

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lucie Havránková

Analýza reakčních produktů vybraných složek piva s dusitanem

Analysis of reaction products of selected beer components with nitrite

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Tomáš Vrzal, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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 21. května 2024

Lucie Havránková

Abstrakt

V této práci byly provedeny reakce vybraných složek piva (především aminokyselin a fenolických sloučenin) s dusitanovými ionty v kyselém prostředí a analýza výsledných reakčních produktů pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí.

Analýzou reakčních produktů bylo nalezeno 127 produktů obsahujících v molekule jeden či více atomů dusíku pocházejících z dusitanu. Nejvíce produktů bylo nalezeno u kyseliny ferulové, kyseliny kumarové, 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu a 2-methoxy-4-vinylfenolu, žádné produkty nebyly nalezeny v případě isoleucinu, kyseliny glutamové, β -fenylethanolu a maltolu.

Klíčová slova

Dusitany, GC–MS, hmotnostní spektrum

Abstract

In this work, reactions of selected beer components (especially amino acids and phenolic compounds) with nitrite ions in an acidic environment and analysis of the resulting reaction products were performed using gas chromatography with mass spectrometric detection.

Analysis of reaction products revealed 127 products containing one or more nitrogen atoms derived from nitrite in the molecule. Most of the products were found in ferulic acid, coumaric acid, 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanone and 2-methoxy-4-vinylphenol, no products were found in the case of isoleucine, glutamic acid, phenylethanol and maltol.

Key words

Nitrites, GC-MS, mass spectrum

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Tomáši Vrzalovi, Ph.D. za ochotu, předané zkušenosti, cenné rady a odborné vedení mé bakalářské práce.

Poděkování patří i mým nejbližším, kteří mi poskytovali podporu během studia.

Obsah

1. Úvod	8
2. Teoretická část	9
2.1. Dusitany a pivo	9
2.2. N-nitrosaminy a nitrosační činidla	10
2.3. Hmotnostní spektrometrie	13
3. Experimentální část	15
3.1. Použité chemikálie.....	15
3.2. Reaktanty	15
3.3. Instrumentace.....	16
3.4. Příprava reakčních směsí pro analýzu	16
3.1. Podmínky separace a hmotnostní detekce	17
3.2. Princip vyhodnocení spekter	17
4. Výsledky a diskuze	20
4.1. 2-acetylpyrol.....	20
4.2. Asparagová kyselina.....	21
4.3. 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon	22
4.4. Fenylacetaldehyd	27
4.5. Fenylalanin	31
4.6. β -fenylethanol, glutamová kyselina, isoleucin, maltol.....	33
4.7. Ferulová kyselina.....	33
4.8. Furaneol.....	45
4.9. Glycin	46
4.10. Histidin	47

4.11. Homofuraneol.....	47
4.12. Kumarová kyselina.....	50
4.13. Leucin.....	59
4.14. Lysin.....	60
4.15. Methionin.....	63
4.16. 2-methoxy-4-vinylfenol.....	65
4.17. Serin.....	68
4.18. Sotolon.....	69
4.19. Tryptofan.....	71
4.20. Tyrosin.....	74
4.21. Valin.....	76
5. Závěr.....	77
6. Seznam použité literatury.....	78

Seznam zkratek a symbolů

ATNC – zdánlivá celková koncentrace nitrososloučenin

BSTFA – N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid

EI – ionizace nárazem elektronu

GC – plynová chromatografie

GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí

MS – hmotnostní spektrometrie

NDMA – N-nitrosodimethylamin

SIM – sledování vybraného iontu

TMCS – trimethylchlorosilan

TMS – trimethylsilyl

1. Úvod

Pivo patří k nejkonzumovanějším nápojům na světě a na jeho kvalitu a zdravotní nezávadnost může mít vliv mnoho faktorů [1]. Mezi tyto faktory patří mikrobiální kontaminace, ke které může docházet v různých fázích výroby piva, nebo při plnění piva do daných nádob [2], [3]. V důsledku mikrobiální kontaminace může docházet k nežádoucím reakcím se sloučeninami obsaženými v pivu, a tudíž k výskytu potenciálně zdraví škodlivých látek v konečném produktu [4]. Mezi možné reaktanty nežádoucích reakcí patří například dusičnany přirozeně se vyskytující v pivu. Mikroorganismy z kontaminace mohou redukovat dusičnany na dusitany, které přispívají k tvorbě toxických nitrosaminů. [2], [4].

Cílem této bakalářské práce bylo nalezení a charakterizace reakčních produktů obsahujících v molekule atom dusíku pocházející z dusitanu a začlenění jejich hmotnostních spekter do stávající knihovny spekter možných dusíkatých kontaminantů piva.

2. Teoretická část

2.1. Dusitany a pivo

Vliv dusitanů na lidské zdraví je stále předmětem diskuse. Mnohé práce poukazují na pozitivní vlastnosti a funkce dusitanů jako zvýšení antibakteriálního účinku žaludečních šťáv přeměnou dusitanu na oxid dusnatý a další dusíkaté meziprodukty v žaludku [5]. O oxidu dusnatém je známo, že reguluje krevní tlak, imunitní odpověď, hojení ran a neurologické funkce. Také bylo dokázáno, že oxid dusný se podílí na řízení průtoku krve v srdečním svalu a potenciálně v dalších tkáních. Produkce oxidu dusnatého a dusitanů může zabránit různým typům kardiovaskulárních onemocnění, včetně hypertenze, aterosklerózy a mrtvice [6], [7], [8].

Nutno zmínit, že nadměrný příjem dusičnanů a dusitanů ve specifických souvislostech spojen se zvýšeným rizikem negativních zdravotních následků, jako je narušení funkce štítné žlázy či porucha trávení a vstřebávání živin [9].

Nicméně největší zdravotní riziko dusitanů plyne z možnosti tvořit potenciálně zdraví škodlivé produkty, jako karcinogenní nitrosaminy, které mohou vznikat reakcí dusitanu se sekundárními aminy. Nejvhodnějším způsobem řešení je odstranění jednoho z prekurzorů nitrosaminů (dusitanů či sekundárních aminů) [7]. Tato práce vzbudila pozornost veřejnosti ohledně bezpečnosti dusitanů a následně byly prováděny studie potenciálních rizik pro lidské zdraví v důsledku expozice dusitanům v potravinách a životním prostředí [7], [9].

Současné životní prostředí je znečištěno různými kontaminanty, jako jsou dusičnany z dusíkatých hnojiv, hojně využívaných v zemědělství pro vyšší výnosy plodin. V půdě se dusík vyskytuje především ve formě amonných solí a dusičnanů. Amonné ionty jsou díky svým sorpčním vlastnostem zadržovány v půdě, na rozdíl od dusičnanů, které se z půdy vyplavují do povrchových a podpovrchových vod a mohou tak dále cirkulovat v přírodě a následně i v potravním řetězci [2].

Mezi významné zdroje dusitanů v potravě patří masné výrobky, jelikož jsou do některých z nich dusitany přidávány záměrně za účelem konzervace. Avšak do piva se mohou dusitany společně s dusičnany dostat skrze některé suroviny jako voda nebo ječný slad [2], [10].

Pivo je neuvěřitelně komplexní nápoj obsahující více než 3000 různých sloučenin, včetně sacharidů, proteinů, iontů, organických kyselin a polyfenolů. [11].

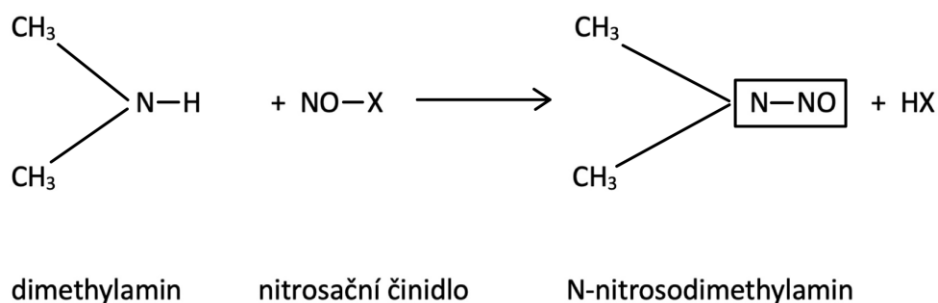
Předpokládá se, že produkty reakcí dusitanů v pivu jsou netěkavé nitrososloučeniny a že jejich prekurzory jsou fenoly, aminy, aminokyseliny nebo peptidy a v závislosti na jejich koncentraci, chemické povaze a podmínkách prostředí mohou být nitrosovány, nitrovány, popř. oxidovány [12], [13].

Podle dostupných zdrojů již byly reakcemi některých aminokyselin, jejich derivátů nebo fenolických sloučenin s dusitanem nalezeny zdraví škodlivé dusíkaté produkty. Byly nalezeny jak nitrosaminy pocházející z reakce dusitanu s lysinem, tak produkty obsahující kyanidovou skupinu pocházející z reakce dusitanu s fenolickými sloučeninami. [14], [15], [16].

2.2. N-nitrosaminy a nitrosační činidla

Existuje souvislost mezi mikrobiální kontaminací piva a koncentrací zdánlivých celkových nitrososloučenin (ATNC, stanovení všech nitroso funkčních skupin ve vzorku) [4]. Za účelem zjistit odkud pochází N-nitrosaminy, byl proveden rozsáhlý výzkum. V rámci výroby piva bylo zjištěno, že ke vzniku N-nitrosaminů může dojít při výrobě sladu, později bylo zjištěno, že mohou vznikat z dalších procesů výroby piva, a to při výrobě mladiny, fermentaci, či zpracování a skladování piva. Avšak pro organické chemiky není nitrosace nic nového, jelikož ji popsal pan Piria v roce 1846 [17]. Ještě, než byl objeven N-nitrosodimethylamin (dále NDMA) a jeho karcinogenní vlastnosti, byla nitrosace součástí průmyslové výroby gumy [4], [17].

N-nitrosaminy mohou být děleny na těkavé, jenž vznikají z naprosté většiny při výrobě sladu, zejména vzniká NDMA [13]. Druhým typem v dělení jsou netěkavé N-nitrosaminy, jejichž množství je udáváno jako ATNC. NDMA je taktéž započítáváno do ATNC, avšak příspěvek k ATNC je zanedbatelný. Sládcům jsou schopni omezit formování NDMA [17]. Vznik netěkavých N-nitrosaminů může proběhnout v kterékoli ze zmíněných procesů výroby piva z předchozího odstavce za předpokladu, že v daném procesu bude přítomné nitrosační činidlo a zároveň amin, či amid, jenž by mohl být nitrosován.



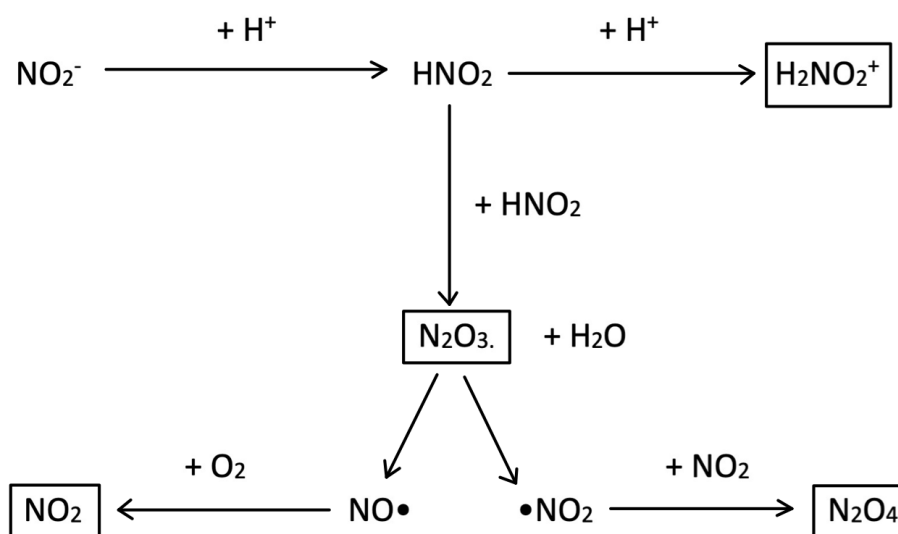
Obrázek 2.2.1.: Příklad reakce vzniku NDMA [17]

Formování N-nitrosaminů lze popsat jako substituci atomu vodíku navázaného na atom dusíku v aminu, či amidu za nitroso skupinu pocházející z nitrosačního činidla (viz Obr 2.2.1.) [2], [17]. Nitrosační činidla mohou být považována za prekurzory nitroso sloučenin. Při formování nitroso sloučenin dochází k nitrosaci, kde nitrosační činidla poskytují nitroso skupinu [17]. Vznik N-nitrosaminů může probíhat v různých fázích výroby piva. Hlavní příčinou jejich vzniku je mikrobiální kontaminace [18]. Každá fáze výroby může mít jiný mikrobiální kontaminant, avšak u všech dochází k postupné redukci dusičnanů, či dusitanů. Mohou probíhat dva druhy mikrobiální redukce, a to asimilační dusičnanová redukce a disimilační dusičnanová redukce [18].

Asimilační dusičnanová redukce je zprostředkována divokými kvasinkami, kdy jsou dusičnany redukovány na amoniak, který poté může být použit jako zdroj buněčného dusíku. Kvůli své energetické náročnosti probíhá redukce pomalu [17]. Tento způsob redukce je možné využít k tzv. denitrifikaci, kde jsou bakterie schopné redukce dusičnanů a dusitanů využívány k odstranění jejich přebytečného množství, například z pitné vody, či půdy [19].

Nitrosační činidla mohou vznikat skrze disimilační dusičnanovou redukci, do které jsou zapojeny bakterie fakultativně anaerobní, případně i aerobní. Avšak ne každá bakterie redukuje na stejné produkty. Některé pouze redukují dusičnany na dusitany, jiné provádí redukci na oxid dusičitý, oxid dusný, nebo až na plynný dusík, dochází tedy k denitrifikaci [17], [19]. Při přechodu oxidu dusičitého na oxid dusný dochází ke vzniku několika meziproduktů, mezi které patří nitrosoniový ion a oxid dusitý. Tyto meziprodukty jsou schopné nitrosace, a tedy patří do nitrosačních činidel [17].

Dusičnanové anionty jsou relativně stabilní a zůstanou neměnné, pokud nebudou zredukovány určitými bakteriemi, případně mohou být zredukovány vlivem vnějších podmínek [2]. Avšak pro dusitany neplatí totéž. Přidáním protonu k dusitanu dochází k reakci s výsledným produktem kyseliny dusité, ze které může dojít ke vzniku několika nitrosačních činidel (viz Obr 2.2.2.). Jednou možností je přidání protonu ke kyselině za vzniku protonizované kyseliny dusité, jež může figurovat jako nitrosační činidlo. Dalším způsobem je přidání nadbytku kyseliny dusité ke kyselině dusité za vzniku vody a oxidu dusitého, jež patří mezi nitrosační činidla. Oxid dusitý dále může disproportionovat na radikál oxidu dusnatého a radikál oxidu dusičitého. Přidáním molekuly kyslíku k radikálu oxidu dusnatého vznikne nitrosační činidlo oxid dusičitý. Pokud je k radikálu oxidu dusičitého přidán oxid dusičitý vznikne dimér oxidu dusičitého, který taktéž patří mezi nitrosační činidla [17].



Obrázek 2.2.2.: Kyselinou katalyzované formování nitrosačních činidel; látky označené rámečkem patří mezi silná nitrosační činidla [17]

Vznik těchto nitrosačních činidel je ovlivněn hodnotou pH. Pokud se hodnota pH nachází v rozmezí 2-5 mohou vznikat všechna zmíněná nitrosační činidla. Při pH nižším

než 2 vzniká především protonizovaná kyselina dusitá, při pH vyšším než 3 je dominantnější oxid dusitý [17].

2.3. Hmotnostní spektrometrie

V hmotnostní spektrometrii jsou molekuly analytu dodáním energie převedeny na ionizované částice, které se filtrují na základě poměru své hmotnosti a náboje (m/z) a dopadají na převodník, kde je počet iontů převeden na elektrický signál [20].

Všechny hmotnostní spektrometry se skládají ze tří hlavních součástí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. K ionizaci analytu dochází v iontovém zdroji, v hmotnostním analyzátoru dochází k rozdělení iontů podle m/z . Ionty s konkrétními hodnotami m/z jsou shromážděny a převedeny na elektrický signál detektorem.

Při výběru způsobu ionizace je nutno zvážit vlastnosti analytu a informace, které jsou předmětem zájmu. Základní ionizační technikou je ionizace nárazem elektronu (dále EI), při níž jsou molekuly analytu bombardovány elektrony o vysoké energii při sníženém tlaku. Elektron z molekuly je během tohoto srážkového procesu vyražen, aby se molekula mohla přeměnit na kationt radikál [21], [22].

V současnosti patří mezi nejpoužívanější hmotnostní analyzátory kvadrupól. Skládá se ze čtyř paralelních tyčí kruhového nebo hyperbolického průřezu, na které je přivedena kombinace střídavého a stejnosměrného napětí. Separace hmoty je založena na pohybu iontů v oscilujícím elektrickém poli vytvořeném změnou napětí mezi tyčemi. Při určitém napětí se budou ionty s konkrétním m/z nacházet na stabilní dráze a projdou kvadrupólem do detektoru, ostatní ionty nejsou analyzátozem propuštěny. Hmotnostní spektrum je získáno skenováním spektra při měnícím se napětí.

Analyzátor může pracovat v nastavení SIM, při kterém dochází k měření odezvy při konkrétním m/z nebo v nastavení Scan při kterém dochází ke kontinuální změně napětí přiváděného na tyče, což umožňuje analýzu všech hodnot m/z v určitém časovém úseku a sledování všech iontů vzniklých v iontovém zdroji [24], [25].

Hmotnostní spektra pozorovaná za standardních podmínek (ionizační energie 70 eV) jsou do značné míry nezávislá na použitém přístroji, tudíž můžeme spektra určená k identifikaci považovat za tzv. molekulární otisky prstů. Tyto molekulární otisky prstů je možné využít při porovnání nalezeného spektra analytu s knihovnou obsahující spektra

identifikovaných molekul. Při analýze směsi obsahující více analytů, je žádoucí nejprve analyty separovat vhodnou separační metodou [20], [21].

Plynová chromatografie se široce využívá v aplikacích zahrnujících analýzu potravin. Typické aplikace se týkají kvantitativní nebo kvalitativní analýzy složení potravin, přírodních produktů či potravinových kontaminantů [26]. Některé analyty nejsou kvůli svým vlastnostem vhodné pro analýzu plynovou chromatografií. Z toho důvodu byly vyvinuty techniky, které mají za účel upravit chemické vlastnosti analytu pro snadnější analýzu. Jednou z rozšířených technik je tzv. derivatizace, jenž v případě analýzy pomocí plynové chromatografie může snížit teplotu varu analytu (zvýšit tenzi par), a tedy zjednodušit zplynění analytu [27].

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie

- Dusitan sodný (roztok NaNO₂ 0,9872 g/50ml)
- Dusitan sodný-izotopicky značený (roztok Na¹⁵NO₂, 1 g/50 ml)
- Kyselina chlorovodíková, 37%, čistota pro analýzu, Merck KGaA, Německo
- Methanol, ≥ 99,6%, Honeywell
- N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid s trimethylchlorosilanem (BSTFA+TMCS 99:1, ≥ 98,5%, Sigma-Aldrich, Německo)

3.2. Reaktanty

- 2-Acetylpyrol 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- L-Asparagová kyselina ≥ 98%, Sigma-Aldrich, Německo
- 5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon 97%, Kosher, Sigma-Aldrich, Německo
- Fenylnaldehyd ≥ 90%, Sigma-Aldrich, Německo
- L-Fenylalanin ≥ 98%, Sigma-Aldrich, Německo
- β-fenylethanol, čistota pro syntézu, Merck KGaA, Německo
- Ferulová kyselina ≥ 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- Furaneol (4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon, DMHF, HDMF ≥ 99,0%), Sigma-Aldrich, Německo
- L-Glutamová kyselina ≥ 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- Glycin ≥ 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- L-Histidin ≥ 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- Homofuraneol (2-Ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon, EMHF, HEMF), Kosher, Sigma-Aldrich, Německo
- L-Isoleucin ≥ 98%, Sigma-Aldrich, Německo
- p-Kumarová kyselina ≥ 98%, Sigma-Aldrich, Německo
- L-Leucin ≥ 98%, Sigma-Aldrich, Německo
- L-Lysin ≥ 98%, Sigma-Aldrich, Německo
- Maltol, Kosher, Sigma-Aldrich, Německo

- L-Methionin $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Německo
- 2-Methoxy-4-vinylfenol $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Německo
- L-Serin $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Německo
- Sotolon (4,5-Dimethyl-3-hydroxy-2,5-dihydrofuran-2-on $\geq 97\%$), Kosher, Sigma-Aldrich, Německo
- L-Tryptofan $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Německo
- L-Tyrosin $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Německo
- L-Valin $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Německo

3.3. Instrumentace

- Topný modul Reacti-Therm I #18822 heating module (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Odpařovací jednotka Reacti-Vap I #18825 evaporation unit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Chromatograf 7890B GC system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Hmotnostní detektor 7000D GC/MS Triple Quad (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Autosampler 7693 Automatic Liquid Sampler (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

3.4. Příprava reakčních směsí pro analýzu

Do insertu bylo převedeno 413 μl vodného roztoku dusitanu sodného. Roztok byl odpařen při teplotě 70 $^{\circ}\text{C}$ v topném modulu Reacti-Therm I pomocí odpařovací jednotky Reacti-Vap I. Po odpaření vody byl do insertu přidán roztok připravený následujícím způsobem: přibližně 5 mg reaktantu bylo rozpuštěno v 204 μl roztoku methanolu, deionizované vody a kyseliny chlorovodíkové v objemovém poměru 150:50:4. Reakce probíhala 3 h při teplotě 45 $^{\circ}\text{C}$ v topném modulu Reacti-Therm I, poté bylo z reakční směsi odebráno 40 μl a odpařeno při teplotě 45 $^{\circ}\text{C}$. Následně bylo přidáno 100 μl derivatizačního činidla BSTFA+TMCS. Derivatizace probíhala 30 min při teplotě 60 $^{\circ}\text{C}$

v topném modulu Reacti-Therm I. Reakce s dusitanem a izotopicky značeným dusitanem byly prováděny paralelně. Analogicky byly připraveny všechny reakční směsi.

3.1. Podmínky separace a hmotnostní detekce

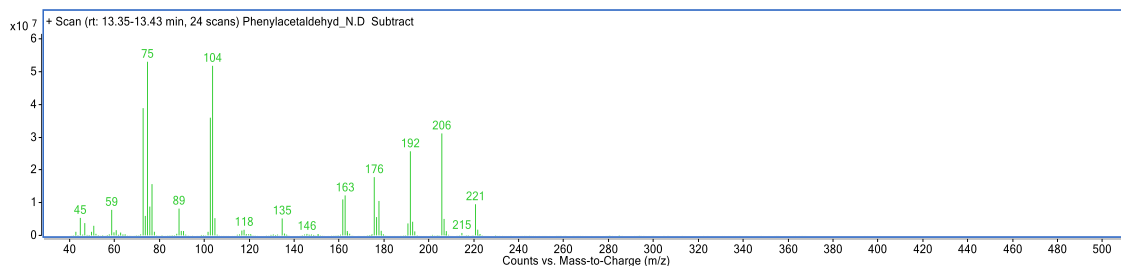
K separaci v chromatografu byla využita kolona HP-5MS UI (5%-fenyl-methylpolysiloxan, 30 m x 0,25 mm x 0,25, μm Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Dávkování bylo prováděno v módu split (poměr 5:1) při teplotě 250 °C, s konstantním průtokem helia 1 ml/min jakožto mobilní fáze. Analýza probíhala při následujícím teplotním gradientu: 50 °C (1,5 min) – 20 °C/min – 150 °C (5 min) – 10 °C/min – 210 °C (3 min) – 10 °C/min – 320 °C (5 min).

Hmotnostní detekce probíhala v módu MS1 Scan (40-500 m/z). Ionizační energie byla 70 eV při teplotě iontového zdroje 230 °C, doba skenu 200 ms a solvent delay 7 min, celková doba analýzy 36,5 min.

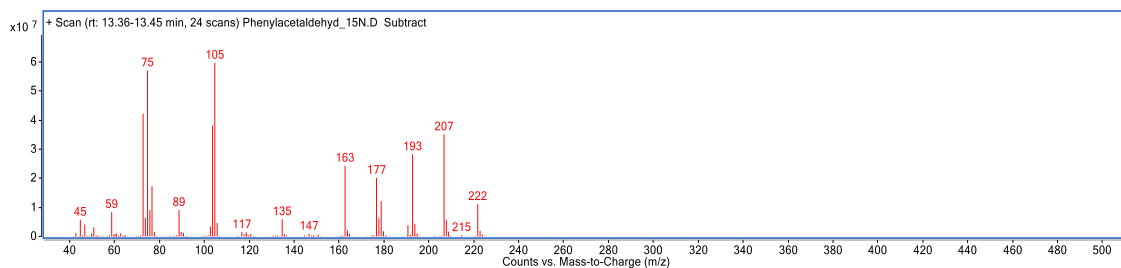
3.2. Princip vyhodnocení spekter

Jednotlivé píky chromatogramu byly integrovány pro získání hmotnostních spekter produktů dané reakce. Při koeluci píků bylo využito dekonvoluce v programu MassHunter. Porovnáním hmotnostních spekter produktů reakce reaktantu s izotopicky neznačeným dusitanem s hmotnostními spektry produktů reakce reaktantu s izotopicky značeným dusitanem ve stejném retenčním čase bylo možné nalézt posuny o jednu či více jednotek m/z, což značí přítomnost izotopicky značeného dusíku pocházejícího z reakce s dusitanem.

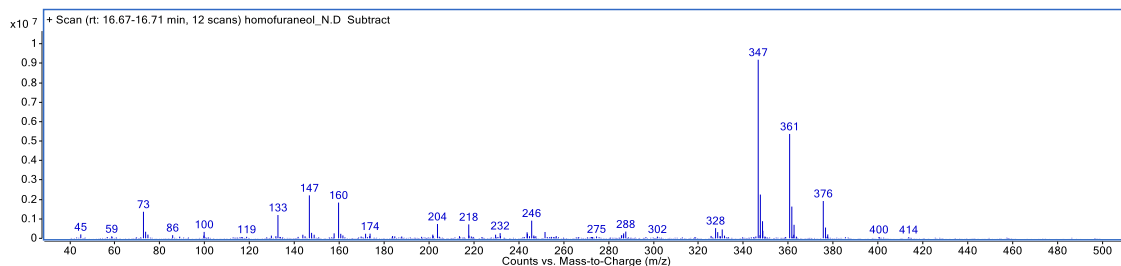
Příklad produktu obsahujícího jeden atom dusíku z dusitanu je patrný při porovnání spektra na *Obr. 3.2.1* se spektrem na *Obr. 3.2.2*. Příklad produktu obsahujícího dva atomy dusíku z dusitanu lze pozorovat při porovnání spekter na *Obr. 3.2.3* a *3.2.4* a příklad produktu obsahujícího tři atomy dusíku z dusitanu lze pozorovat při porovnání spekter na *Obr. 3.2.5* a *3.2.6*.



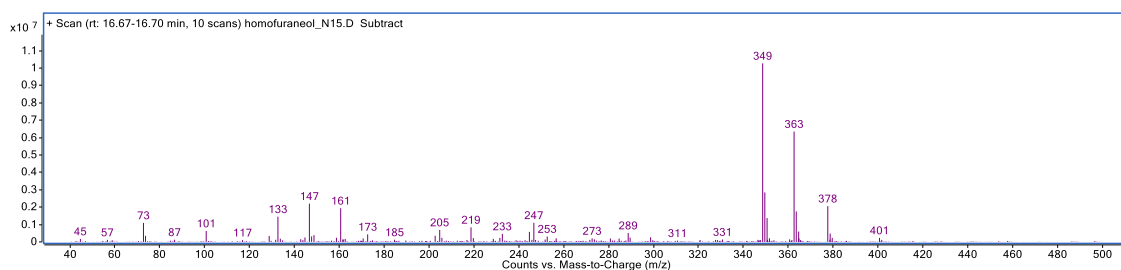
Obrázek 3.2.1: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylacetaldehydu s dusitanem sodným v retenčním čase 13,39 min



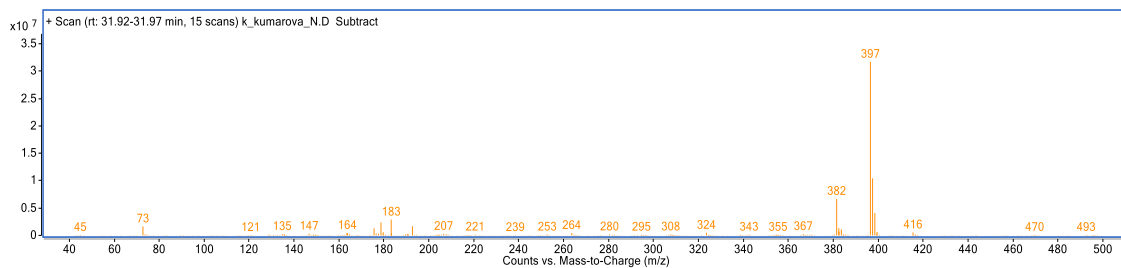
Obrázek 3.2.2: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylacetaldehydu s izotopicky značeným dusitanem sodným v retenčním čase 13,40 min



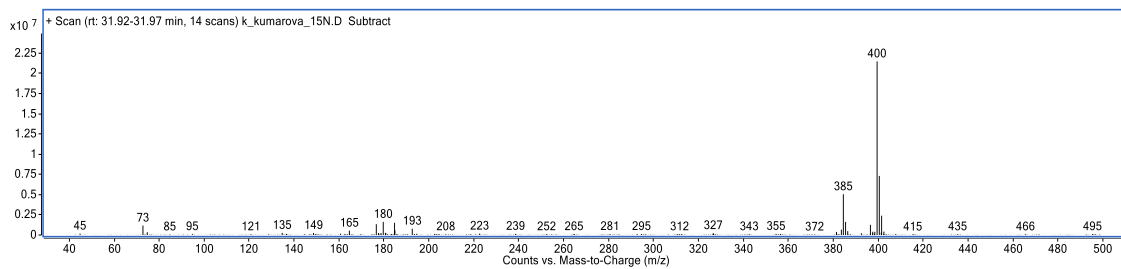
Obrázek 3.2.3: Hmotnostní spektrum produktu reakce homofuraneolu s dusitanem sodným v retenčním čase 16,69 min



Obrázek 3.2.4: Hmotnostní spektrum produktu reakce homofuraneolu s izotopicky značeným dusitanem sodným v retenčním čase 16,68 min



Obrázek 3.2.5: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 31,94 min



Obrázek 3.2.6: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s izotopicky značeným dusitanem sodným v retenčním čase 31,94 min

4. Výsledky a diskuze

V této práci byly provedeny reakce dvaceti čtyř vybraných složek piva s dusitanem. Tyto konkrétní látky byly vybrány na základě jejich struktury a obsahu funkčních skupin. Jednalo se o látky, u nichž lze předpokládat, že budou reagovat s dusitanem. Celkem bylo detekováno 127 produktů obsahujících v molekule atom dusíku pocházející z dusitanu. Z toho 12 produktů bylo detekováno dvakrát, tedy ve dvanácti případech došlo k nalezení shodného produktu u dvou různých výchozích látek.

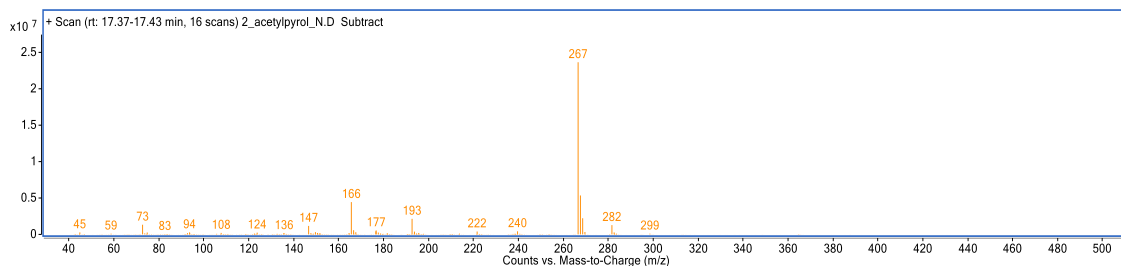
Devět produktů reakce 2-methyl-4-vinylfenolu s dusitanem bylo shodných s produkty reakcí dusitanu s kyselinou ferulovou. Dva produkty reakce kyseliny ferulové s dusitanem byly shodné s produkty reakce dusitanu s kyselinou kumarovou. Jeden produkt reakce kyseliny kumarové s dusitanem byl shodný s produktem reakce dusitanu s tyrosinem. Shodnost produktů pocházejících z jiných výchozích látek je pravděpodobně zapříčiněna strukturní podobností výchozích látek.

V šesti případech došlo k detekování dvou shodných spekter produktů v odlišných retenčních časech u jedné výchozí látky. Podobnost těchto spekter může znamenat, že se jedná o dvě izomerní formy jedné sloučeniny.

Nejvíce produktů reakce dusitanu bylo detekováno v případě kyseliny ferulové (26), kyseliny kumarové (22), 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu (12) a 2-methoxy-4-vinylfenolu (11). Naopak žádné produkty nebyly detekovány v případě isoleucinu, kyseliny glutamové, β -fenylethanolu a maltolu.

4.1. 2-acetylpyrol

Vyhodnocením získaných spekter byl detekován jeden produkt reakce 2-acetylpyrolu s dusitanem v retenčním čase 17,40 min (viz *Obr 4.1.1.*). Molekula produktu obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion je zde pravděpodobně 282 m/z. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje trimethylsilylovou skupinu (TMS; vnesena derivatizací), což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Jelikož fragment $M-15^+$ (267 m/z) je ze získaného spektra nejintenzivnější, molekula produktu je pravděpodobně stále aromatická.

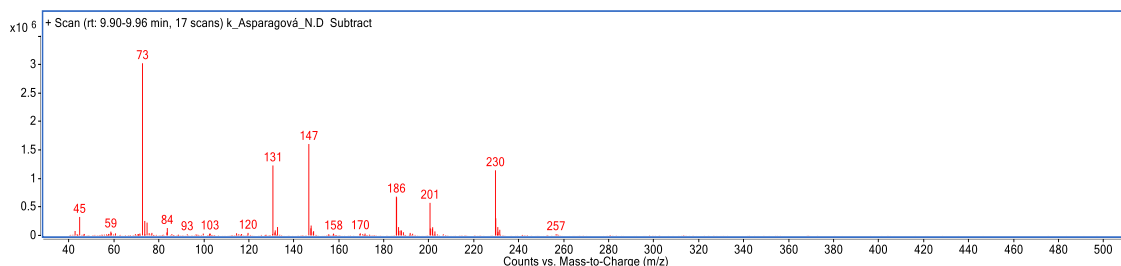


Obrázek 4.1.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 2-acetylpyroly s dusitanem sodným v retenčním čase 17,40 min. Produkt obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

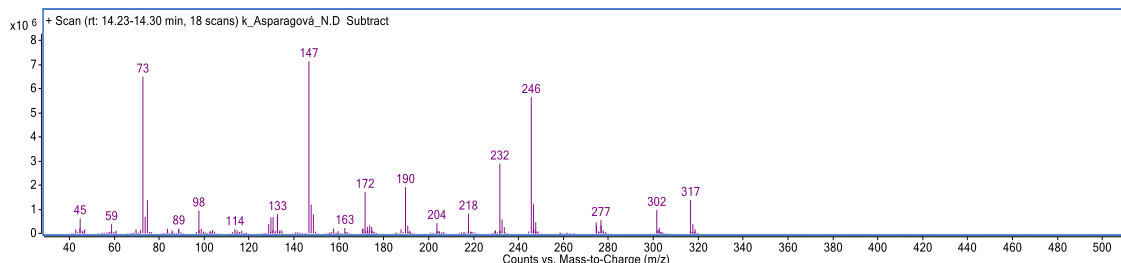
4.2. Asparagová kyselina

Vyhodnocením získaných spekter byly detekovány dva produkty reakce kyseliny asparagové s dusitanem viz *Obr. 4.2.1.* a *Obr. 4.2.2.* Oba produkty reakce kyseliny asparagové s dusitanem obsahují jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že obě detekované molekuly obsahují více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů.

Molekulární ion produktu reakce kyseliny asparagové s dusitanem v retenčním čase 14,26 min je pravděpodobně 317 m/z a podle dusíkového pravidla tedy molekula produktu neobsahuje dusík z původní molekuly kyseliny asparagové.



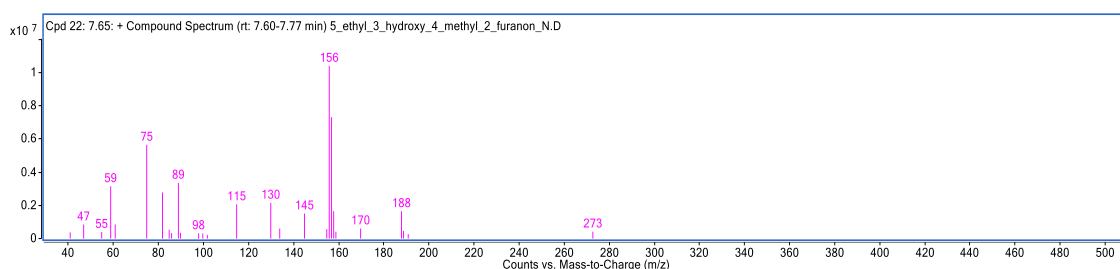
Obrázek 4.2.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny asparagové s dusitanem sodným v retenčním čase 9,93 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



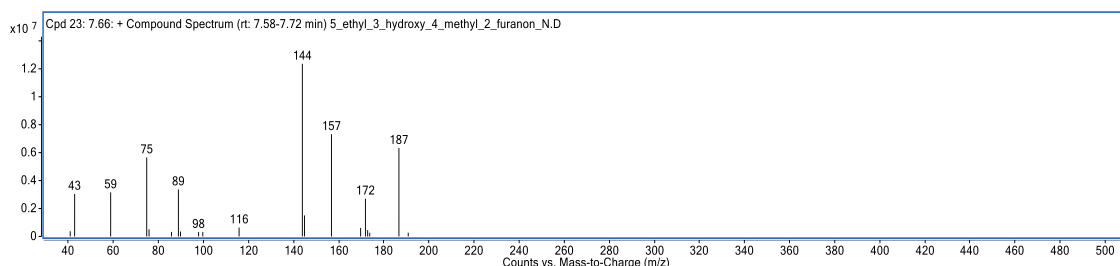
Obrázek 4.2.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny asparagové s dusitanem sodným v retenčním čase 14,26 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

4.3. 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon

Vyhodnocením získaných spekter bylo detekováno dvanáct produktů reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem. Produkty reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem v retenčních časech 7,65 min (viz Obr. 4.3.1.) a 7,66 min (viz Obr. 4.3.2.) obsahují jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Absence fragmentu 73 m/z značí, že obě detekované molekuly neobsahují TMS skupinu, což znamená, že obě detekované molekuly produktu neobsahují žádnou polární skupinu, kterou by bylo možné derivatizovat.

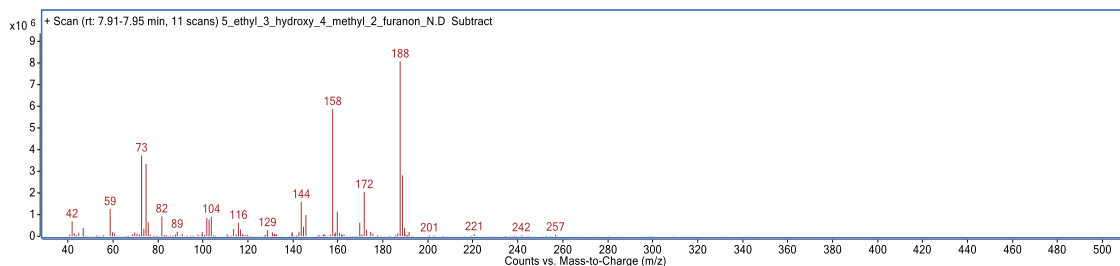


Obrázek 4.3.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem sodným v retenčním čase 7,65 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu



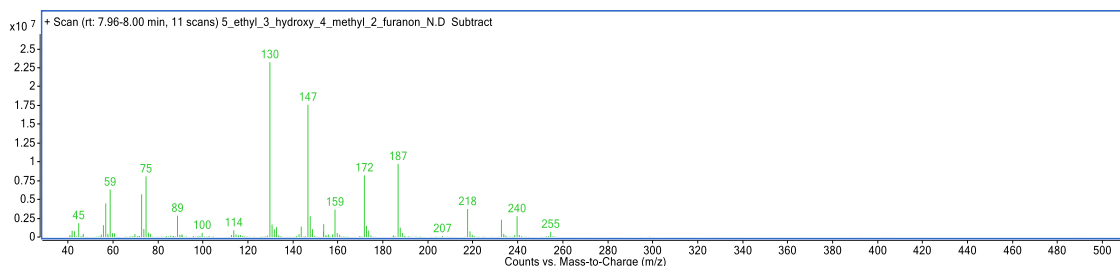
Obrázek 4.3.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem sodným v retenčním čase 7,66 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu

Produkt reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem v retenčním čase 7,93 min (viz Obr. 4.3.3.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 75 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou pravděpodobně přes hydroxylovou skupinu.



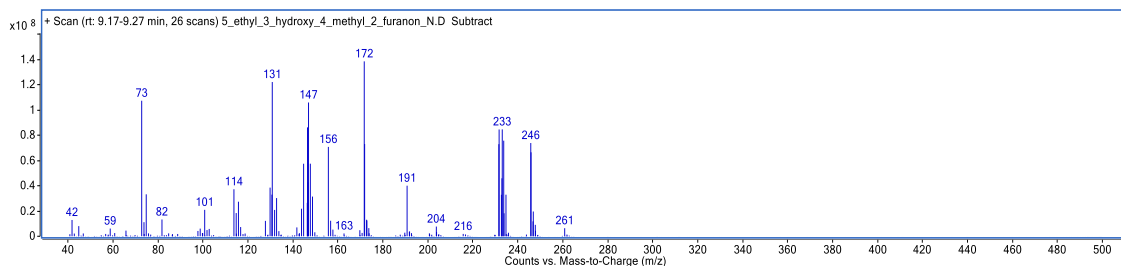
Obrázek 4.3.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem sodným v retenčním čase 7,93 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem v retenčním čase 7,98 min (viz Obr. 4.3.4.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73, 75 a 89 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou pravděpodobně přes hydroxylovou skupinu. Fragment 147 m/z pak indikuje přítomnost další polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



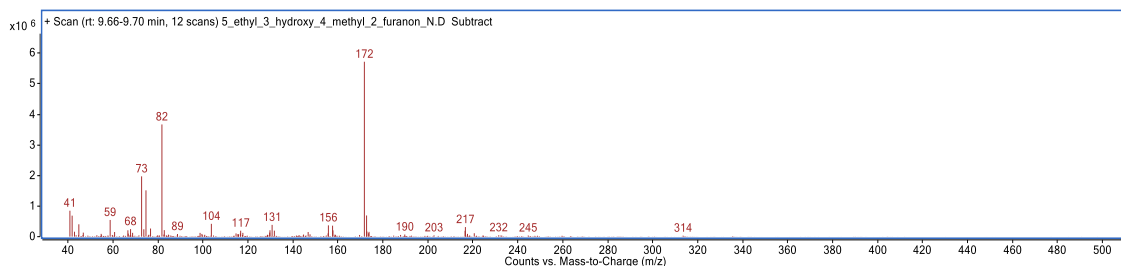
Obrázek 4.3.4.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem sodným v retenčním čase 7,98 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem v retenčním čase 9,22 min (viz Obr. 4.3.5.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion je zde pravděpodobně 261 m/z. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



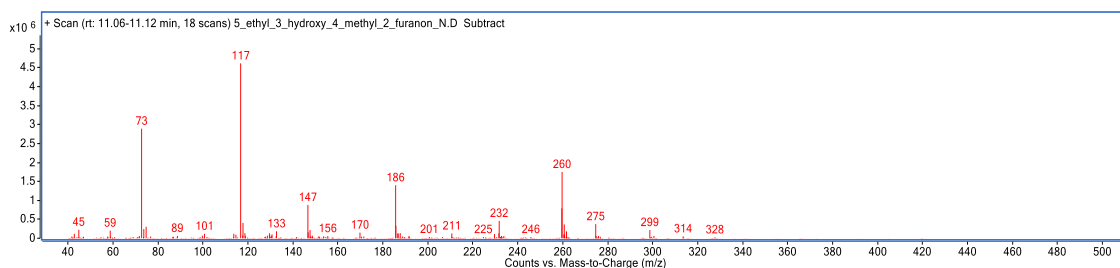
Obrázek 4.3.5.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem sodným v retenčním čase 9,22 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem v retenčním čase 9,68 min (viz Obr. 4.3.6.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 75 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou pravděpodobně přes hydroxylovou skupinu.



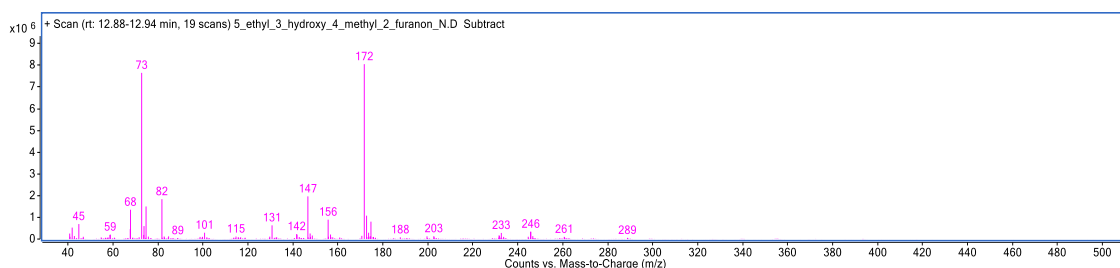
Obrázek 4.3.6.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem sodným v retenčním čase 9,68 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem v retenčním čase 11,09 min (viz Obr. 4.3.7.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 117 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes karboxyl či hydroxyl. Fragment 147 m/z pak indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



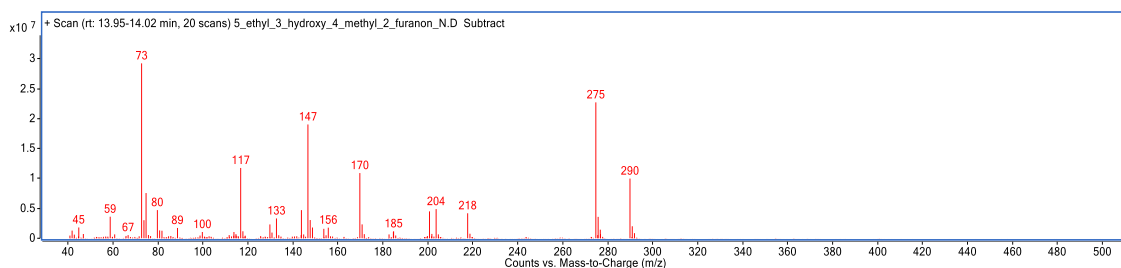
Obrázek 4.3.7.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem sodným v retenčním čase 11,09 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem v retenčním čase 12,91 min (viz Obr. 4.3.8.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



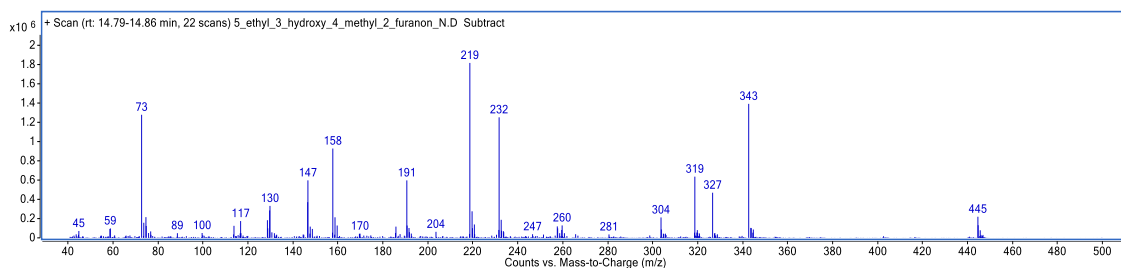
Obrázek 4.3.8.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem sodným v retenčním čase 12,91 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem v retenčním čase 13,99 min (viz Obr. 4.3.9.) obsahuje dva atomy dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion je zde nejspíše 290 m/z. Přítomnost fragmentů 73, 75, 89 a 117 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou pravděpodobně přes hydroxylovou či karboxylovou skupinu. Fragment 147 m/z pak značí přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



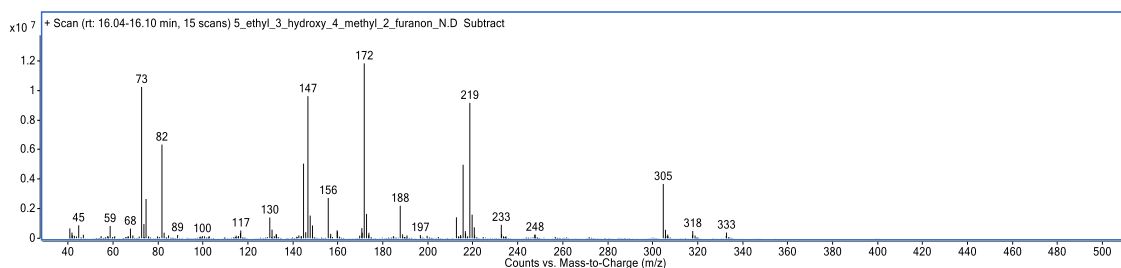
Obrázek 4.3.9.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem sodným v retenčním čase 13,99 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

Produkt reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem v retenčním čase 14,83 min (viz Obr. 4.3.10.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73, 89 a 117 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes karboxyl či hydroxyl. Fragment 147 m/z pak značí přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.

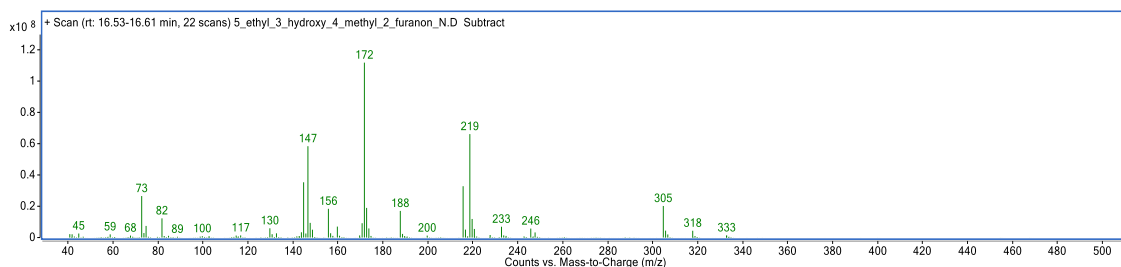


Obrázek 4.3.10.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem sodným v retenčním čase 14,83 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkty reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem v retenčních časech 16,07 min (viz Obr. 4.3.11.) a 16,58 min (viz Obr. 4.3.12.) obsahují jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Podobnost těchto spekter může znamenat, že se jedná o dvě izomerní formy jedné sloučeniny. Možný molekulární ion je zde 333 m/z. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekované molekuly obsahují více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů.



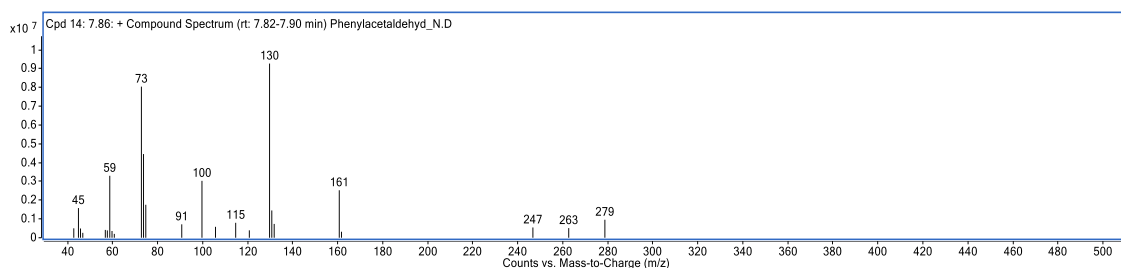
Obrázek 4.3.11.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem sodným v retenčním čase 16,07 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



Obrázek 4.3.12.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanonu s dusitanem sodným v retenčním čase 16,58 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

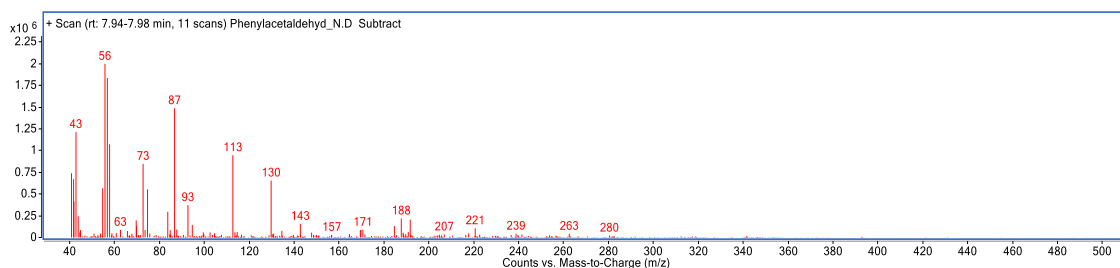
4.4. Fenylacetaldehyd

Vyhodnocením získaných spekter bylo detekováno osm produktu reakce fenylacetaldehydu s dusitanem. Produkt reakce fenylacetaldehydu s dusitanem v retenčním čase 7,86 min (viz Obr. 4.4.1) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Díky fragmentu 91 m/z lze usuzovat, že došlo k zachování benzenového jádra z původní molekuly fenylacetaldehydu.



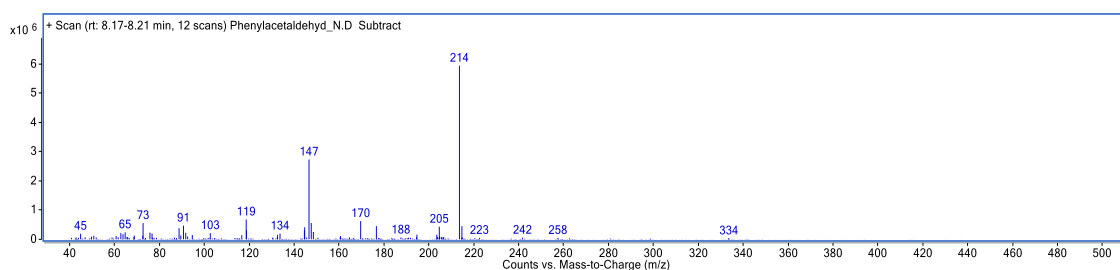
Obrázek 4.4.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylacetaldehydu s dusitanem sodným v retenčním čase 7,86 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce fenylacetaldehydu s dusitanem v retenčním čase 7,96 min (viz Obr. 4.4.2) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 75 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou pravděpodobně přes hydroxylovou skupinu.



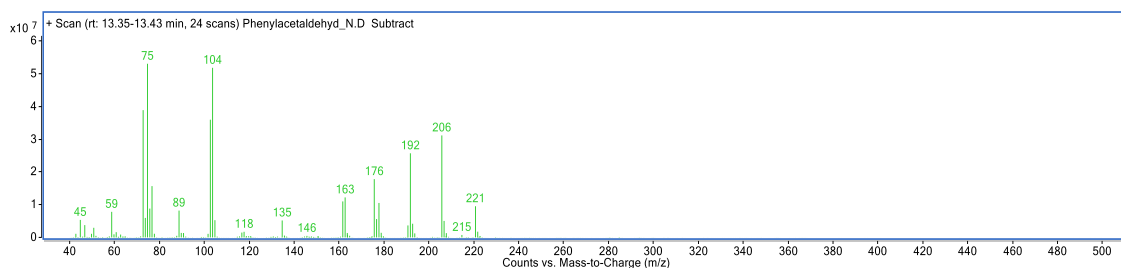
Obrázek 4.4.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylacetaldehydu s dusitanem sodným v retenčním čase 7,96 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce fenylacetaldehydu s dusitanem v retenčním čase 8,19 min (viz Obr. 4.4.3) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekované molekuly obsahují více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.

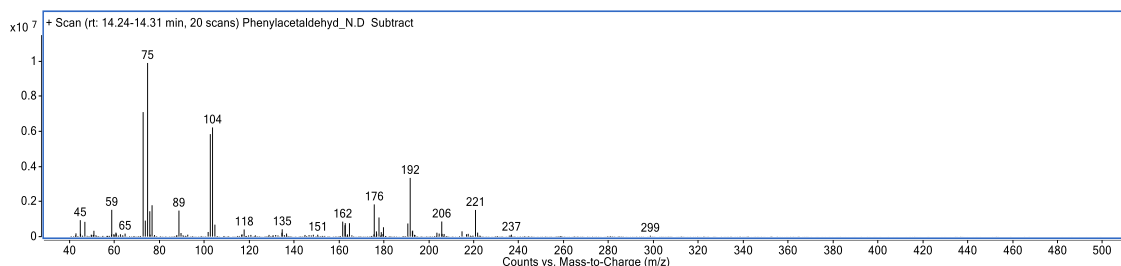


Obrázek 4.4.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylacetaldehydu s dusitanem sodným v retenčním čase 8,19 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkty reakce fenylacetaldehydu s dusitanem v retenčních časech 13,39 min (viz Obr. 4.4.4) a 14,28 min (viz Obr. 4.4.5) obsahují jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Podobnost těchto spekter může znamenat, že se jedná o dvě izomerní formy jedné sloučeniny. Molekulární ion je zde nejspíše 221 m/z. Přítomnost fragmentů 73, 75 a 89 m/z značí, že detekované molekuly obsahují TMS skupinu navázanou pravděpodobně přes hydroxylovou skupinu.

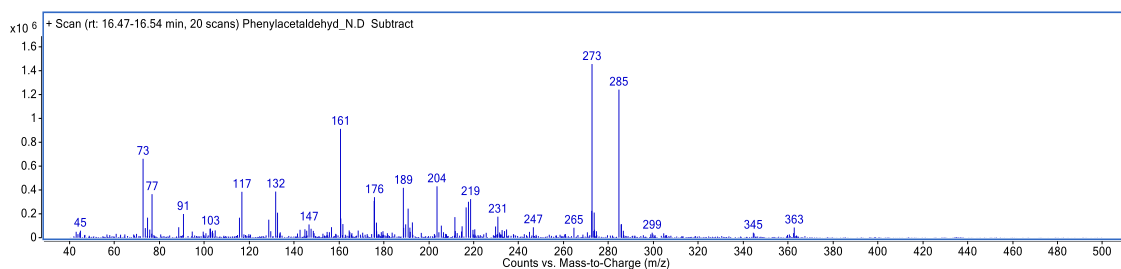


Obrázek 4.4.4.: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylacetaldehydu s dusitanem sodným v retenčním čase 13,39 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



Obrázek 4.4.5.: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylacetaldehydu s dusitanem sodným v retenčním čase 14,28 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

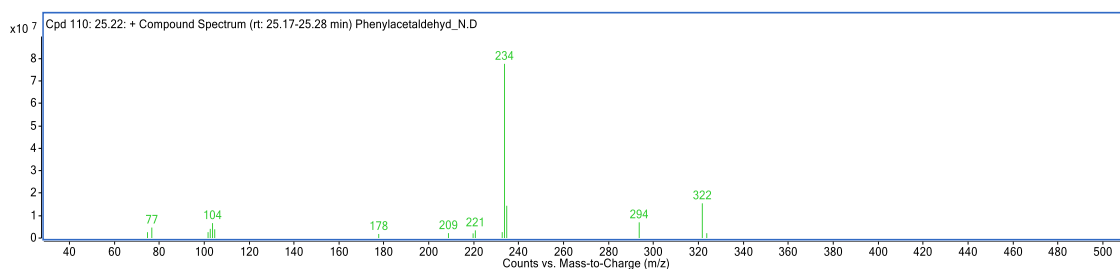
Produkt reakce fenylacetaldehydu s dusitanem v retenčním čase 16,51 min (viz Obr. 4.4.6) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 117 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes karboxyl či hydroxyl. Díky fragmentu 91 m/z lze usuzovat, že došlo k zachování benzenového jádra z původní molekuly fenylacetaldehydu. Fragment 147 m/z pak značí přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



Obrázek 4.4.6.: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylacetaldehydu s dusitanem sodným v retenčním čase 16,51 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

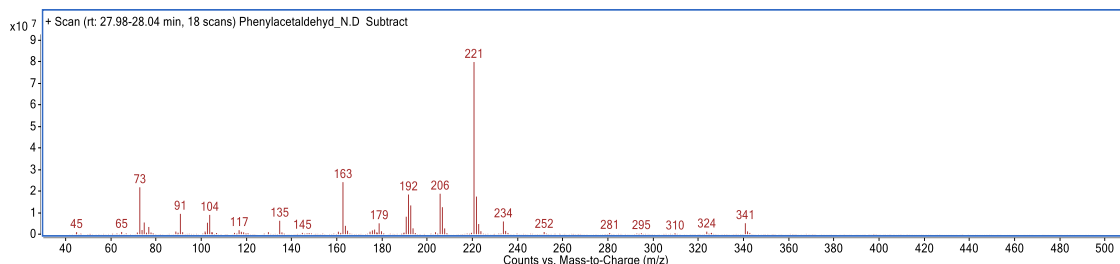
Produkt reakce fenylacetaldehydu s dusitanem v retenčním čase 25,22 min (viz Obr. 4.4.7) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Absence fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula neobsahuje TMS skupinu, což znamená, že

detekovaná molekula produktu neobsahuje žádnou polární skupinu, kterou by bylo možné derivatizovat.



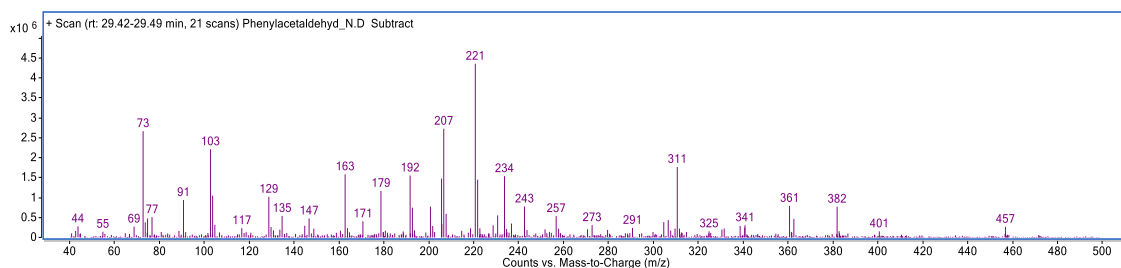
Obrázek 4.4.7.: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylacetaldehydu s dusitanem sodným v retenčním čase 25,22 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce fenylacetaldehydu s dusitanem v retenčním čase 28,01 min (viz Obr. 4.4.8) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Díky fragmentu 91 m/z lze usuzovat, že došlo k zachování benzenového jádra z původní molekuly fenylacetaldehydu.



Obrázek 4.4.8.: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylacetaldehydu s dusitanem sodným v retenčním čase 28,01 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

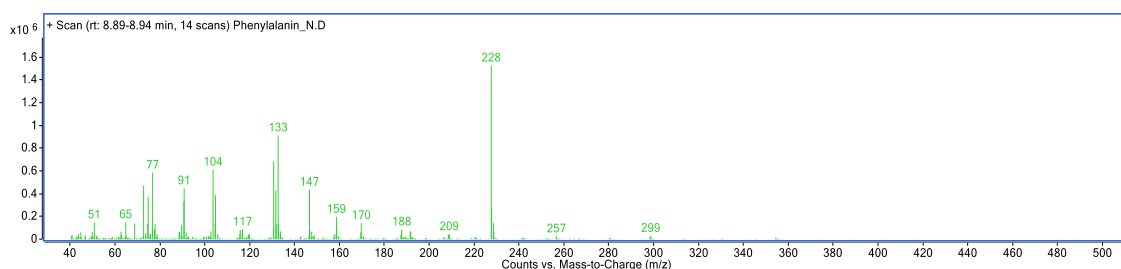
Produkt reakce fenylacetaldehydu s dusitanem v retenčním čase 29,45 min (viz Obr. 4.4.9) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 117 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes karboxyl či hydroxyl. Díky fragmentu 91 m/z lze usuzovat, že došlo k zachování benzenového jádra z původní molekuly fenylacetaldehydu. Fragment 147 m/z pak značí přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



Obrázek 4.4.9.: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylacetaldehydu s dusitanem sodným v retenčním čase 29,45 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

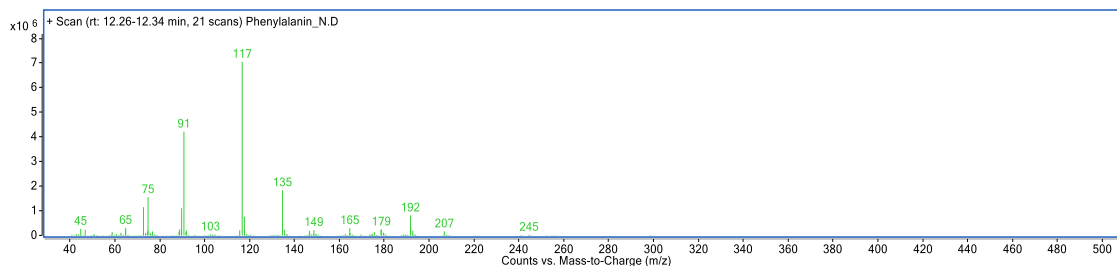
4.5. Fenylalanin

Vyhodnocením získaných spekter byly detekovány čtyři produkty reakce fenylalaninu s dusitanem. Produkt reakce fenylalaninu s dusitanem v retenčním čase 8,91 min (viz Obr. 4.5.1) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 75 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu. Díky fragmentu 91 m/z lze usuzovat, že došlo k zachování benzenového jádra z původní molekuly fenylalaninu. Fragment 147 m/z pak značí přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



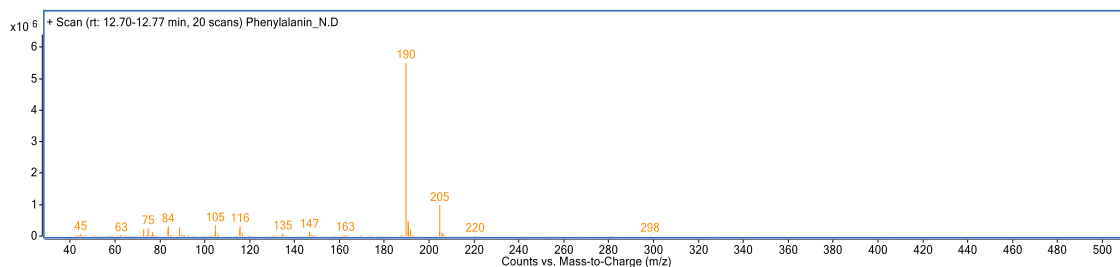
Obrázek 4.5.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylalaninu s dusitanem sodným v retenčním čase 8,91 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce fenylalaninu s dusitanem v retenčním čase 12,30 min (viz Obr. 4.5.2) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73, 75 a 117 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes karboxyl nebo hydroxyl. Díky fragmentu 91 m/z lze usuzovat, že došlo k zachování benzenového jádra z původní molekuly fenylalaninu.



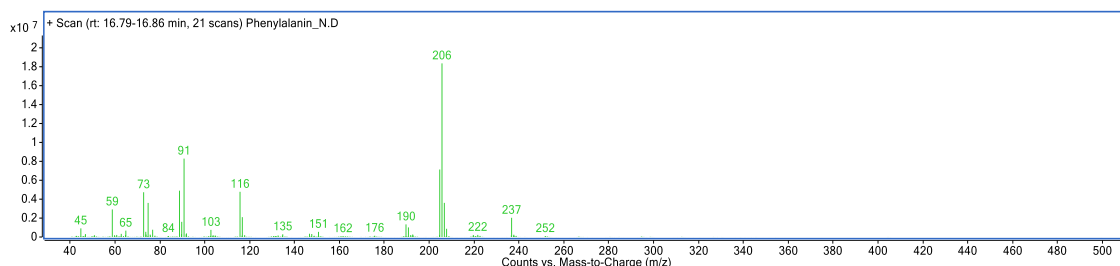
Obrázek 4.5.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylalaninu s dusitanem sodným v retenčním čase 12,30 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce fenylalaninu s dusitanem v retenčním čase 12,74 min (viz Obr. 4.5.3) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 75 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu.



Obrázek 4.5.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylalaninu s dusitanem sodným v retenčním čase 12,74 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce fenylalaninu s dusitanem v retenčním čase 16,83 min (viz Obr. 4.5.4) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 75 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu. Díky fragmentu 91 m/z lze usuzovat, že došlo k zachování benzenového jádra z původní molekuly fenylalaninu.



Obrázek 4.5.4.: Hmotnostní spektrum produktu reakce fenylalaninu s dusitanem sodným v retenčním čase 16,83 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

4.6. β -fenylethanol, glutamová kyselina, isoleucin, maltol

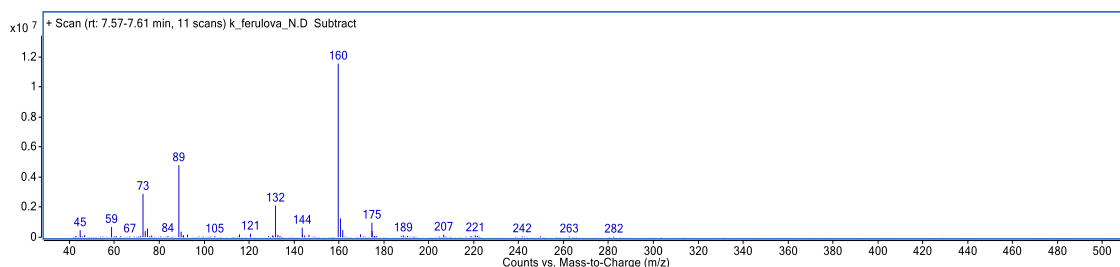
V případě β -fenylethanolu, kyseliny glutamové a isoleucinu nebyl detekován žádný produkt obsahující dusík z dusitanu při porovnávání spekter produktů reakcí reaktantu s izotopicky neznačeným dusitanem s hmotnostními spektry produktů reakce reaktantu s izotopicky značeným dusitanem.

V případě maltolu nebyl detekován žádný produkt obsahující dusík z dusitanu, protože pravděpodobně došlo k chybě při přípravě reakčních směsí k analýze a ve výsledných chromatogramech nebylo možné najít odpovídající píky pro integraci a srovnání.

4.7. Ferulová kyselina

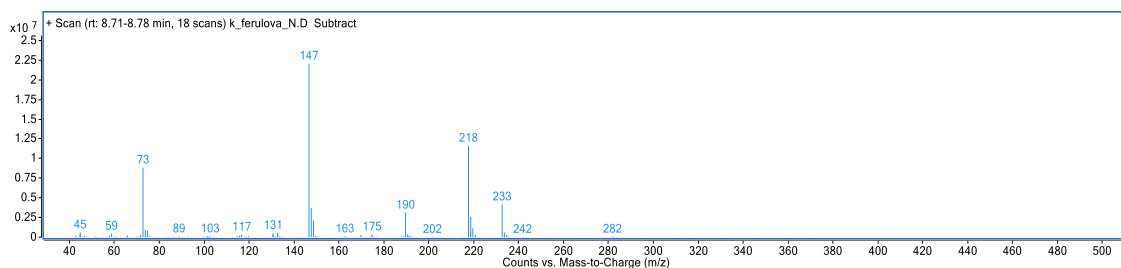
Vyhodnocením získaných spekter bylo detekováno dvacet šest produktů reakce kyseliny ferulové s dusitanem. Devět z nich bylo detekováno i při reakci 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem a dva z nich byly detekovány i při reakci dusitanu s kyselinou kumarovou.

Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 7,59 min (viz Obr. 4.7.1.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 89 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou pravděpodobně přes hydroxylovou skupinu. Nepřítomnost fragmentu 147 m/z značí, že molekula produktu neobsahuje další polární skupinu a možná tedy došlo k odštěpení části původní molekuly kyseliny ferulové. Stejný produkt byl nalezen i při reakci dusitanu s kyselinou kumarovou v odpovídajícím retenčním čase (viz Obr. 4.12.1.).



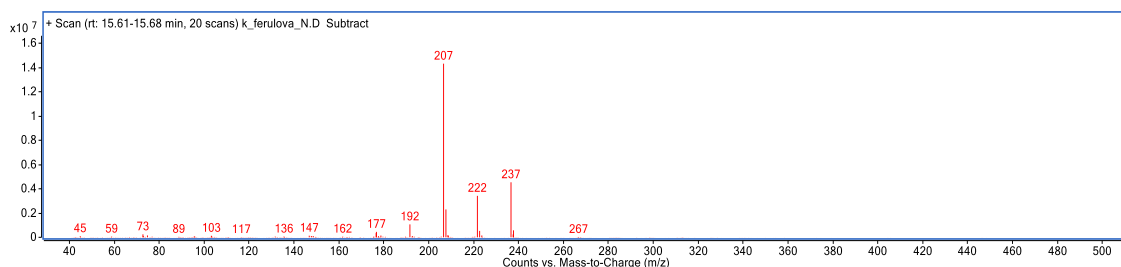
Obrázek 4.7.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 7,59 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 8,75 min (viz Obr. 4.7.2.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion je zde pravděpodobně 233 m/z. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Stejný produkt byl nalezen i při reakci dusitanu s kyselinou kumarovou v odpovídajícím retenčním čase (viz Obr. 4.12.2.).



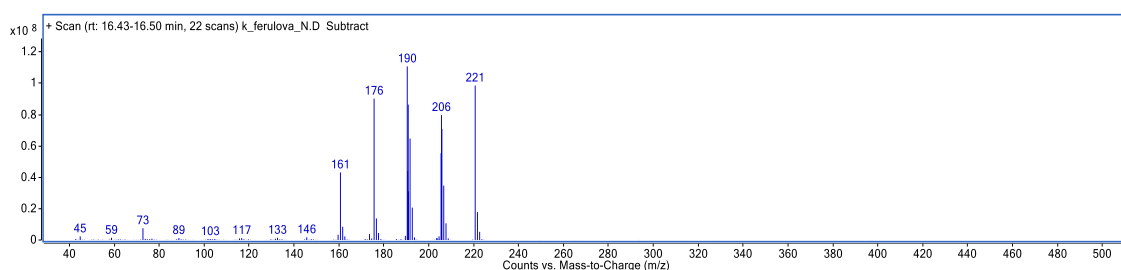
Obrázek 4.7.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 8,75 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 15,65 min (viz Obr. 4.7.3.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion je zde pravděpodobně 237 m/z. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Fragments 177, 192, 207, 222 a 237 m/z odpovídají postupnému odštěpení čtyř methylových skupin, z čehož lze usuzovat, že molekula produktu obsahuje methoxy skupinu, jelikož tři methyly se odštěpí z TMS skupiny a čtvrtá právě ze zmíněné methoxy skupiny.



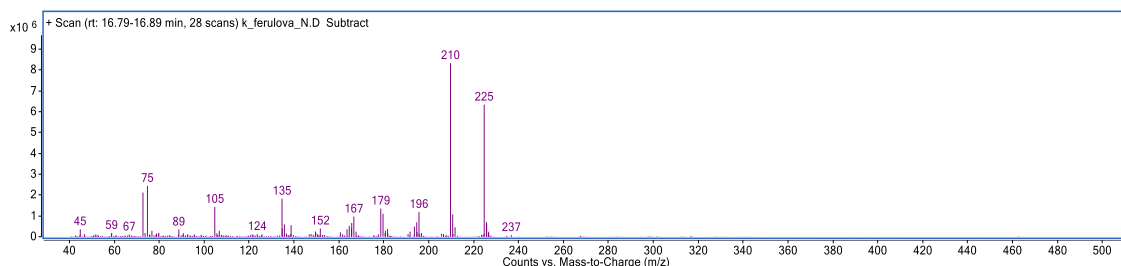
Obrázek 4.7.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 15,65 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 16,47 min (viz Obr. 4.7.4.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Možný molekulární ion je zde 221 m/z. V důsledku vysoké koncentrace analytu došlo k destrukci spektra, reálný m/z by měl být 191, nikoli 190. Fragmenty 161, 176, 191, 206 a 221 m/z odpovídají postupnému odštěpení čtyř methylových skupin, z čehož lze usuzovat, že molekula produktu obsahuje methoxy skupinu, jelikož tři methyly se odštěpí z TMS skupiny a čtvrtá právě ze zmíněné methoxy skupiny. Stejný produkt byl nalezen i při reakci dusitanu s 2-methoxy-4-vinylfenolem v odpovídajícím retenčním čase (viz Obr. 4.16.1.) právě s fragmentem 191 m/z.



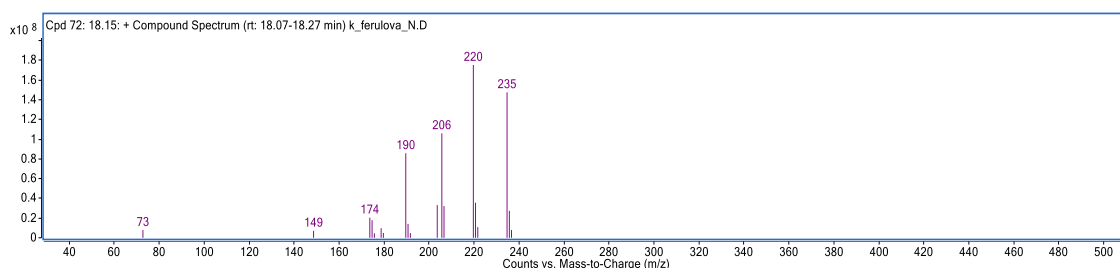
Obrázek 4.7.4.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 16,47 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 16,87 min (viz Obr. 4.7.5.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73, 75 a 89 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu.



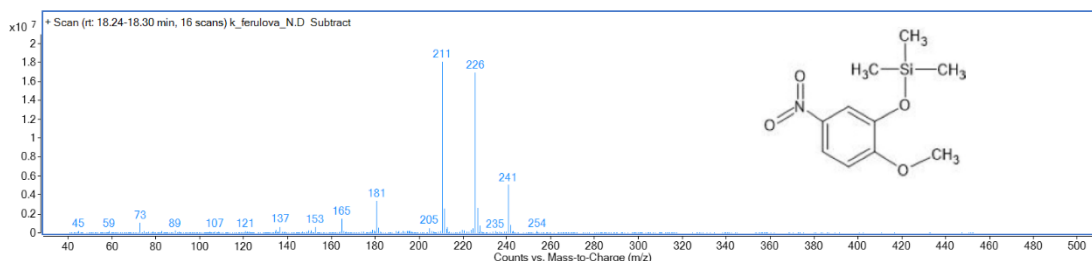
Obrázek 4.7.5.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 16,87 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 18,15 min (viz Obr. 4.7.6.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Možný molekulární ion je zde 235 m/z. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Absence fragmentu 147 m/z znamená, že molekula produktu neobsahuje další polární skupinu a možná tedy došlo k odštěpení části původní molekuly kyseliny ferulové, v tomto případě karboxylu, jelikož stejný produkt byl nalezen i při reakci dusitanu s 2-methoxy-4-vinylfenolem v odpovídajícím retenčním čase (viz Obr. 4.16.2.). Struktura 2-methoxy-4-vinylfenolu se od struktury kyseliny ferulové liší právě absencí karboxylu.



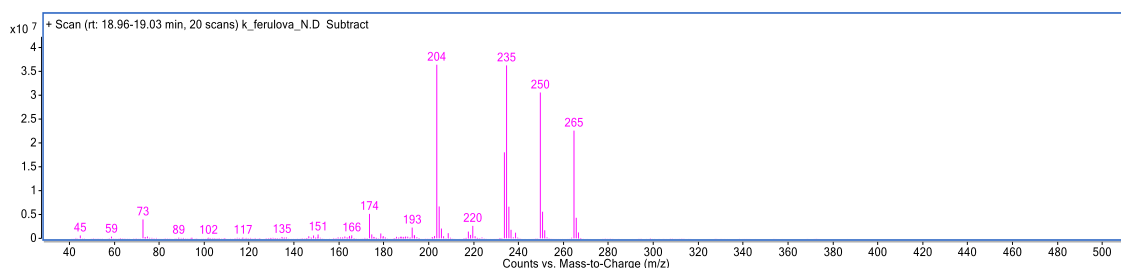
Obrázek 4.7.6.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 18,15 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 18,27 min (viz Obr. 4.7.7.) byl dle dostupných zdrojů identifikován jako trimethylsilyl derivát 2-methoxy-5-nitrofenolu [12]. Ve zmíněné práci byla prekurzorem kyselina vanilová. Stejný produkt byl nalezen i při reakci dusitanu s 2-methoxy-4-vinylfenolem v odpovídajícím retenčním čase (viz Obr. 4.16.3.).



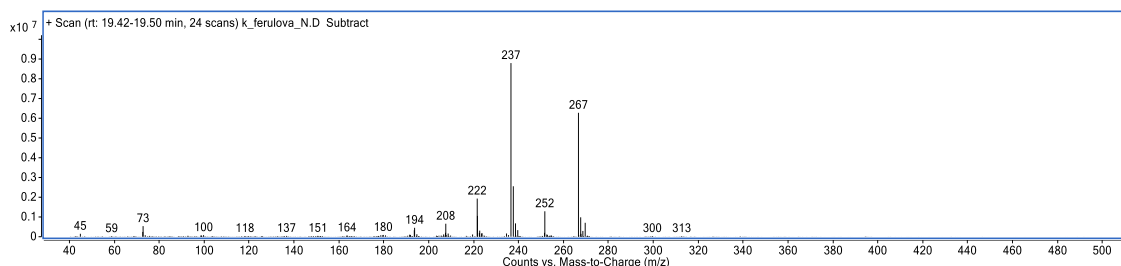
Obrázek 4.7.7.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 18,27 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 18,99 min (viz Obr. 4.7.8.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Možný molekulární ion je zde 265 m/z. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Absence fragmentu 147 m/z znamená, že molekula produktu neobsahuje další polární skupinu a možná tedy došlo k odštěpení části původní molekuly kyseliny ferulové. Stejný produkt byl nalezen i při reakci dusitanu s 2-methoxy-4-vinylfenolem v odpovídajícím retenčním čase (viz Obr. 4.16.4.).



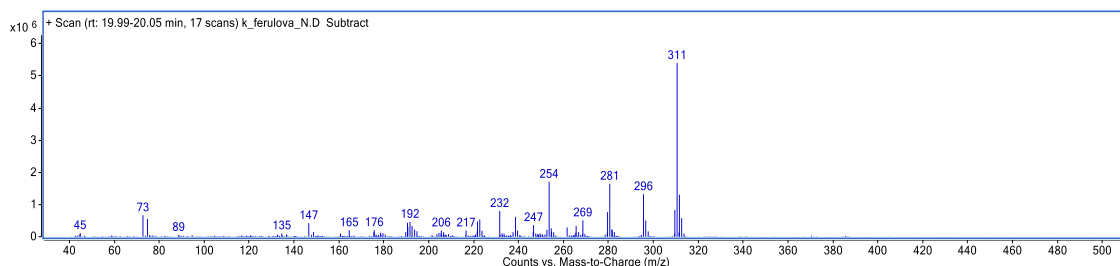
Obrázek 4.7.8.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 18,99 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce dusitanu s kyselinou ferulovou v retenčním čase 19,46 min (viz Obr. 4.7.9.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Možný molekulární ion 267 m/z odpovídá navázání jedné nitroskupiny, pokud by zároveň došlo k odštěpení karboxylu. Tomu odpovídá i absence fragmentu 147 m/z, indikující, že v molekule produktu se nachází pouze jedna polární skupina.



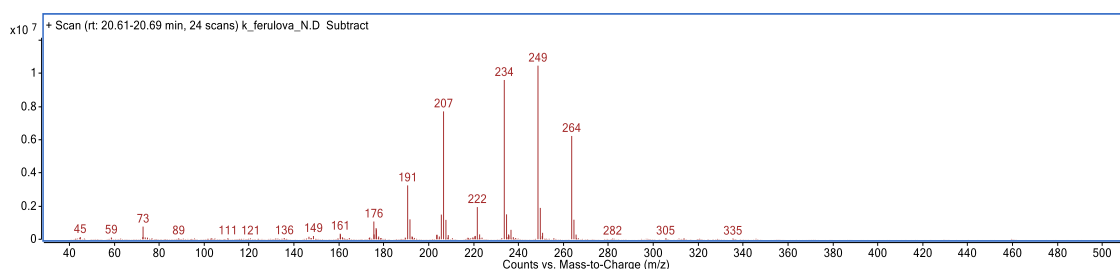
Obrázek 4.7.9.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 19,46 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 20,02 min (viz Obr. 4.7.10.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 75 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou pravděpodobně přes hydroxylovou skupinu. Možný molekulární ion 311 m/z odpovídá navázání jedné nitroskupiny.



Obrázek 4.7.10.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 20,02 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

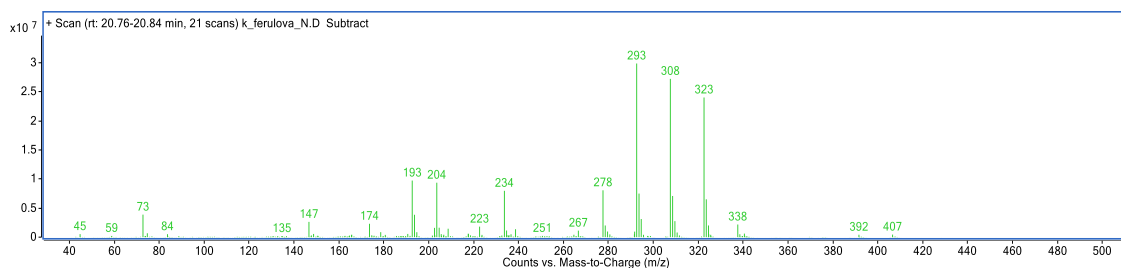
Produkty reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčních časech 20,65 min (viz Obr. 4.7.11.) a 32,18 min (viz Obr. 4.7.26.) obsahují dva dusíky pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekované molekuly obsahují TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v původních nederivatizovaných molekulách. Absence fragmentu 147 m/z znamená, že molekuly produktů neobsahují další polární skupinu a možná tedy došlo k odštěpení části původní molekuly kyseliny ferulové. V případě produktu v retenčním čase 32,18 min je možný molekulární ion 442 m/z.



Obrázek 4.7.11.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 20,65 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

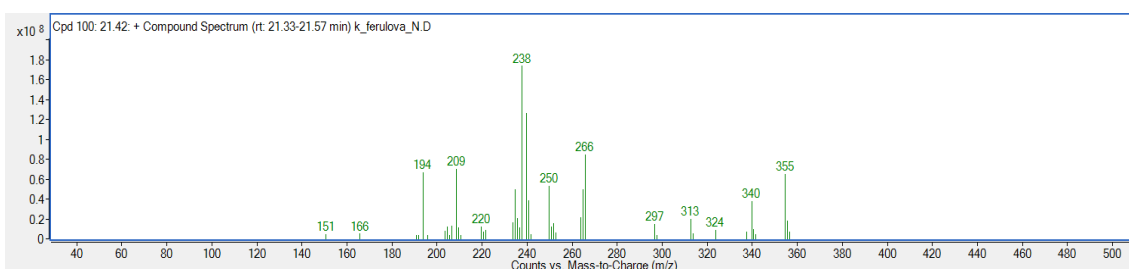
Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 20,80 min (viz Obr. 4.7.12.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion je zde pravděpodobně 338 m/z. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná

molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Fragments 278, 293, 308, 323 a 338 m/z odpovídají postupnému odštěpení čtyř methylových skupin, z čehož lze usuzovat, že molekula produktu obsahuje methoxy skupinu, jelikož tři methyly se odštěpí z TMS skupiny a čtvrtá právě ze zmíněné methoxy skupiny. Stejný produkt byl nalezen i při reakci dusitanu s 2-methoxy-4-vinylfenolem v odpovídajícím retenčním čase (viz Obr. 4.16.5).



Obrázek 4.7.12.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 20,80 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

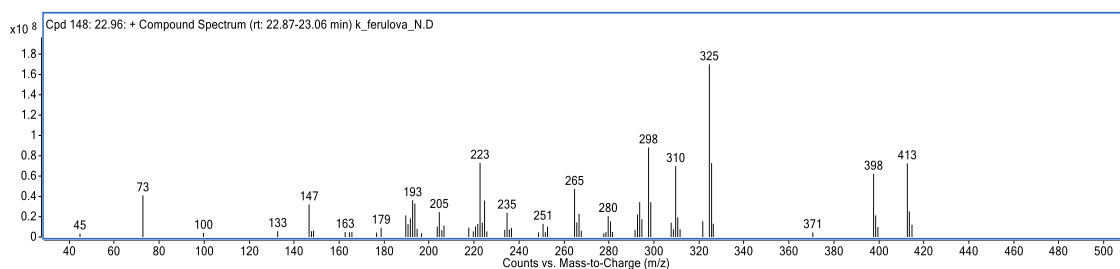
Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 21,42 min (viz Obr. 4.7.13.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Stejný produkt byl nalezen i při reakci dusitanu s 2-methoxy-4-vinylfenolem v odpovídajícím retenčním čase (viz Obr. 4.16.6.), kde je možné nalézt i fragment 73 m/z, který značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Molekulární ion je zde pravděpodobně 355 m/z.



Obrázek 4.7.13.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 21,42 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

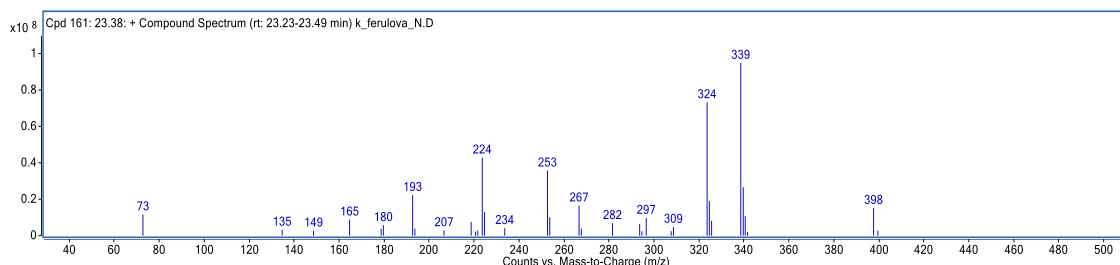
Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 22,96 min (viz Obr. 4.7.14.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion je zde pravděpodobně 413 m/z. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná

molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



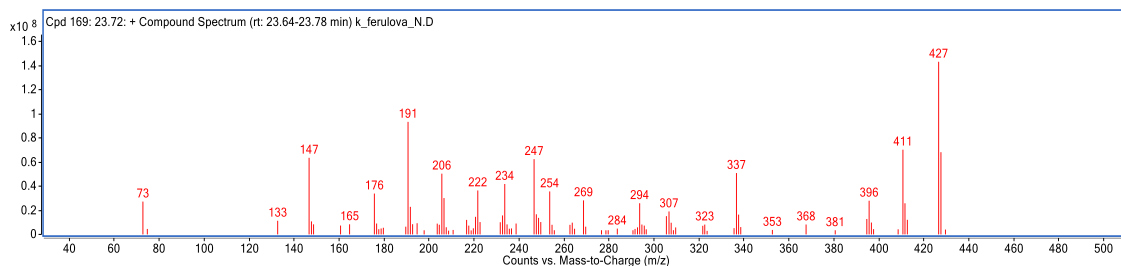
Obrázek 4.7.14.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 22,96 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 23,38 min (viz Obr. 4.7.15.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Absence fragmentu 147 m/z znamená, že molekula produktu neobsahuje další polární skupinu a možná tedy došlo k odštěpení části původní molekuly kyseliny ferulové. Stejný produkt byl nalezen i při reakci dusitanu s 2-methoxy-4-vinylfenolem v odpovídajícím retenčním čase (viz Obr. 4.16.8.).



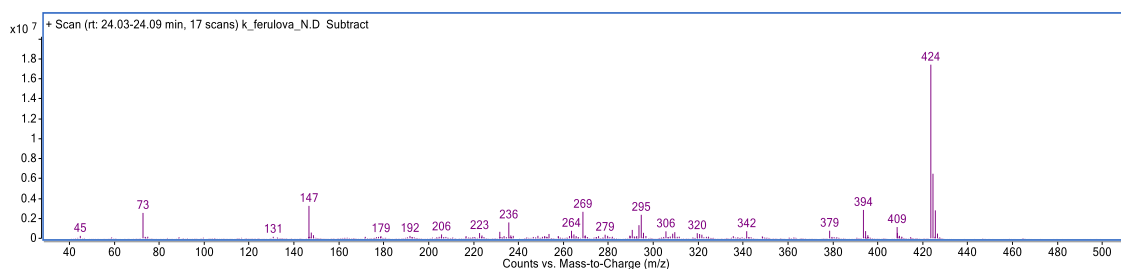
Obrázek 4.7.15.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 23,38 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkty reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčních časech 23,72 min (viz Obr. 4.7.16.) a 25,00 min (viz Obr. 4.7.18.) obsahují dva atomy dusíku pocházející z dusitanu. Podobnost těchto spekter může znamenat, že se jedná o dvě izomerní formy jedné sloučeniny. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekované molekuly obsahují více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů.

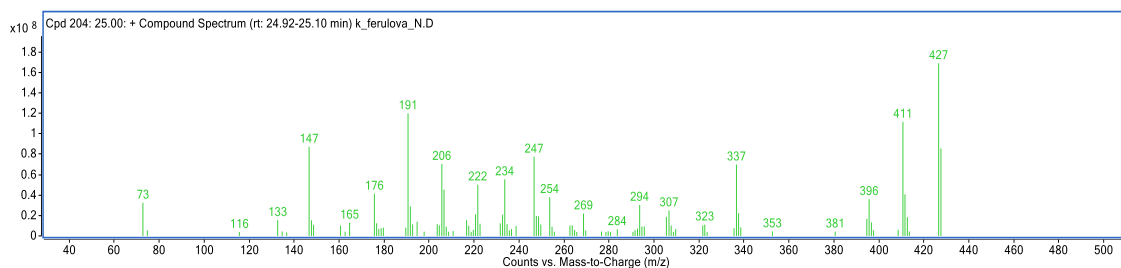


Obrázek 4.7.16.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 23,72 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 24,06 min (viz Obr. 4.7.17.) obsahuje dva atomy dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion je zde pravděpodobně 424 m/z. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



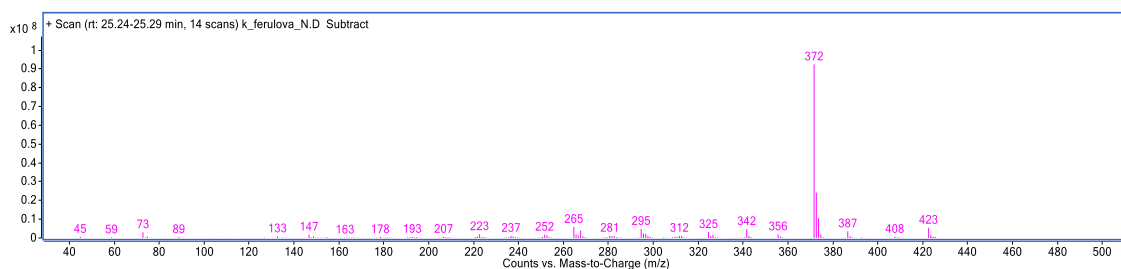
Obrázek 4.7.17.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 24,06 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.



Obrázek 4.7.18.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 25,00 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

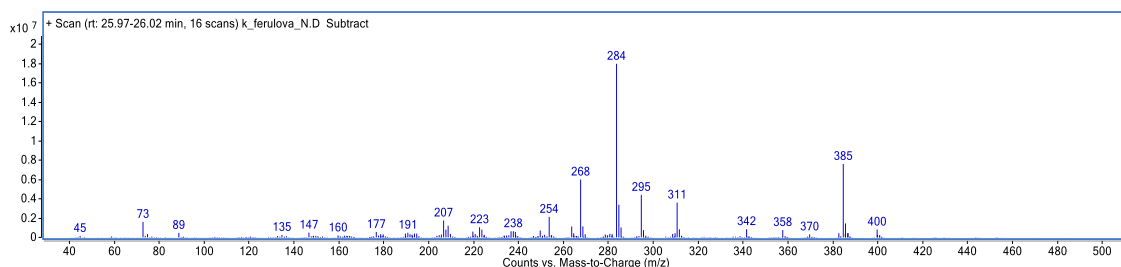
Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 25,27 min (viz Obr. 4.7.19.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion by zde mohl být 423 m/z. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula

obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



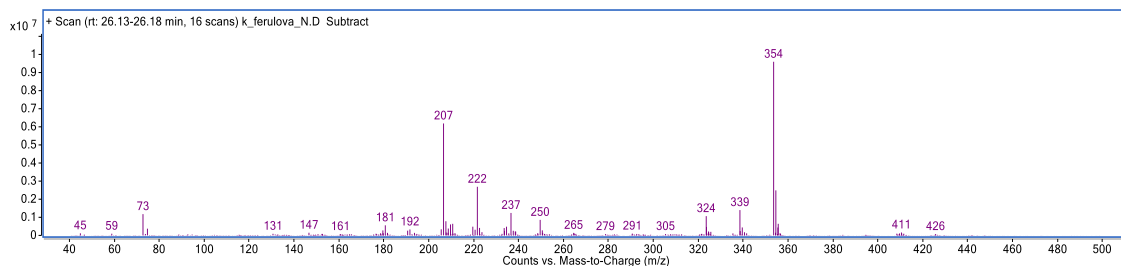
Obrázek 4.7.19.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 25,27 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkty reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčních časech 25,99 min (viz Obr. 4.7.20.) a 26,59 min (viz Obr. 4.7.23.) obsahují dva atomy dusíku pocházející z dusitanu. Podobnost těchto spekter může znamenat, že se jedná o dvě izomerní formy jedné sloučeniny. Molekulární ion je zde pravděpodobně 400 m/z. Přítomnost fragmentů 73 a 89 m/z indikuje, že detekované molekuly obsahují TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu. Fragment 147 m/z značí přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů.



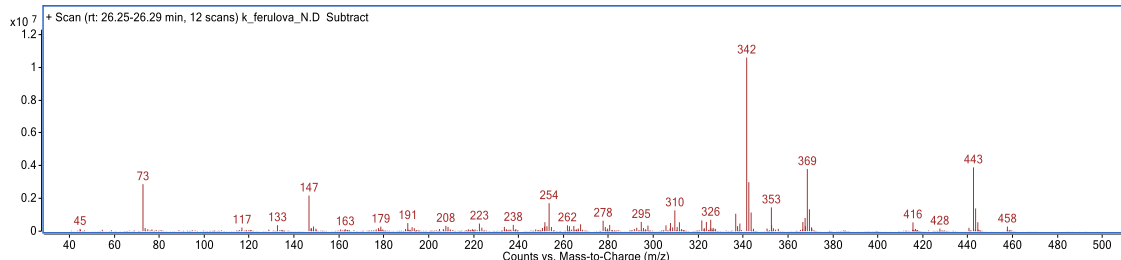
Obrázek 4.7.20.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 25,99 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 26,15 min (viz Obr. 4.7.21.) obsahuje dva atomy dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion by zde mohl být 354 m/z. Přítomnost fragmentů 73 a 75 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu.

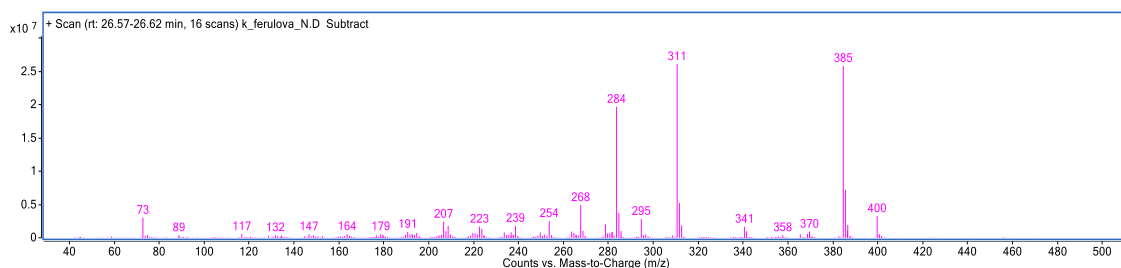


Obrázek 4.7.21.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 26,15 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

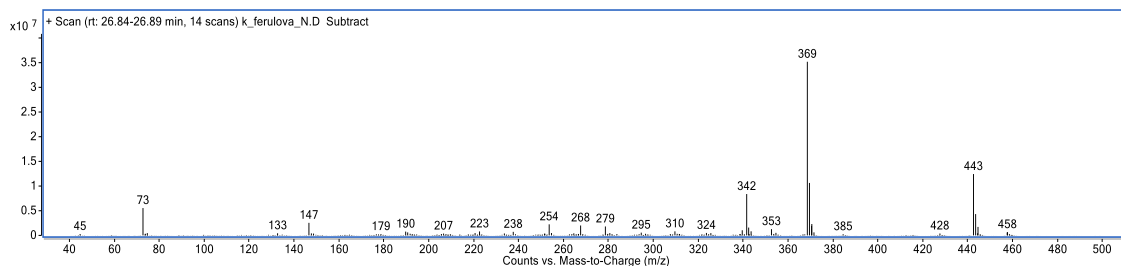
Produkty reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčních časech 26,27 min (viz Obr. 4.7.22.) a 26,86 min (viz Obr. 4.7.24.) obsahují dva atomy dusíku pocházející z dusitanu. Podobnost těchto spekter může znamenat, že se jedná o dvě izomerní formy jedné sloučeniny. Molekulární ion je zde pravděpodobně 458 m/z. Přítomnost fragmentů 73 a 117 m/z indikuje, že detekované molekuly obsahují TMS skupinu navázanou přes karboxyl či hydroxyl. Fragment 147 m/z značí přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů. Stejně produkty byl detekovány i při reakci dusitanu s 2-methoxy-4-vinylfenolem v odpovídajících retenčních časech (viz Obr. 4.16.10. a Obr. 4.16.11.).



Obrázek 4.7.22.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 26,27 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

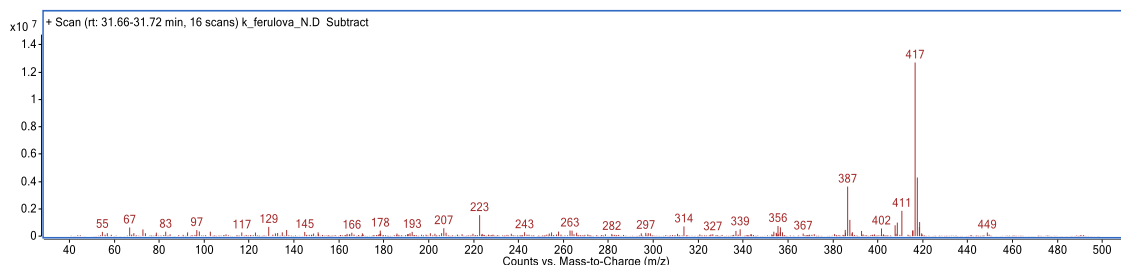


Obrázek 4.7.23.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 26,59 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.



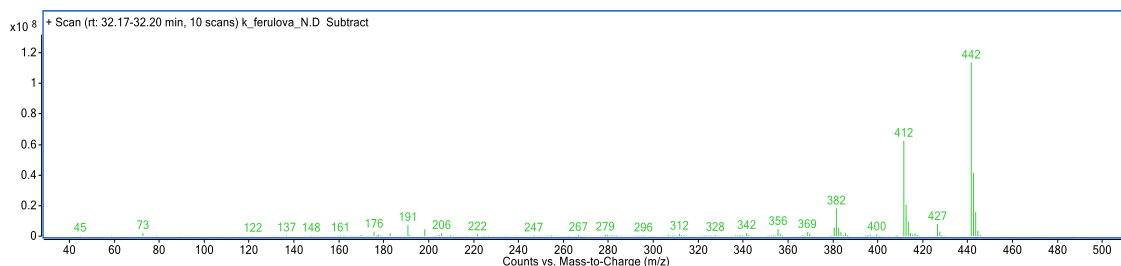
Obrázek 4.7.24.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 26,86 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 31,69 min (viz Obr. 4.7.25.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 117 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes karboxyl či hydroxyl.



Obrázek 4.7.25.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 31,69 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

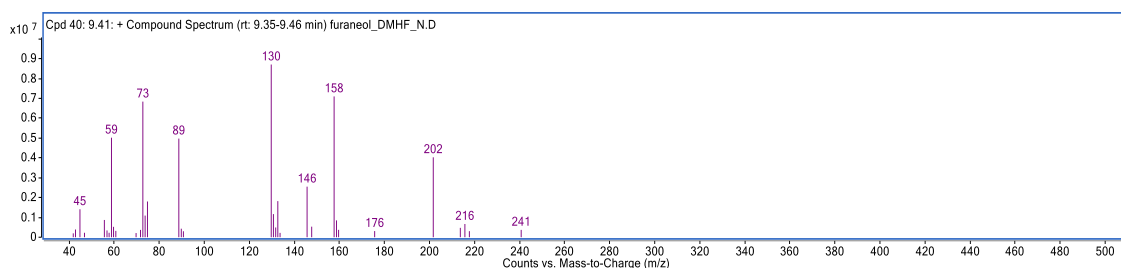
Produkt reakce kyseliny ferulové s dusitanem v retenčním čase 32,18 min (viz Obr. 4.7.26.) obsahuje dva atomy dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion je zde pravděpodobně 442 m/z. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



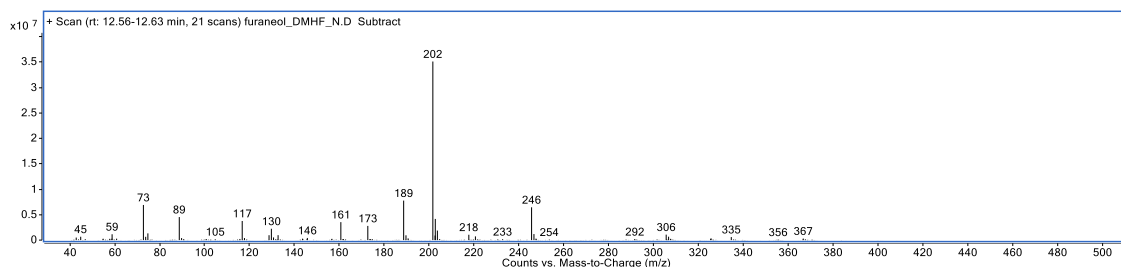
Obrázek 4.7.26.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny ferulové s dusitanem sodným v retenčním čase 32,18 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

4.8. Furaneol

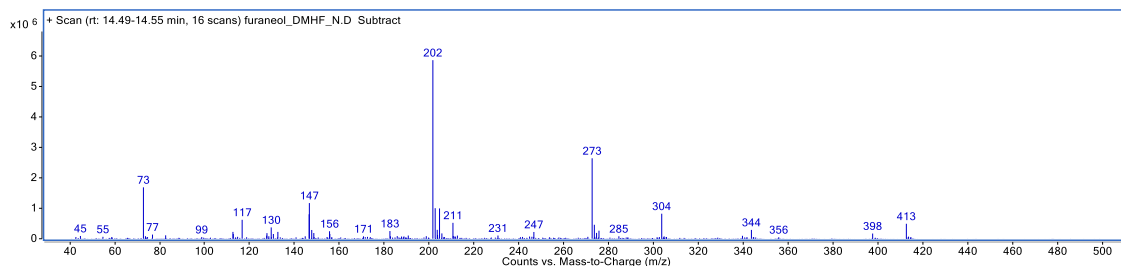
Vyhodnocením získaných spekter byly detekovány čtyři produkty reakce furaneolu s dusitanem. Všechny čtyři produkty obsahují jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Díky přítomnosti fragmentů 73 a 89 m/z lze konstatovat, že produkty reakce furaneolu s dusitanem v retenčních časech 9,41 min (viz Obr. 4.8.1.) a 12,59 min (viz Obr. 4.8.2) pravděpodobně obsahují TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu. Fragmenty 73 a 147 m/z značí, že detekované molekuly retenčních časech 14,52 min (viz Obr. 4.8.3.) a 17,89 min (viz Obr. 4.8.4) obsahují více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů. Možné molekulární ionty jsou zde 413 m/z pro Obr. 4.8.3. a 391 m/z pro Obr. 4.8.4.



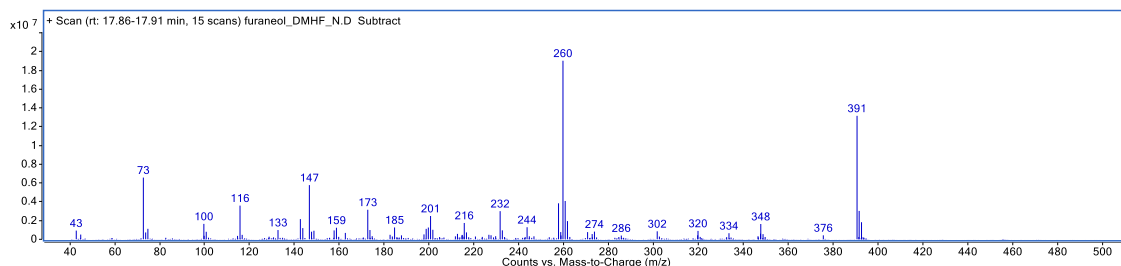
Obrázek 4.8.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce furaneolu s dusitanem sodným v retenčním čase 9,41 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



Obrázek 4.8.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce furaneolu s dusitanem sodným v retenčním čase 12,59 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



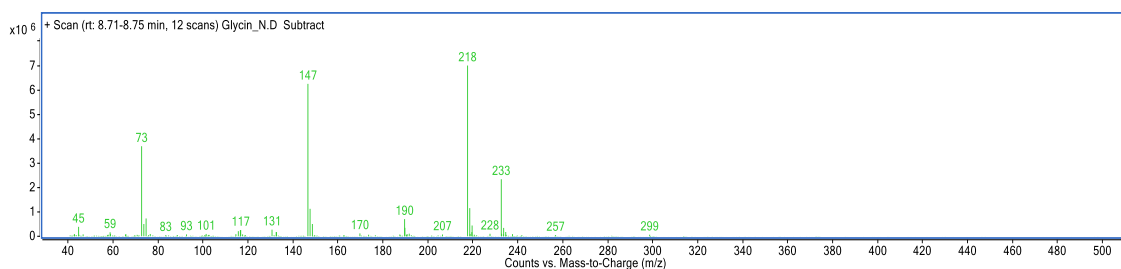
Obrázek 4.8.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce furaneolu s dusitanem sodným v retenčním čase 14,52 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



Obrázek 4.8.4.: Hmotnostní spektrum produktu reakce furaneolu s dusitanem sodným v retenčním čase 17,89 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

4.9. Glycin

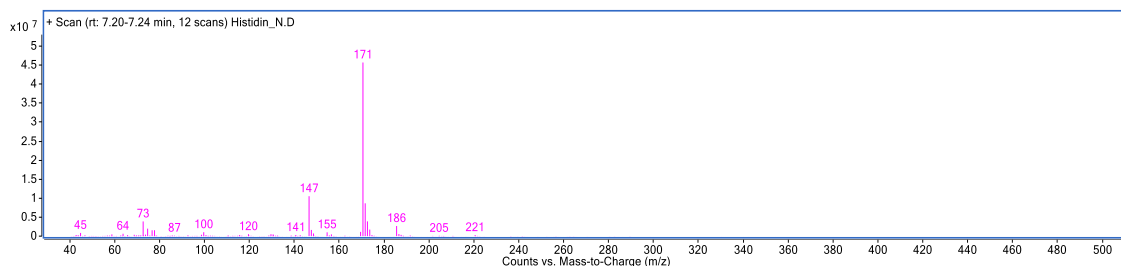
Vyhodnocením získaných spekter byl detekován jeden produkt reakce glycinu s dusitanem v retenčním čase 8,73 min (viz *Obr 4.9.1.*). Tento produkt obsahuje jeden dusík z reakce s dusitanem. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



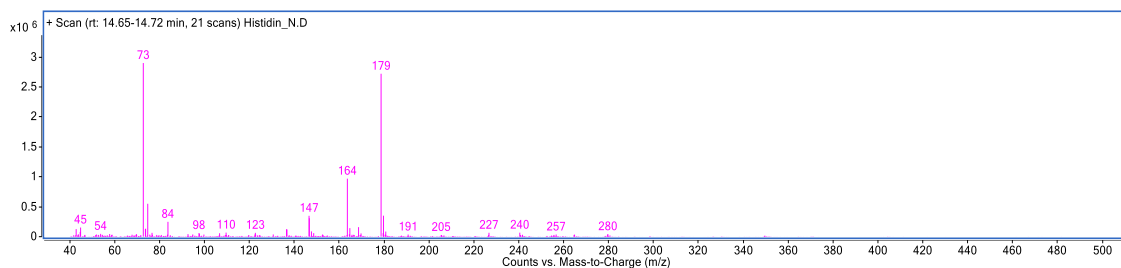
Obrázek 4.9.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce glycinu s dusitanem sodným v retenčním čase 8,73 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

4.10. Histidin

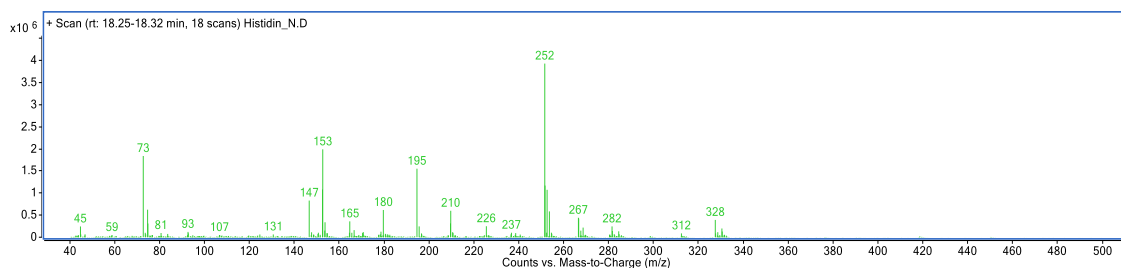
Vyhodnocením získaných spekter byly detekovány tři produkty reakce histidinu s dusitanem viz *Obr. 4.10.1. – Obr. 4.10.3.* Všechny tři produkty obsahují jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Fragменты 73 a 147 m/z značí, že všechny tři detekované molekuly obsahují více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v původních nederivatizovaných molekulách.



Obrázek 4.10.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce histidinu s dusitanem sodným v retenčním čase 7,22 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



Obrázek 4.10.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce histidinu s dusitanem sodným v retenčním čase 14,68 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

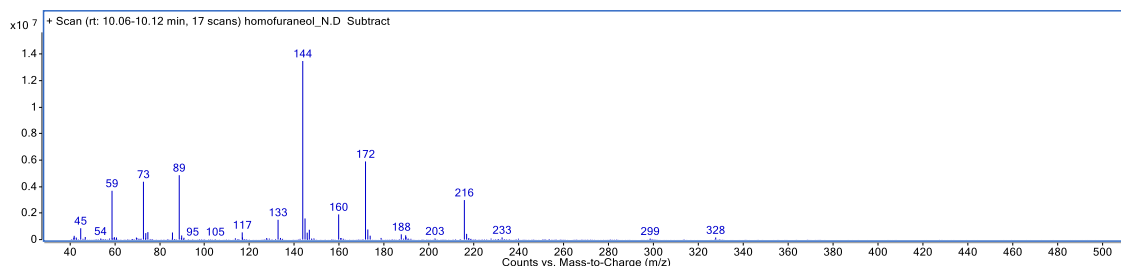


Obrázek 4.10.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce histidinu s dusitanem sodným v retenčním čase 18,28 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

4.11. Homofuraneol

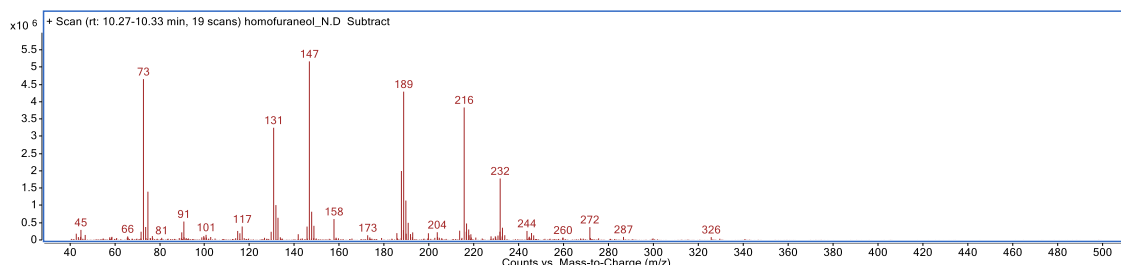
Vyhodnocením získaných spekter bylo nalezeno sedm produktů reakce homofuraneolu s dusitanem. Produkt reakce homofuraneolu s dusitanem v retenčním čase 10,09 min

(viz Obr. 4.11.1.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73, 89 a 117 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes karboxyl či hydroxyl.



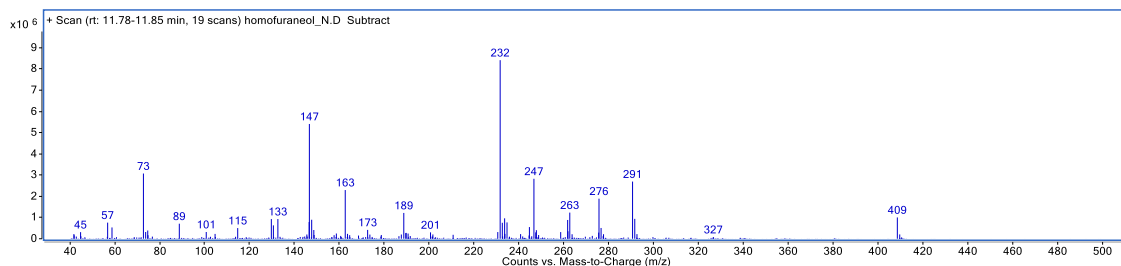
Obrázek 4.11.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce homofuraneolu s dusitanem sodným v retenčním čase 10,09 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce homofuraneolu s dusitanem v retenčním čase 10,30 min (viz Obr. 4.11.2.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 75 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu. Díky fragmentu 91 m/z lze usuzovat, že došlo k zachování benzenového jádra z původní molekuly homofuraneolu. Fragment 147 m/z pak značí přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



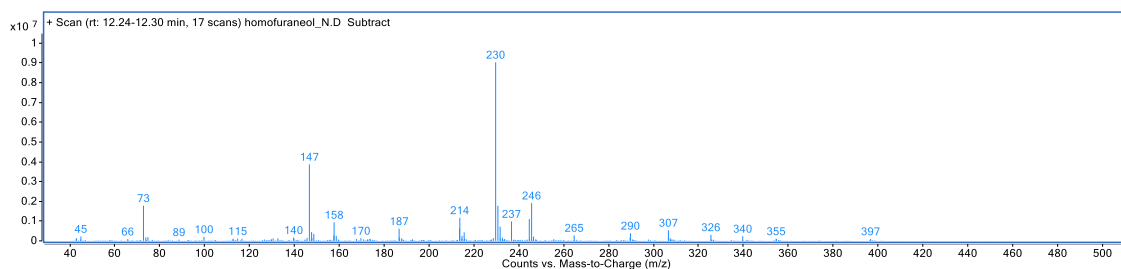
Obrázek 4.11.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce homofuraneolu s dusitanem sodným v retenčním čase 10,30 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce homofuraneolu s dusitanem v retenčním čase 11,81 min (viz Obr. 4.11.3.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 89 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu. Fragment 147 m/z pak značí přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Možný molekulární ion je zde 291 m/z.



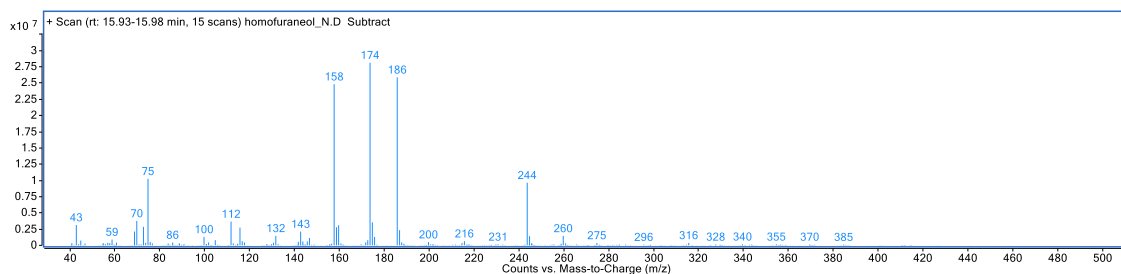
Obrázek 4.11.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce homofuraneolu s dusitanem sodným v retenčním čase 11,81 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce homofuraneolu s dusitanem v retenčním čase 12,27 min (viz Obr. 4.11.4.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



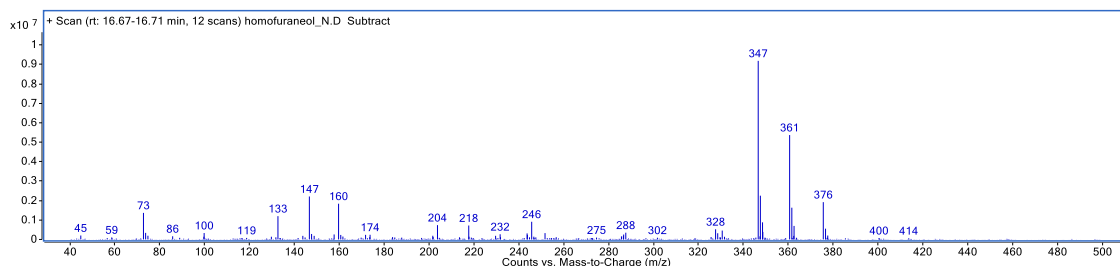
Obrázek 4.11.4.: Hmotnostní spektrum produktu reakce homofuraneolu s dusitanem sodným v retenčním čase 12,27 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce homofuraneolu s dusitanem v retenčním čase 15,95 min (viz Obr. 4.11.5.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 75 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu.



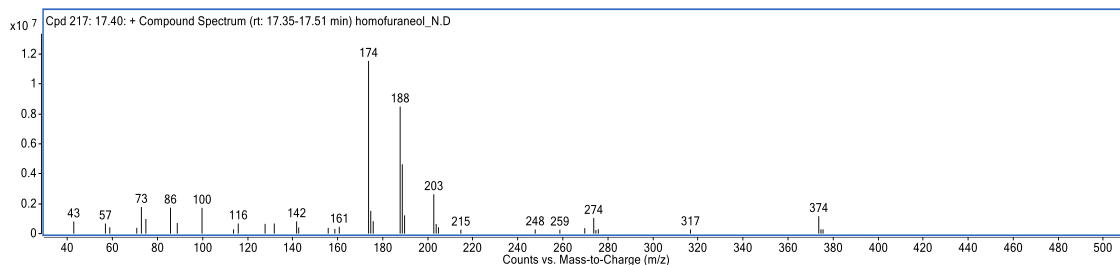
Obrázek 4.11.5.: Hmotnostní spektrum produktu reakce homofuraneolu s dusitanem sodným v retenčním čase 15,95 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce homofuraneolu s dusitanem v retenčním čase 16,69 min (viz Obr. 4.11.6.) obsahuje dva atomy dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion je zde pravděpodobně 376 m/z. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



Obrázek 4.11.6.: Hmotnostní spektrum produktu reakce homofuraneolu s dusitanem sodným v retenčním čase 16,69 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

Produkt reakce homofuraneolu s dusitanem v retenčním čase 17,40 min (viz Obr. 4.11.7.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.

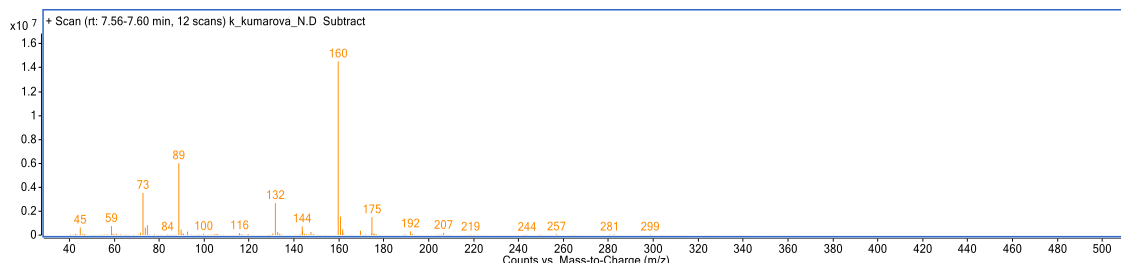


Obrázek 4.11.7.: Hmotnostní spektrum produktu reakce homofuraneolu s dusitanem sodným v retenčním čase 17,40 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

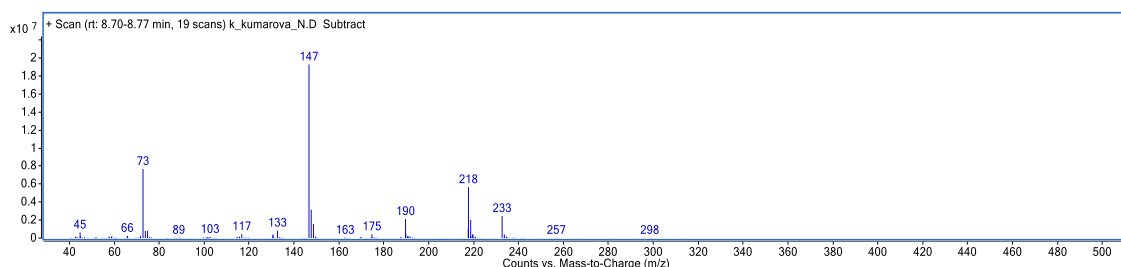
4.12. Kumarová kyselina

Vyhodnocením získaných spekter bylo detekováno dvacet dva produktů reakce kyseliny kumarové s dusitanem. Produkty reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčním čase 7,58 min (viz Obr. 4.12.1.) a 8,74 min (viz Obr. 4.12.2.) byly detekovány i při reakci dusitanu s kyselinou ferulovou v odpovídajících retenčních časech, jejich charakterizace je tedy již uvedena výše viz Kapitola 4.7. Ferulová kyselina.

Absence fragmentu 147 m/z u poloviny produktů (viz *Obr. 4.12.1., 4.12.4.- 4.12.7., 4.12.9., 4.12.11.- 4.12.13., 4.12.19. a 4.12.20.*) značí, že molekula produktu neobsahuje další polární skupinu a možná tedy došlo k odštěpení části původní molekuly kyseliny kumarové.

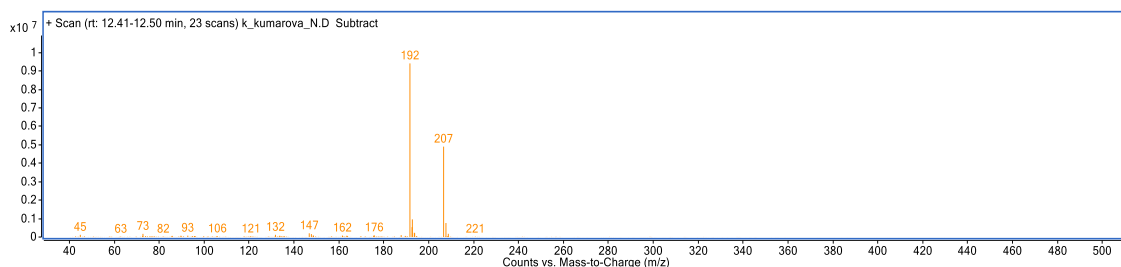


Obrázek 4.12.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 7,58 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



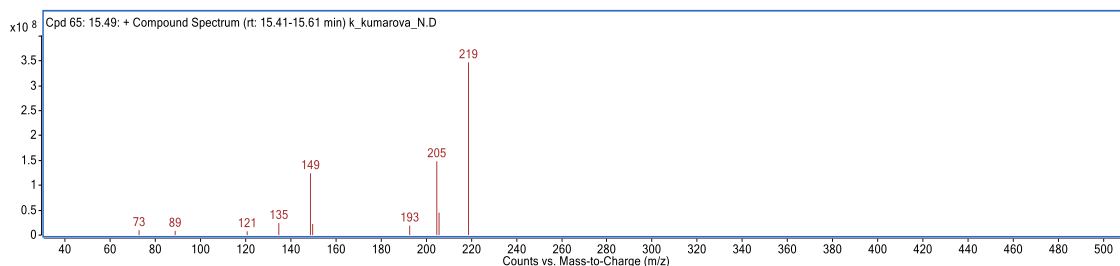
Obrázek 4.12.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 8,74 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčním čase 12,46 min (viz *Obr. 4.12.3.*) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny. Pokud je molekulární ion 207 m/z, tak je molekula produktu pravděpodobně stále aromatická, jelikož fragment M-15⁺ (192 m/z) je ze získaného spektra nejintenzivnější.



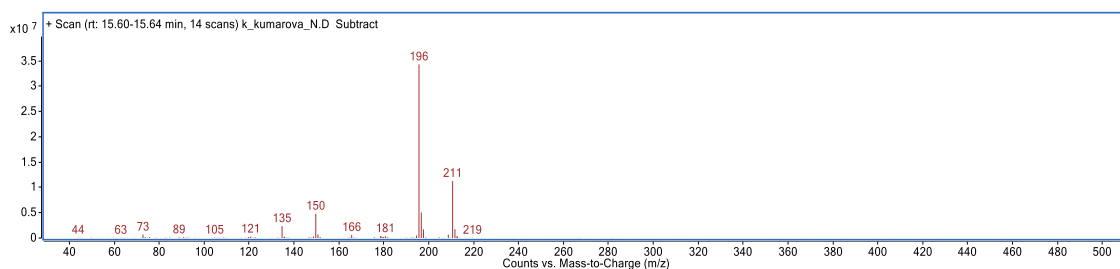
Obrázek 4.12.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 12,46 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkty reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčních časech 15,49 min (viz Obr. 4.12.4.) a 21,74 min (viz Obr. 4.12.13.) obsahují jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 89 m/z indikuje, že detekované molekuly obsahují TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu. V případě produktu v retenčním čase 21,74 min je možný molekulární ion 339 m/z.



Obrázek 4.12.4.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 15,49 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

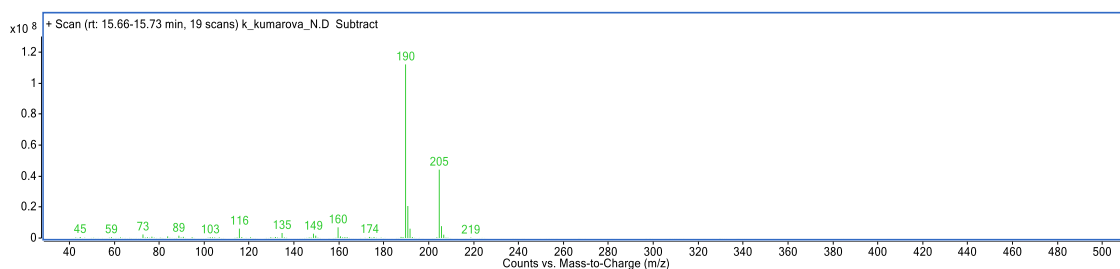
Produkt reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčním čase 15,62 min (viz Obr. 4.12.5.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 89 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu. Pokud je zde molekulární ion 211 m/z, tak je molekula produktu pravděpodobně stále aromatická, jelikož fragment $M-15^+$ (196 m/z) je ze získaného spektra nejintenzivnější.



Obrázek 4.12.5.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 15,62 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

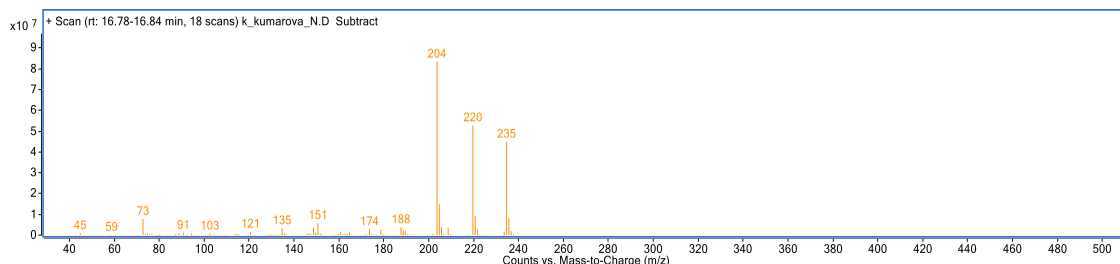
Produkt reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčním čase 15,69 min (viz Obr. 4.12.6.) obsahuje jeden dusík pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 89 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu. Pokud je zde molekulární ion 205 m/z, tak je molekula produktu pravděpodobně stále aromatická, jelikož fragment $M-15^+$ (190 m/z) je ze získaného

spektra nejintenzivnější. Stejný produkt vznikl i z reakce dusitanu s tyrosinem ve shodném retenčním čase (viz Obr. 4.20.2.).



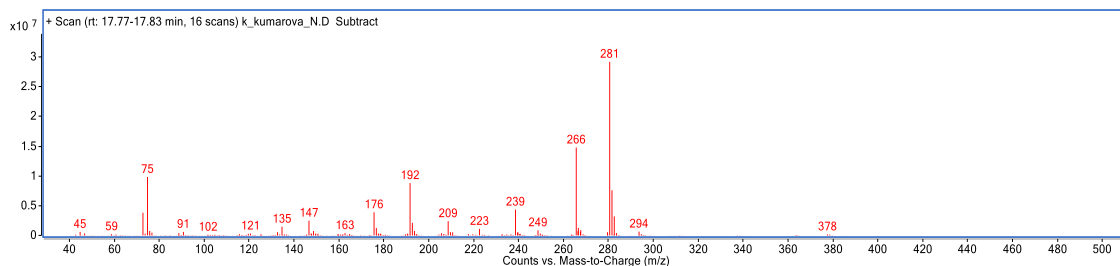
Obrázek 4.12.6.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 15,69 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkty reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčních časech 16,81 min (viz Obr. 4.12.7.) a 21,57 min (viz Obr. 4.12.12.) obsahují jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekované molekuly obsahují TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů. V případě produktu v retenčním čase 16,81 min je možný molekulární ion 235 m/z.



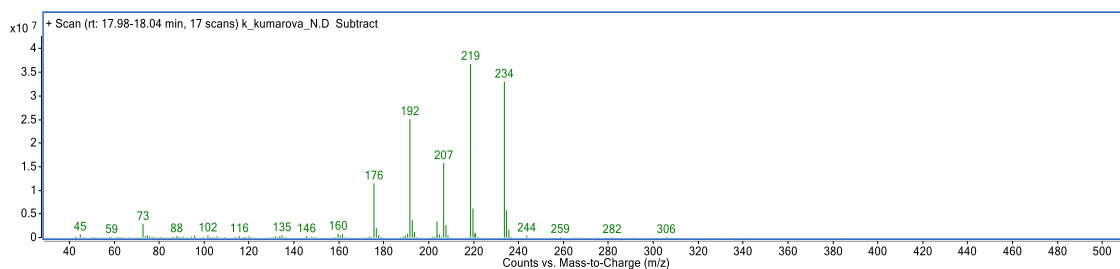
Obrázek 4.12.7.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 16,81 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčním čase 17,80 min (viz Obr. 4.12.8.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 75 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu. Fragment 147 m/z značí přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Molekulární ion zde může být 281 m/z.



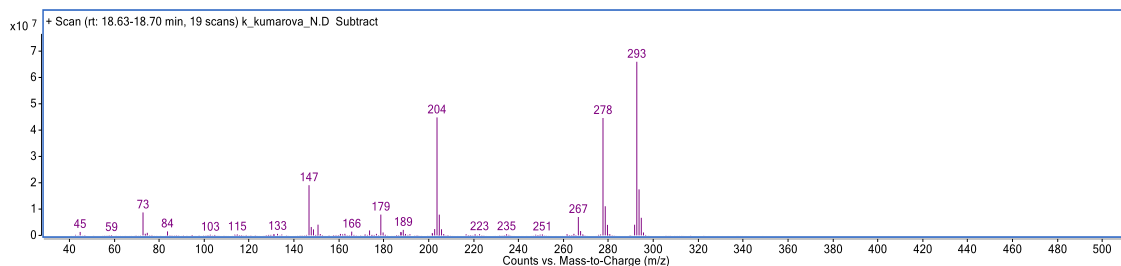
Obrázek 4.12.8.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 17,80 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčním čase 18,01 min (viz Obr. 4.12.9.) obsahuje dva atomy dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Pokud je zde molekulární ion 234 m/z, tak je molekula produktu pravděpodobně stále aromatická, jelikož fragment $M-15^+$ (219 m/z) je ze získaného spektra nejintenzivnější.



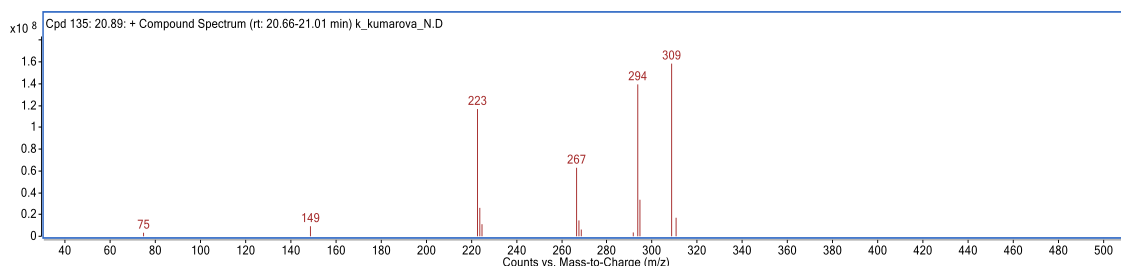
Obrázek 4.12.9.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 18,01 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčním čase 18,66 min (viz Obr. 4.12.10.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Možný molekulární ion 293 m/z odpovídá obsahu jedné nitrososkupiny v molekule produktu, pokud by zároveň došlo k odštěpení karboxylu.

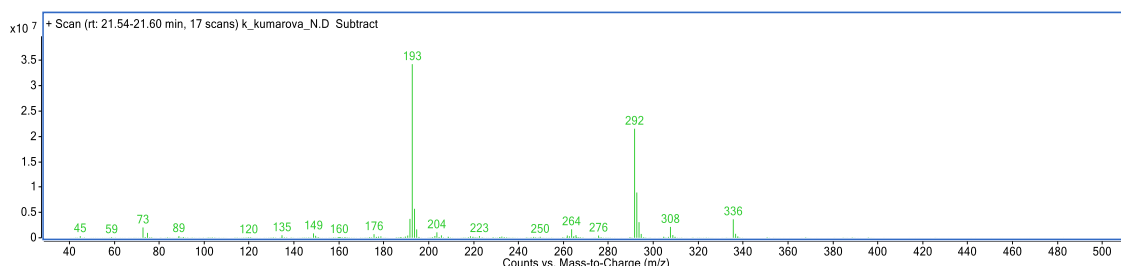


Obrázek 4.12.10.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 18,66 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

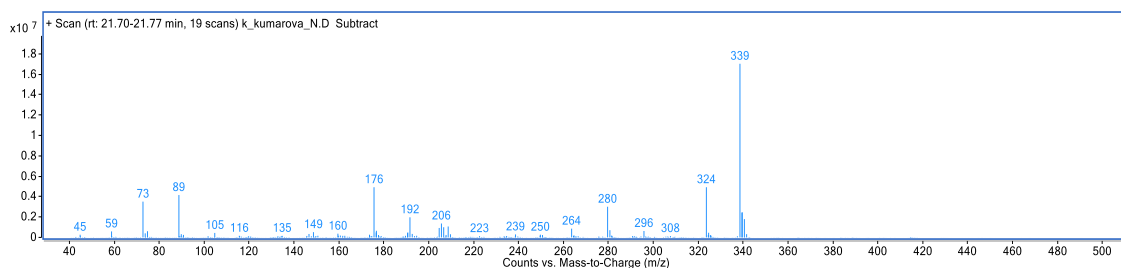
Produkt reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčním čase 20,89 min (viz Obr. 4.12.11.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Absence fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula neobsahuje TMS skupinu, což znamená, že detekovaná molekula produktu neobsahuje žádnou polární skupinu, kterou by bylo možné derivatizovat.



Obrázek 4.12.11.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 20,89 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

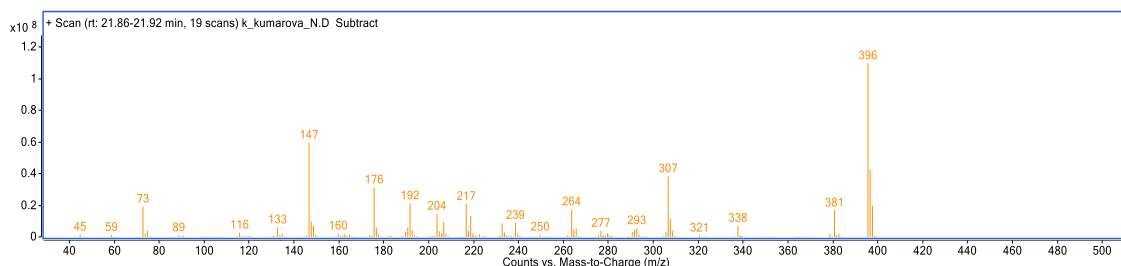


Obrázek 4.12.12.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 21,57 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



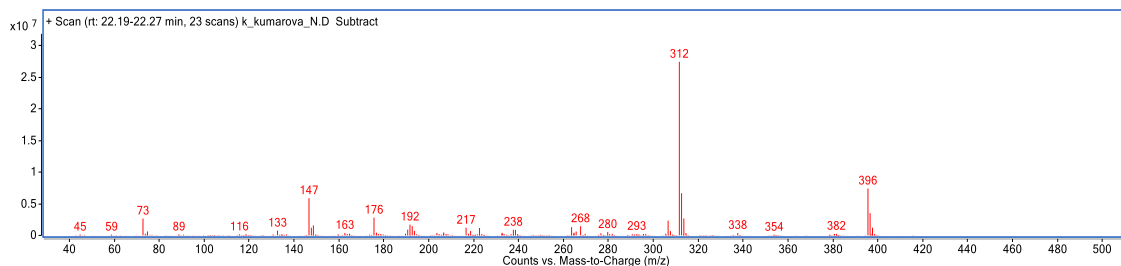
Obrázek 4.12.13.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 21,74 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkty reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčních časech 21,89 min (viz Obr. 4.12.14.), 22,50 min (viz Obr. 4.12.16.) a 31,62 min (viz Obr. 4.12.21.) obsahují dva atomy dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekované molekuly obsahují více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů. V případě produktu v retenčním čase 21,89 min je možný molekulární ion 396 m/z, pro produkt v retenčním čase 22,50 min je možný molekulární ion 394 m/z a pro produkt v retenčním čase 31,62 min je možný molekulární ion 382 m/z.

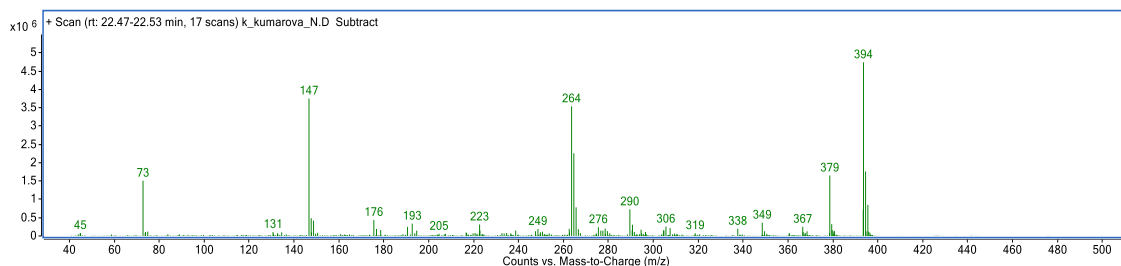


Obrázek 4.12.14.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 21,89 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

Produkty reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčních časech 22,23 min (viz Obr. 4.12.15.) a 28,42 min (viz Obr. 4.12.18.) obsahují jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekované molekuly obsahují více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů. V případě produktu v retenčním čase 28,42 min je možný molekulární ion 369 m/z.

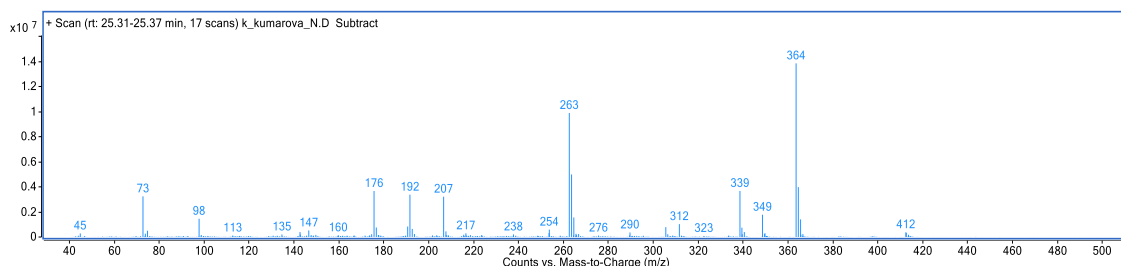


Obrázek 4.12.15.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 22,23 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

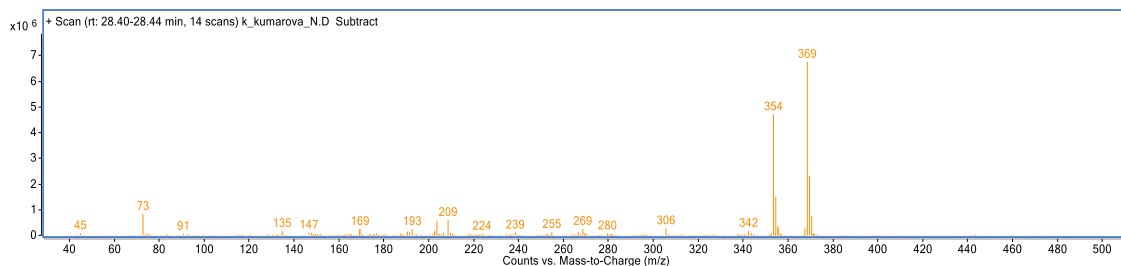


Obrázek 4.12.16.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 22,50 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

Produkt reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčním čase 25,34 min (viz Obr. 4.12.17.) obsahuje dva atomy dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 89 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu. Fragment 147 m/z pak značí přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Možný molekulární ion je zde 364 m/z.

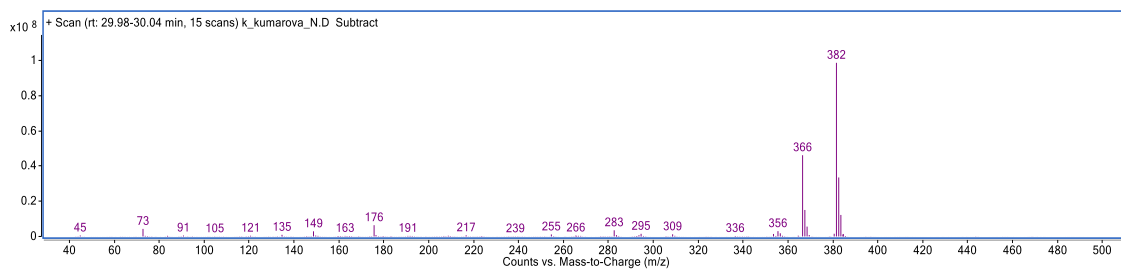


Obrázek 4.12.17.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 25,34 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

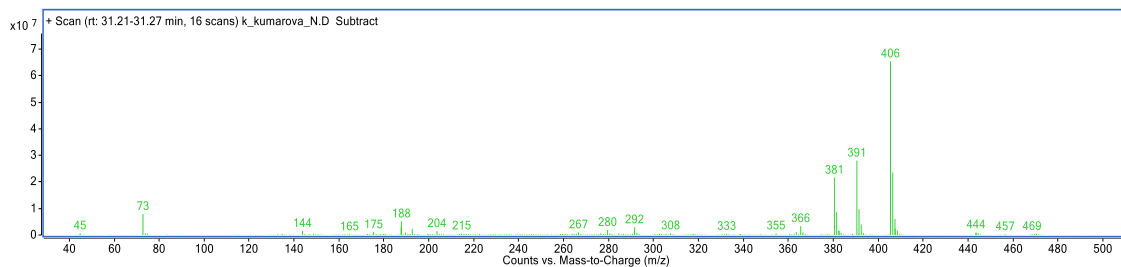


Obrázek 4.12.18.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 28,42 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

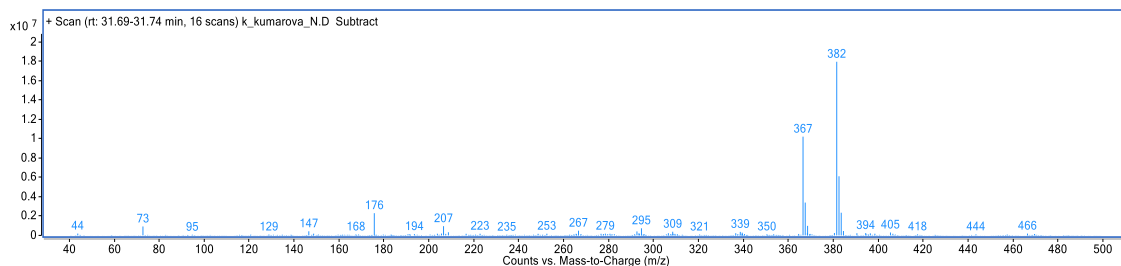
Produkty reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčních časech 30,01 min (viz Obr. 4.12.19.) a 31,24 min (viz Obr. 4.12.20.) obsahují dva atomy dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekované molekuly obsahují TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů. V případě produktu v retenčním čase 31,34 min je možný molekulární ion 406 m/z.



Obrázek 4.12.19.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 30,01 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

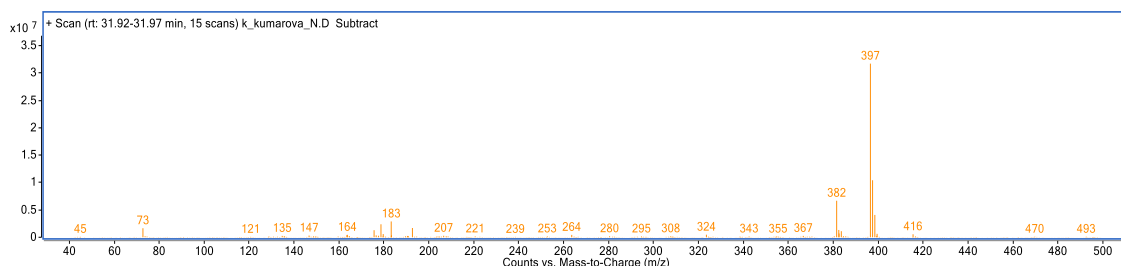


Obrázek 4.12.20.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 31,24 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.



Obrázek 4.12.21.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 31,62 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

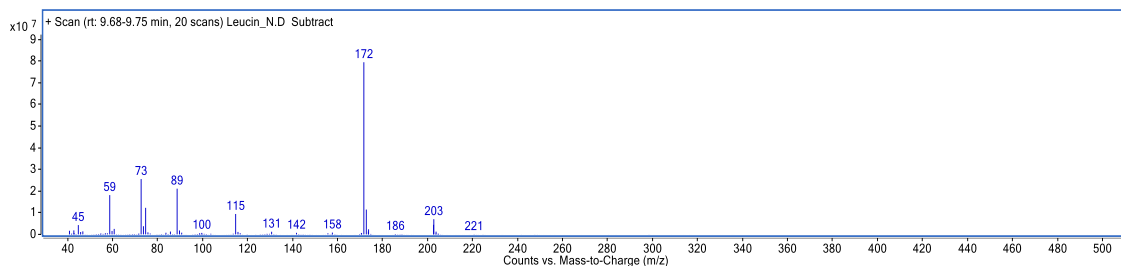
Produkt reakce kyseliny kumarové s dusitanem v retenčním čase 31,94 min (viz Obr. 4.12.22.) obsahuje tři atomy dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion by zde mohl být 397 m/z. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



Obrázek 4.12.22.: Hmotnostní spektrum produktu reakce kyseliny kumarové s dusitanem sodným v retenčním čase 31,94 min. Produkt reakce obsahuje tři atomy dusíku z dusitanu.

4.13. Leucin

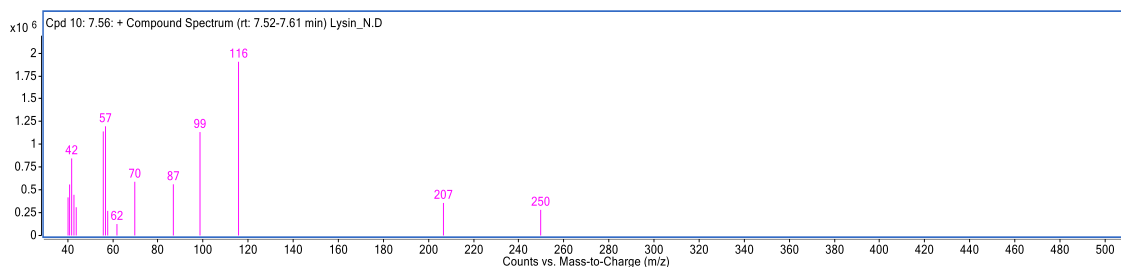
Vyhodnocením získaných spekter byl detekován jeden produkt reakce leucinu s dusitanem v retenčním čase 9,71 min (viz Obr. 4.13.1.). Tento produkt obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 89 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes hydroxylovou skupinu.



Obrázek 4.13.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce leucinu s dusitanem sodným v retenčním čase 9,71 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

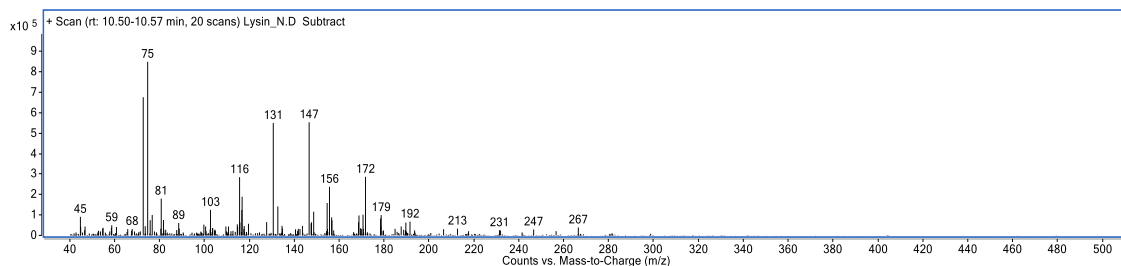
4.14. Lysin

Vyhodnocením získaných spekter bylo detekováno deset produktů reakce lysinu s dusitanem. Produkt reakce lysinu s dusitanem v retenčním čase 7,53 min (viz Obr. 4.14.1.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Absence fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula neobsahuje TMS skupinu, což znamená, že detekovaná molekula produktu neobsahuje žádnou polární skupinu, kterou by bylo možné derivatizovat.



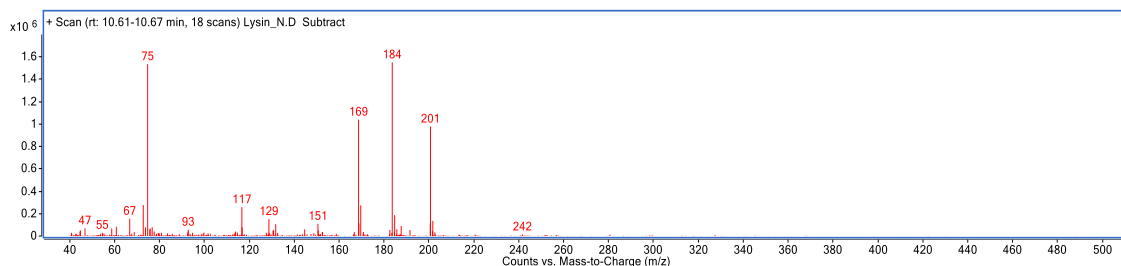
Obrázek 4.14.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce lysinu s dusitanem sodným v retenčním čase 7,56 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkty reakce lysinu s dusitanem v retenčních časech 10,54 min (viz Obr. 4.14.2.), 11,16 min (viz Obr. 4.14.5.) a 18,01 min (viz Obr. 4.14.7.) obsahují jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 75 m/z značí, že detekované molekuly obsahují TMS skupinu navázanou pravděpodobně přes hydroxylovou skupinu. Fragment 147 m/z pak indikuje přítomnost další polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů. Molekulární ion produktu reakce lysinu s dusitanem v retenčním čase 11,16 min může být 201 m/z a molekulární ion produktu této reakce v retenčním čase 18,01 min může být 302 m/z.



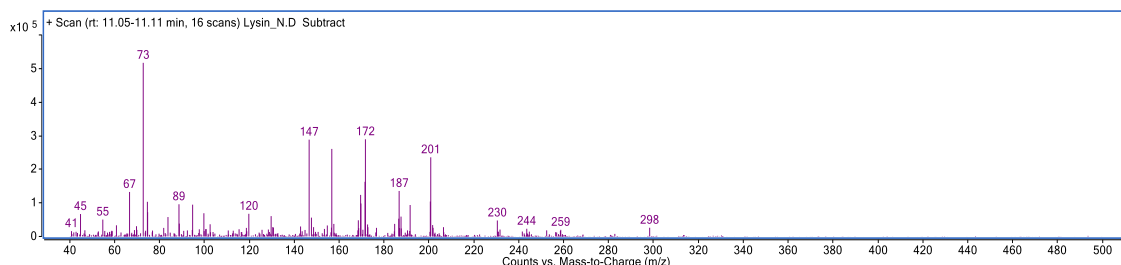
Obrázek 4.14.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce lysinu s dusitanem sodným v retenčním čase 10,54 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce lysinu s dusitanem v retenčním čase 10,64 min (viz Obr. 4.14.3.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73, 75 a 117 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes karboxyl či hydroxyl.

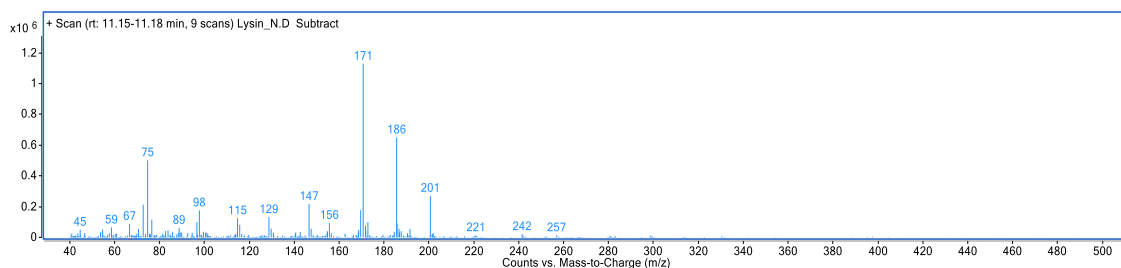


Obrázek 4.14.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce lysinu s dusitanem sodným v retenčním čase 10,64 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce lysinu s dusitanem v retenčním čase 11,08 min (viz Obr. 4.14.4.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 89 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou pravděpodobně přes hydroxylovou skupinu. Fragment 147 m/z pak indikuje přítomnost další polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.

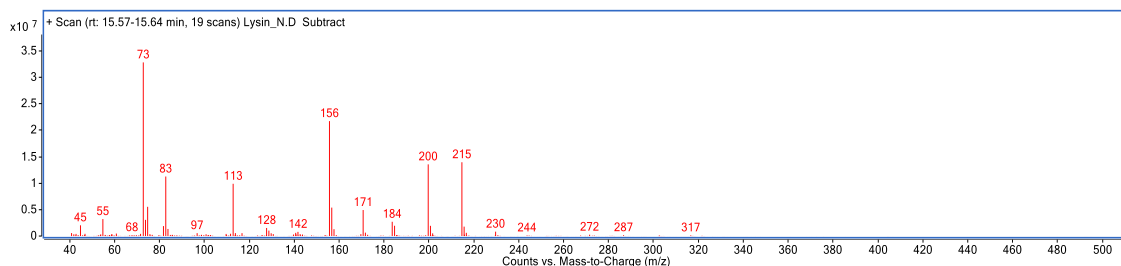


Obrázek 4.14.4.: Hmotnostní spektrum produktu reakce lysinu s dusitanem sodným v retenčním čase 11,08 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

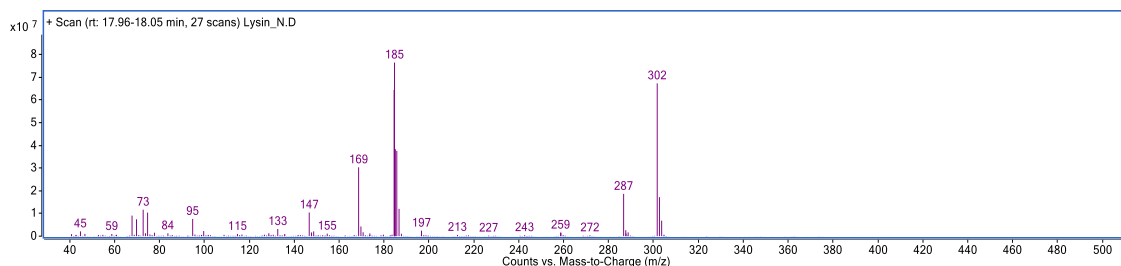


Obrázek 4.14.5.: Hmotnostní spektrum produktu reakce lysinu s dusitanem sodným v retenčním čase 11,16 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce lysinu s dusitanem v retenčním čase 15,61 min (viz Obr. 4.14.6.) obsahuje jeden atom dusík pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.

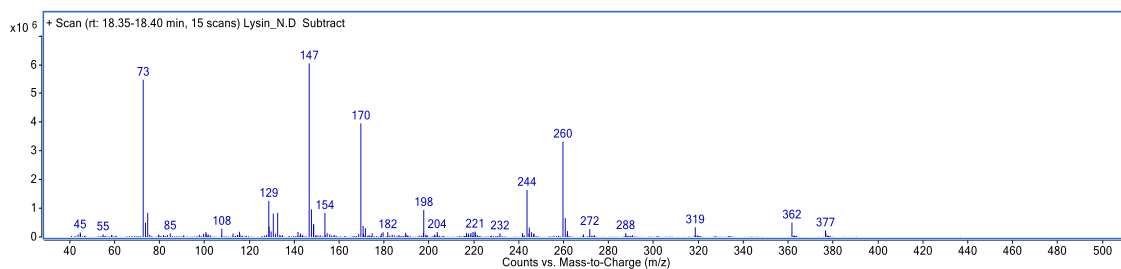


Obrázek 4.14.6.: Hmotnostní spektrum produktu reakce lysinu s dusitanem sodným v retenčním čase 15,61 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

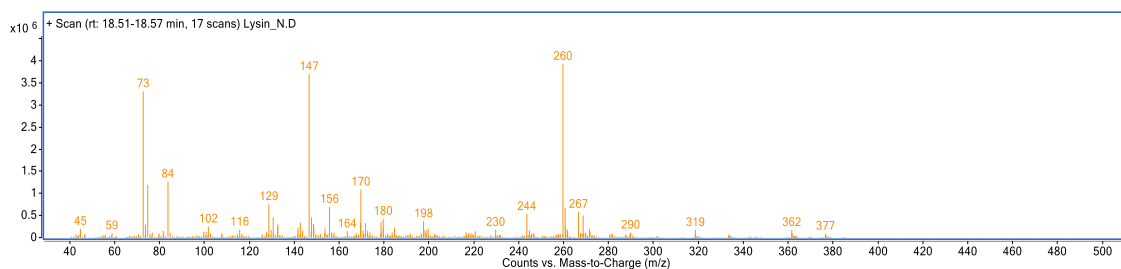


Obrázek 4.14.7.: Hmotnostní spektrum produktu reakce lysinu s dusitanem sodným v retenčním čase 18,01 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkty reakce lysinu s dusitanem v retenčních časech 18,38 min (viz Obr. 4.14.8.) a 18,54 min (viz Obr. 4.14.9.) obsahují jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Podobnost těchto spekter může znamenat, že se jedná o dvě izomerní formy jedné sloučeniny. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekované molekuly obsahují více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů. Možný molekulární ion je zde 377 m/z.

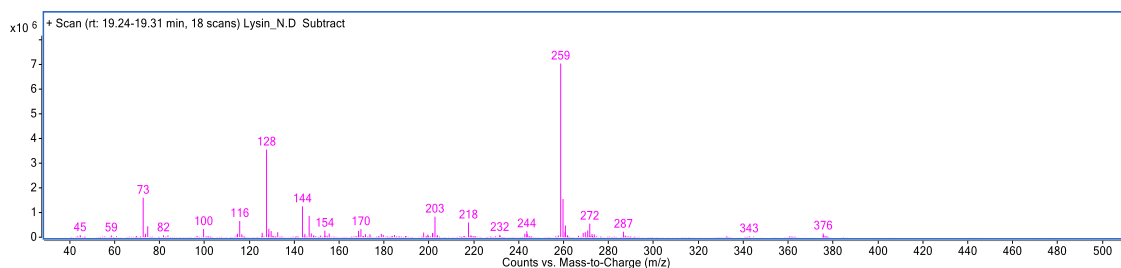


Obrázek 4.14.8.: Hmotnostní spektrum produktu reakce lysinu s dusitanem sodným v retenčním čase 18,38 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



Obrázek 4.14.9.: Hmotnostní spektrum produktu reakce lysinu s dusitanem sodným v retenčním čase 18,54 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce lysinu s dusitanem v retenčním čase 19,27 min (viz Obr. 4.14.10.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.

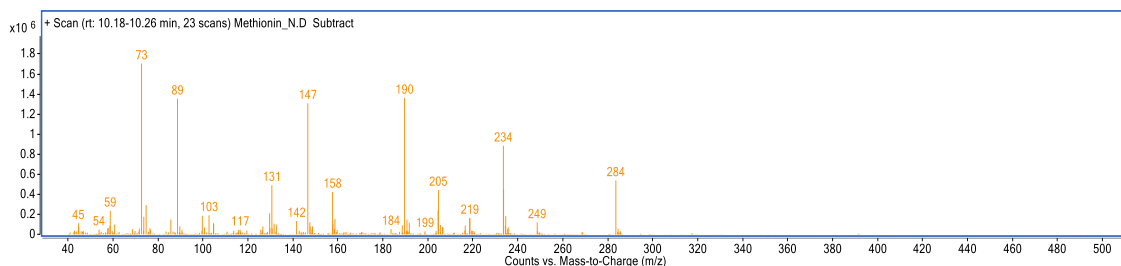


Obrázek 4.14.10.: Hmotnostní spektrum produktu reakce lysinu s dusitanem sodným v retenčním čase 19,27 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

4.15. Methionin

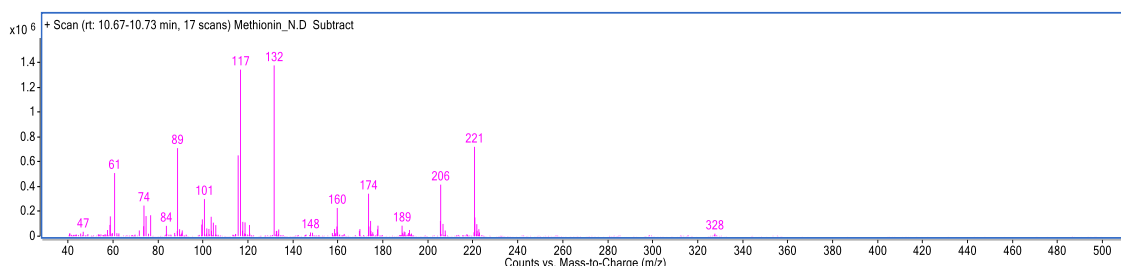
Vyhodnocením získaných spekter byly detekovány čtyři produkty reakce methioninu s dusitanem. Produkt reakce methioninu s dusitanem v retenčním čase 10,22 min (viz Obr. 4.15.1.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost

fragmentů 73 a 89 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou pravděpodobně přes hydroxylovou skupinu. Fragment 147 m/z pak indikuje přítomnost další polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.

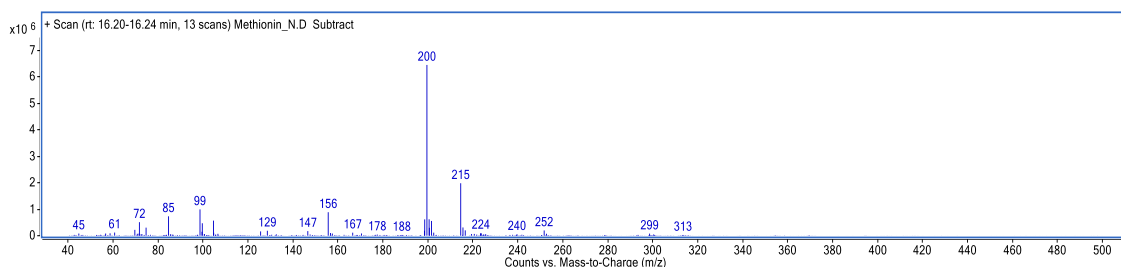


Obrázek 4.15.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce methioninu s dusitanem sodným v retenčním čase 10,22 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

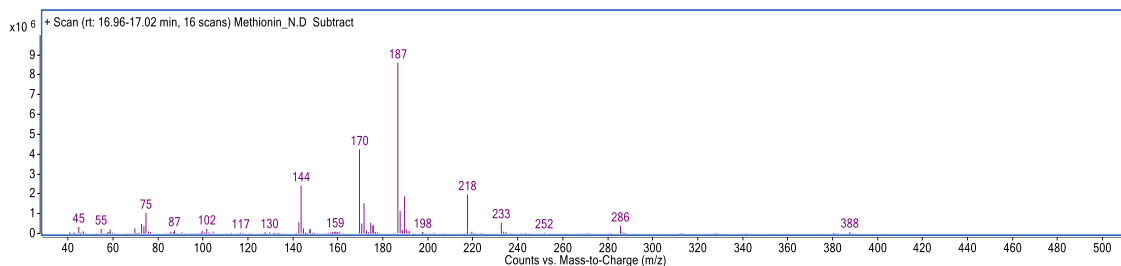
Produkty reakce methioninu s dusitanem v retenčních časech 10,70 min (viz Obr. 4.15.2.), 16,22 min (viz Obr. 4.15.3.) a 16,99 min (viz Obr. 4.15.4.) obsahují jeden dusík pocházející z dusitanu. Absence fragmentu 73 m/z značí, že detekované molekuly neobsahují TMS skupinu, což znamená, že molekuly produktů neobsahují žádnou polární skupinu, kterou by bylo možné derivatizovat.



Obrázek 4.15.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce methioninu s dusitanem sodným v retenčním čase 10,70 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



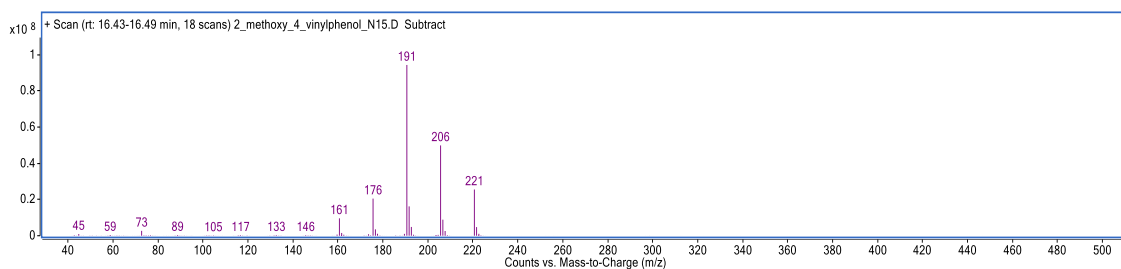
Obrázek 4.15.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce methioninu s dusitanem sodným v retenčním čase 16,22 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



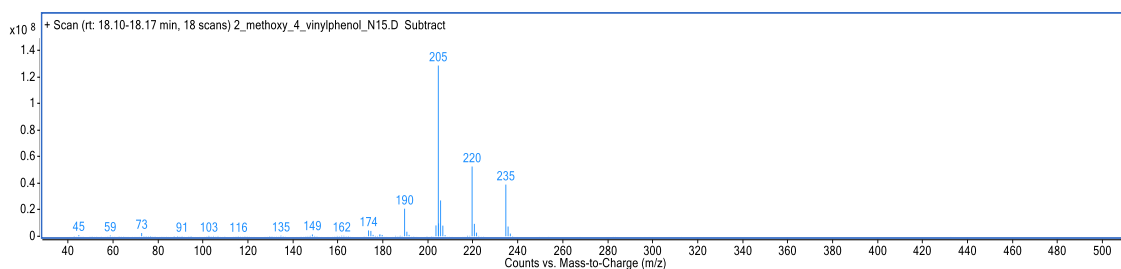
Obrázek 4.15.4.: Hmotnostní spektrum produktu reakce methioninu s dusitanem sodným v retenčním čase 16,99 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

4.16. 2-methoxy-4-vinylfenol

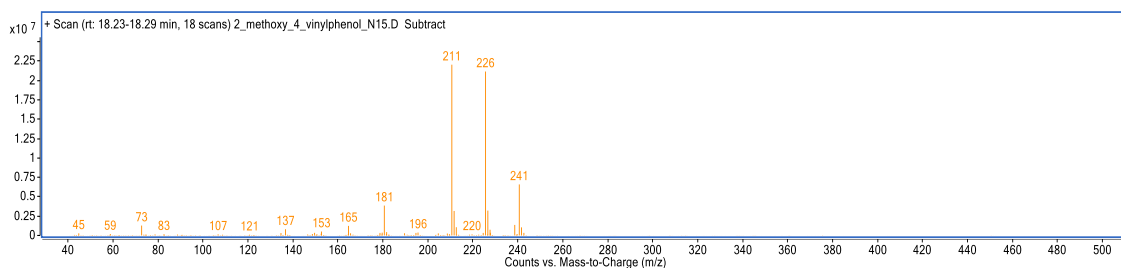
Vyhodnocením získaných spekter bylo detekováno jedenáct produktů reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem. Devět z nich (Obr. 4.16.1.-4.16.6., 4.16.8., 4.16.10.-4.16.11.) bylo detekováno i při reakci dusitanu s kyselinou ferulovou v odpovídajících retenčních časech, jejich charakterizace je tedy již uvedena výše viz Kapitola 4.7. Ferulová kyselina.



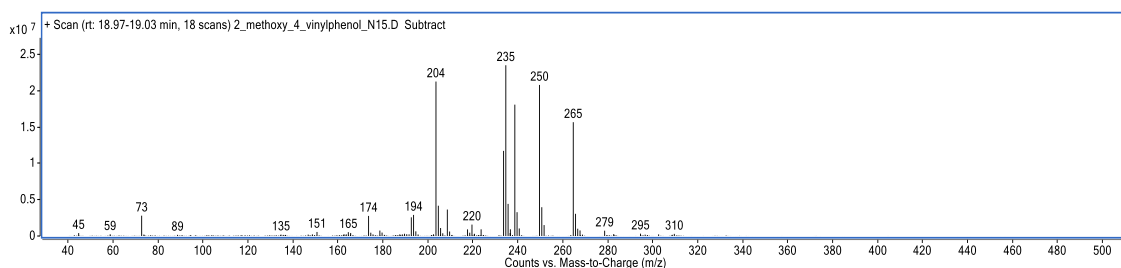
Obrázek 4.16.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem sodným v retenčním čase 16,46 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



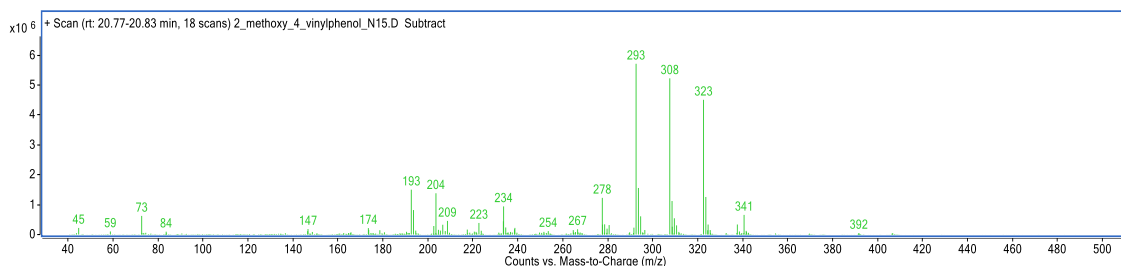
Obrázek 4.16.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem sodným v retenčním čase 18,14 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



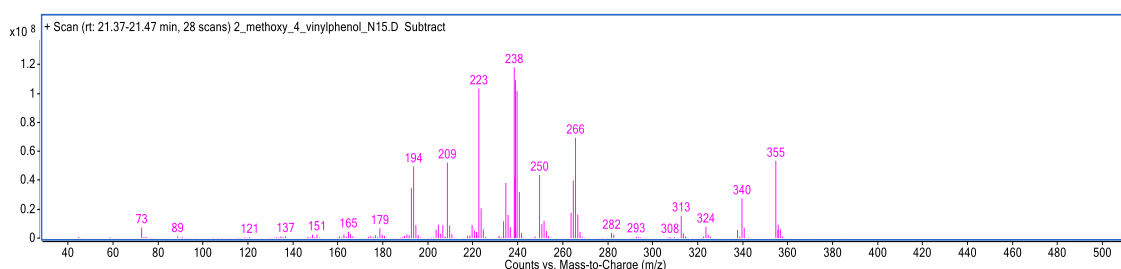
Obrázek 4.16.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem sodným v retenčním čase 18,26 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



Obrázek 4.16.4.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem sodným v retenčním čase 19,00 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



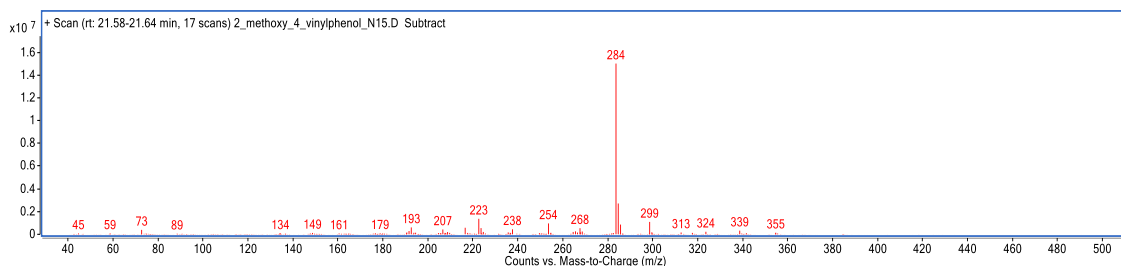
Obrázek 4.16.5.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem sodným v retenčním čase 20,80 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



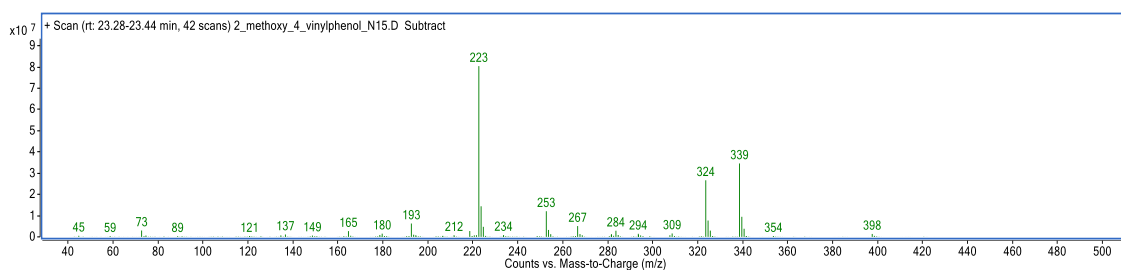
Obrázek 4.16.6.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem sodným v retenčním čase 21,42 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem v retenčním čase 21,61 min (viz Obr. 4.16.7.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje

přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu. Pokud je molekulární ion 299 m/z, tak je molekula produktu pravděpodobně stále aromatická, jelikož fragment M-15⁺ (284 m/z) je ze získaného spektra nejintenzivnější.

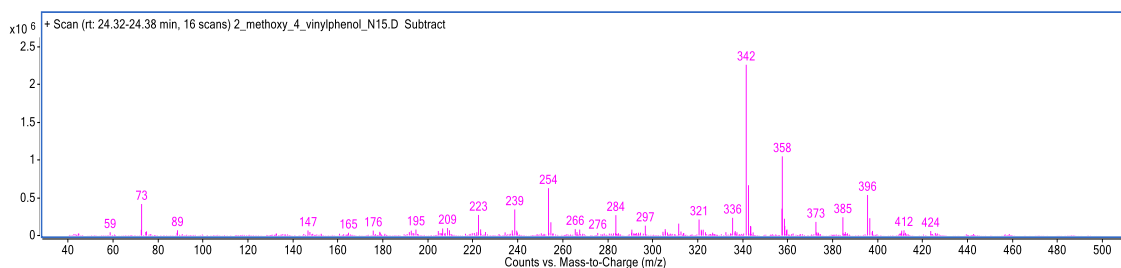


Obrázek 4.16.7.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem sodným v retenčním čase 21,61 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

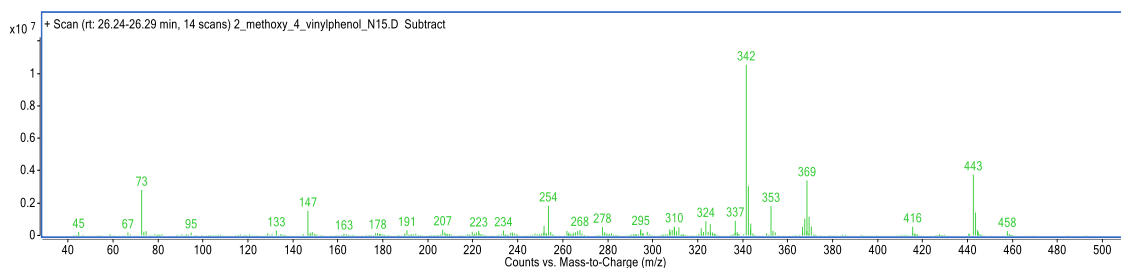


Obrázek 4.16.8.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem sodným v retenčním čase 23,36 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

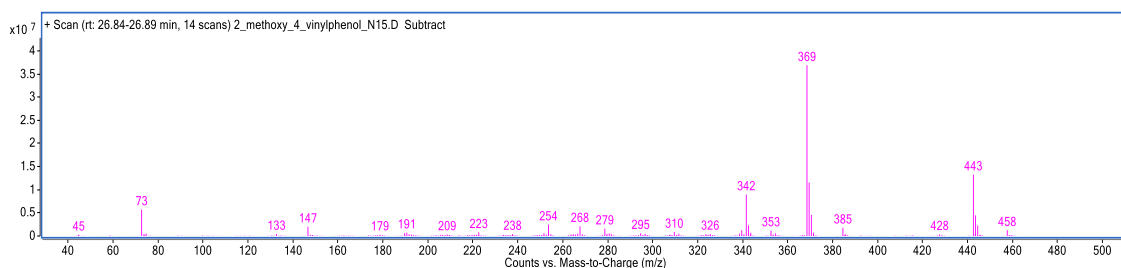
Produkt reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem v retenčním čase 24,35 min (viz Obr. 4.16.9.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



Obrázek 4.16.9.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem sodným v retenčním čase 24,35 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



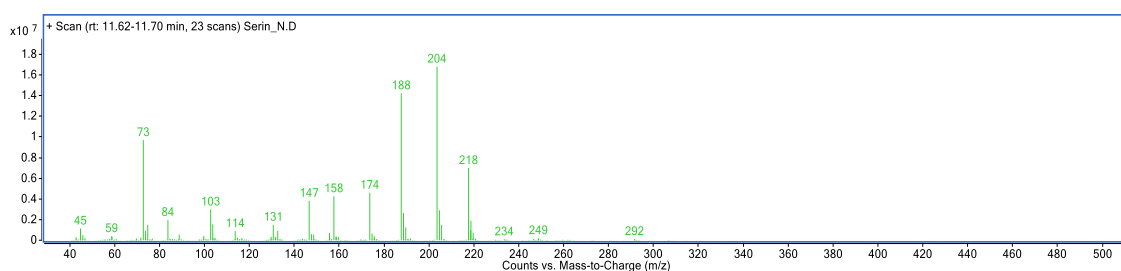
Obrázek 4.16.10.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem sodným v retenčním čase 26,26 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.



Obrázek 4.16.11.: Hmotnostní spektrum produktu reakce 2-methoxy-4-vinylfenolu s dusitanem sodným v retenčním čase 26,87 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

4.17. Serin

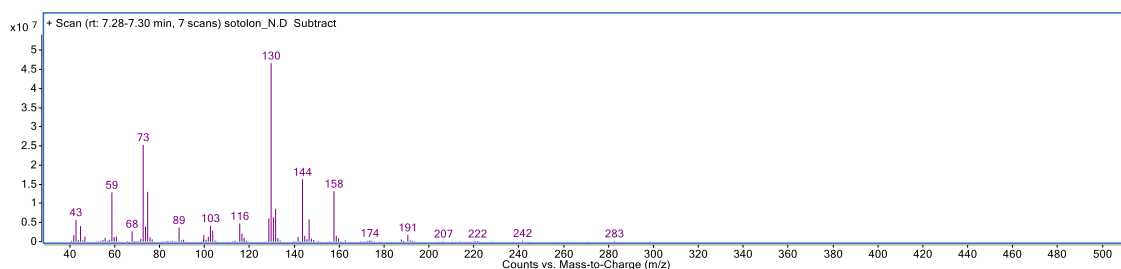
Vyhodnocením získaných spekter byl detekován jeden produkt reakce serinu v retenčním čase 11,66 min (viz Obr. 4.17.1.). Tento produkt obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



Obrázek 4.17.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce serinu s dusitanem sodným v retenčním čase 11,66 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

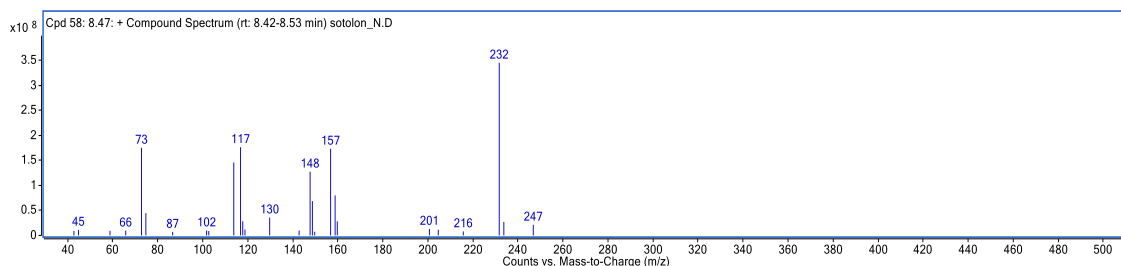
4.18. Sotolon

Vyhodnocením získaných spekter bylo nalezeno šest produktů reakce sotolonu s dusitanem. Produkt reakce sotolonu s dusitanem v retenčním čase 7,29 min (viz *Obr. 4.18.1.*) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73, 75 a 89 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou pravděpodobně přes hydroxylovou skupinu. Fragment 147 m/z pak indikuje přítomnost další polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



Obrázek 4.18.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce sotolonu s dusitanem sodným v retenčním čase 7,29 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

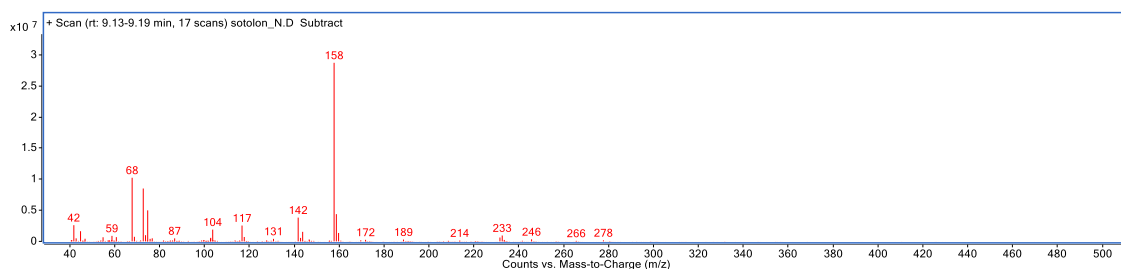
Produkt reakce sotolonu s dusitanem v retenčním čase 8,47 min (viz *Obr. 4.18.2.*) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 117 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes karboxyl či hydroxyl. Pokud je molekulární ion 247 m/z, tak je molekula produktu pravděpodobně stále aromatická, jelikož fragment $M-15^+$ (232 m/z) je ze získaného spektra nejintenzivnější.



Obrázek 4.18.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce sotolonu s dusitanem sodným v retenčním čase 8,47 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

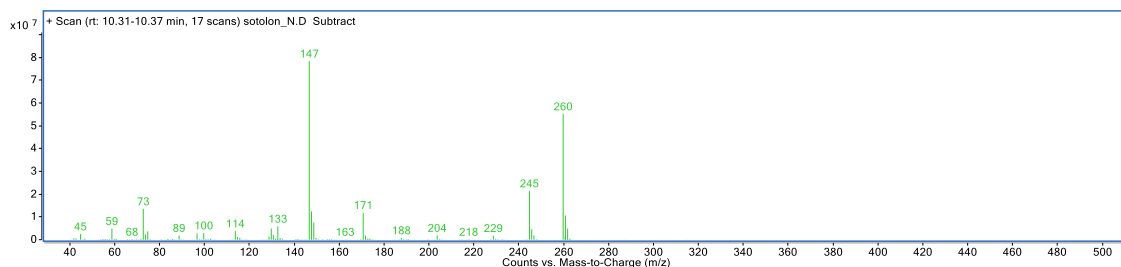
Produkt reakce sotolonu s dusitanem v retenčním čase 9,16 min (viz *Obr. 4.18.3.*) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73, 75 a

117 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes karboxyl nebo hydroxyl.

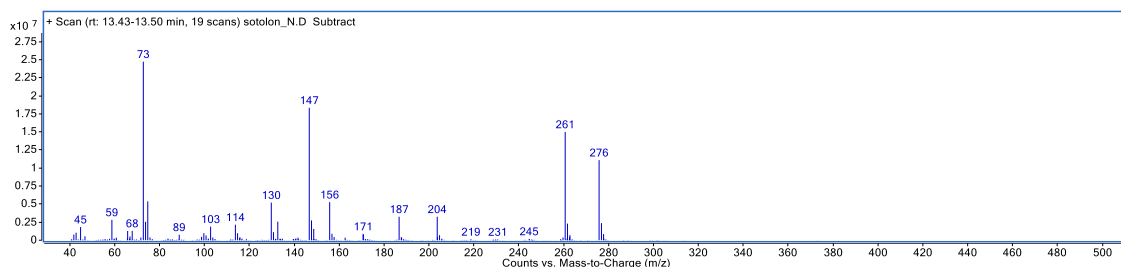


Obrázek 4.18.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce sotolonu s dusitanem sodným v retenčním čase 9,16 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkty reakce sotolonu s dusitanem v retenčních časech 10,34 min (viz Obr. 4.18.4.) a 13,47 min (viz Obr. 4.18.5.) obsahují dva atomy dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekované molekuly obsahují více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů. Molekulární ion produktu reakce sotolonu s dusitanem v retenčním čase 10,34 min je pravděpodobně 260 m/z a molekulární ion produktu této reakce v retenčním čase 13,47 min je pravděpodobně 276 m/z.

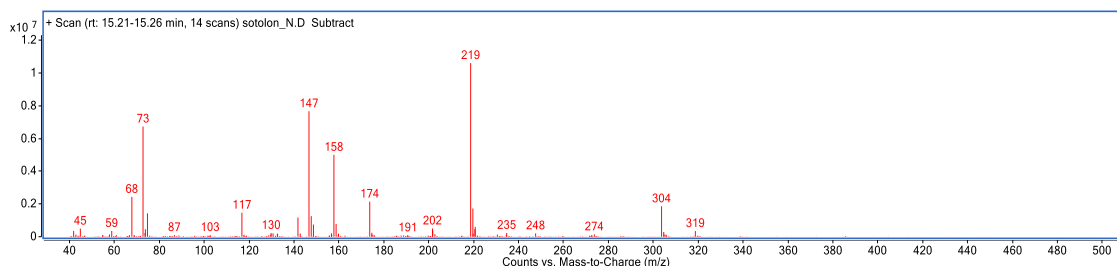


Obrázek 4.18.4.: Hmotnostní spektrum produktu reakce sotolonu s dusitanem sodným v retenčním čase 10,34 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.



Obrázek 4.18.5.: Hmotnostní spektrum produktu reakce sotolonu s dusitanem sodným v retenčním čase 13,47 min. Produkt reakce obsahuje dva atomy dusíku z dusitanu.

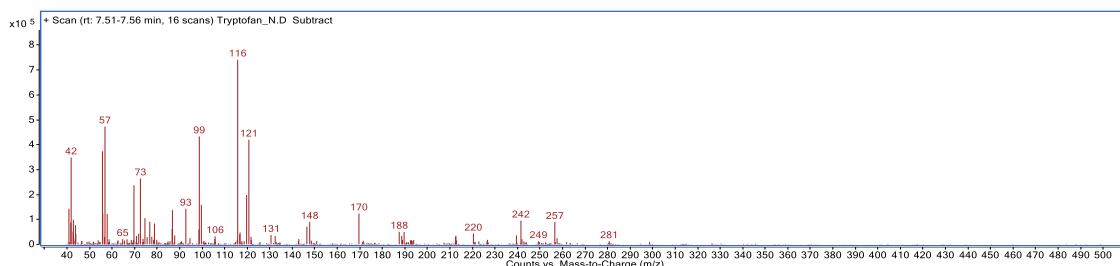
Produkt reakce sotolonu s dusitanem v retenčním čase 15,23 min (viz *Obr. 4.18.6.*) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Molekulární ion zde může být 319 m/z. Přítomnost fragmentů 73 a 117 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes karboxyl či hydroxyl. Fragment 147 m/z pak indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



Obrázek 4.18.6.: Hmotnostní spektrum produktu reakce sotolonu s dusitanem sodným v retenčním čase 15,23 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

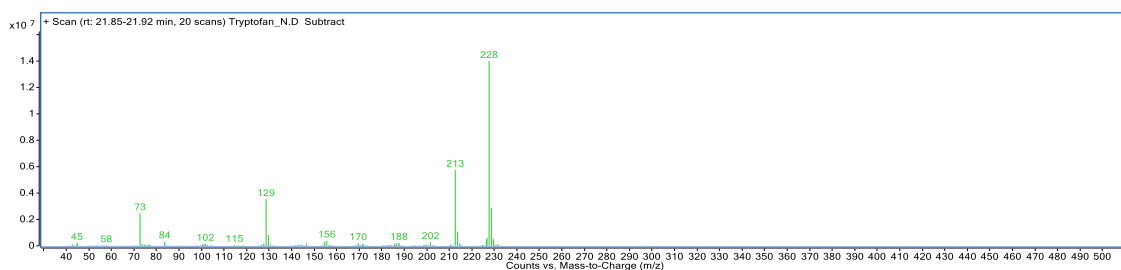
4.19. Tryptofan

Vyhodnocením získaných spekter bylo detekováno osm produktů reakce tryptofanu s dusitanem. Produkty reakce tryptofanu s dusitanem v retenčních časech 7,53 min (viz *Obr. 4.19.1.*), 23,41 min (viz *Obr. 4.19.3.*), 23,86 min (viz *Obr. 4.19.4.*), 24,32 min (viz *Obr. 4.19.6.*) a 26,56 min (viz *Obr. 4.19.8.*) obsahují jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekované molekuly obsahují více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů. Molekulární ion produktu reakce tryptofanu s dusitanem v retenčním čase 23,86 min je pravděpodobně 316 m/z a molekulární ion produktu této reakce v retenčním čase 26,56 min je pravděpodobně 406 m/z.

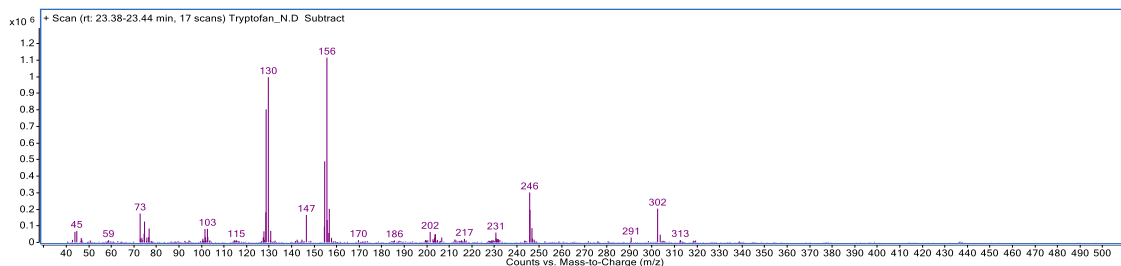


Obrázek 4.19.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tryptofanu s dusitanem sodným v retenčním čase 7,53 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

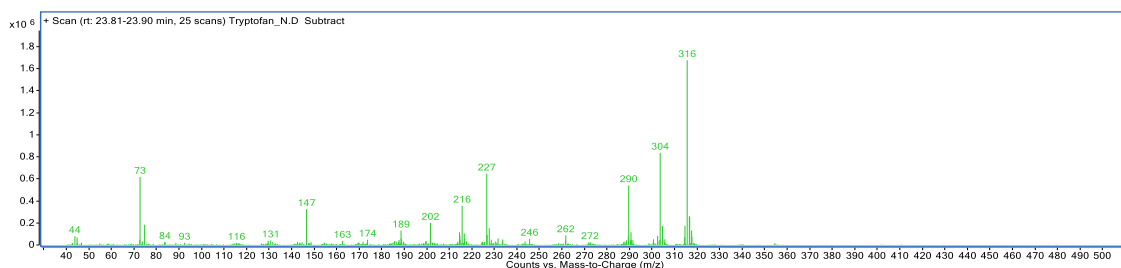
Produkty reakce tryptofanu s dusitanem v retenčních časech 21,89 min (viz Obr. 4.19.2.) a 24,04 min (viz Obr. 4.19.5.) obsahují jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentu 73 m/z značí, že detekované molekuly obsahují TMS skupinu, což indikuje přítomnost polární skupiny v nederivatizovaných molekulách produktů. Absence fragmentu 147 m/z znamená, že molekuly produktů neobsahují další polární skupinu a možná tedy došlo k odštěpení části původní molekuly tryptofanu. Molekulární ion produktu reakce tryptofanu s dusitanem v retenčním čase 21,89 min je pravděpodobně 228 m/z.



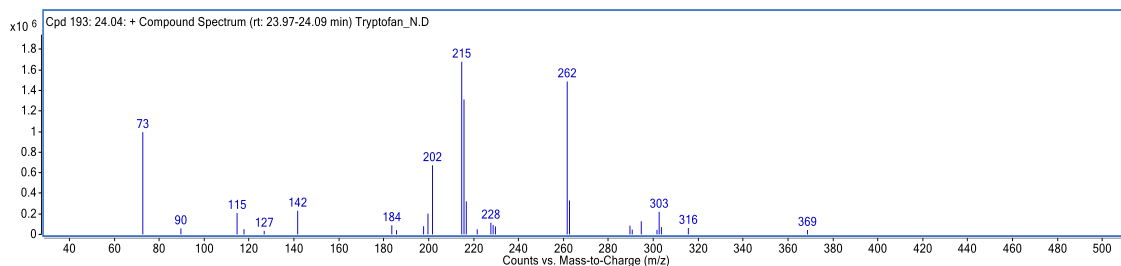
Obrázek 4.19.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tryptofanu s dusitanem sodným v retenčním čase 21,89 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



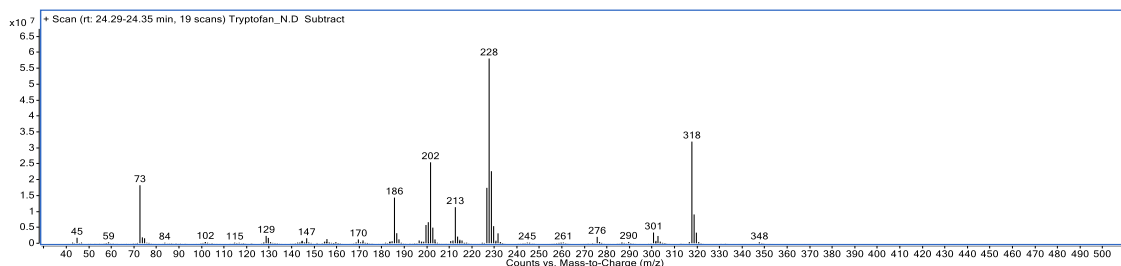
Obrázek 4.19.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tryptofanu s dusitanem sodným v retenčním čase 23,41 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



Obrázek 4.19.4.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tryptofanu s dusitanem sodným v retenčním čase 23,86 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

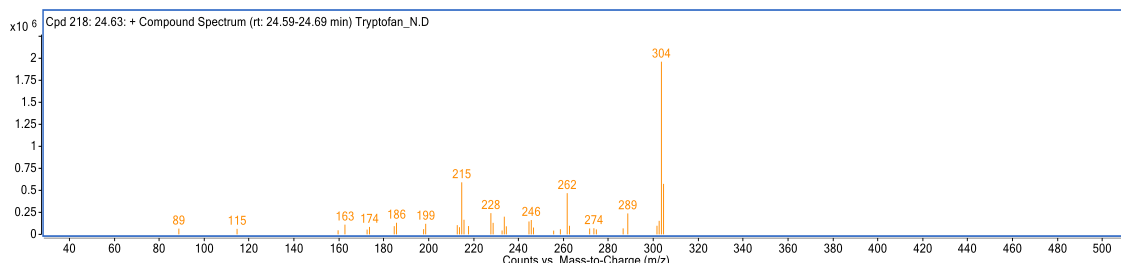


Obrázek 4.19.5.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tryptofanu s dusitanem sodným v retenčním čase 24,04 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

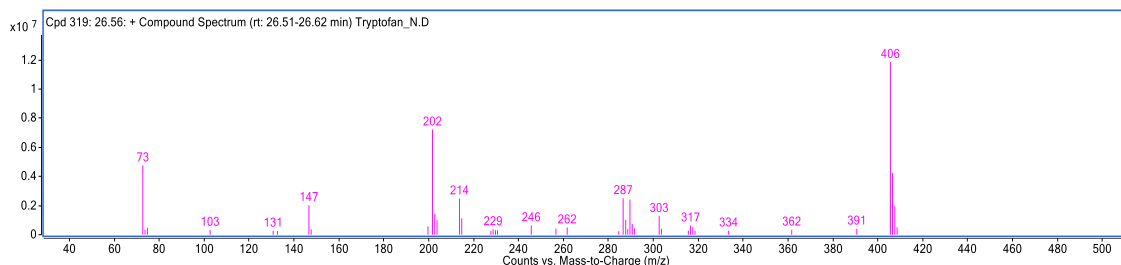


Obrázek 4.19.6.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tryptofanu s dusitanem sodným v retenčním čase 24,32 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce tryptofanu s dusitanem v retenčním čase 24,63 min (viz Obr. 4.19.7.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Absence fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula neobsahuje TMS skupinu, což znamená, že detekovaná molekula produktu neobsahuje žádnou polární skupinu, kterou by bylo možné derivatizovat.



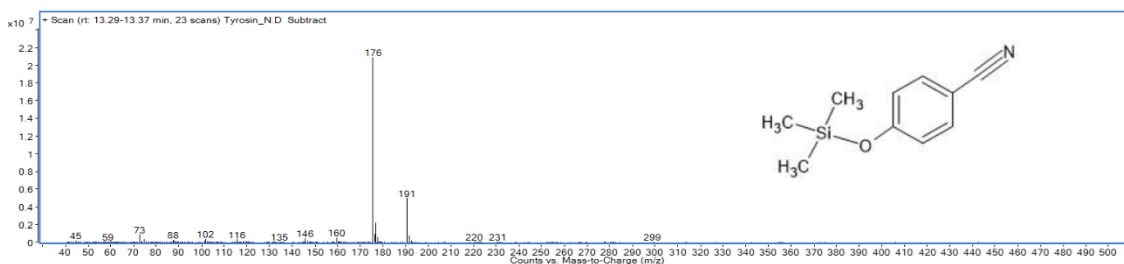
Obrázek 4.19.7.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tryptofanu s dusitanem sodným v retenčním čase 24,63 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.



Obrázek 4.19.8.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tryptofanu s dusitanem sodným v retenčním čase 26,56 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

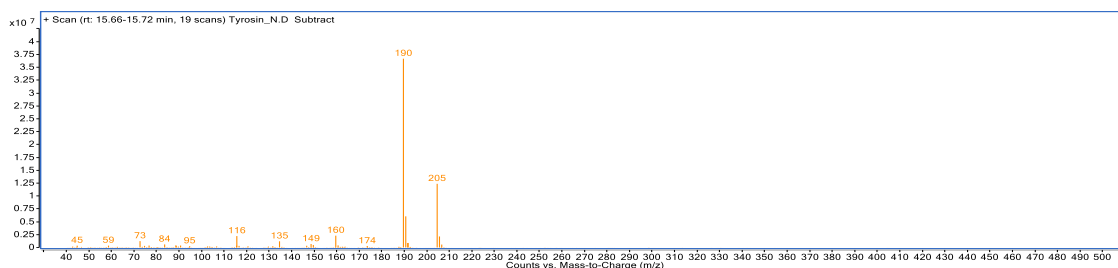
4.20. Tyrosin

Vyhodnocením získaných spekter bylo detekováno šest produktů reakce tyrosinu s dusitanem. Produkt reakce tyrosinu s dusitanem v retenčním čase 13,33 min (viz *Obr. 4.20.1.*) byl dle dostupných zdrojů identifikován jako trimethylsilyl derivát 4-kyanofenolu [12].



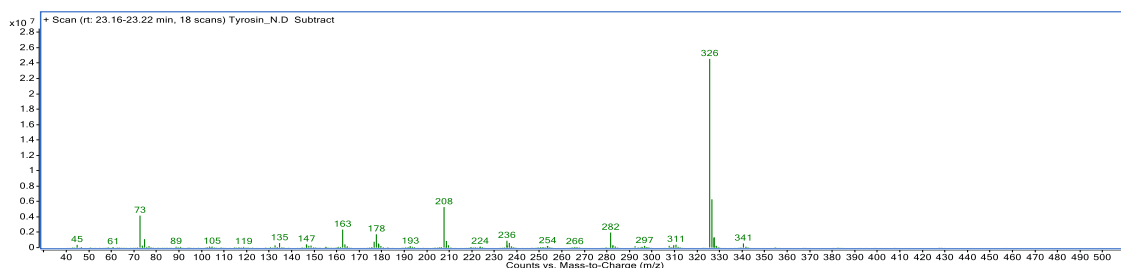
Obrázek 4.20.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tyrosinu s dusitanem sodným v retenčním čase 13,33 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce tyrosinu s dusitanem v retenčním čase 15,69 min (viz *Obr. 4.20.2.*) vznikl i při reakci dusitanu s kyselinou kumarovou ve shodném retenčním čase (viz *Obr. 4.12.6.*), charakterizace molekuly je tedy již uvedena výše viz *Kapitola 4.12. Kumarová kyselina.*



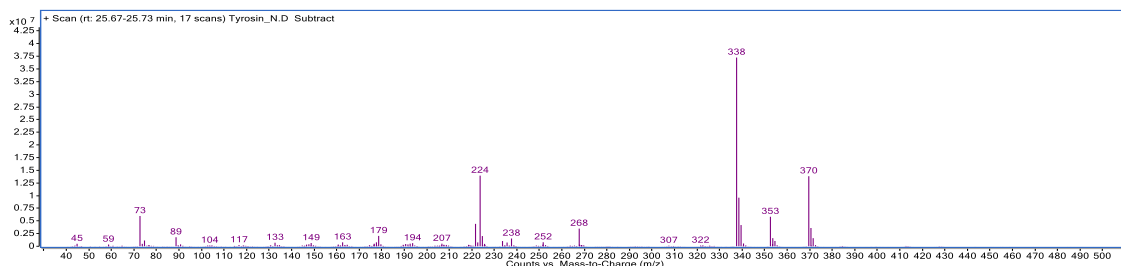
Obrázek 4.20.2.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tyrosinu s dusitanem sodným v retenčním čase 15,69 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce tyrosinu s dusitanem v retenčním čase 23, 19 min (viz *Obr. 4.20.3.*) byl již dříve nalezen, ale nikoliv identifikován. Nicméně byl potvrzen molekulární ion (341 m/z). Dle fragmentace byla jako možný produkt této reakce kyselina nitrosovanilová, což se však nepotvrdilo. [12]



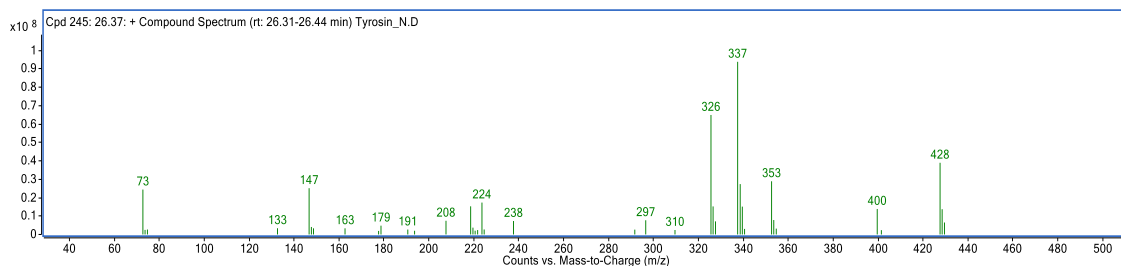
Obrázek 4.20.3.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tyrosinu s dusitanem sodným v retenčním čase 23,19 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce tyrosinu s dusitanem v retenčním čase 25,7 min (viz Obr. 4.20.4.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73, 89 a 117 m/z indikuje, že detekovaná molekula obsahuje TMS skupinu navázanou přes karboxyl či hydroxyl.



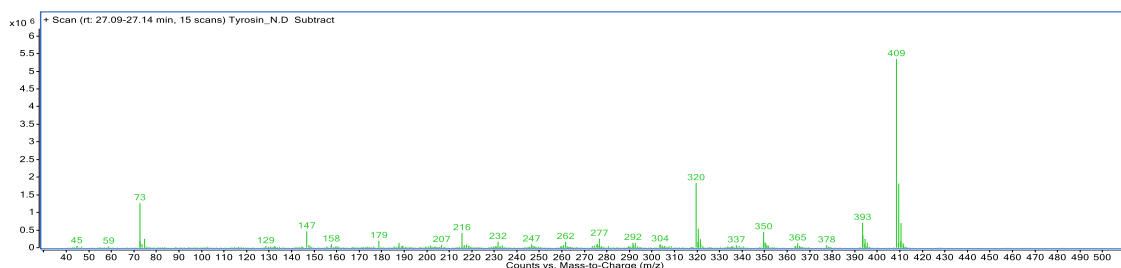
Obrázek 4.20.4.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tyrosinu s dusitanem sodným v retenčním čase 25,70 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

Produkt reakce tyrosinu s dusitanem v retenčním čase 26,37 min (viz Obr. 4.20.5.) byl také již dříve nalezen, ale neidentifikován. Molekulární ion (m/z 443) byl potvrzen spektrem prekurzorových iontů m/z 400. [12]



Obrázek 4.20.5.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tyrosinu s dusitanem sodným v retenčním čase 26,37 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

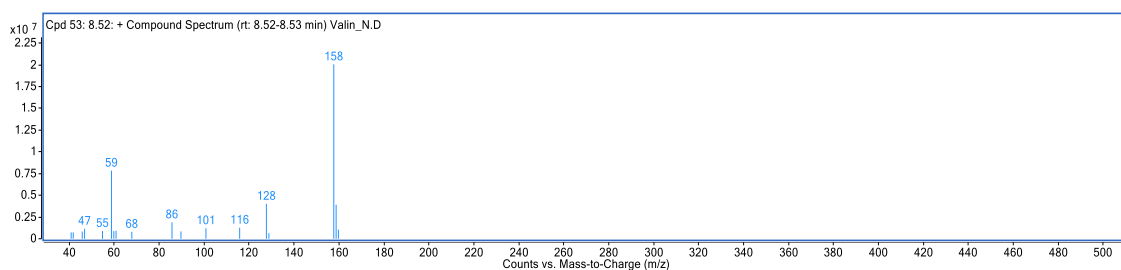
Produkt reakce tyrosinu s dusitanem v retenčním čase 27,11 min (viz Obr. 4.20.6.) obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Přítomnost fragmentů 73 a 147 m/z značí, že detekovaná molekula obsahuje více než jednu TMS skupinu, což indikuje přítomnost více než jedné polární skupiny v nederivatizované molekule produktu.



Obrázek 4.20.6.: Hmotnostní spektrum produktu reakce tyrosinu s dusitanem sodným v retenčním čase 27,11 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

4.21. Valin

Vyhodnocením získaných spekter byl detekován jeden produkt reakce valinu s dusitanem v retenčním čase 8,52 min (viz Obr. 4.21.1.). Obsahuje jeden atom dusíku pocházející z dusitanu. Absence fragmentu 73 m/z značí, že detekovaná molekula neobsahuje TMS skupinu, což znamená, že molekula produktu neobsahuje žádnou polární skupinu, kterou by bylo možné derivatizovat.



Obrázek 4.21.1.: Hmotnostní spektrum produktu reakce valinu s dusitanem sodným v retenčním čase 8,52 min. Produkt reakce obsahuje jeden atom dusíku z dusitanu.

5. Závěr

Analýzou reakčních produktů reakcí dusitanových iontů s vybranými složkami piva bylo nalezeno 127 produktů obsahujících v molekule atom dusík pocházející z dusitanu. Některé nalezené produkty byly již dříve objeveny či dokonce identifikovány. U všech produktů došlo k zjištění počtu atomů dusíku pocházejících z dusitanu v molekule produktu. U většiny produktů pak došlo k odhadu základních strukturních charakteristik molekul produktů jako například obsah polárních skupin či potenciální navázání nitro nebo nitroso skupin. U některých produktů došlo k identifikaci možného molekulárního iontu.

Stávající knihovna spekter možných dusíkatých kontaminantů piva byla rozšířena o získaná spektra. Dalším postupem může být objasnění struktur nalezených produktů, případně jejich kompletní identifikace, za účelem zjištění informací o jejich možných negativních účincích na lidské zdraví.

6. Seznam použité literatury

1. Betta, F. D.; Siqueira, M. A.; Vitali, L.; Fett, R.; Costa, A. C. O.: Assessment of nitrate, nitrite, bromate and bromide levels in beer from different styles and origins. *Journal of Food Compositin and Analysis* **79**, 63–69 (2019)
2. Olšovská, J.; Jandovská, V.; Běláková, S.; Kubizniaková, P.; Vrzal, T.; Štěrbá, K.: Monitoring of potential contaminants in beer from the Czech Republic. *Kvasný průmysl* **65**, 84–96 (2019)
3. Wagner, E. M.; Thalguter, S.; Wagner, M.; Rychli, K.: Presence of Microbial Contamination and Biofilms at a Beer Can Filling Production Line. *Journal of Food Protection* **84**:5, 896–902 (2021)
4. Olšovská, J.; Matoulková, D.; Čejka, P.; Jurková, M.: Pivo a zdraví. *Kvasný průmysl* **60**, 7–8 (2014)
5. Björne, H.; Weitzberg, E.; Lundberg, J. O.: Intra-gastric generation of antimicrobial nitrogen oxides from saliva—Physiological and therapeutic considerations. *Free Radical Biology and Medicine* **41**:9, 1404–1412 (2006)
6. McKnight, G. M.; Duncan, C. W.; Leifert, C.; Golden, M. H.: Dietary nitrate in man: friend or foe? *British Journal of Nutrition* **81**, 349–358 (1999)
7. Sindelar, J. J.; Milokowski, A. L.: Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide* **26**, 259–226 (2012)
8. Milokowski, A. L.; Garg, H. K.; Coughlin, J. R.; Bryan, N. S.: Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: A risk–benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. *Nitric Oxide* **22**, 110–119 (2010)
9. Hord, N. G.; Tang, Y.; Bryan, N. S.: Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American journal of clinical nutrition* **90**:1, 1–10 (2009)
10. Chamandoost, S.; Moradi, M. F.; Hosseini M. J.: A Review of Nitrate and Nitrite Toxicity in Foods. *Journal of Human, Environment, and Health Promotion* **1**:2, 80–86 (2016)
11. Anderson, H. E.; Santos, I. C.; Hildenbrand, Z. L.; Schug, K. A.: A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. *Analytica Chimica Acta* **1085**, 1–20 (2019)
12. Malečková, M.; Vrzal, T.; Olsövska, J.; Sobotníková, J.: Characterization of Nitrite-Related Reaction Products in Beer. *Journal of Agricultural and food chemistry* **69**, 11687–11695 (2021)
13. Wainright, T.: Nitrosamines in malt and beer. *Journal of the Institute of Brewing* **92**:1, 73–80 (1986)
14. Zheng, A.; Dzombak, D. A.; Luthy, R. G. Effects of nitrosation on the formation of cyanide in publicly owned treatment works secondary effluent. *Water Environment Research* **76**:3 197–204 (2004)
15. Warthesen, J. J.; Scanlan, R. A.; Bills, D. D.; Libbey, L. M.: Formation of heterocyclic N-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino acids. *Journal of agricultural and food chemistry* **23**:5 898–902 (1975)
16. Yamada, T.; Yamamoto, M.; Tanimura, A.: Reaction of Pyroglutamic Acid with Sodium Nitrite. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* **22**:5, 404–408 (1981)

17. Smith, N. A.: Cambridge prize lecture nitrate reduction and N-nitrosation in brewing. *Journal of the Institute of Brewing* **100**:5, 347–355 (1994)
18. Šrogl, J.; Kořán, M.; Čepička, J.: Redukce dusičnanů během přípravy mladiny. *Kvasný průmysl* **38**:7, 200–204 (1992)
19. Zheng, M.; Li, C.; Liu, S.; Gui, M.; Ni, J.: Potential application of aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PCN-2 in nitrogen oxides (NO_x) removal from flue gas. *Journal of Hazardous Materials* **318**, 571–578 (2016)
20. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Fundamentals of Analytical chemistry* 9th ed. Belmont Brooks/Cole, Cengage Learning 2014
21. Vestal, M. L. Methods of Ion Generation. *Chemical reviews* **101**:2, 361–375 (2001)
22. Dass, Ch.: *Fundamentals of contemporary mass spektrometry* Hoboken, John Wiley & Sons 2007
23. Friedecký, D.; Lemr, K.: Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* **20**:3 152–157 (2012)
24. Wittmann, Ch.: Fluxome analysis using GC-MS. *Microbial Cell Factories* **6**:6, (2007)
25. Haag, A. M.: *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications* Švýcarsko, Springer 2016
26. Lehotay, S. J.; Hajšlová, J.: Application of gas chromatography in food analysis. *Trends in Analytical chemistry* **21**, 686–697 (2002)
27. Moldoveanu, S. C.; David, V.: *Gas Chromatography – Derivatization, Sample Preparation, Application* Londýn, IntechOpen 2019