (240 °C). Bylo také pozorováno, že za těchto podmínek se stabilita odezvy zhoršila i pro látku 2-butanol, která eluuje těsně vedle ethyl-acetátu. Tato nastavení měření mohla být spojena s nežádoucím jevem známým jako „backflash“, kdy objem vzniklých par přesáhne kapacitu lineru. Tento proces může narušit separaci látek a mít negativní dopad na kvalitu analýzy^{29,91}.

Obecně vyšší hodnoty směrodatné odchylky u všech analyzovaných látek mohly být způsobeny manuálním dávkováním vzorků do chromatografického systému.

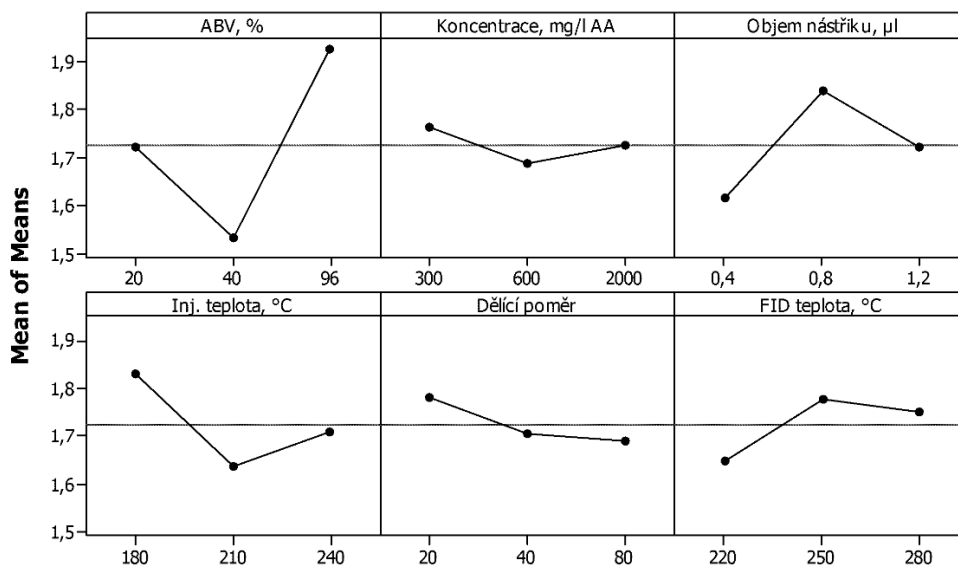
5.4 Taguchiho analýza

Pro návrh a zpracování experimentu byla použita multifaktoriální Taguchiho metoda. Analýza výsledků byla provedena pomocí statistického programu Minitab 16. Ze získaných hodnot RRF byly softwarem vytvořeny Taguchiho grafy, které slouží jako nástroj pro grafickou analýzu a interpretaci dat. Jako příklad jsou uvedeny Taguchiho grafy pro acetaldehyd na obrázku 5.8, všechny získané grafy studovaných látek pro obě metody IS jsou uvedeny v Příloze 1 na obrázcích 8.1 až 8.10.

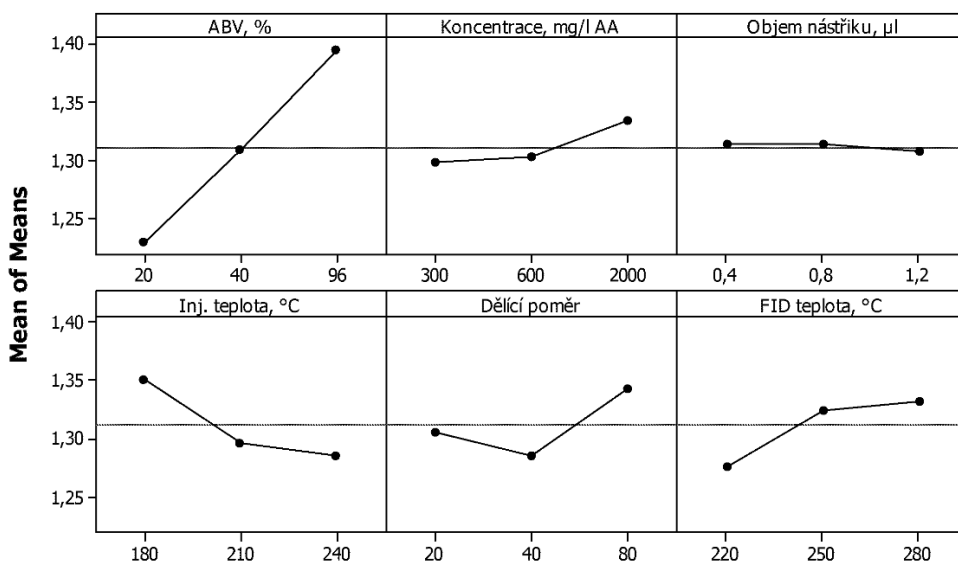
Pro vyhodnocování výsledků byl použit typ grafu nazývaný „mean of means“, který prezentuje průměr ze všech vypočítaných středních hodnot odpovědí zkoumaného systému při různých kombinacích faktorů a jejich úrovních. Na horizontální ose diagramu jsou zobrazeny jednotlivé faktory a jejich úrovně, zatímco na vertikální ose jsou vyznačeny průměrné hodnoty získaných RRF. Středem těchto grafů prochází osa, která představuje průměrnou hodnotu RRF pro studovanou látku získanou ze všech kombinací analýz Taguchiho plánu. Celkově bylo v rámci experimentu provedeno 27 sérií měření, přičemž každá úroveň faktoru byla použita 9krát. Tři body na grafu daného faktoru reprezentují tři zvolené úrovně a jejich číselná hodnota odpovídá průměrné hodnotě z jejich 9 měření. Tyto body jsou spojeny lomenou čarou, která umožňuje posouzení variability RRF způsobené jednotlivými faktory.

Získané Taguchiho grafy ukazují, jak jednotlivé faktory a jejich úrovně ovlivňují hodnotu RRF. Podíváme-li se například na grafy pro acetaldehyd (Obr. 5.8), můžeme si všimnout, že při použití 1-pentanolu jako vnitřního standardu má největší vliv na hodnotu RRF faktor ABV. Dále je vidět, že objem nástřiku a teplota injektoru mají také značný vliv na hodnotu RRF. Naopak koncentrace látky, dělicí poměr vzorku a teplota detektoru mají pouze minimální vliv na výslednou hodnotu RRF. Grafy ukazují, že i při použití ethanolu jako vnitřního standardu je faktor ABV hlavním ovlivňujícím faktorem hodnoty RRF. Teplota injektoru spolu s dělicím poměrem vzorku a teplotou detektoru mají jen minimální dopad na RRF. Koncentrace acetaldehydu a objem nástřiku se téměř neprojeví ve výsledné variabilitě hodnoty RRF.

Acetaldehyd
IS 1-pentanol



Acetaldehyd
IS Ethanol



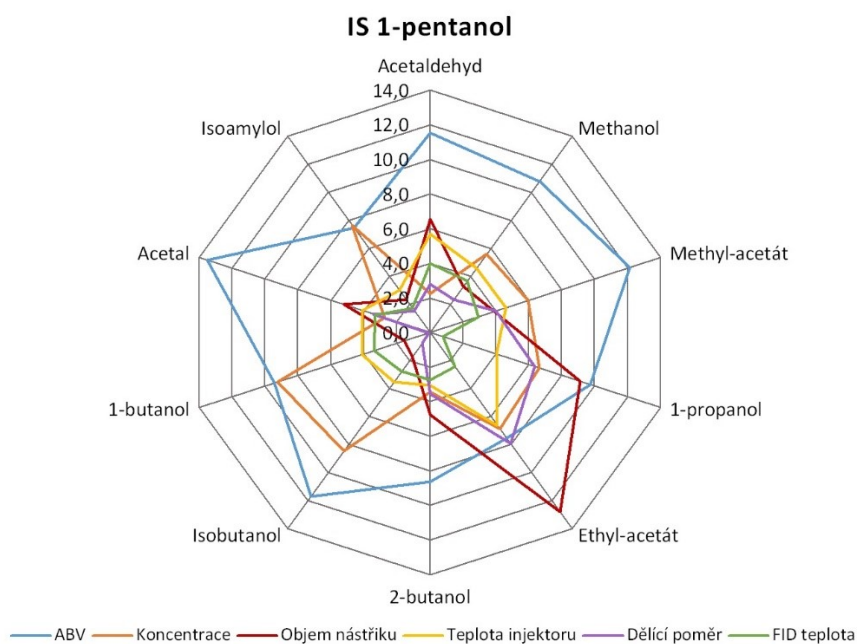
Obrázek 5.8 Taguchiho grafy pro acetaldehyd u metody s interním standardem 1-pentanolem a metody „Ethanol jako interní standard“.

Z analýzy Taguchiho grafů pro všechny studované látky vyplývá, že různé parametry a jejich úrovně mají rozdílný vliv na RRF, přičemž některé faktory jsou významnější než jiné. Pro komplexnější zhodnocení vlivu kontrolních faktorů na hodnotu RRF byla z průměrných hodnot RRF tří úrovní jednotlivých faktorů vypočítána relativní směrodatná odchylka pro každou analyzovanou látku a pro obě metody vnitřního standardu. Získané hodnoty RSD všech zvolených faktorů pro jednotlivé látky jsou uvedeny v tabulce 5.2 a graficky jsou znázorněny na obrázcích 5.9 a 5.10. Z důvodu detailnější analýzy získaných dat a přehledného srovnání obou metod vnitřního standardu byly vytvořeny samostatné grafy pro každou analyzovanou látku zobrazené na obrázku 5.11, které jasně ukazují, jak kontrolní faktor ovlivňuje hodnotu RRF konkrétní látky u obou metod IS.

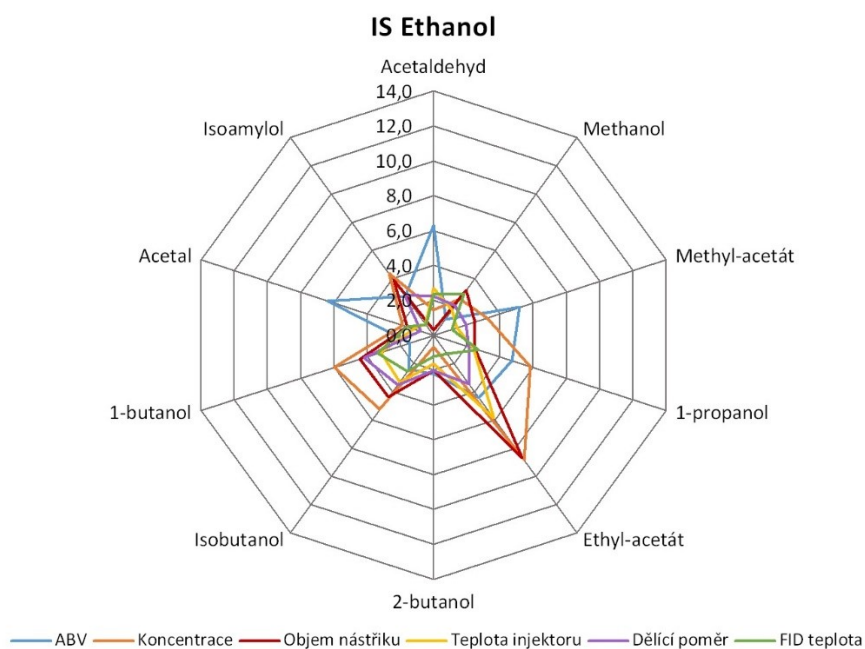
Tabulka 5.2 RSD [%] vypočítaná z průměrných hodnot RRF každé úrovně daného faktoru.

IS 1-pentanol	RSD, %					
	ABV	Koncentrace	Objem nástřiku	Teplota injektoru	Dělicí poměr	FID teplota
Acetaldehyd	11,5	2,2	6,6	5,7	2,8	4,0
Methanol	10,8	5,2	3,3	4,6	2,3	3,7
Methyl-acetát	12,1	6,2	3,9	4,6	4,0	2,9
1-propanol	9,7	6,6	9,1	4,0	6,4	0,8
Ethyl-acetát	7,5	6,9	12,8	6,6	7,9	2,4
2-butanol	8,6	3,4	4,7	3,1	3,6	2,7
Isobutanol	11,7	8,5	1,7	3,5	0,8	2,8
1-butanol	9,4	9,2	1,6	4,1	0,1	3,4
Acetal	13,5	2,7	5,2	4,1	3,4	3,3
Isoamylol	7,4	7,6	2,4	3,0	1,5	1,7
Průměrná RSD ± δ	10,2 ± 1,5	5,9 ± 1,7	5,1 ± 2,5	4,3 ± 0,8	3,3 ± 1,7	2,8 ± 0,7

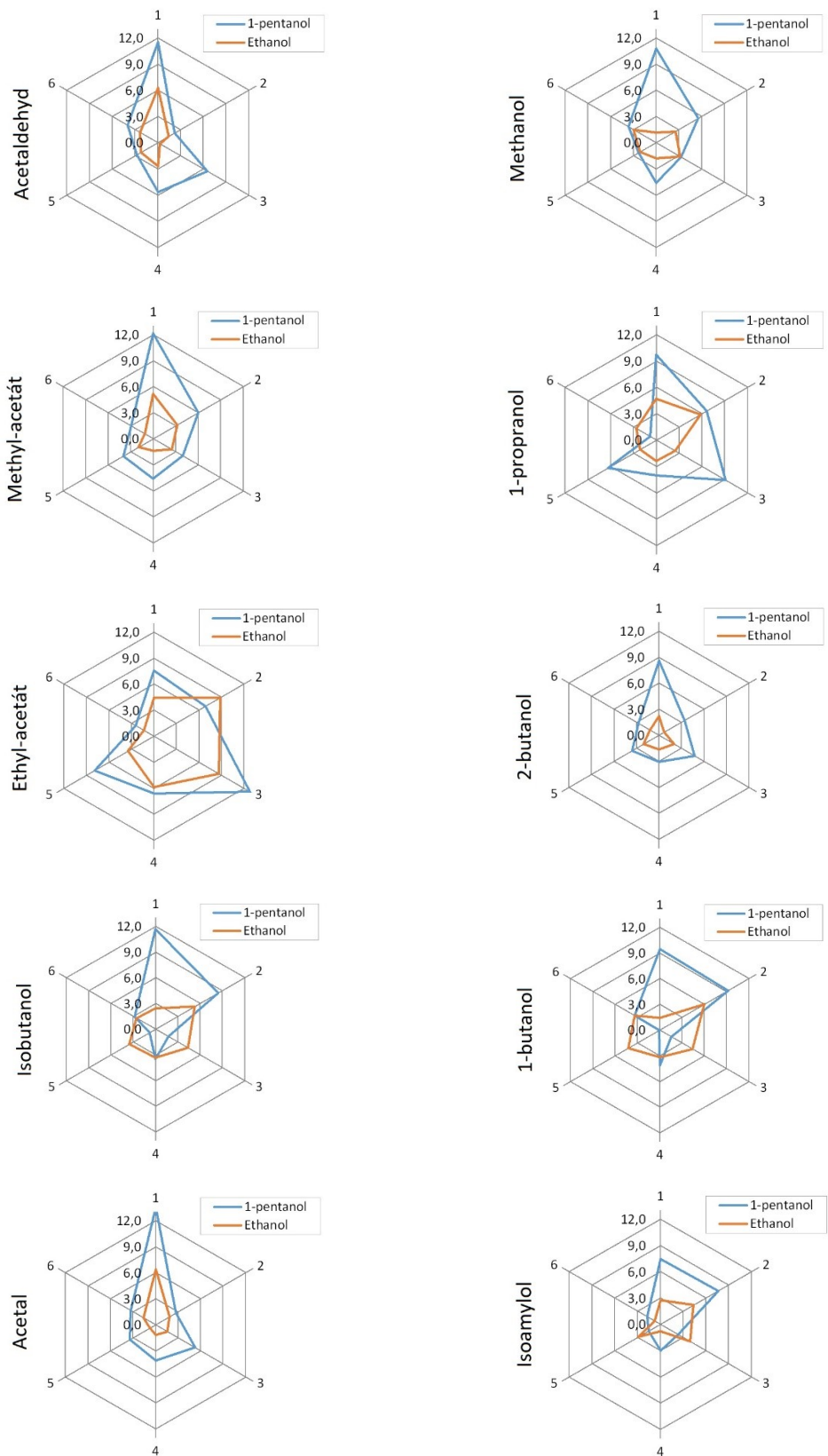
IS Ethanol	RSD, %					
	ABV	Koncentrace	Objem nástřiku	Teplota injektoru	Dělicí poměr	FID teplota
Acetaldehyd	6,3	1,5	0,3	2,7	2,2	2,3
Methanol	1,2	2,6	3,2	1,8	2,1	2,9
Methyl-acetát	5,2	3,2	2,5	1,4	2,0	1,1
1-propanol	4,7	5,8	2,5	2,4	2,1	2,7
Ethyl-acetát	4,4	8,8	8,7	5,9	3,5	1,3
2-butanol	2,2	0,7	2,0	1,6	2,1	1,2
Isobutanol	2,4	5,3	4,4	3,3	3,5	2,6
1-butanol	1,4	6,0	4,4	3,2	4,2	3,4
Acetal	6,4	1,9	1,6	1,2	0,8	1,6
Isoamylol	2,7	4,4	3,9	0,8	2,9	0,8
Průměrná RSD ± δ	3,7 ± 1,4	4,0 ± 1,8	3,4 ± 1,6	2,4 ± 1,1	2,5 ± 0,7	2,0 ± 0,6



Obrázek 5.9 Relativní směrodatná odchylka [%] hodnot RRF u jednotlivých faktorů pro všechny těkavé látky při použití vnitřního standardu 1-pentanolu.

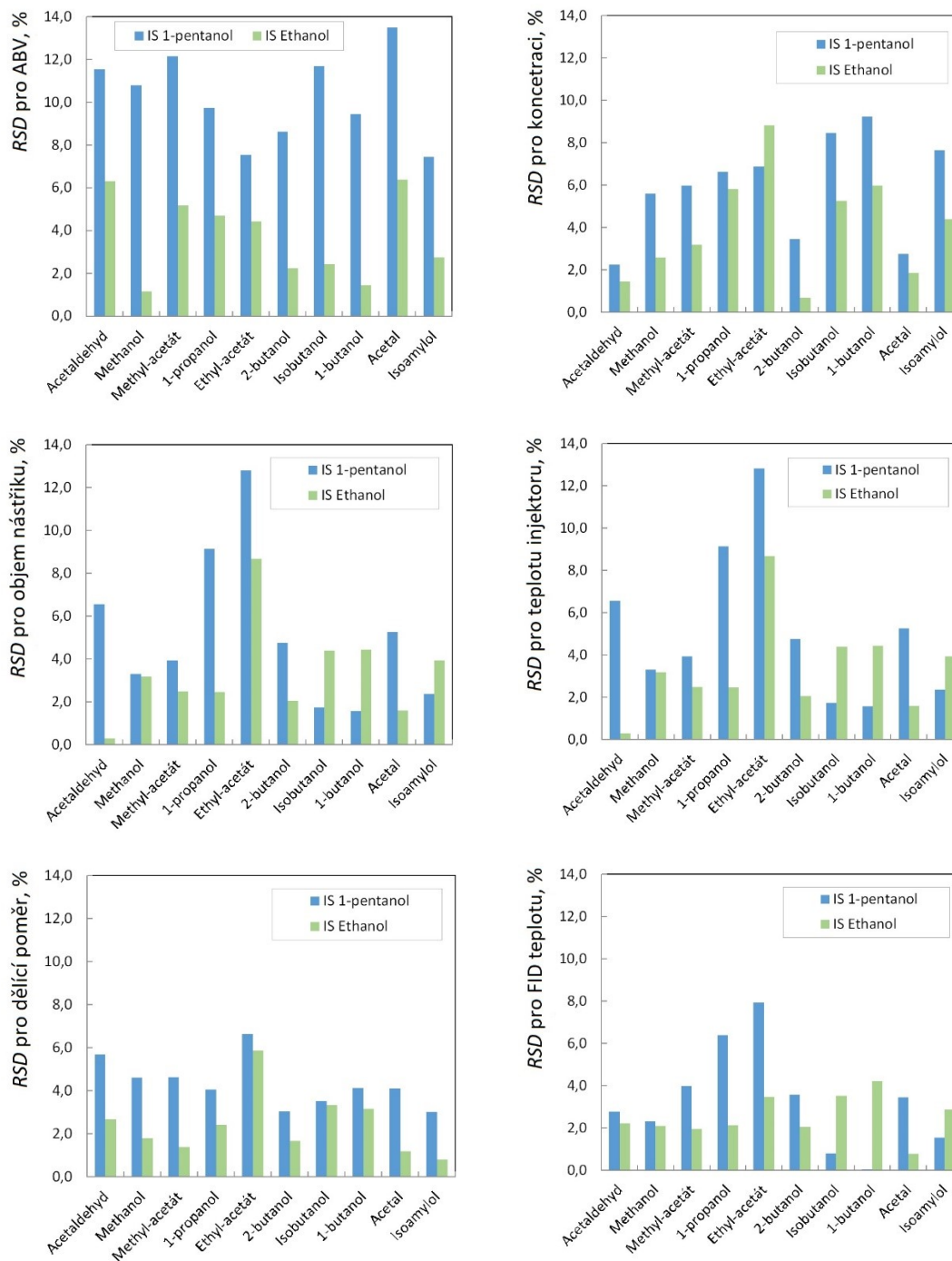


Obrázek 5.10 Relativní směrodatná odchylka [%] hodnot RRF u jednotlivých faktorů pro všechny těkavé látky při použití vnitřního standardu ethanolu.



Obrázek 5.11 RSD [%] z hodnot RRF u všech látek pro jednotlivé faktory. Číslo 1 odpovídá ABV, 2 koncentraci, 3 dávčovanému objemu, 4 teplotě injektoru, 5 dělicímu poměru a 6 teplotě FID.

Dále byly pro usnadnění interpretace získaných údajů vytvořeny rovněž sloupcové grafy uvedené na obrázku 5.12. Zobrazují vliv jednotlivého faktoru na všechny zkoumané látky.



Obrázek 5.12 Srovnání relativních směrodatných odchylek [%] pro jednotlivé faktory a všechny analyzované látky u obou metod vnitřního standardu.

Z uvedených dat je zřejmé, že kontrolní faktor ABV má nejvýznamnější dopad na variabilitu výsledné hodnoty RRF zejména při běžně používané metodě interního standardu. Průměrná relativní směrodatná odchylka pro tento faktor při použití 1-pentanolu jako vnitřního standardu dosáhla hodnoty $10,2 \pm 1,5$ %. Nejvýraznější variabilita odezvy byla přitom sledována u těchto látek: acetaldehydu, methyl-acetátu, isobutanolu a acetalu. Při použití metody „Ethanol jako IS“ představovala průměrná relativní směrodatná odchylka pro faktor ABV o 6,5 % nižší hodnotu, což značí určité zlepšení stability v odezvě systému. I v tomto případě byly faktorem ABV nejvíce ovlivněny látky acetaldehyd a acetal. Na základě Taguchiho grafu pro acetaldehyd (Obr. 5.8) a acetal (Obr. 8.9) s použitím ethanolu jako interního standardu je pozorovatelný určitý trend. U acetaldehydu se zdá, že s rostoucím obsahem ethanolu v matrici stoupá hodnota odezvy, zatímco u acetalu se hodnota odezvy snižuje s nárůstem obsahu ethanolu. Přestože byl acetaldehyd připravován v nižší koncentraci ve standardních roztocích než ostatní analyzované látky, v matrici s 96% obsahem ethanolu pravděpodobně docházelo k jeho transformaci na acetal. Tento jev by mohl vysvětlit vyšší hodnotu relativní směrodatné odchylky u obou látek, což nakonec vedlo k celkově vyšší RSD pro faktor ABV.

Dalším významným faktorem přispívajícím k variabilitě RRF byla koncentrace zkoumaných látek. U tradiční metody vnitřního standardu dosáhla průměrná relativní směrodatná odchylka hodnoty $5,9 \pm 1,7$ %. Pro metodu „Ethanol jako IS“ byla tato odchylka nižší, činila $4,0 \pm 1,8$ %. To naznačuje, že koncentrace látek měla větší vliv na stabilitu odezvy při použití ethanolu jako vnitřního standardu než ABV.

Faktory objem nástřiku, teplota injektoru a dělicí poměr vzorku ovlivnily RRF různých látek v různé míře. U obou metod vnitřního standardu byly průměrné RSD nižší než hodnoty pro faktor ABV a koncentraci. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5.2.

Teplota plamenového ionizačního detektoru byla parametrem, který měl nejmenší vliv na variabilitu RRF u obou metod vnitřního standardu. U metody s použitím 1-pentanolu jako interního standardu byla průměrná hodnota RSD $2,8 \pm 0,7$ %, zatímco u metody „Ethanol jako IS“ činila $2 \pm 0,6$ %.

6 Závěr

Tato diplomová práce se zabývá variabilitou relativních faktorů odezvy deseti těkavých látek běžně přítomných v alkoholických produktech v závislosti na různých podmínkách měření a složení roztoků. Prioritou bylo zjistit, jak různé faktory ovlivňují kalibrační koeficienty s následnou možností snížit počet potřebných kalibračních měření v běžné praxi.

Analýza probíhala pomocí GC-FID za použití dvou metod vnitřního standardu s cílem jejich porovnání. Série experimentů byla navržena Taguchiho statistickou metodou, která umožňuje zkoumat účinek více faktorů současně. Byl posuzován vliv následujících šesti kontrolních faktorů: obsah ethanolu v matrici, koncentrace sledovaných analytů, objem dávkovaného vzorku, teplota injektoru, dělicí poměr a teplota detektoru. Každý parametr během měření nabýval jednu ze tří úrovně hodnot. Tyto faktory a jejich úrovně byly vybrány tak, aby zahrnovaly běžně používané podmínky měřících systémů a charakterizovaly většinu alkoholických produktů analyzovaných v praxi.

Nejprve byla provedena optimalizace teplotního profilu GC systému s cílem zajistit dostatečnou separaci všech analyzovaných složek. Poté bylo provedeno 27 sérií analýz podle Taguchiho plánu ve třech opakováních. Každé měření představovalo rozdílnou kombinaci šesti kontrolních faktorů a jejich tří úrovní. Kompletní analýza poskytla 27 hodnot relativních faktorů odezvy pro každou zkoumanou látku u obou metod interního standardu. Tyto výsledky ukázaly, že hodnoty RRF v závislosti na podmínkách měření značně kolísaly. Nejvyšší hodnoty RRF byly zaznamenány pro nejvíce těkavé látky acetaldehyd, methyl-acetát a methanol u obou metod vnitřního standardu.

Pro porovnání variability získaných hodnot RRF obou metod interního standardu byla vypočítána průměrná relativní směrodatná odchylka RRF všech analyzovaných látek. Pro tradiční metodu s použitím 1-pentanolu jako IS byla tato hodnota $13,3 \pm 1,6$ %. Při použití metody „Ethanol jako IS“ byla tato hodnota nižší, a to $7,8 \pm 1,8$ %.

Získané RRF hodnoty byly použity k vytvoření Taguchiho grafů pro každou analyzovanou látku a obě metody vnitřního standardu. Tyto grafy vizualizují, jak jednotlivé faktory a jejich úrovně ovlivnily hodnotu RRF. Bylo zjištěno, že různé parametry a jejich odlišné úrovně měly rozdílný vliv na RRF, přičemž některé faktory se ukázaly být významnější než ostatní. U tradiční metody interního standardu byl klíčovým parametrem ovlivňujícím variabilitu RRF kontrolní faktor ABV, jehož průměrná hodnota RSD dosahovala $10,2 \pm 1,5$ %. U metody „Ethanol jako IS“ měla největší vliv na RRF hodnoty koncentrace analyzovaných látek, přičemž průměrná hodnota RSD činila $4,0 \pm 1,8$ %.

Z analýzy dat jednoznačně vyplývá, že při měnících se podmínkách měření prokazuje metoda s ethanolem jako vnitřním standardem větší stabilitu hodnot relativních faktorů odezvy. Je zřejmé, že tento analytický postup vede ke zvýšení přesnosti a správnosti kvantifikace sledovaných látek v alkoholických produktech. Navíc tato metoda výrazně zjednodušuje proces měření, protože není nutné přidávat interní standard do každého analyzovaného vzorku a měřit jeho hustotu k určení hodnoty ABV, jak je tomu u běžně používané metody vnitřního standardu. Tím se zkracuje doba analýzy, zvyšuje se její spolehlivost a snižují se náklady. Experimentální výsledky této diplomové práce potvrzují vhodnost použití metody „Ethanol jako IS“ v rutinní praxi při kontrole kvality alkoholických nápojů. Zároveň mohou data týkající se stability kalibračních faktorů přispět k redukci počtu potřebných kalibračních měření.

7 Použitá literatura

- [1] Open library: *29.4 Chromatography Technology* [on-line]. Dostupné z: <https://ecampusontario-pressbooks-pub.translate.goog/orgbiochemsupplement/chapter/chromatography-technology/?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=cs&_x_tr_hl=cs&_x_tr_pto=sc> [cit. 10.8.2023]
- [2] *06. Plynová chromatografie (GC)* [on-line]. Dostupné z: <<https://is.muni.cz/el/sci/jaro2009/C6390/7480488/uvod.pdf>> [cit. 2.7.2023]
- [3] Karlíček, R., a kol.: *Analytická chemie pro farmaceuty*. 2. vyd. Praha, Karolinum 2005.
- [4] Kosina, P.: Kolonové separace - chromatografie. In: *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. N. Cibiček; J. Vacek (Ed.). Olomouc, Univerzita Palackého, 2014, p. 122–131.
- [5] Technology Networks: *Gas Chromatography - How a Gas Chromatography Machine Works, How To Read a Chromatograph and GCxGC* [on-line]. Dostupné z: <<https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxc-335168>> [cit. 25.3.2024]
- [6] Balíková, M.: *Forezní a klinická toxikologie*. Praha, Galén 2007.
- [7] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.: *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Praha, VŠCHT 2019.
- [8] Bartovský, T.: *Provozní plynové chromatografy* [on-line]. Dostupné z: <https://automa.cz/Aton/FileRepository/pdf_articles/10151.pdf> [cit. 5.6.2023]
- [9] Čajdová, J.: *Objektivizácia faktorov životného a pracovného prostredia I*. Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine 2020.

- [10] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. 2. vyd. Praha, Karolinum 2010.
- [11] Zachař, P.; Sýkora, D.: *Plynová chromatografie* [on-line]. Dostupné z: <<http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>> [cit. 22.7.2022]
- [12] Poustka, J.: *Plynová chromatografie - základní teorie* [on-line]. Dostupné z: <<https://web.vscht.cz/~poustkaj/1%20seznam%20studijnich%20materialu%20ISM%20od%202019.htm>> [cit. 9.9.2023]
- [13] Literák, J.: *Plynová chromatografie* [on-line]. Dostupné z: <<https://is.muni.cz/el/sci/podzim2012/C5060/um/prezentace.pdf>> [cit. 30.10.2023]
- [14] Nováková, L.; Douša, M., a kol.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Hradec Králové, Lucie Nováková 2013.
- [15] Coufal, P.; Bosáková, Z.; Čabala, R.; Suchánková, J.; Feltl, L.: *Seminář z analytické chemie. Teorie, příklady, cvičení*. 2. přeprac. vyd. Praha, Karolinum 2007.
- [16] Ondroušek, S.: Stanovení organických látek v Celně technické laboratoři. In: *Organická analýza*. J. Čáslavský; J. G. K. Ševčík (Ed.). Český Těšín: 2 THETA, 2022, p. 423–428
- [17] LabRulez: *Teorie, praxe a údržba: GC – Plynová chromatografie – základy a principy* [on-line]. Dostupné z: <<https://gcms.cz/article/854>> [cit. 2.3.2024]
- [18] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava, Pavel Klouda 2003.
- [19] Ševčík, J. G. K.; Vozka, P.: Plynová chromatografie. In: *Organická analýza*. J. Čáslavský; J. G. K. Ševčík (Ed.). Český Těšín: 2 THETA, 2022, p. 57–91.
- [20] Čabala, R.: *Plynová chromatografie, instrumentace* [on-line]. Dostupné z: <<https://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/plynova-chromatografie-pro-studenty-kata/instrumentace-v-gc>> [cit. 12.11.2022]
- [21] Skácel, F.; Tekáč, V.: *Analýza ovzduší*. Praha, VŠCHT 2019.
- [22] Wiśniewska, P.; Śliwińska, M.; Dymerski, T.; Wardencki, W.; Namieśnik, J.: Application of Gas Chromatography to Analysis of Spirit-Based Alcoholic Beverages. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **45**, 201–225 (2015).
- [23] Skoblia, S.: *Komplexní stanovení složení plynu metodou GC-TCD/FID* [on-line]. Dostupné z: <https://upkoo.vscht.cz/files/uzel/0023451/P6-Chromatograficke_stanoveni_topnych_plynu.pdf> [cit. 25.10.2023]

- [24] Křížek, M.; Šíma, J.: *Analytická chemie*. České Budějovice, Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta 2015.
- [25] AntiTeck Life Sciences Limited: *Detektor plynové chromatografie* [on-line]. Dostupné z: <<https://antiteck.com/cs/detektor-plynové-chromatografie-2/>> [cit. 25.9.2023]
- [26] Horák, T.; Čulík, J.; Jurková, M.; Čejka, P.; Kellner, V.; Dvořák, J.; Hašková, D.: Rychlejší plynová chromatografie a její využití v pivovarství. Část 1. - Teoretické a praktické aspekty. *Kvasný průmysl* **55**:9, 250–254 (2009).
- [27] Shimadzu Excellence in Science: *Basics Fundamentals & Gas Chromatography* [on-line]. Dostupné z: <<https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/gaschromatography/sampleinjection/index.htm>> [cit. 26.10.2023]
- [28] Ministerstvo zdravotnictví: *Detektor* [on-line]. Dostupné z: <https://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/AJAOH.htm> [cit. 26.10.2023]
- [29] Poustka, J.: *Plynová chromatografie - nástřiky* [on-line]. Dostupné z: <<https://web.vscht.cz/~poustkaj/1%20seznam%20studijnich%20materialu%20ISM%20od%202019.htm>> [cit. 29.10.2023]
- [30] LabRulez: *Jak vybrat GC liner pro Split, Splitless, Headspace, Purge & Trap nebo SPME nástřík* [on-line]. Dostupné z: <<https://gcms.cz/article/2049>> [cit. 6.11.2023]
- [31] Petrus, K.: *GC Injektory* [on-line]. Dostupné z: <<https://www.pragolab.cz/chromatografie-a-ms/gc>> [cit. 17.9.2023]
- [32] LabRulez: *Head-space analýzy v pivovarské analytice* [on-line]. Dostupné z: <<https://gcms.cz/article/252>> [cit. 4.11.2023]
- [33] Poustka, J.: *Headspace, Purge & Trap* [on-line]. Dostupné z: <<https://web.vscht.cz/~poustkaj/1%20seznam%20studijnich%20materialu%20ISM%20od%202019.htm>> [cit. 29.10.2023]
- [34] Český lékopis: *Plynová chromatografie* [on-line]. Dostupné z: <http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_28.htm> [cit. 29.10.2023]
- [35] Horák, T.; Čulík, J.; Štěrba, K.; Olšovská, J.: Výhody a nevýhody záměny helia jako nosného plynu v plynové chromatografii za vodík. Část III. - Nástřík vzorku a detektory. *Kvasný průmysl* **59**:9, 242–245 (2013).
- [36] Altium International: *SPME (Solid Phase Micro Extraction)* [on-line]. Dostupné z: <<https://hpst.cz/priprava-vzorku/spme/spme>> [cit. 31.10.2023]

- [37] Krofta, K.; Čepička, J.: Stanovení chmelových silic metodou mikroextrakce na tuhou fázi (SPME). *Kvasný průmysl* **46**:9, 235–241 (2000).
- [38] LibreTexts™ Chemistry: *Dynamic Headspace Gas Chromatography Analysis* [on-line]. Dostupné z: <[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_\(Barron\)/05%3A_Reactions_Kinetics_and_Pathways/5.01%3A_Dynamic_Headspace_Gas_Chromatography_Analysis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/05%3A_Reactions_Kinetics_and_Pathways/5.01%3A_Dynamic_Headspace_Gas_Chromatography_Analysis)> [cit. 1.11.2023]
- [39] Horák, T.; Čulík, J.; Jurková, M.; Čejka, P.; Kellner, V.; Dvořák, J.; Hašková, D.: Základní detektory v plynové chromatografii používané v pivovarské analytice. *Kvasný průmysl* **57**:6, 138–142 (2011).
- [40] Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: *Detektory GC - I* [on-line]. Dostupné z: <http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK02-Separace/GC_5.pdf> [cit. 23.1.2024]
- [41] Holčápek, M.: *Spojení hmotnostní spektrometrie a separačních technik* [on-line]. Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz/teaching/MS/07_Spojeni_MS_separaceRJ.pdf> [cit. 23.1.2024]
- [42] Jelínek, I.: *Hmotnostní spektrometrie*. In: *Klinická a toxikologická analýza*. K. Štulík; T. Zima (Ed.) [on-line]. Dostupné z: <<https://old.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Klinicka.pdf>> [cit. 7.9.2023]
- [43] Eurolab: *Zkušební laboratoř pro plynovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii (GC-MS / MS)* [on-line]. Dostupné z: <[https://www.laboratuar.com/cs/testler/kimyasal-testler/gaz-kromatografisi-kutle-spektrometresi-\(gc-ms-ms\)-test-laboratuvvari/](https://www.laboratuar.com/cs/testler/kimyasal-testler/gaz-kromatografisi-kutle-spektrometresi-(gc-ms-ms)-test-laboratuvvari/)> [cit. 7.12.2023]
- [44] Rome, K.; McIntyre, A.: Intelligent use of Relative Response Factors in Gas Chromatography-Flame Ionisation Detection. *Chromatography today* **5**, 52–56 (2012).
- [45] Tissot, E.; Rochat, S.; Debonneville, C.; Chaintreau, A.: Rapid GC-FID quantification technique without authentic samples using predicted response factors. *Flavour and Fragrance Journal* **27**, 290–296 (2012).
- [46] Luan, F.; Liu, H. T.; Wen, Y.; Zhang, X.: Prediction of quantitative calibration factors of some organic compounds in gas chromatography. *Analyst* **133**, 881–887 (2008).
- [47] Laumer, J.-Y.; Cicchetti, E.; Merle, P.; Egger, J.; Chaintreau, A.: Quantification in Gas Chromatography: Prediction of Flame Ionization Detector Response

Factors from Combustion Enthalpies and Molecular Structures. *Analytical Chemistry* **82**, 6457–6462 (2010).

- [48] Korban, A.; Čabala, R.; Egorov, V.; Bosáková, Z.: Variability of internal standard method calibration factors estimated with a multifactorial Taguchi experiment in the analysis of alcoholic products by gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Separation Science* 47:1, 1615–9306 (2024).
- [49] *Zákony pro lidi: Zákon č. 65/2017 Sb. Zákon o ochraně zdraví před škodlivými účinky návykových látek* [on-line]. Dostupné z: <<https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2017-65>> [cit. 17.1.2024]
- [50] *Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 110/2008 ze dne 15. ledna 2008 o definici, popisu, obchodní úpravě, označování a ochraně zeměpisných označení lihovin a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 1576/89* [on-line]. Dostupné z: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32008R0110&qid=1706284658719>> [cit. 17.2.2024]
- [51] Dragone, G.; Mussatto, S. I.; Oliveira, J. M.; Teixeira, J. A.: Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry* **112**, 929–935 (2009).
- [52] Kościelniak, P.; Wiczorek, M.: Univariate analytical calibration methods and procedures. A review. *Analytica chimica acta* 944, 14–28 (2016).
- [53] Plutowska, B.; Wardencki, W.: Application of gas chromatography–olfaktometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages - A review. *Food Chemistry* **107**, 449–463 (2008).
- [54] *Nařízení Komise (ES) č. 2870/2000 ze dne 19. prosince 2000, kterým se stanoví referenční metody Společenství používané pro rozbor lihovin* [on-line]. Dostupné z: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:02000R2870-20160426&qid=1650638305619&from=en#tocId17>> [cit. 8.10.2023]
- [55] *Prováděcí nařízení Komise (EU) 2023/383 ze dne 16. února 2023* [on-line]. Dostupné z: <<https://op.europa.eu/cs/publication-detail/-/publication/ac1214ea-b18b-11ed-8912-01aa75ed71a1/language-cs>> [cit. 20.2.2024]
- [56] AOAC Official Method 972.10. (2005). *Alcohol (higher) and ethyl acetate in distilled liquors. Alternative gas chromatographic method*. Gaithersburg USA, AOAC International 2002.
AOAC Official Method 972.11. (2005). In *Methanol in distilled liquors. Gas chromatographic method*. Gaithersburg USA, AOAC International 2002.

- [57] GB/T 11858 (2008). *Vodka* (p. 10). Beijing, National Standards of People's Republic of China 2008.
- [58] NOM-199-SCFI (2017). *Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones físicoquímicas, información comercial y métodos de prueba*. Ciudad de México, CCONNSE 2017.
- [59] BIS IS 3752. (2009). *Alcoholic drinks – methods of test* (p. 2005). New Delhi, Bureau of Indian Standards 2005.
- [60] Charapitsa, S. V.; Kavalenka, A. N.; Kulevich, N. V.; Makoed, N. M.; Mazanik, A. L.; Sytova, S. N.; Zayats, N. I.; Kotov, Y. N.: Direct Determination of Volatile Compounds in Spirit Drinks by Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**, 2950–2956 (2013).
- [61] Korban, A.; Čabala, R.; Egorov, V.; Charapitsa, S.; Bosáková, Z.; Sytova, S.: Fluctuation of internal standard method calibration factors based on a Taguchi designed experiment while alcoholic products analysis with GC–MS. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **153**, 745–751 (2022).
- [62] Krmenčík, P.; Holcnerová, P.: *Alkohol - Charakteristika* [on-line]. Dostupné z: <<https://www.adiktologie.cz/file/417/alkohol-charakteristika.pdf>> [cit. 5.10.2023]
- [63] Dohnal, V.: *Toxikologie potravin* [on-line]. Dostupné z: <https://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Toxikologie_potravin.pdf> [cit. 9.10.2023]
- [64] Pohanka, M.: *Přehled toxikologie* [on-line]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/profile/Miroslav-Pohanka/publication/272822264_Prehled_toxikologie/links/54f02c300cf2432ba658705c/Prehled-toxikologie.pdf> [cit. 7.10.2023]
- [65] Pokorný, J.; a kol.: *Urgentní medicína*. Praha, Galén 2004.
- [66] Air Products: *Tepelný vodivostní detektor (TCD)* [on-line]. Dostupné z: <<https://www.airproducts.cz/applications/thermal-conductivity-detector>> [cit. 15.1.2024]
- [67] Melzoch, K.: *Lihoviny jako „zdravotně nezávadné“ potraviny?* [on-line]. Dostupné z: <<https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/Publikace/vyroba%20lihoviny.pdf>> [cit. 15.2.2024]
- [68] Burda, A.: *Výroba lihu a členění destilátů* [on-line]. Dostupné z: <https://is.slu.cz/el/fpf/zima2020/ULGATLA048/Vyroba_lihu_destilat.pdf> [cit. 18.2.2024]

- [69] Barták, M.; Šejvl, J.; Mašlánirová, M.; Rogalewicz, V.; Petruželka, B.; Miovský, M.: *Průběh metanolové otravy z veřejnozdravotní perspektivy* [on-line]. Dostupné z: <https://vlada.gov.cz/assets/ppov/protidrogova-politika/koordinace/Bartak_Prubeh_metanolove_otravy_z_veřejnozdravotni_per_spektivy.pdf> [cit. 9.10.2023]
- [70] Toxikologické informační středisko: *Metanol - doporučení pro nemocnice* [on-line]. Dostupné z: <<https://www.tis-cz.cz/index.php/informace-pro-odborniky/methylalkohol/metanol-doporuceni-pro-nemocnice>> [cit. 15.10.2023]
- [71] Česká lékařská komora: *Odborné doporučení pro intoxikaci - metanol (methanol, metylalkohol, dřevný líh, CH₃OH)* [on-line]. Dostupné z: <https://www.lkr.cz/doc/clanky_file/jak-lecit-otravu-metanolem-99324.pdf> [cit. 15.10.2023]
- [72] Linhart, I.: *Toxikologie: Interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. 2. vyd. Praha, VŠCHT 2014.
- [73] Zakharov, S.; Pelclová, D.: *Akutní intoxikace metanolem – diagnostika a léčba. Odborné doporučení* [on-line]. Dostupné z: <<https://docplayer.cz/1495097-Vyskyt-otrav-akutni-intoxikace-metanolem-diagnostika-a-lecba-odborne-doporuceni-1-10-2012-s-zakharov-d-pelclova.html>> [cit. 15.10.2023]
- [74] Apostolopoulou, A. A.; Flouros, A. I.; Demertzis, P. G.; Akrida-Demertzi, K.: Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates. *Food Control* **16**, 157–164 (2005).
- [75] International programme on chemical safety: *1-propanol* [on-line]. Dostupné z: <<https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc102.htm>> [cit. 20.10.2023]
- [76] Vujasinović, M.; Kočar, M.; Kramer, K.; Bunc, M.; Brvar, M.: Poisoning with 1-propanol and 2-propanol. *Human and Experimental Toxicology* **26**, 975–978 (2007).
- [77] Fitzgerald, G.; James, K. J.; MacNamara, K.; Stack, M. A.: Characterisation of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography–mass spektrometry. *Journal of Chromatography A* **896**, 351–359 (2000).
- [78] Geroyiannaki, M.; Komaitis, M. E.; Stavrakas, D. E.; Polysiou, M.; Athanasopoulos, P. E.; Spanos, M.: Evaluation of acetaldehyde and methanol in greek traditional alcoholic beverages from varietal fermented grape pomaces (*Vitis vinifera* L.). *Food Control* **18**, 988–995 (2007).
- [79] Wardencki, W.; Sowiński, P.; Curylo, J.: Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A* **984**, 89–96 (2003).

- [80] Guo, R.; Ren, J.: Alcohol and Acetaldehyde in Public Health: From Marvel to Menace. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **7**, 1285–1301 (2010).
- [81] Greizerstein, H. B.: Congener Contents of Alcoholic Beverages. *Journal of Studies on Alcohol* **42**:11, 1030–1037 (1981).
- [82] Tešević, V.; Nikićević, N.; Milosavljević, S.; Bajić, D.; Vajs, V.; Vučković, I.; Vujisić, L.; Dordević, I.; Stanković, M.; Veličković, M.: Characterization of volatile compounds of “Drenja”, an alcoholic beverage obtained from the fruits of cornelian cherry. *Journal of the Serbian Chemical Society* **74**:2, 117–128 (2009).
- [83] National Library of Medicine: *Methyl acetate* [on-line]. Dostupné z: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl-acetate>> [cit. 23.11.2023]
- [84] Kacker, R. N.; Lagergen, E. S.; Filliben, J. J.: Taguchi’s Orthogonal Arrays Are Classical Designs of Experiments. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* **96**:5, 577–591 (1991).
- [85] Korban, A.; Čabala, R.; Egorov, V.; Bosáková, Z.; Charapitsa, S.: Evaluation of the variation in relative response factors of GC-MS analysis with the internal standard methods: Application for the alcoholic products quality control. *Talanta* **246** (2022).
- [86] *Introduction to Taguchi method* [on-line]. Dostupné z: <https://www.ee.iitb.ac.in/~apte/CV_PRA_TAGUCHI_INTRO.htm> [cit. 12.10.2023]
- [87] Deşliu-Avram, M.; Popescu, M.; Radu, E.; Constantinescu-Aruxandei, D.; Oancea, F.: Optimization of Aroma Compounds Extraction from Wine Lees Using a Taguchi Design. *Proceedings* **57**:42 1–2 (2020).
- [88] Woolf, P.: *Chemical Process Dynamics and Controls* [on-line]. Dostupné z: <<https://ia600701.us.archive.org/28/items/ChemicalProcessDynamicsAndControls/ChemicalProcessDynamicsAndControls.pdf>> [cit. 2.10.2023]
- [89] Charapitsa, S.; Sytova, S.; Kavalenka, A.; Sobolenko, L.; Shauchenka, Y.; Kostyuk, N.; Egorov, V.; Leschev, S.; Vetokhin, S.; Zayats, N.; Tsimbalaev, S.; Kolesnov, A.: The Method for Direct Gas Chromatographic Determination of Acetaldehyde, Methanol, and Other Volatiles Using Ethanol as a Reference Substance: Application for a Wide Range of Alcoholic Beverages. *Food Analytical Methods* **14**, 2088–2100 (2021).
- [90] Charapitsa, S.; Sytova, S.; Korban, A.; Boyarin, N.; Shestakovich, I.; Čabala, R.: The establishment of metrological characteristics of the method “Ethanol as

Internal Standard” for the direct determination of volatile compounds in alcoholic products. *Journal of chemical metrology* **12**:1, 59–69 (2018).

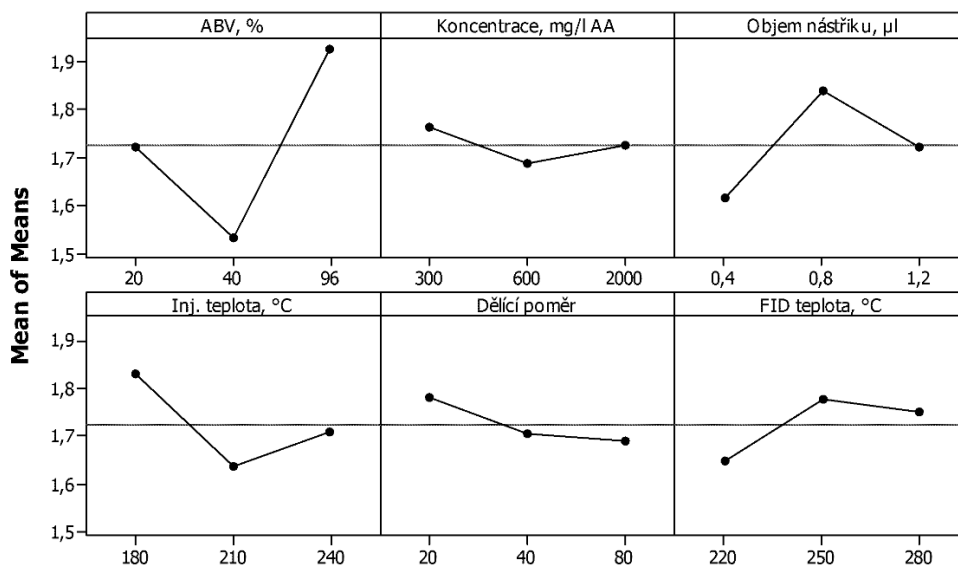
- [91] LabRulez: *Průvodce řešením problémů v GC - základní parametry* [on-line]. Dostupné z: <<https://gcms.cz/article/1732>> [cit. 5.3.2024]
- [92] Zvárová, J.: *Základy statistiky pro biomedicínské obory* [on-line]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/pharm/podzim2020/F1IS1_15/um/download_psa_biomedicina__1_.pdf> [cit. 15.4.2024]

8 Přílohy

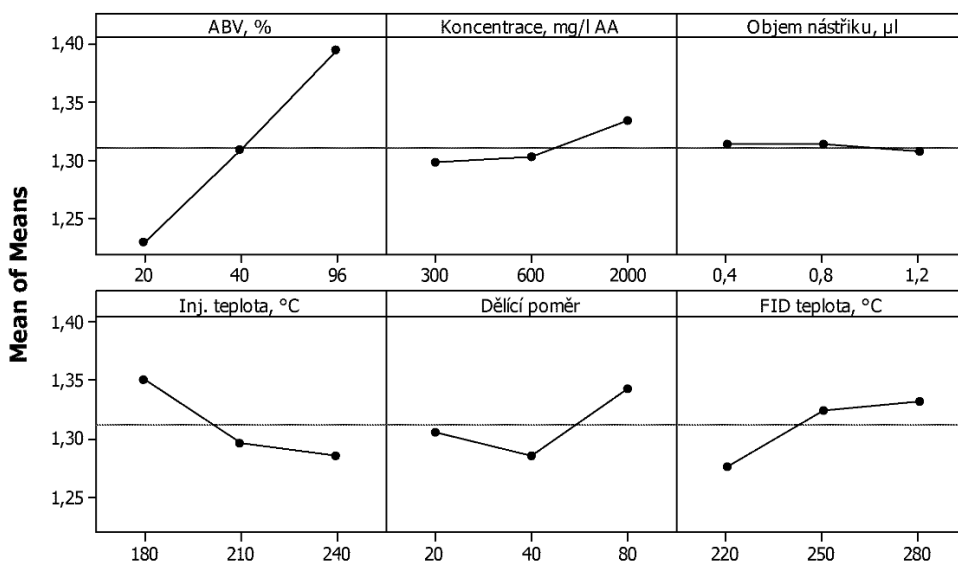
Příloha 1 Taguchiho grafy

Všechny získané grafy studovaných látek pro obě metody IS

Acetaldehyd
IS 1-pentanol

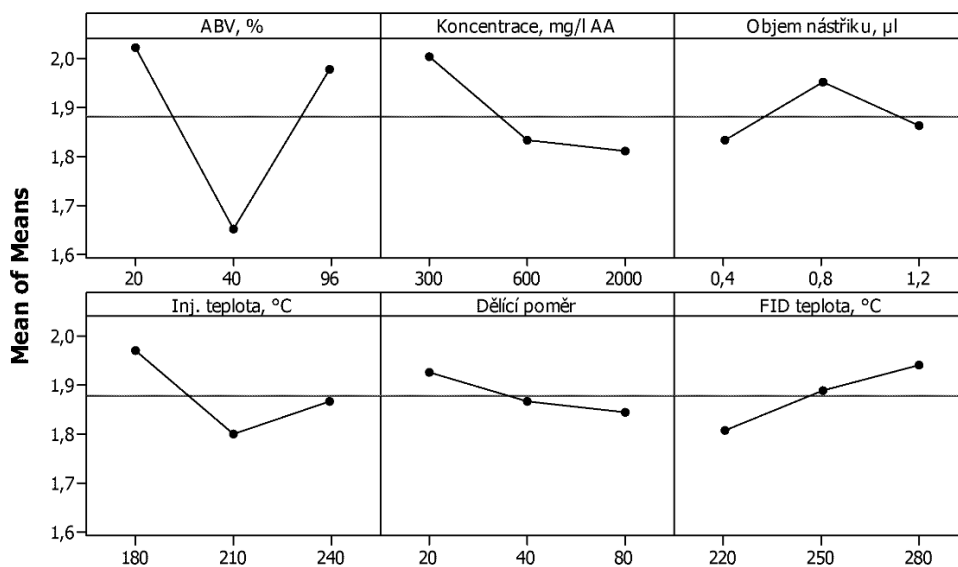


Acetaldehyd
IS Ethanol

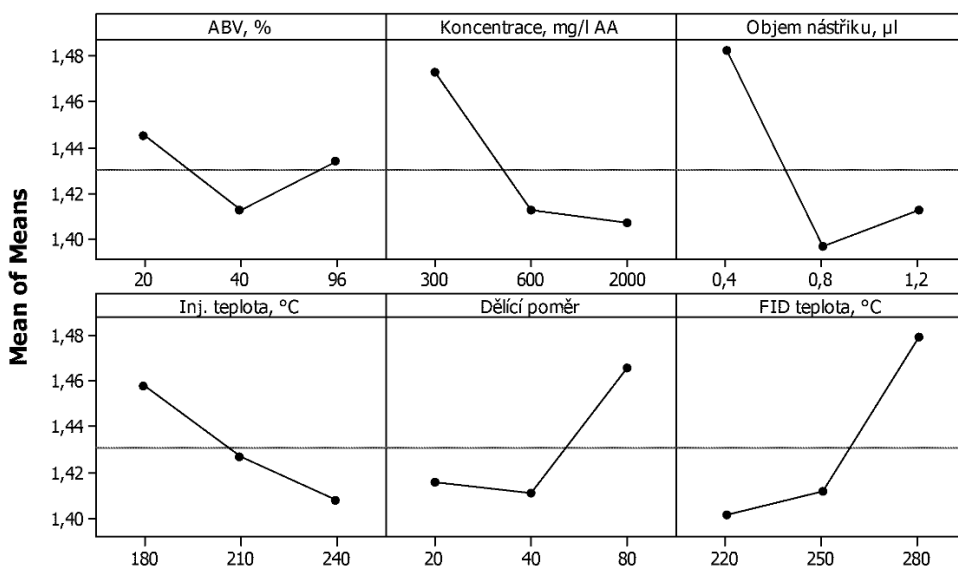


Obrázek 8.1 Taguchiho grafy pro acetaldehyd u metody s interním standardem 1-pentanolem a metody „Ethanol jako interní standard“.

Methanol
IS 1-pentanol



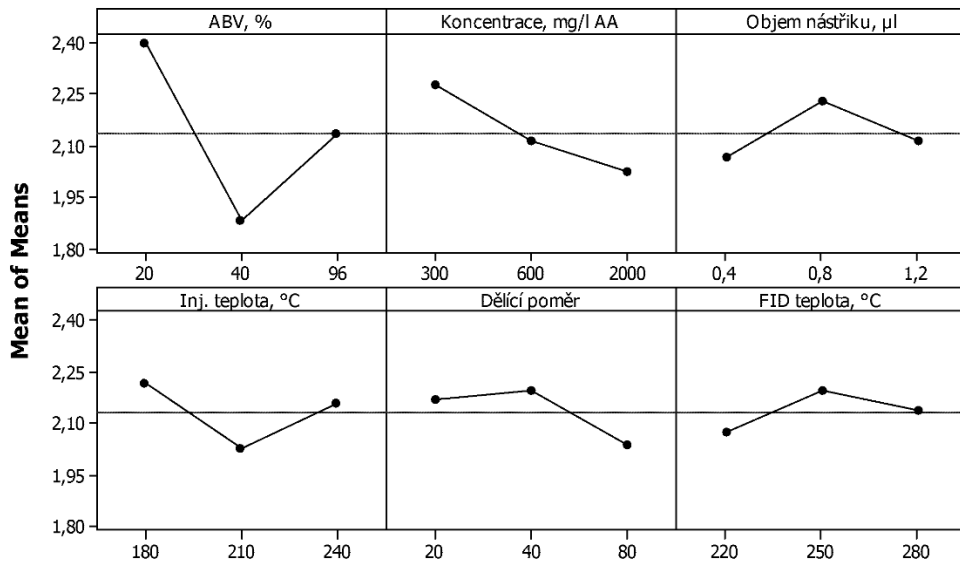
Methanol
IS Ethanol



Obrázek 8.2 Taguchiho grafy pro methanol u metody s interním standardem 1-pentanolem a metody „Ethanol jako interní standard“.

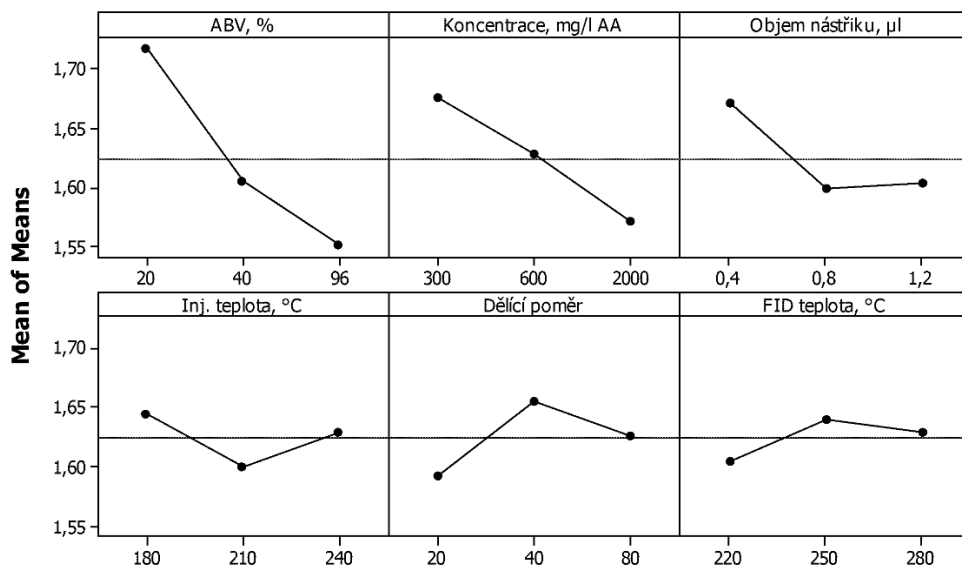
Methyl-acetát

IS 1-pentanol



Methyl-acetát

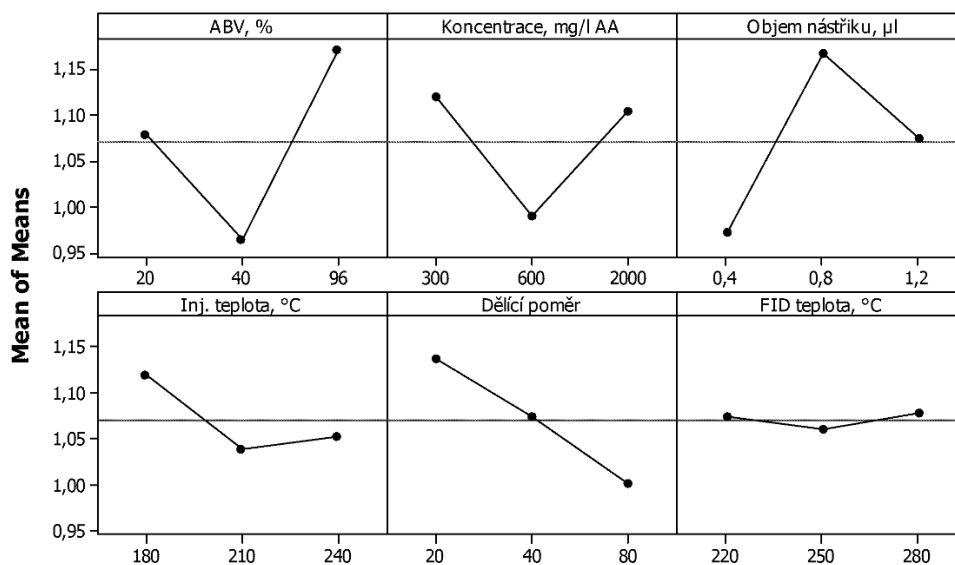
IS Ethanol



Obrázek 8.3 Taguchiho grafy pro methyl-acetát u metody s interním standardem 1-pentanolem a metody „Ethanol jako interní standard“.

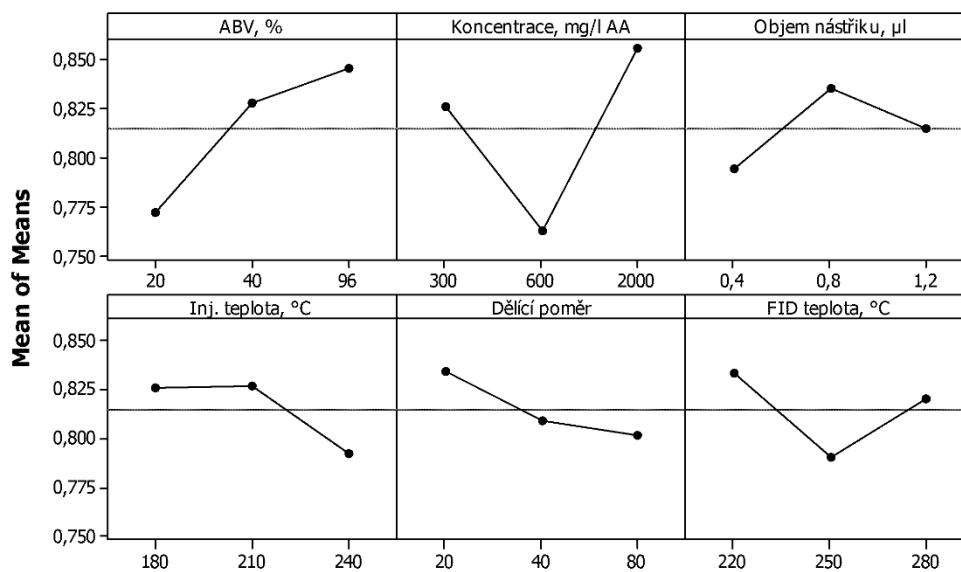
1-propanol

IS 1-pentanol



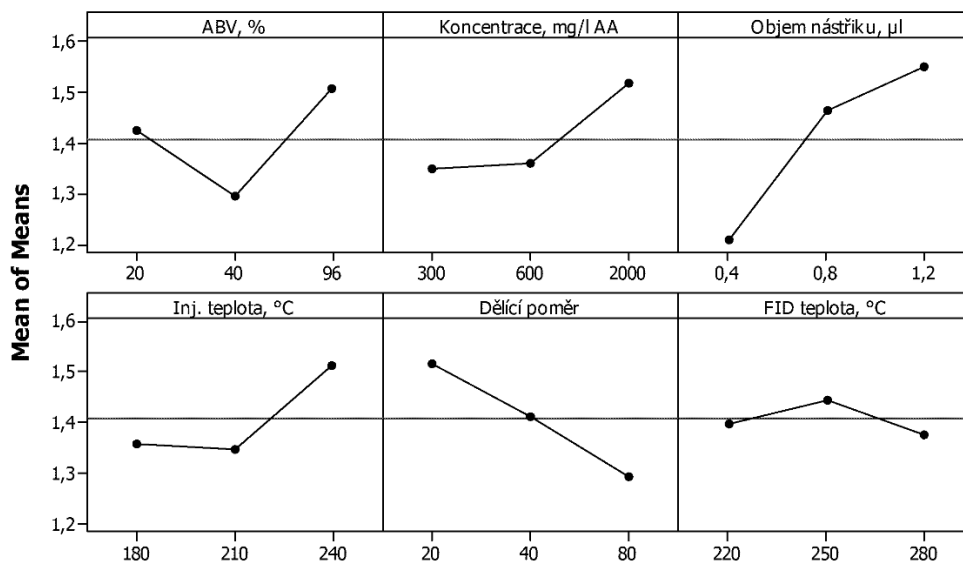
1-propanol

IS Ethanol

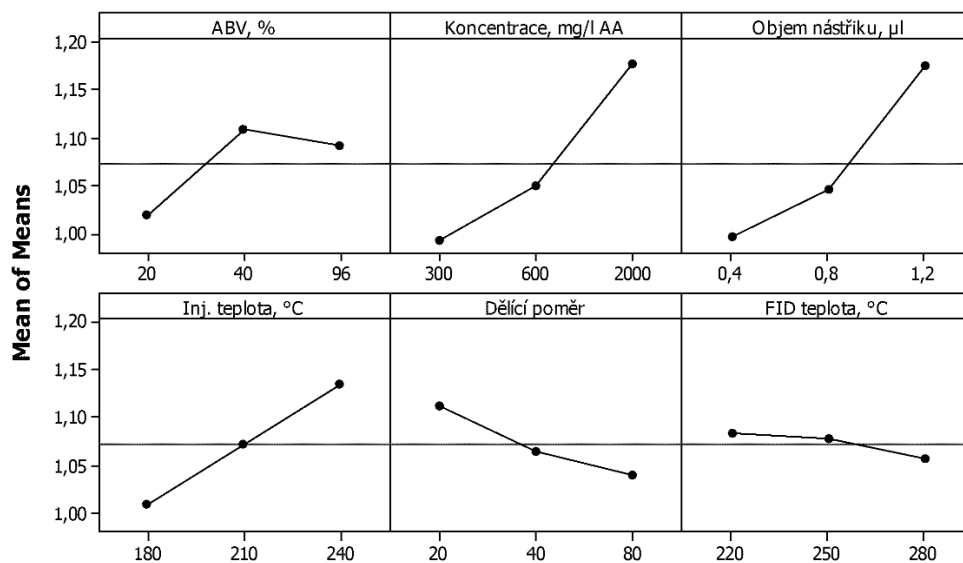


Obrázek 8.4 Taguchiho grafy pro 1-propanol u metody s interním standardem 1-pentanolem a metody „Ethanol jako interní standard“.

Ethyl-acetát
IS 1-pentanol



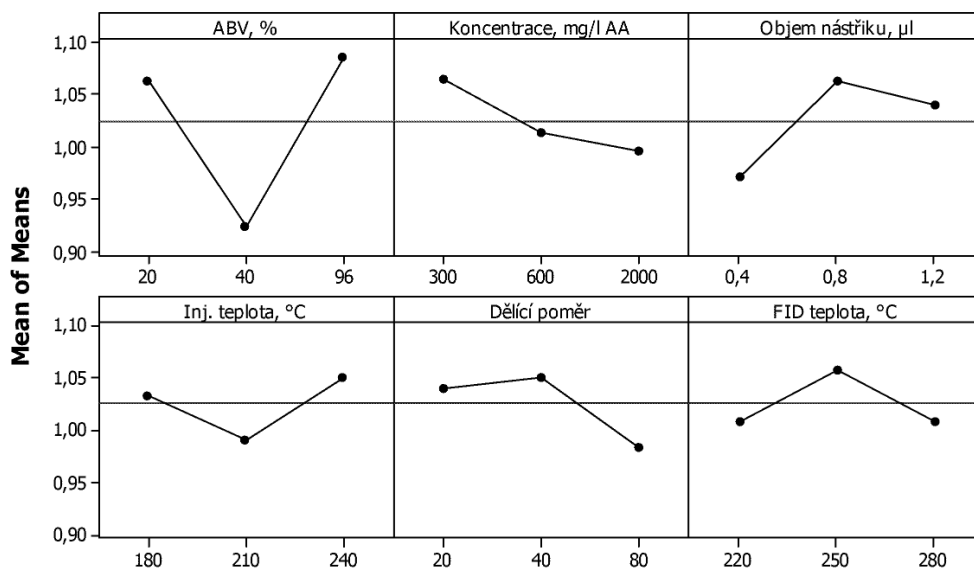
Ethyl-acetát
IS Ethanol



Obrázek 8.5 Taguchiho grafy pro ethyl-acetát u metody s interním standardem 1-pentanolem a metody „Ethanol jako interní standard“.

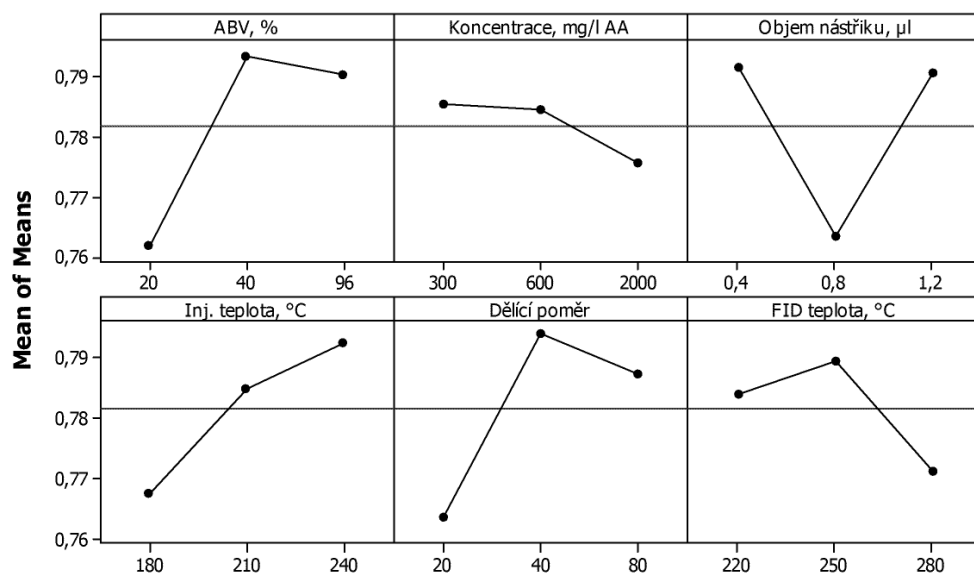
2-butanol

IS 1-pentanol



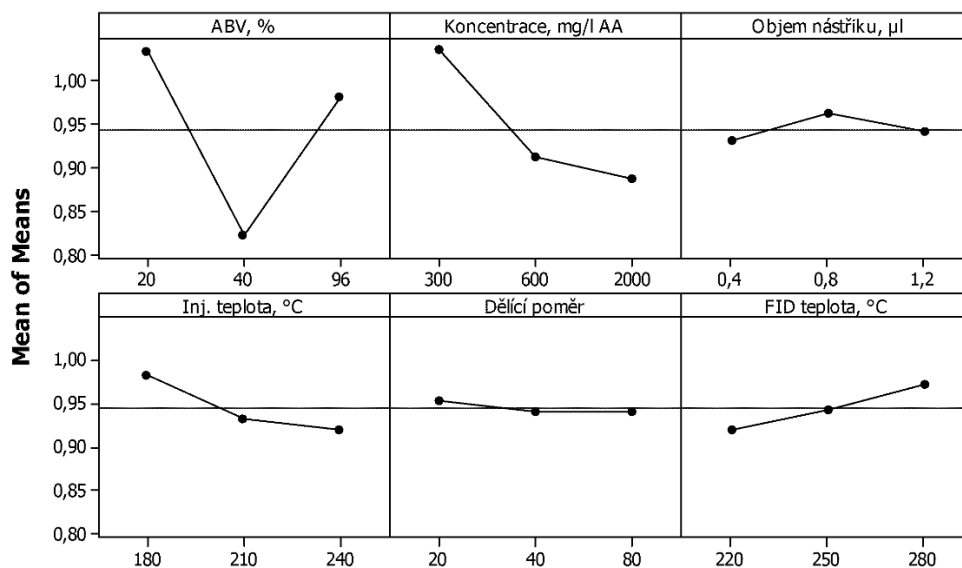
2-butanol

IS Ethanol

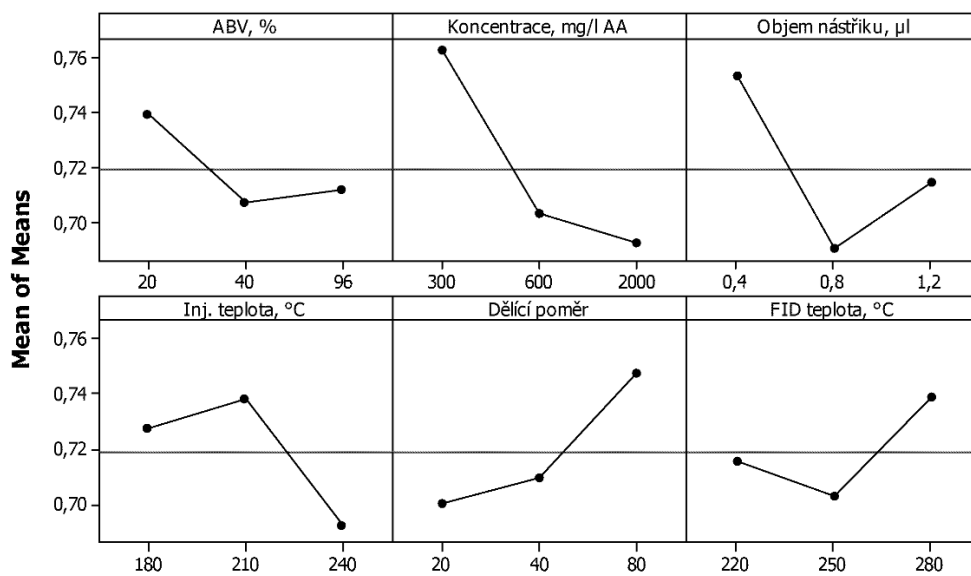


Obrázek 8.6 Taguchiho grafy pro 2-butanol u metody s interním standardem 1-pentanolem a metody „Ethanol jako interní standard“.

Isobutanol
IS 1-pentanol



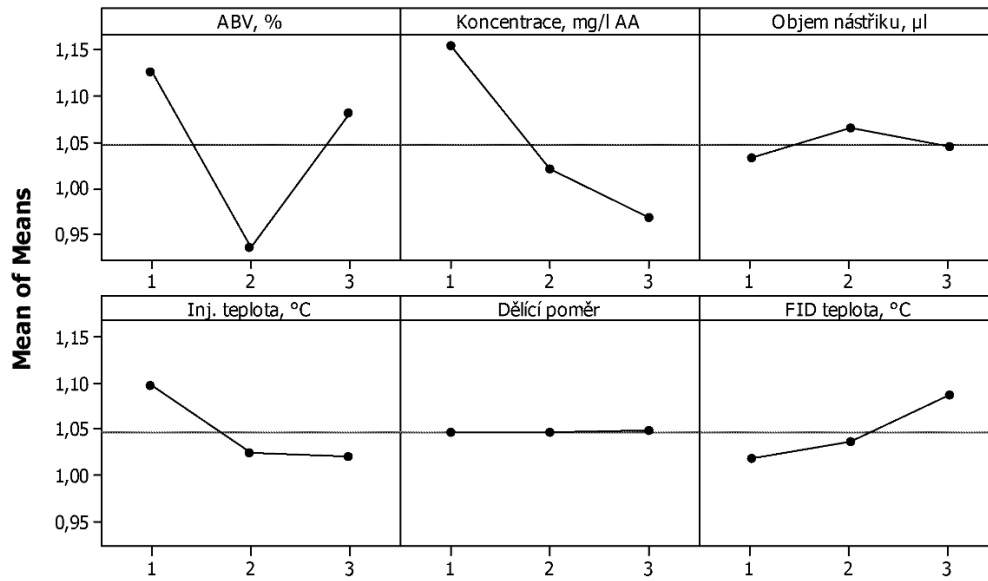
Isobutanol
IS Ethanol



Obrázek 8.7 Taguchiho grafy pro isobutanol u metody s interním standardem 1-pentanolem a metody „Ethanol jako interní standard“.

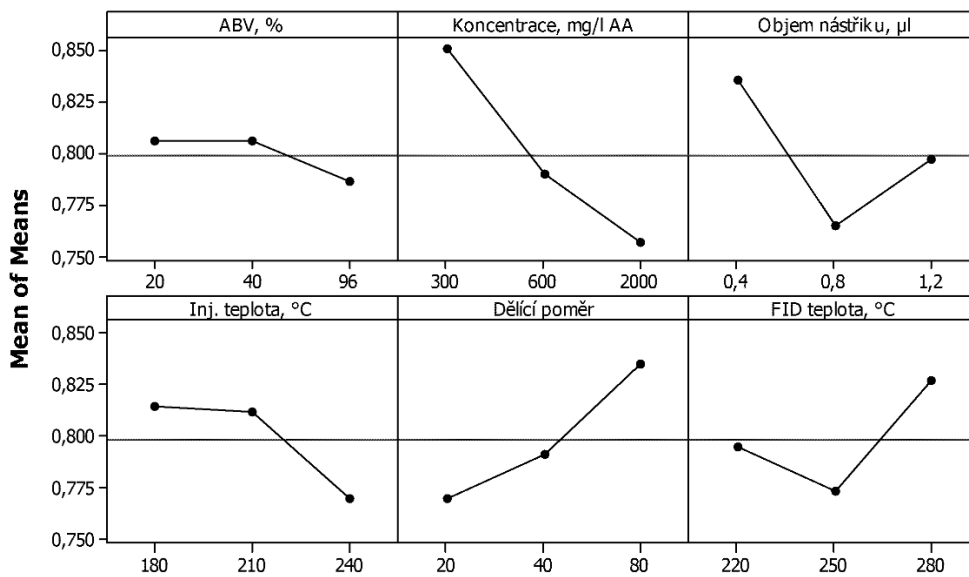
1-butanol

IS 1-pentanol

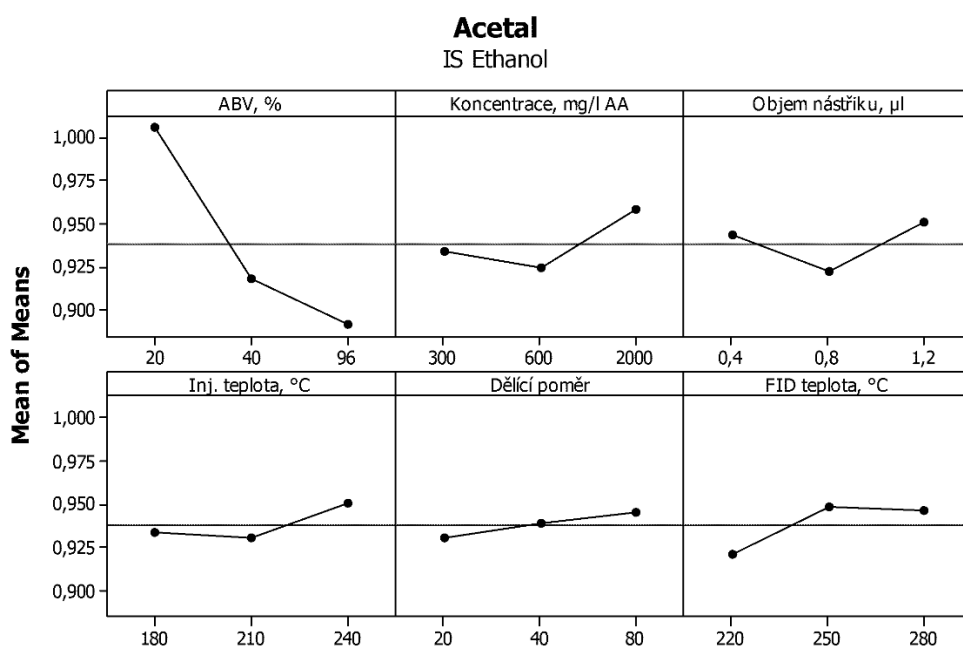
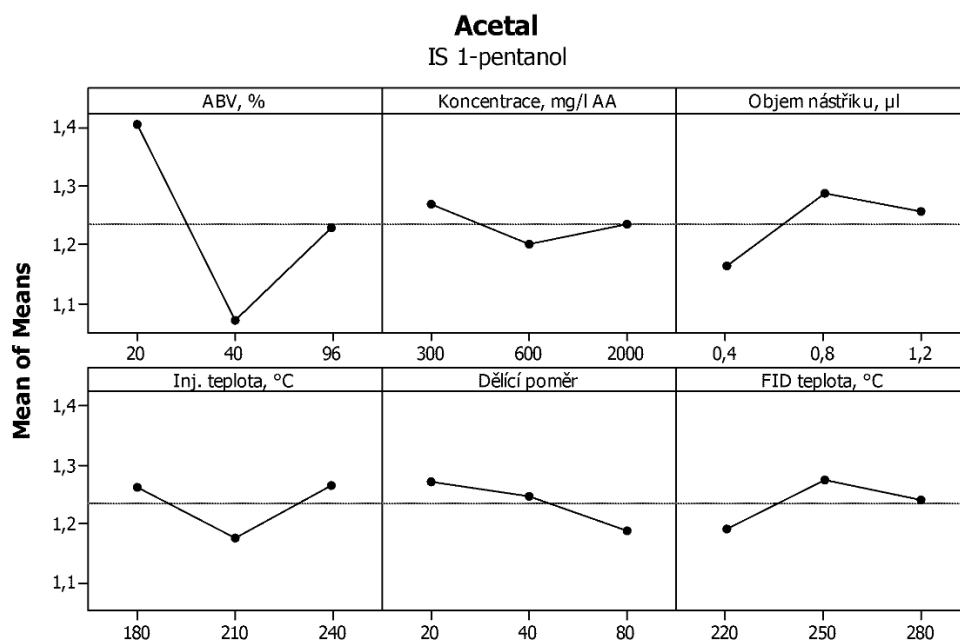


1-butanol

IS Ethanol

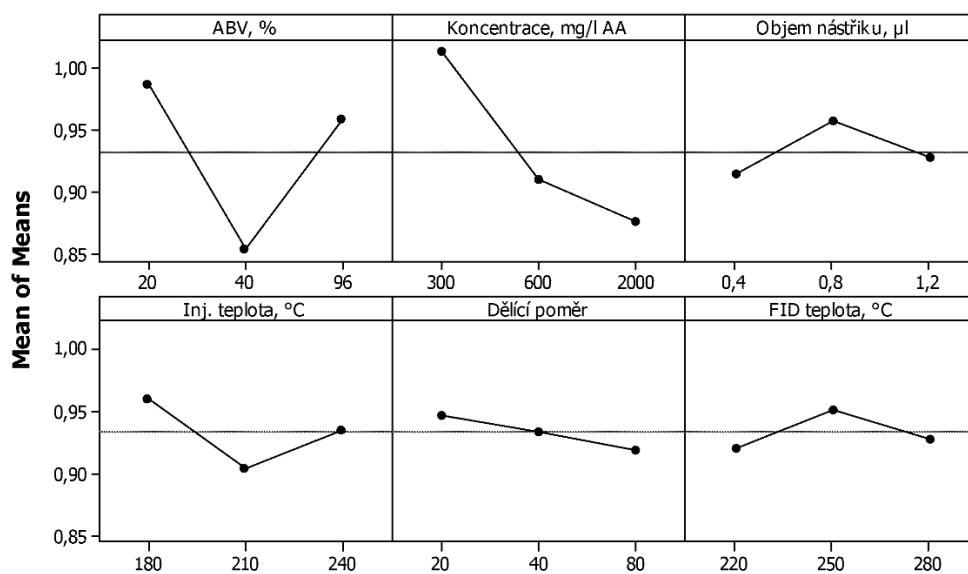


Obrázek 8.8 Taguchiho grafy pro 1-butanol u metody s interním standardem 1-pentanolem a metody „Ethanol jako interní standard“.

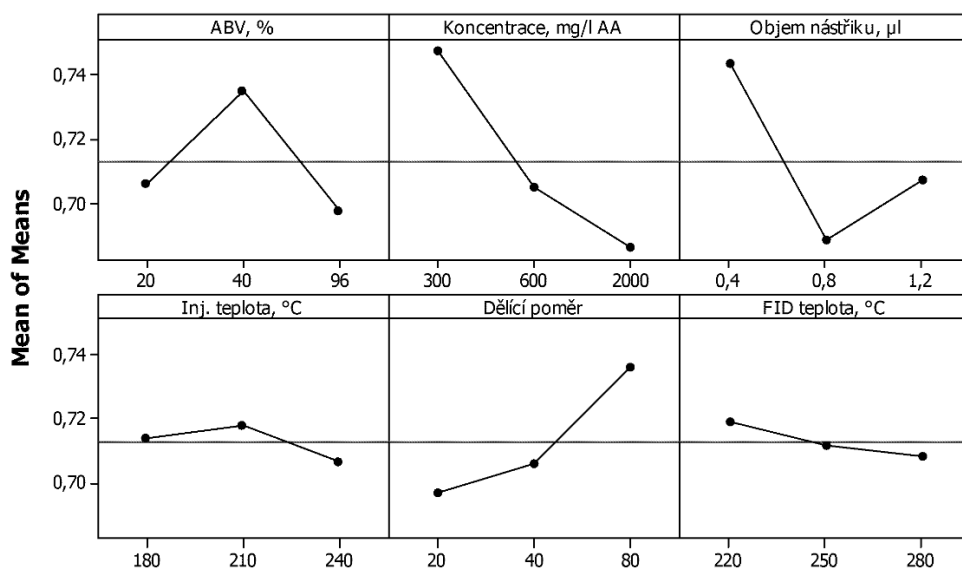


Obrázek 8.9 Taguchiho grafy pro acetal u metody s interním standardem 1-pentanolem a metody „Ethanol jako interní standard“.

Isoamylol
IS 1-pentanol



Isoamylol
IS Ethanol



Obrázek 8.10 Taguchiho grafy pro isoamylol u metody s interním standardem 1-pentanolem a metody „Ethanol jako interní standard“.